

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 190**

51 Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2003 E 03757356 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1536807**

54 Título: **Coágulos de células hematopoyéticas no poliméricos para suministro de agentes activos**

30 Prioridad:

06.06.2002 US 386870 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.04.2013

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 FRANCIS STREET
BOSTON, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**PASCHER, ARNULF;
PALMER, GLYN;
GHIVIZZANI, STEVEN y
EVANS, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 401 190 T3

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

DESCRIPCIÓN

Coágulos de células hematopoyéticas no poliméricos para suministro de agentes activos.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a suministro de agentes activos, y más en particular, a un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico para ayudar en el suministro de un agente activo.

10 Antecedentes de la invención

El tratamiento de lesiones de cartílago, hueso, disco vertebral y tejido blando con factores biológicos y células es una propuesta emergente para la mejora de la reparación de defectos. La administración de proteínas recombinantes y factores de crecimiento de proteínas para estimular el crecimiento de tejido de nuevo, conduce a resultados decepcionantes ya que el mantenimiento de concentraciones terapéuticas requiere dosis de carga muy alta o administración repetida, disminuyendo de ese modo la eficacia de la reparación, al tiempo que aumenta el coste, la complejidad y el riesgo de generar efectos secundarios no deseados a partir de la exposición de órganos no diana.

Una propuesta diseñada para facilitar la aplicación de proteínas recombinantes a reparación de tejido ha sido incorporarlas a una matriz biocompatible o dispositivo de liberación lenta para implante en un defecto de tejido, localizando de ese modo las proteínas en el sitio del daño y proporcionando posiblemente una estructura tridimensional para colonizar células emigrantes. Las matrices que se han evaluado para reparar tejidos musculoesqueléticos incluyen una variedad de polímeros sintéticos y naturales. Estos sistemas también presentan limitaciones porque las proteínas cargadas en la matriz pueden ser extraordinariamente caras de producir en cantidad, raramente presentan liberaciones prolongadas y uniformes, al tiempo que el tejido de reparación recién formado puede verse influenciado adversamente por la presencia de un material implantado, extraño. La transferencia de genes ofrece una propuesta que puede superar las muchas limitaciones del suministro de proteínas a tejidos dañados (Bonadio et al., 1.999; Evans y Robbins, 1.995; Evans et al., 1.995; Kang et al., 1.997; Smith et al., 2.000).

La patente de EE.UU. 4.902.288 desvela un sistema de inmunotratamiento implantable que comprende una matriz con células inmunológicamente activas incorporadas a la misma. Goto et al., (J. Bone and Joint Surg. 81 (7): 918-925, 1.999) desvelan el tratamiento de daño en el menisco por transformación de los genes que codifican los factores de crecimiento. La patente internacional WO 02/068010 A1 que se publicó después de la fecha de prioridad de la presente invención muestra un material de injerto de médula ósea de material compuesto con una población enriquecida de células progenitoras distribuidas de manera uniforme.

Sumario de la invención

La invención presenta un nuevo sistema para la aplicación de sustancias activas, tales como vehículos de suministro de genes, células y proteínas solubles para la curación de tejidos dañados. Se ha descubierto que el uso de coágulos de células hematopoyéticas no poliméricos se puede usar para suministrar una sustancia a un individuo. El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico funciona como un vehículo de suministro para la sustancia en el individuo.

Se desvela un método para suministro de una sustancia a un individuo. El método comprende administrar a un individuo un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene una sustancia para suministrar la sustancia al individuo.

Según un aspecto, la invención es un método para preparar un sistema de suministro de sustancias de coágulos de células hematopoyéticas no polimérico según la reivindicación 19. Este método comprende añadir una sustancia a una muestra de células hematopoyéticas y permitir que la muestra de células hematopoyéticas que contiene la sustancia forme un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.

Según otro aspecto más, la invención es un sistema de suministro de sustancias que comprende un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico con una sustancia incorporada en el mismo según las reivindicaciones 1, 5 y 12.

El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico comprende células de médula ósea. También se desvelan células sanguíneas o cualquier otro tipo de célula que formaría un coágulo. La sustancia puede comprender un vehículo de transferencia de genes, células adicionales, tales como células de ingeniería genética o células naïf, proteínas, tales como proteínas recombinantes o solubles, moléculas bioactivas o cualquier otro tipo de sustancia que pueda afectar a un individuo. Según la invención, la sustancia comprende un vehículo de transferencia de genes, proteínas o células logradas genéticamente.

El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se puede suministrar a cualquier tipo de tejido. Por ejemplo, en

algunas realizaciones el tejido es hueso, tejidos blandos, cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales o cualquier otra región del cuerpo.

5 La forma y el tamaño del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico en algunas realizaciones se pueden determinar mediante un recipiente. El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se puede homogeneizar con la sustancia. En otras realizaciones el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se puede modificar genéticamente para expresar al menos uno de los factores de crecimiento y otros productos génicos que faciliten la reparación del tejido.

10 El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico en otras realizaciones puede presentar un volumen que se determina por el tamaño de un tejido que se tiene que reparar.

15 En otras realizaciones más el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se puede obtener de un individuo. Las células de masa ósea se pueden extraer en otras realizaciones de crestas ilíacas, de defectos osteocondrales que expongan médula ósea subyacente o cualquier otro área de un individuo del que se pudieran extraer células de médula ósea.

El sustrato puede estar opcionalmente en la forma de una disolución.

20 El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene la sustancia se puede valorar. La valoración se puede realizar usando una pipeta.

25 En algunas realizaciones, el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se mezcla con una suspensión de al menos una célula naíf o células modificadas genéticamente, formando una suspensión celular. La suspensión celular puede contener vectores génicos adicionales o vectores génicos no adicionales.

30 En otras realizaciones, el suministro puede ser una liberación localizada, lenta, de la sustancia a partir del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico. El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se puede conformar de una manera que permita un suministro eficaz de la sustancia. El sistema de suministro de sustancias puede dar como resultado la regeneración de tejido en el área de suministro de la sustancia.

35 El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico puede producirse, en algunas realizaciones a partir de una muestra de células hematopoyéticas que se permite que coagule durante 15-30 minutos, a temperatura ambiente o cuando se pone en un recipiente. El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se puede extraer después del recipiente.

40 El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico también puede ser producido a partir de una muestra de células hematopoyéticas que se lava en una disolución salina de tampón de fosfato. Cualquier sustancia no ligada se puede eliminar del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.

45 Según otras realizaciones el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se puede implantar en un individuo. Se puede suministrar la sustancia al individuo. El suministro puede ser una liberación localizada, lenta, de la sustancia del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico. Opcionalmente, el sistema de suministro de coágulos de células hematopoyéticas no polimérico se puede usar para regenerar tejido.

La muestra de células hematopoyéticas se puede obtener de un individuo o se puede obtener de otra fuente de células hematopoyéticas. El individuo puede ser el mismo o un individuo diferente en que se implanta más tarde el coágulo.

50 **Breve descripción de los dibujos**

Ahora se describirán diversas realizaciones de la presente invención, como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en que:

55 La Fig. 1 es una lista ejemplar de genes que se han usado en tratamiento génico;

La Fig. 2 es una gráfica de la capacidad de carga de un coágulo sanguíneo humano y una matriz de colágeno-glicosaminoglicano;

60 La Fig. 3 es una foto de un coágulo sanguíneo humano con células de médula ósea de conejo preinfectadas 24 horas después de coagulación;

La Fig. 4 es una foto de un coágulo sanguíneo humano de 2 mm de espesor, 30 mm de diámetro (conformado en un pozo de cultivo de tejidos);

65 La Fig. 5 es una foto de células positivas GFP en coágulos el día 1 (Fig. 5a) y el día 21 (Fig. 5b);

La Fig. 6 es una gráfica de la producción de TGF- β por coágulos sanguíneos de conejo que contienen células de médula ósea de conejo infestadas por Ad TGF- β ;

5 La Fig. 7 es una gráfica de la expresión de TGF- β al medio circundante, en el que "BL" representa sangre y "BM" representa médula ósea;

La Fig. 8 es una gráfica de la expresión de TGF- β en coágulos de médula ósea y sanguíneos de conejos disgregados;

10

La Fig. 9 es una gráfica de la estabilidad del adenovirus en un coágulo;

La Fig. 10 es una gráfica de la expresión de los genes in vivo en conejos el día 3;

15 La Fig. 11 es una foto de coágulo de médula ósea de conejo después de 6 semanas in vitro, usando coloración del Estuche de Tricromo de Gomori y

La Fig. 12 es una foto de coágulo de médula ósea de conejo con Ad TGF- β después de 6 semanas in vitro, usando coloración del Estuche de Tricromo de Gomori.

20

Descripción detallada

25 Según la presente invención, se descubrió que una sustancia se podía suministrar a un individuo por administración al individuo de un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene la sustancia. Los métodos de la técnica anterior para suministrar una sustancia a un individuo, presentan muchas limitaciones. Por ejemplo, algunos de ellos son caros, complejos y raramente presentan liberaciones prolongadas y uniformes deseadas.

30 Como se usa en la presente memoria un "coágulo de células hematopoyéticas" es un coágulo que comprende células de médula ósea que pueden formar un coágulo en diversas condiciones. Son ejemplos los coágulos de médula ósea. Los aspirados de médula ósea se pueden obtener fácilmente de un individuo usando procedimientos mínimamente invasivos. Esto contrasta con la fabricación de matrices artificiales que exige mucho más tiempo, es mucho más caro y trabajoso. Para generar coágulos de médula ósea se puede extraer un volumen adecuado de aspirados de médula ósea de fuentes ricas en médula ósea tales como las crestas ilíacas, de defectos osteocondrales que exponen la médula ósea subyacente u otros sitios apropiados. Los aspirados de médula ósea y la sangre tienen en general la misma consistencia y presentan propiedades de coagulación similares.

35

40 El uso de coágulos de médula ósea en reparación de tejidos ofrece la ventaja de que la formación de coágulos sanguíneos y la migración de células de médula ósea son parte de la respuesta a la reparación natural siguiendo a la generación de defectos osteocondrales, defectos de hueso, tendón, menisco o disco intervertebral. Además, los coágulos de médula ósea están enriquecidos con hemocitoblastos, que retienen la capacidad para formar los diferentes tejidos del cuerpo; por lo tanto, el coágulo representa el microentorno natural para una respuesta a la reparación. Si se acoplan con los agentes biológicos apropiados, el coágulo hematopoyético tiene el potencial para activar la reparación de diversos tipos de tejido.

45

45 La célula hematopoyética se puede aislar del mismo individuo a que se suministrará el coágulo, a partir de otro individuo al que no se suministrará la sustancia, a partir de una muestra de laboratorio cultivada *in vitro* o a partir de cualquier otra fuente de células hematopoyéticas. Claramente, diferentes situaciones y sustancias favorecerían diferentes fuentes desde las que se tomaría el coágulo de células hematopoyéticas. Por ejemplo, si el coágulo de células hematopoyéticas se obtiene del mismo individuo al que se suministrará la sustancia, el coágulo es completamente natural y autólogo para el individuo. Por lo tanto, es menos probable que las células hematopoyéticas interfieran con el suministro de sustancia, inhiban el efecto deseado de la sustancia o produzcan una respuesta inmunitaria.

50

55 El coágulo de células hematopoyéticas puede presentar cualquier tamaño y forma. Por ejemplo, el coágulo de células hematopoyéticas se puede usar en cualquier forma que tome de manera natural durante el procedimiento de coagulación. Alternativamente se pueden requerir etapas para conformar el coágulo de células hematopoyéticas en un tamaño o forma específicos. Un coágulo de células hematopoyéticas de un tamaño o forma específicos puede ser útil para la reparación de un defecto de tejido específico. En ese caso puede ser deseable producir un coágulo con un tamaño similar al defecto particular que se tiene que corregir o tratar.

60

65 Un método para preparar un coágulo de células hematopoyéticas en un tamaño o forma específicos es usar un recipiente de moldeado. Por ejemplo, el coágulo de células hematopoyéticas se puede conformar en un recipiente; a fin de que la muestra de células hematopoyéticas y la mezcla de sustancias solidifiquen en el recipiente. De dicha manera, el coágulo tendrá un tamaño y forma que se determina por el tamaño y la forma del recipiente. El coágulo de células hematopoyéticas también se puede conformar de manera que permita el suministro eficaz de una sustancia, tal como un fármaco, es decir incluso en ausencia de un defecto de tejido. El estado sólido del coágulo de

células hematopoyéticas permite que se manipule fácilmente el coágulo y se implante en sitios de daño.

Como se mencionó anteriormente, el coágulo de células hematopoyéticas puede ser útil para la reparación de tejido defectuoso. Se puede poner el coágulo en el tejido para ayudar en el procedimiento de curación. Preferiblemente, se incorpora al coágulo una sustancia que también es útil en el procedimiento de reparación. Es posible en algunos casos que se use solo el coágulo para proporcionar simplemente una matriz para crecimiento hacia adentro de las células durante el procedimiento de reparación, pero preferiblemente se incorpora en la misma una sustancia, tal como una célula, fármaco o vector génico. El tejido defectuoso puede ser cualquier tejido que requiera reparación. Por ejemplo, el tejido puede ser hueso y diversos tejidos blandos, incluyendo pero no limitándose a, cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales. Alternativamente, el coágulo de células hematopoyéticas se puede usar como un sistema *in vitro* para lograr o reparar tejidos para implante posterior. Para formación de tejido *in vitro*, los coágulos de células hematopoyéticas se pueden sembrar con las células y cultivar en el medio apropiado.

El coágulo de células hematopoyéticas también se puede usar para suministrar fármacos o células a un individuo en ausencia de tejido que se tenga que reparar. Por ejemplo, el coágulo se puede usar como se usa cualquier otro dispositivo de liberación prolongada para suministrar un compuesto a un individuo. Los usos específicos dependerán del tipo de fármaco, célula o vector génico que se tenga que suministrar al individuo.

Como se usa en la presente memoria, un "individuo" es un vertebrado tal como un ser humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor.

La formación del coágulo de células hematopoyéticas puede tener lugar en diversas condiciones, tal como a temperatura ambiente. Por ejemplo, la coagulación de sangre y aspirado de médula ósea de conejo o ser humano tendrá lugar en aproximadamente 15-30 minutos. Este coágulo se puede generar por lo tanto e implantar de manera intra-operativa, si se desea así.

Una vez que se ha formado el coágulo de células hematopoyéticas, se puede retirar del coágulo cualquier sustancia no ligada. Por ejemplo, el coágulo de células hematopoyéticas se podía lavar en una disolución tal como una disolución salina de tampón de fosfato. Ejemplos de métodos más detallados para preparar los coágulos se explican en la descripción de experimentos presentados a continuación. Los expertos en la materia saben de otros métodos para preparar coágulos con células hematopoyéticas.

Como se usa en la presente memoria un "coágulo de células hematopoyéticas no polimérico" es un coágulo de células hematopoyéticas, como se definió anteriormente, en el que no se incorpora una matriz polimérica en el coágulo o se usa como la estructura del coágulo. La mayoría de los dispositivos de suministro de fármacos para reparaciones de tejidos usan una matriz polimérica como una estructura para suministrar el fármaco. Una matriz polimérica se forma de polímeros, tales como polisacáridos modificados o naturales, tales como quitosán, quitina, hialuronan, glicosaminoglicano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano, sulfato de dermatan, heparina o sulfato de heparina. Un polímero puede ser una proteína natural, recombinante o sintética, tal como colágeno soluble o gelatina soluble o poliaminoácidos, tales como por ejemplo una polilisina. Un polímero también puede ser poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), homopolímeros y copolímeros de bloque sintéticos que contienen funcionalidades de carboxílico, amino, sulfónico, fosfónico, fosfénico con o sin funcionalidades adicionales tales como, por ejemplo, sin limitación hidroxilo, tiol, alcoxi, ariloxi, aciloxi y aroiloxi. Adicionalmente, un polímero puede comprender ortoésteres, anhídridos, propileno-co-fumaratos o un polímero de uno o más monómeros de ácido alfa-hidroxicarboxílico (por ej., ácido alfa-hidroxiacético (ácido glicólico) y/o ácido alfa-hidroxi propiónico (ácido láctico)).

Se puede disolver o suspender inicialmente un polímero en un tampón que contiene sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, fosfato, sulfato y carboxilato de potasio calcio, magnesio. También se puede disolver o suspender un polímero en un tampón que contenga una sal orgánica tal como fosfato de glicerol, fosfato de fructosa, fosfato de glucosa, fosfato de L-Serina, fosfato de adenosina, glucosamina, galactosamina, HEPES, PIPES y MES.

Según la presente invención se incorpora una sustancia en el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico. Como se usa en la presente memoria, una "sustancia" es cualquier composición que tenga un efecto sobre un individuo, incluyendo un efecto de diagnóstico. La sustancia, puede ser, por ejemplo, una célula o cualquier otro agente activo, por ej., un fármaco o un vector génico capaz de expresar un péptido, una molécula pequeña, etc. La sustancia es una sustancia exógena. Es decir, es una que se añade a la muestra de células hematopoyéticas y que no estaba presente en la muestra de células antes de que se tomara de su entorno previo (es decir, un individuo, un entorno *in vitro*, etc.). Son ejemplos de la sustancia vehículos de transferencia de genes (víricos y no víricos), células adicionales, de ingeniería genética o naíf, recombinantes, solubles o cualquier otro tipo de proteínas u otras moléculas bioactivas tales como factores de crecimiento.

Un agente activo como se usa en la presente memoria es cualquier compuesto que presenta un efecto de diagnóstico, profiláctico o terapéutico en un organismo biológico. Los agentes activos incluyen compuestos tales como proteínas, péptidos, anticuerpos, polisacáridos, ácidos nucleicos (por ej., ARN, ADN, APN, múltiples de ellos (por ej., triple)), sacáridos, glicoproteínas, aminoácidos, virus, mezclas heterogéneas de macromoléculas (por ej., un

extracto de producto natural) y macromoléculas híbridas (por ej., híbridos de proteína/ácido nucleico, proteínas conjugadas de albúmina, fármacos con ligadores moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas o combinaciones de los mismos.

5 Un agente bioactivo es cualquier compuesto que tiene un efecto profiláctico o terapéutico en un organismo biológico. En algunas realizaciones, el agente bioactivo es cualquiera de los siguientes agentes: agente adrenérgico; esteroide adrenocortical; supresor adrenocortical; agentes para tratamiento del conocimiento, antiplaquetas; antagonista de la aldosterona; aminoácido; anabólico; analéptico; analgésico; anestésico; anoréctico; agente anti-acné; anti-adrenérgico; anti-alérgico; anti-Alzheimer, anti-améxico; anti-anémico; anti-anginal; anti-artrítico; anti-asmático; anti-ateroesclerótico; antibacteriano; anticolinérgico; anticoagulante; anticonvulsivo; antidepresivo; antidiabético; antidiarreico; antidiurético; anti-emético; anti-epiléptico; antifibrinolítico; antifúngico; antihemorrágico; antihistamina; antihiperlipidemia; antihipertensivo; antihipotensivo; anti-infectivo; anti-inflamatorio; antimicrobiano; antimigraña; antimitótico; antimicótico, antináuseas, antineoplásico; antineutropénico; antiparasitario; antiproliferativo; antipsicótico; antireumático; antiseborreico; antisecretor; antiespasmódico; antitrombótico; anti-ulcerativo; antivírico; 10 anxiolíticos; amosores del apetito; regulador de glucosa en sangre; inhibidor de la resorción ósea; broncodilatador; agente cardiovascular; colinérgico; inhibidores de la COX1, inhibidores de la COX2, inhibidores de trombina directos, depresores; auxiliares de diagnóstico; diuréticos; agentes dopaminérgicos; agonista de los receptores de estrógenos; fibrinolítico; agente fluorescente; eliminador de radicales oxígeno libre; efector de la motilidad gastrointestinal; glucocorticoide; antagonistas de GPIIb/IIIa, estimulante del crecimiento del cabello; hemostático; antagonistas de los 20 receptores de histamina H2; hormona; hormona del crecimiento humano, hipocolesterolémico; hipoglicémico; hipolipidémico; hipnóticos, hipotensivo; agente formador de imágenes; agentes inmunológicos tales como agentes inmunizantes, inmunomoduladores, inmunoreguladores, inmunoesestimulantes e inmunosupresores; queratolíticos; agonista LHRH; regulador del humor; mucolítico; midriático; descongestionante nasal; agente de bloqueo neuromuscular; neuroprotector; antagonista NMDA; derivado de esteroide no hormonal; activador plasminógeno; antagonista de factor de activación de plaquetas; inhibidor de agregación de plaquetas; inhibidores de bomba de protones; psicotrópico; agente radioactivo; escabícida; agente esclerosante; sedante; sedante-hipnótico; antagonista de adenosina A1 selectivo; antagonista de la serotonina; inhibidor de la serotonina; antagonista de los receptores de serotonina; estatinas; esteroide; hormona tiroidea; inhibidor tiroideo; tiromimético; tranquilizante; agente de esclerosis lateral amiotrófica; agente de isquemia cerebral; agente de la enfermedad de Paget; agente de angina 25 inestable; vasoconstrictor; vasodilatador; agente de curación de heridas; inhibidor de la xantina oxidasa.

Un uso preferido del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico es reparar defectos de hueso y tejidos. Las proteínas que es más probable que estén ligadas a reparación de cartílago, huesos y tejido blando son los miembros de la superfamilia de factor- β de crecimiento transformante (TGF- β) incluyendo TGF- β S 1-3, diversas proteínas morfogenéticas óseas (las BMP), factores de crecimiento de fibroblastos, hormona del crecimiento y factores de crecimiento de tipo insulina (los IGF).

La administración in vivo de proteínas recombinantes para mejorar la formación de cartílago y reparación de cartílago así como la de hueso y tejido blando se ha investigado en diversos modelos de defectos y animales 2 experimentales. A pesar de los resultados prometedores, la aplicación clínica de las proteínas recombinantes está impedida por las semividas biológicas cortas de estas moléculas y la ausencia de un método eficaz para suministro diana, prolongado. La inyección directa de factores de crecimiento de proteínas a sitios de daño de tejidos ha conducido a resultados decepcionantes debido a que los factores se diluyen mediante fluidos corporales, se metabolizan rápidamente o se diseminan a otros tejidos. Así, el mantenimiento de concentraciones terapéuticas requiere dosis de carga muy altas o administración repetida. Esto disminuye la eficacia de reparación, al tiempo que aumentan los costes, la complejidad y el riesgo de generar efectos secundarios no deseados de la exposición de órganos no diana. Los coágulos de células hematopoyéticas no poliméricos descritos en la presente memoria superan muchos de estos problemas, como se demuestra en los ejemplos presentados a continuación.

50 El coágulo es también útil para suministrar genes a un individuo, en general o a un tejido específico de un individuo. Como se usa en la presente memoria, un "gen" es una molécula de ácido nucleico aislada de más de treinta nucleótidos, más típicamente cien nucleótidos o más, de longitud. En general estará bajo el control de un activador apropiado, que puede ser inducible, reprimible o constitutivo. Cualquier gen que sería útil en reemplazar o enriquecer una función deseada, o conseguir un efecto deseado tal como la inhibición de crecimiento tumoral, se podía 55 introducir usando los coágulos descritos en la presente memoria. Los activadores pueden ser activadores generales, que proporcionan expresión en una variedad de células de mamíferos o célula específica, o incluso nucleares frente a citoplasmáticas específicas. Estos son conocidos para los expertos en la materia y se pueden construir usando protocolos de biología molecular estándar.

²Hunziker, 2.001; Nixon et al., 1.999; Sellers et al., 1.997.

Cualquier tipo de gen es útil según los métodos de la invención. Los genes específicos usados en una circunstancia particular dependerán de la afección que se esté tratando y/o el resultado terapéutico deseado. Una lista ejemplar de genes que se han usado en tratamiento génico se proporciona en la Figura 1. En algunas realizaciones de la invención, uno cualquiera o cualquier combinación de los genes enumerados en la Figura 1 se puede incorporar al dispositivo de suministro de la invención.

La transferencia génica ofrece una propuesta que puede superar las muchas limitaciones de suministro de proteínas a tejidos dañados. La invención descrita en esta descripción presenta un nuevo sistema para la aplicación de vehículos de suministro de genes, células y proteínas solubles para la curación de tejidos dañados. Por suministro de los ADNc que codifican las proteínas con potencial reparador o terapéutico para células específicas en sitios de lesión o enfermedad, las células modificadas genéticamente se convierten en factores locales para producción de fármacos, permitiendo la síntesis prolongada de la proteína específica.

Se publican en la bibliografía activadores, potenciadores, vectores, etc., adecuados, para dichos genes. En general, los genes útiles reemplazan o enriquecen la función, incluyendo los genes que codifican enzimas ausentes tales como adenosina desaminasa (ADA) que se ha usado en estudios clínicos para tratar la deficiencia de ADA y cofactores tales como insulina y factor de coagulación VIII. Los genes que afectan a la regulación también se pueden administrar solos o en asociación con un gen enriqueciendo o reemplazando una función específica. Por ejemplo, se puede administrar un gen que codifica una proteína que suprime la expresión de un gen codificador de proteínas particular mediante los coágulos de la invención. Los genes se pueden obtener o proceder de una variedad de fuentes, incluyendo referencias bibliográficas, Genbank, o suministradores comerciales. Se pueden sintetizar usando síntesis de fase sólida si son relativamente pequeños, obtenidos de muestras depositadas tales como las depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD o aislados de novo usando información publicada de secuencias.

Además de genes, la sustancia puede ser un oligonucleótido corto tal como antisentido y ribozimas que se distinguen de los genes por su longitud y función. A diferencia de dichos oligonucleótidos cortos, los genes codifican proteínas y por lo tanto tendrán típicamente un mínimo de más de 100 pares de bases en longitud, más típicamente en los cientos de pares de bases.

Como se usa en la presente memoria, los vectores son agentes que transportan el gen a una célula sin degradación e incluyen un activador que proporciona expresión del gen en las células a que se suministra.

También se reconocerá que los genes en vectores de expresión se pueden transferir a células huésped y estirpes celulares por ej. procariotas (por ej., *E. coli*) o eucariotas (por ej., células dendríticas, células B, células CHO, células COS, sistemas de expresión de levaduras y expresión de baculovirus recombinante en células de insectos) *in vitro*. Estas células se pueden incorporar después a los coágulos. Son especialmente útiles las células de mamíferos tales como ser humano, ratón, hámster, cerdo, cabra, primate, etc. Pueden ser de una amplia variedad de tipos de tejidos e incluyen células primarias y estirpes celulares. Los ejemplos específicos incluyen queratinocitos, leucocitos sanguíneos periféricos, hemocitoblastos de médula ósea y hemocitoblastos embrionarios. Los vectores de expresión requieren que la secuencia génica pertinente esté ligada de manera operativa a un activador.

En algunas realizaciones, se selecciona un vector de virus para suministrar un gen del grupo que consiste en: adenovirus, virus adeno-asociados, poxvirus incluyendo virus vaccinia y poxvirus atenuados, virus Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana, retrovirus, virus Sindbis y partícula de tipo virus Ty. Ejemplos de virus y partículas de tipo virus que se han usado para suministrar ácidos nucleicos exógenos incluyen: adenovirus de replicación defectuosa (por ej., Xiang et al., *Virology* 219: 220-227, 1.996; Eloit et al., *J. Virol.* 7: 5.375-5.381, 1.997; Chengalvala et al., *Vaccine* 15: 335-339, 1.997), un retrovirus modificado (Townsend et al., *J. Virol.* 71: 3.365-3.374, 1.997), un retrovirus no replicado (Irwin et al., *J. Virol.* 68: 5.036-5.044, 1.994), un virus Semliki Forest de replicación defectuosa (Zhao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3.009-3.013, 1.995), virus canarypox y derivado de virus vaccinia muy atenuado (Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11.349-11.353, 1.996), virus vaccinia no replicado (Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11.341-11.348, 1.996), virus vaccinia replicado (Moss, *Dev. Biol. Stand.* 82: 55-63, 1.994), virus de la encefalitis equina venezolana (Davis et al., *J. Virol.* 70: 3.781-3.787, 1.996), virus Sindbis (Pugachev et al., *Virology* 212: 587-594, 1.995) y partícula de tipo virus Ty (Allsopp et al., *Eur. J. Immunol.* 26: 1.951-1.959, 1.996). En realizaciones preferidas, el vector vírico es un adenovirus o un alfavirus.

Otro virus preferido para ciertas aplicaciones es el virus adeno-asociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adeno-asociado es capaz de infectar un amplio intervalo de tipos de células y especies y se puede lograr para que sea de replicación deficiente. Además presenta ventajas, tales como estabilidad del disolvente al calor y a los lípidos, altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas y carece de inhibición de superinfección permitiendo así múltiples series de transducciones. El virus adeno-asociado puede integrarse en ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando de ese modo la posibilidad de mutagénesis insercional y variabilidad de expresión de genes insertados. Además, las infecciones por virus adeno-asociados de tipo natural se han seguido en cultivo de tejidos para más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un caso relativamente estable. El

virus adeno-asociado también puede funcionar de un modo extracromosómico.

En general, otros vectores víricos preferidos se basan en virus de eucariotas no citopáticos en que los genes no esenciales han sido reemplazados con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus, el ciclo de vida de los cuales implica la transcripción inversa de ARN vírico genómico a ADN con la integración provírica posterior a ADN celular de huésped. Se han homologado adenovirus y retrovirus para ensayos de tratamiento génico humano. En general, los retrovirus son de replicación deficiente (es decir, capaces de síntesis directa de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovíricos modificados genéticamente presentan utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Los protocolos estándar para producir retrovirus de replicación deficiente (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una estirpe celular empaquetada con plásmido, producción de retrovirus recombinante por la estirpe celular empaquetada, colección de partículas víricas de medios de cultivo de tejidos e infección de las células diana con partículas víricas) se proporcionan en Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual," W. H. Freeman Co., Nueva York (1.990) y Murry, E. J. Ed. "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, Nueva Jersey (1.991).

Preferiblemente, los vectores de suministro de ácidos nucleicos anteriores: (1) contienen material genético exógeno que se puede transcribir y traducir en una célula de mamífero y (2) opcionalmente puede contener sobre una superficie un ligando que se una selectivamente a un receptor sobre la superficie de una célula diana, tal como una célula de mamífero y gana de ese modo entrada a la célula diana.

Se pueden emplear diversas técnicas para introducir los ácidos nucleicos de la invención en células, dependiendo de si los ácidos nucleicos se introducen *in vitro* o *in vivo* en un huésped. Dichas técnicas incluyen la transfección de precipitados de ácido nucleico-CaPO₄, transfección de ácidos nucleicos asociados con DEAE, transfección o infección con los virus anteriores incluyendo el ácido nucleico de interés, transfección mediada por liposomas y similares. Para algunos usos, se puede preferir dirigir el ácido nucleico a células particulares, especialmente si el coágulo se implanta o se administra en un sitio distante de la célula diana. En dichos casos, un vehículo usado para suministrar un ácido nucleico de la invención a una célula (por ej., un retrovirus u otro virus; un liposoma) después de la liberación del coágulo puede tener una molécula diana unida al mismo. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo específico para una proteína superficial de membrana en la célula diana o un ligando para un receptor en la célula diana se puede unir a, o incorporar en, el vehículo de suministro de ácidos nucleicos. En el caso de que se empleen liposomas para suministrar los genes, las proteínas que se unen a una proteína superficial de membrana asociada con la endocitosis se pueden incorporar a la formulación de liposomas para dirigir y/o facilitar la absorción. Dichas proteínas incluyen proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, proteínas que dirigen la localización intracelular y mejoran la semivida intracelular y similares.

La sustancia puede estar en cualquier estado, tal como una disolución, sólido, vector, gas o cualquier otro estado que permitiría que la sustancia se mezcle con la célula hematopoyética para formar un coágulo.

Para transferencia génica directa, la sangre o la médula ósea extraída se puede añadir a una disolución que contenga un vector de transferencia génica (vírico o no vírico) o una proteína en un recipiente de tamaño y forma apropiados o en cualquier recipiente que permita que la muestra de células se mezcle con la sustancia. Esta mezcla se puede titular usando una pipeta o cualquier otro dispositivo o sistema que mezcle la sustancia con la muestra de células.

Para una propuesta de suministro de genes *ex vivo*, la célula hematopoyética, por ej., sangre o aspirado de médula ósea se puede mezclar con una suspensión de células naïf o modificadas genéticamente con o sin un vector adicional. Las células se incorporan después en el coágulo y se devuelven al cuerpo.

La invención también incluye productos. Los productos son sistemas de suministro de sustancias según las reivindicaciones 1, 5 y 12. Como se usa en la presente memoria un "sistema de suministro de sustancias" es un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene una sustancia de manera que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico puede suministrar la sustancia a un individuo.

Cuando se administran, las composiciones (coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene la sustancia) se pueden administrar en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Dichas preparaciones pueden contener de manera rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, portadores compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos no incorporados.

Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía convencional, incluyendo inyección o por infusión intravenosa gradual con el tiempo. La administración puede ser, por ejemplo, inyección directa o implantación, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, intrapulmonar, mucosal (es decir, rectal, vaginal, ocular, dérmica, intranasal, etc.), subcutánea, aerosol o transdérmica. La administración puede ser sistémica o local.

Las composiciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" es esa cantidad de

una composición que sola o junto con dosis adicionales, produce la respuesta deseada. La respuesta deseada, por supuesto, dependerá de la afección particular que esté tratando y del tipo de célula o agente activo que se esté administrando en el coágulo. Estos factores son conocidos para los expertos en la materia y se pueden aplicar con no más que experimentación de rutina. Se prefiere en general que se use una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis segura más alta según el buen criterio médico. Se entenderá por los expertos en la materia, sin embargo, que un paciente puede insistir en una dosis menor o dosis tolerable por razones médicas, razones psicológicas o por virtualmente cualquier otra razón. Las composiciones usadas en los métodos anteriores son preferiblemente estériles y contienen una cantidad eficaz de la sustancia para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para administración a un paciente.

Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Dichas preparaciones pueden contener de manera rutinaria sales, agentes tampón, conservantes, portadores compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar de manera conveniente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la invención. Dichas sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen las preparadas de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. También se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables como sales de metal alcalino o de alcalino-térreo, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Ejemplos

En los ejemplos, los coágulos de médula ósea se usan según la presente invención. Los coágulos sanguíneos son ejemplos comparativos.

In Vitro:

Ejemplo 1: Capacidad de carga de coágulos sanguíneos o de médula ósea.

Para evaluar la cantidad máxima de fluido que se puede añadir a sangre humana sin interrumpir el procedimiento de coagulación, se mezclaron unos 200 µl de volumen de sangre con cantidades crecientes de PBS. Aún tuvo lugar coagulación después de añadir un volumen de PBS casi dos veces el de sangre. Como se muestra en la Fig. 2, este hallazgo fue comparado con la cantidad de fluido que era capaz de absorber una matriz de colágeno-glicosaminoglicano (matriz de colágeno-gag) del mismo tamaño. No se observó diferencia significativa en la absorción de fluido entre coágulos y matriz de colágeno-gag.

Para determinar si un coágulo sanguíneo humano es capaz de incorporar células, se cultivaron células de médula ósea de conejo en monocapa y se infectaron con un vector de adenovirus que soportaba una proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) codificadora de genes. Después de 24 h, se tripsinizaron aproximadamente 600.000 células fluorescentes y se recuperaron por centrifugación. Se volvió a suspender cada uno de los gránulos de células en 450 µl de sangre humana. Estas construcciones de células sanguíneas formaron coágulos entonces en tubos de microcentrífuga. Después de 1 h se extrajeron los coágulos, se sumergieron en 1 ml de PBS y se cultivaron durante 24 h en medio F12 de Ham, cada uno en una placa de 12 pozos.

Los coágulos sanguíneos humanos mostraron una alta densidad de células de médula ósea de conejo fluorescente verdes 24 h después de coagulación, como se puede ver en la Fig. 3. El análisis del fluido restante en los tubos Eppendorf después de coagulación no reveló células verdes residuales, indicando que todas las células de médula ósea de conejo transducidas habían sido retenidas por los coágulos sanguíneos humanos.

Ejemplo 2: Forma del coágulo.

Los experimentos usando diferentes recipientes para coagulación, confirmaron que los coágulos se podían conformar en una amplia variedad de formas y tamaños. Los coágulos así generados permanecían suficientemente estables para ser implantados en cualquier tamaño y forma de defecto, un ejemplo de lo cual se muestra en la Fig. 4.

Ejemplo 3: Siembra de coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea con células modificadas genéticamente (para simular una propuesta de suministro de genes ex vivo).

Para simular una propuesta de suministro de genes ex vivo, se examinaron 4 grupos de coágulos sanguíneos de conejo in vitro:

1. 450 µl de sangre de conejo sólo.

2. 450 µl de sangre de conejo mezclada con una suspensión de 400.000 células de médula ósea de conejo.

3. 450 µl de sangre de conejo mezclada con una suspensión de 400.000 de células de médula ósea de conejo modificadas genéticamente con adenovirus recombinante para expresar GFP.

5 4. 450 µl de sangre de conejo mezclada con una suspensión de 400.000 células de médula ósea de conejo modificadas genéticamente con adenovirus recombinante para expresar TGF-β.

10 Cada grupo contenía 4 replicados. Se examinaron los coágulos por microscopía fluorescente los días 1, 3, 7, 14 y 21. Se determinó la expresión TGF-β en coágulos sembrados con células transducidas para expresar TGF-β por medición de niveles de TGF-β en el medio usando ELISA.

15 Se observaron células fluorescentes dentro de los coágulos durante al menos 21 días in vitro. La Fig. 5a muestra las células el día 1 y la Fig. 5b muestra las células después de 21 días. Similarmente se observó expresión de TGF-β durante al menos 21 días con expresión máxima el día siete; los resultados se muestran en la Fig. 6.

Ejemplo 4: Transducción directa de células dentro de coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea (para simular la propuesta de suministro de genes directo).

20 Para determinar si las células dentro de los coágulos sanguíneos o coágulos de médula ósea pueden soportar expresión transgénica, se mezclaron sangre y médula ósea con los vectores adenovíricos, Ad TGF-β y Ad GFP.

1. 450 µl de sangre de conejo sólo.

25 2. 450 µl de sangre de conejo y 10 µl de Ad GFP.

3. 450 µl de sangre de conejo y 10 µl de Ad TGF-β.

4. 450 µl de aspirado de médula ósea de conejo sólo.

30 5. 450 µl de aspirado de médula ósea de conejo y 10 µl de Ad GFP.

6. 450 µl de aspirado de médula ósea de conejo y 10 µl de Ad TGF-β.

35 Cada grupo constaba de 4 replicados. Se formaron coágulos como se describió previamente y se examinaron microscópicamente el día 1, 3, 7, 14 y 21. Se realizó ELISA del medio acondicionado en los mismos instantes de tiempo para medir la expresión de TGF-β.

40 Se observó expresión de GFP dentro de coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea durante hasta 14 días, los resultados de lo cual se pueden ver en la Fig. 7.

Se detectó la producción de TGF-β durante hasta 7 días en coágulos de médula ósea, con el máximo el día 3 y disminuyendo a niveles de fondo por el día 14.

45 Por el contrario, los niveles detectables de TGF-β no se expresaron en coágulos sanguíneos infectados con Ad TGF-β. La ausencia de TGF-β segregado en el medio puede ser debido a que el factor de crecimiento llega a ser atrapado en el coágulo o alguna otra diferenciación con el vector.

Se realizó un experimento más para cuantificar estos productos transgénicos que permanecen atrapados en los coágulos sanguíneos usando el mismo procedimiento, los resultados de lo cual se pueden ver en la Fig. 8.

50 1. Sangre de conejo (450 µl).

2. Médula ósea de conejo (450 µl).

55 3. Sangre de conejo (450 µl) y Ad TGF-β (10 µl).

4. Médula ósea de conejo (450 µl) y TGF-β (10 µl).

60 En el segundo día de cultivo, se extrajeron coágulos, se lavaron en PBS, se disgregaron mecánicamente y se cultivaron en medio F12 de Ham. Se ensayaron los niveles de TGF-β los días 3, 7, 14, 21.

65 Los niveles de TGF-β en los coágulos sanguíneos y de médula ósea fueron altos 3 días después del suministro de genes, pero cayó a niveles muy bajos por el día 7. Sin embargo, los coágulos de médula ósea mostraron una expresión total seis veces mayor de TGF-β comparado con coágulos sanguíneos que se debe probablemente a su mayor celularidad. Como tal el uso de médula ósea parece ser más eficaz para la expresión de productos transgénicos después de suministro directo de genes que la sangre.

Ejemplo 5: Estabilidad de adenovirus en coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea.

5 Se realizó un estudio más para determinar si los vectores víricos infecciosos podían ser retenidos y permanecen transduciéndose dentro de los coágulos, los resultados de lo cual se pueden ver en la Fig. 9.

10 Se infectaron coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea con Ad GFP y se cultivaron como se describió anteriormente. En diversos instantes del tiempo se disgregaron de manera mecánica los coágulos y se centrifugaron para eliminar las partículas celulares. Se recogieron los sobrenadantes y se usaron para infectar cultivos monocapa de 293 células. Después de 24 horas se analizaron las células por fluorescencia.

Las células fluorescentes estuvieron presentes por supuesto en cultivos que habían sido infectados con los sobrenadantes a partir de coágulos rotos desde los días 1, 3 y 7.

15 Este hallazgo demostró que el vector vírico, Ad GFP, atrapado en los coágulos, era capaz de retener su infectividad durante al menos 7 días en cultivo.

In Vivo:

20 Ejemplo 6: El uso de coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea autólogos para suministro directo de genes a defectos de cartílago en las rodillas de conejos.

25 Para este objetivo, los vectores de suministro de genes adenovíricos que codifican los genes para luciferasa, GFP y/o Lac Z se mezclaron y se coagularon con sangre o aspirado de médula ósea obtenido de conejos blancos de Nueva Zelanda. Después de coagulación (aproximadamente 30 minutos) se implantaron construcciones de vector sanguíneo o de médula ósea en defectos osteocondrales generados de manera quirúrgica en las epífisis femorales de los mismos conejos. Después de la implantación, la cápsula de la articulación se suturó y fueron reanimados los animales. Después de 3 días se sacrificaron los conejos y se extrajeron los coágulos de los defectos. Para análisis cuantitativos, se determinó la actividad de la luciferasa en el coágulo. Para análisis cualitativo, se visualizaron de manera microscópica las células fluorescentes. También se examinó en el sinovio adyacente la expresión de los transgenes.

35 Como se muestra en la Fig. 10, se observaron altos niveles de expresión transgénica de luciferasa en los coágulos sanguíneos y los coágulos de médula ósea extraídos que se habían mezclado con Ad Luciferasa. Similarmente, se observaron grandes números de células fluorescentes en los coágulos extraídos que fueron infectados con Ad GFP. También se observaron algunas células verdes en el revestimiento sinovial inmediatamente adyacente al sitio del defecto. Sin embargo, no se observó expresión en otras áreas del sinovio. Estos resultados contrastaban con un revestimiento sinovial altamente fluorescente verde que se observó después de suministro directo de genes de una matriz de colágeno-gag que contenía Ad GFP para defectos osteocondrales. Así, los coágulos sanguíneos y de médula ósea proporcionan más expresión transgénica localizada contenida cuando se implantan in vivo.

Ejemplo 7: El potencial para condrogénesis u osteogénesis usando coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea de conejo.

45 Este estudio investiga la capacidad de las células precursoras endógenas para cambiar el fenotipo y experimentar diferenciación condrogénica u osteogénica dentro de coágulos sanguíneos y de médula ósea. Para esto, se extrajeron sangre y médula ósea de conejos blancos de Nueva Zelanda y se coagularon para "un total" de 6 grupos:

- 50 1. Sangre de conejo (450 µl) (1 coágulo).
2. Sangre de conejo (450 µl) y Ad GFP (10 µl) (3 coágulos).
3. Sangre de conejo (450 µl) y Ad TGF-β (10 µl) (4 coágulos).
- 55 4. Médula ósea de conejo (450 µl) (1 coágulo).
5. Médula ósea de conejo (450 µl) y GFP (10 µl) (5 coágulos).
- 60 6. Médula ósea de conejo (450 µl) y TGF-β (10 µl) (3 coágulos).

Los coágulos fueron cultivados en medio F12 de Ham durante 6 semanas. Después de extracción se fijaron, se embebieron en parafina, se seccionaron y se examinaron para histología. Se colorearon las secciones con Hematoxilina-Eosina y Estuche Tricromo de Gomori (Coloración Azul de Colágeno). Se examinaron las secciones mediante tres individuos diferentes de una manera ciega.

65 En los coágulos de médula ósea que no fueron modificados genéticamente con factores de crecimiento (médula

5 ósea sólo y médula ósea mezclada con Ad GFP), la naturaleza pluripotente de las células endógenas fue aparente. Se encontraron áreas de tejido de tipo músculo, de tipo grasa y fibroso en todos estos coágulos después de 6 semanas, como se representa en la Fig. 11. Los coágulos de médula ósea enriquecidos con Ad TGF- β mostraron una diferenciación más homogénea, no observándose tejido de tipo músculo. En su lugar, se observó tejido más fibroso, como se representa en la Fig. 12.

10 La diferenciación celular no fue evidente en coágulos sanguíneos. Sin embargo, las diferentes concentraciones y combinaciones de vectores pueden dar como resultado diferenciación. Estos resultados sugieren que las células dentro de coágulos de médula ósea son multipotenciales, con la capacidad de diferenciarse en muchos tipos de tejidos.

15 Debido a que los vectores adenovíricos son herramientas poderosas para estudiar los efectos de la sobreexpresión de productos génicos, fueron el vector de elección en los experimentos descritos en la presente memoria. Sin embargo, se espera que otros vectores de transferencia génica, tales como Virus Adeno-Asociados (VAA) y vectores retrovirales puedan tener incluso mayor utilidad clínica que los vectores procedentes de adenovirus.

Ejemplo 8: El uso de los coágulos de médula ósea modificados con Ad.TGF- β 1 para reparar tejido cartilaginoso.

20 Este estudio investiga el uso de los coágulos de médula ósea en la reparación de tejido cartilaginoso. Se creó un efecto osteocondral taladrando agujeros de 3 mm de ancho y 8 mm de profundidad por el cartílago y el hueso y la médula de rodillas de conejo. Se dejaron sin tratar (defecto vacío) los defectos de control o recibieron un coágulo de médula ósea no modificado. Un coágulo de médula ósea, que fue pre-infectado con adenovirus que contenía el gen para transformar factor de crecimiento beta-1 (TGF- β 1), se implantó en los defectos osteocondrales restantes.

25 Se tomaron láminas seis semanas después de cirugía y se colorearon con hematoxilina-eosina (H&E) y azul de toluidina. H&E es una coloración histológica ácido-base común; el azul de toluidina actúa como un indicador de glicosaminoglicanos (los GAG).

30 En el defecto de control que se dejó sin tratar, se formó una reparación fibrosa que no se parecía al cartílago flanqueador. El otro defecto de control que se trató con el implante de coágulo de médula ósea no modificado mostró sólo una superficie ósea y no los GAG.

35 El defecto que se trató con el coágulo de médula ósea pre-infectado que contenía TGF- β 1, presentaba un aspecto condrogénico, mostrando una matriz extracelular robusta. En la mayor parte de la reparación, se coloreó la matriz de reparación azul oscuro, indicando que los GAG estaban presentes. Las células dentro de la matriz de reparación se parecían a condrocitos morfológicamente, pero aparecen en racimos. Debajo del tejido de reparación de cartílago hubo una formación ósea robusta. También, la capa de cartílago fue de aproximadamente la misma profundidad que el tejido flanqueador.

40 Estos resultados sugieren que aunque el tejido de reparación no es perfecto, usando esta propuesta para suministrar genes, la biología de las células dentro de un aspirado de médula ósea coagulado puede verse influenciada en una dirección positiva.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de suministro de sustancias que comprende:
- 5 un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que comprende células de médula ósea, en el que no se incorpora una matriz polimérica en el coágulo o se usa como la estructura para el coágulo con una sustancia exógena incorporada en el mismo, en el que la sustancia exógena comprende un vehículo de transferencia de genes, proteínas o células de ingeniería genética.
- 10 2. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que el coágulo de células se conforma de una manera que permita un suministro eficaz de la sustancia exógena.
3. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que la proteína es una proteína recombinante.
- 15 4. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que la proteína es una proteína soluble.
5. Un sistema de suministro de sustancias que comprende:
- 20 un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que comprende células de médula ósea, en el que no se incorpora una matriz polimérica en el coágulo o se usa como la estructura para el coágulo, con una sustancia exógena incorporada en el mismo, en el que la sustancia exógena comprende un vehículo de transferencia de genes, proteínas o células de ingeniería genética y en el que el coágulo de células de médula ósea está formulado para suministro al hueso o tejido blando.
- 25 6. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 5, en el que el coágulo de células se formula para suministro en al menos uno de: cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales.
- 30 7. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que la forma y el tamaño del coágulo de células se determina mediante un molde.
8. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que el coágulo de células se homogeneiza con la sustancia exógena.
- 35 9. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que el coágulo de células es modificado genéticamente para expresar al menos uno de los factores de crecimiento y otros productos génicos que facilitan la reparación de tejido.
- 40 10. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que el coágulo de células tiene un volumen que se determina por el tamaño de un tejido que se tiene que reparar.
- 45 11. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que se prepara el coágulo de células a partir de una muestra aislada de células de médula ósea.
12. Un sistema de suministro de sustancias que comprende:
- 50 un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que comprende células de médula ósea, en el que no se incorpora una matriz polimérica en el coágulo o se usa como la estructura del coágulo, teniendo una sustancia exógena incorporada en el mismo, en el que la sustancia exógena comprende un vehículo de transferencia de genes, proteínas o células de ingeniería genética y en el que las células de médula ósea se aíslan de células de médula ósea de cresta ilíaca.
- 55 13. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que las células de médula ósea se aíslan de defectos osteocondrales que exponen médula ósea subyacente.
14. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que la sustancia exógena está en la forma de una disolución.
- 60 15. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que el coágulo de células se mezcla con una suspensión de al menos uno de, células naïf y células modificadas genéticamente, formando una suspensión de células.
16. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 15, en el que la suspensión celular contiene al menos un vector génico.
- 65 17. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 15, en el que la suspensión celular no contiene

vectores genéticos no adicionales.

18. El sistema de suministro de sustancias según la reivindicación 1, en el que la sustancia exógena se formula para suministro como una liberación localizada, lenta, de la sustancia exógena del coágulo de células.

19. Un método para preparar un sistema de suministro de sustancias de coágulos de células hematopoyéticas no polimérico, comprendiendo el método:

añadir una sustancia exógena a una muestra de células de médula ósea, en la que la sustancia exógena comprende un vehículo de transferencia de genes, proteínas o células de ingeniería genética y

permitir que la muestra de células de médula ósea que contiene la sustancia exógena forme un coágulo de células comprendiendo células de médula ósea, en la que no se incorpora una matriz polimérica en el coágulo o se usa como la estructura para el coágulo.

20. Un método según la reivindicación 19, en el que la sustancia exógena se formula para suministro a un individuo.

21. Un método según la reivindicación 19, en el que la sustancia exógena se formula para suministro como una liberación localizada, lenta, de la sustancia exógena de coágulo de células.

22. Un método según la reivindicación 19, en el que el coágulo de células se conforma de una manera que permite un suministro eficaz de la sustancia exógena.

23. Un método según la reivindicación 19, en el que el coágulo de células se conforma en un recipiente.

24. Un método según la reivindicación 23, que comprende además extraer el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico del recipiente.

25. Un método según la reivindicación 24, que comprende además lavar el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.

26. Un método según la reivindicación 25, en el que cualquier sustancia exógena no ligada se elimina por lavado.

27. Un método según la reivindicación 25, en el que el coágulo de células se lava en una Disolución Salina de Tampón de Fosfato.

28. El método según la reivindicación 19, en el que se permite que el coágulo de células coagule durante 15-30 minutos.

29. El método según la reivindicación 19, en el que se permite que el coágulo de células coagule a temperatura ambiente.

30. El método según la reivindicación 19, en el que la sustancia exógena comprende células adicionales.

31. El método según la reivindicación 30, en el que las células adicionales comprenden células *naïf*.

32. El método según la reivindicación 19, en el que la sustancia exógena comprende proteínas recombinantes.

33. El método según la reivindicación 19, en el que la sustancia exógena comprende proteínas solubles.

34. El método según la reivindicación 19, en el que la sustancia exógena comprende moléculas profilácticas, de diagnóstico o terapéuticas.

35. El método según la reivindicación 19, en el que el coágulo de células se formula para suministro al hueso o tejido blando.

36. El método según la reivindicación 31, en el que el coágulo de células se formula para suministro a al menos uno de: cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y disco intervertebrales.

37. El método según la reivindicación 19, en el que la forma y el tamaño del coágulo de células se determina mediante un molde.

38. El método según la reivindicación 19, en el que el coágulo de células se homogeniza con la sustancia exógena.

39. El método según la reivindicación 19, en el que las células de médula ósea se modifican genéticamente para expresar al menos uno de factores de crecimiento y otros productos génicos que faciliten la reparación de tejido.

40. El método según la reivindicación 19, en el que el coágulo de células presenta un volumen que se determina por el tamaño de un tejido que se tiene que reparar.
- 5 41. El método según la reivindicación 19, en el que las células de médula ósea se extraen de crestas ilíacas.
42. El método según la reivindicación 19, en el que las células de médula ósea se extraen de defectos osteocondrales que exponen médula ósea subyacente.
- 10 43. El método según la reivindicación 19, en el que la sustancia exógena está en la forma de una disolución.
44. El método según la reivindicación 43, en el que se titula el coágulo de células que contiene sustancia exógena.
- 15 45. El método según la reivindicación 44, en el que la valoración se realiza usando una pipeta.
46. El método según la reivindicación 19, en el que las células de médula ósea se mezclan con una suspensión de al menos uno de, células naíf y células modificadas genéticamente, formando una suspensión celular.
- 20 47. El método según la reivindicación 46, en el que la suspensión celular contiene al menos un vector génico.
48. El método según la reivindicación 46, en el que la suspensión celular no contiene vectores génicos adicionales.
49. El uso de un sistema de suministro de sustancias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la fabricación de un medicamento.
- 25 50. Un sistema de suministro de sustancias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para uso como un medicamento.

FIGURA 1

Inmunodeficiencia combinada severa (SCID) debida a deficiencia de adenosina desaminasa (ADA)	Linfocitos autólogos transducidos con gen ADA humano
Cancer avanzado	Linfocitos de infiltración tumoral transducidos con gen de factor de necrosis tumoral
Cancer avanzado	Inmunización con células cancerígenas autólogas transducidas con gen de factor de necrosis tumoral
Cancer avanzado	Inmunización con células cancerígenas autólogas transducidas con gen de interleucina-2
Hipercolesterolemia familiar	Tratamiento génico ex vivo
Tumor maligno	Transferencia génica in vivo en tumores
Cancer	Transferencia génica
Neuroblastoma recurrente/resistente al tratamiento	Células de neuroblastoma autólogas modificadas con el gen de la citocina (Estudio de fase I)
Tumores cerebrales	Transducción intratumoral con el gen de la timidina cinasa y ganciclovir intravenoso
Melanoma metastásico	Inmunización con células de melanoma alogénicas acopladas a HLA-A2 que segregan interleucina-2
Carcinoma de células renales avanzado	Inmunización con células de carcinoma de células renales acopladas a HLA-A2 alogénicas que segregan interleucina-2
Cancer	Vacuna antitumoral modificada con el gen de interleucina-4 (estudio piloto)
Fibrosis quística	Adenovirus recombinante de replicación deficiente que soporta ADNc de gen (CFRT) regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística humano normal; única administración al pulmón (Estudio de fase I)
Fibrosis quística	Vector de adenovirus suprimido EI para suministrar gen CFTR (Estudio de fase I)
Fibrosis quística	Vector de adenovirus usado para suministrar gen CFTR a epitelio nasal
Glioblastoma recurrente (tumor cerebral)	Transducción tumoral in vivo usando sistema gen de timidina cinasa de herpes simplex /ganciclovir
Carcinoma de células renales metastásico	Inyección de células tumorales autólogas de no replicación preparadas +/- transducción de factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (Estudio de fase I)
Fibrosis quística	Uso de vector de adenovirus recombinante de replicación deficiente para suministrar ADNc de CFTR humano a los pulmones (Estudio de fase I)

ES 2 401 190 T3

Fibrosis quística	Uso de adenovirus suprimido EI para suministrar gen CFTR a la cavidad nasal (Estudio de fase I)
Melanoma maligno diseminado	Células tumorales autólogas transducidas de interferón-gamma humano (Estudio de fase I)
Cancer de ovario	Uso de retrovirus modificados para introducir secuencias de resistencia a la quimioterapia en células hematopoyéticas normales para quimioprotección (estudio piloto)
Cancer	Inmunotratamiento por transferencia génica directa a tumores
Enfermedad de Gaucher	Transferencia génica ex vivo y trasplante autólogo de células CD34 +
Enfermedad de Gaucher	Transferencia mediada retroviral de ADNc para glucocerebrosidasa humana en hemocitoblastos hematopoyéticos
Pacientes asintomáticos infectados con VIH-1	Genes de VIH-1 codificadores de vector Retroviral Murino [VIH-IT(V)]
SIDA	Efectos de una forma trans dominante de gen rev en intervención de SIDA
Astrocitomas malignos pediátricos recurrentes	Transducción tumoral in vivo con gen de timidina cinasa de herpes simplex
Cancer avanzado	Transferencia génica de resistencia a fármacos múltiples humana (MDR, por sus siglas en inglés)
Tumores cerebrales	Transcripción de ADNc antisentido a base de episoma de factor I de crecimiento de tipo insulina
Cáncer de pulmón de células pequeñas	Células cancerosas transinfectadas con y que expresan gen de interleucina-2 (Estudio de fase I)
Cancer de mama (post-quimioterapia)	Transferencia mediada retroviral del gen MDR humano en hemocitoblastos hematopoyéticos (trasplante autólogo)
Tumores cerebrales pediátricos recurrentes	Transducción intra-tumoral con gen de la timidina cinasa y administración intravenosa de ganciclovir
Melanoma maligno	Inmunización con células de melanoma humano alogénico secretor de interleucina-2
Infección por VIH	Linfocitos autólogos transducidos con ribozima catalítica que escinde ARN de VIH-1 (Estudio de fase I)
Melanoma metastásico	Vacunas tumorales autólogas de ingeniería genética que producen interleucina-2
Carcinomatosis leptomenigeal	Tratamiento génico intratecal
Carcinoma de colon	Inyección con células tumorales irradiadas autólogas y fibroblastos genéticamente modificados para segregar interleucina-2
Enfermedad de Gaucher	Transferencia mediada por retrovirus de ADNc para glucocerebrosidasa humana en células de pacientes de repoblación de sangre periférica
Infección por VIH	Genes de VIH-IT(V) codificadores de vector Retroviral Murino (ensayo de Fase I/II de etiqueta abierta)

ES 2 401 190 T3

Melanoma avanzado (fase IV)	Inducción de inmunidad mediada por células contra antígenos asociados a tumores por estirpes celulares de melanoma alogénicas irradiadas letalmente B7-transfectadas (Estudio de fase I)
Carcinoma colorectal avanzado	Inmunoterapia por transferencia directa de genes en metástasis hepática (Estudio Fase 1)
Melanoma	Inmunoterapia adoptiva con células de ganglios linfáticos activadas imprimadas in vivo con células tumorales autólogas transducidas con gen de interleucina-4
Fibrosis quística	Transferencia mediada por liposomas catiónicos de gen CFTR en las vías respiratorias (Estudio Fase 1)
Fibrosis quística	Transferencia mediada por adenovirus de gen CFTR al epitelio nasal y seno maxilar
Neuroblastoma pediátrico	Inmunización con células de neuroblastoma transducidas de interferón γ (ex vivo) (Fase I)
Infección por VIH (gemelos idénticos)	Transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos singéneos (Fase I/II estudio piloto)
Enfisema	Expresión de un gen de alfa-1-antitripsina humana administrado de manera exógena en las vías respiratorias
Carcinoma de células renales metastásico	Inmunoterapia por transferencia génica directa en lesiones metastásicas (Estudio de fase I)
Melanoma maligno	Inmunoterapia por transferencia génica directa (Estudio de fase I)
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Modificación de expresión de oncogén y gen supresor de tumor (primero terapia antisentido; protocolo original homologado por RAC 9/15/92, pero después retirada homologada 12/03/93)
Cancer colorectal metastásico	Inmunización anti-tumor aumentada por polinucleótidos a antígeno carcinoembrionario humano (Fase I)
Artritis reumatoide	Transducción de gen antagonista de receptores de interleucina-1 para articulaciones humanas
Cáncer de mama (quimio-protección durante terapia)	Uso de Retrovirus modificados para introducir secuencias de resistencia a la quimioterapia en células hematopoyéticas normales (estudio piloto)
Anemia de Fanconi	Transferencia génica mediada retroviral del gen del grupo C de complemento de la anemia de Fanconi para progenitores hematopoyéticos
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Modificación de expresión de genes supresores de tumores e inducción de muerte celular programada con vector adenovirus que expresa tipo p53 natural y cisplatino
Glioblastoma	Inyección de células tumorales genéticamente modificadas para segregar interleucina-2 (Estudio de fase I)
Cancer	Inyección directa de tumores con fibroblastos autólogos de ingeniería para que contengan gen de interleucina-12

ES 2 401 190 T3

Carcinoma de próstata metastásico	Vacuna de cáncer de próstata transducida de gen de factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos humanos autólogos *(primer protocolo que se tiene que homologar bajo el procedimiento de revisión acelerada; ORDA = Oficina de Actividades de ADN Recombinante, por sus siglas en inglés)
Fibrosis quística (adultos con enfermedad leve)	Vector virus adeno-asociado para suministrar gen CFTR a células en nariz y pulmón (Estudio de fase I)
Cancer de mama metastásico	Infección in vivo con vector Retroviral diana de mama que expresa ARN antisentido de c-fox o antisentido de c-myc
Fibrosis quística	Administración repetida de adenovirus recombinante de replicación deficiente que contiene ADNc CFTR normal a las vías respiratorias del paciente.
Cáncer metastásico de mama (resistente al tratamiento o recurrente)	Sistema no vírico (a base de liposomas) para suministrar gen de interleucina-2 humano a células tumorales autólogas (estudio piloto)
Síndrome de Hunter Leve (muco-polisacaridosis tipo II)	Transferencia mediada retroviral del gen de idronato-2-sulfatasa a linfocitos
Enfermedad arterial periférica	Transferencia génica arterial para angiogénesis terapéutica
Tumor maligno del SNC avanzado	Uso de adenovirus recombinante (Estudio de fase I)
Mesotelioma avanzado	Uso de adenovirus recombinante (Estudio de fase I)

FIGURA 2

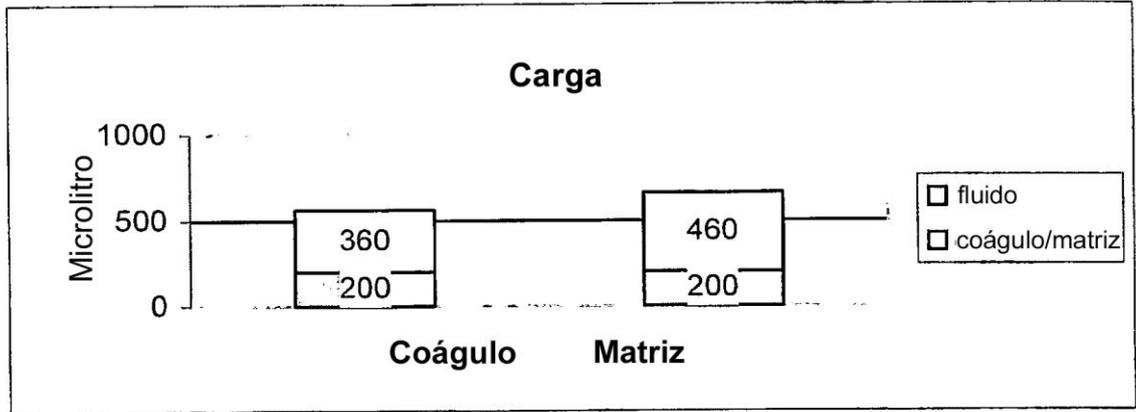


FIGURA 3

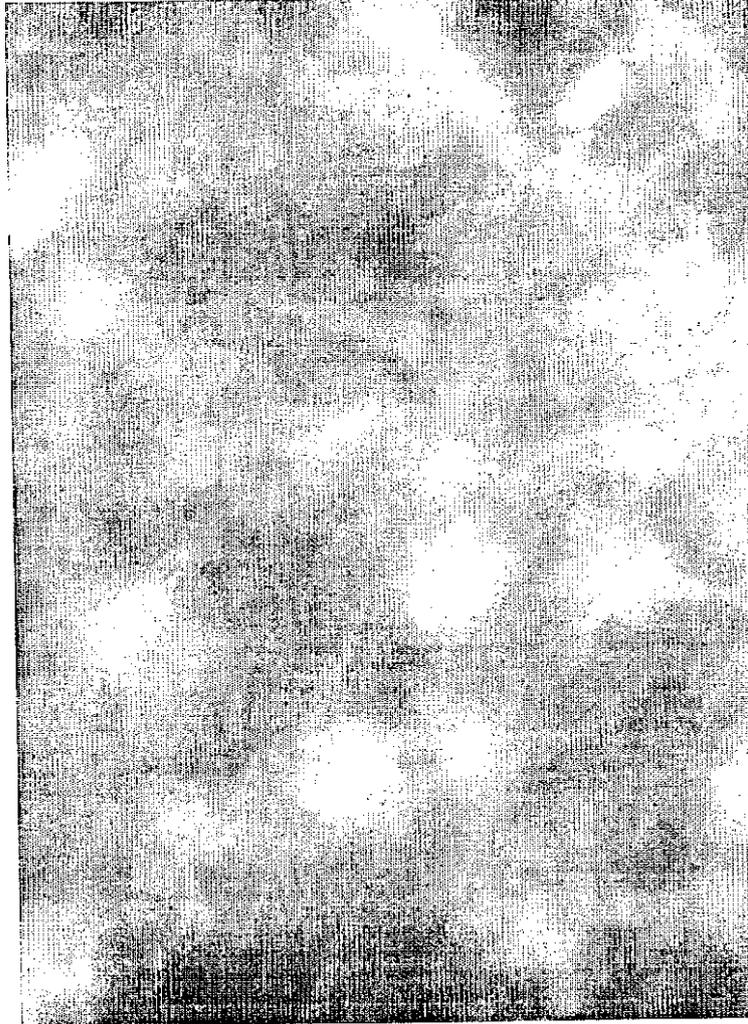


FIGURA 4

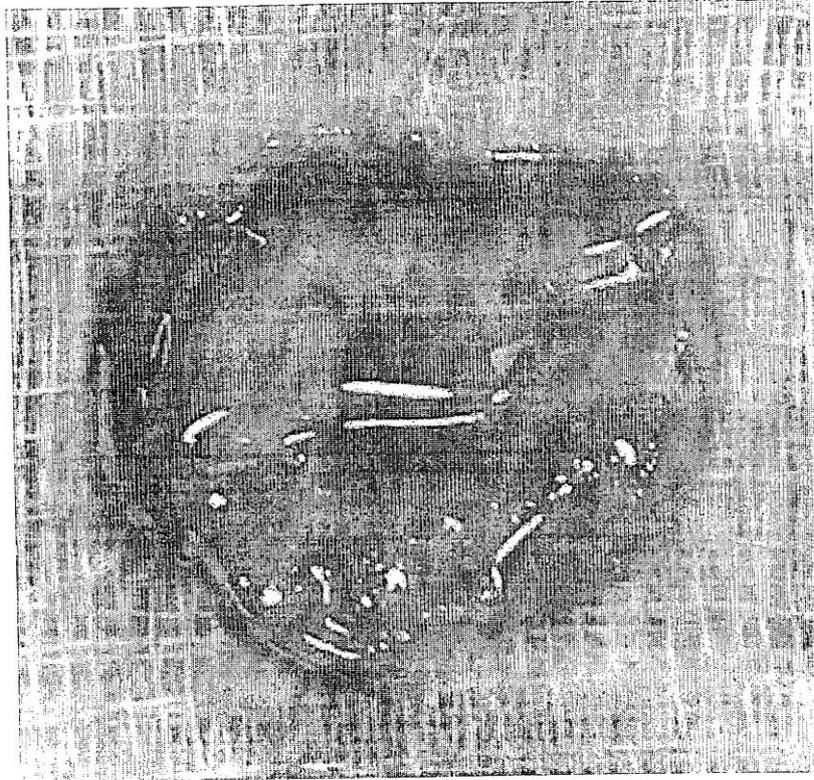


FIGURA 5a

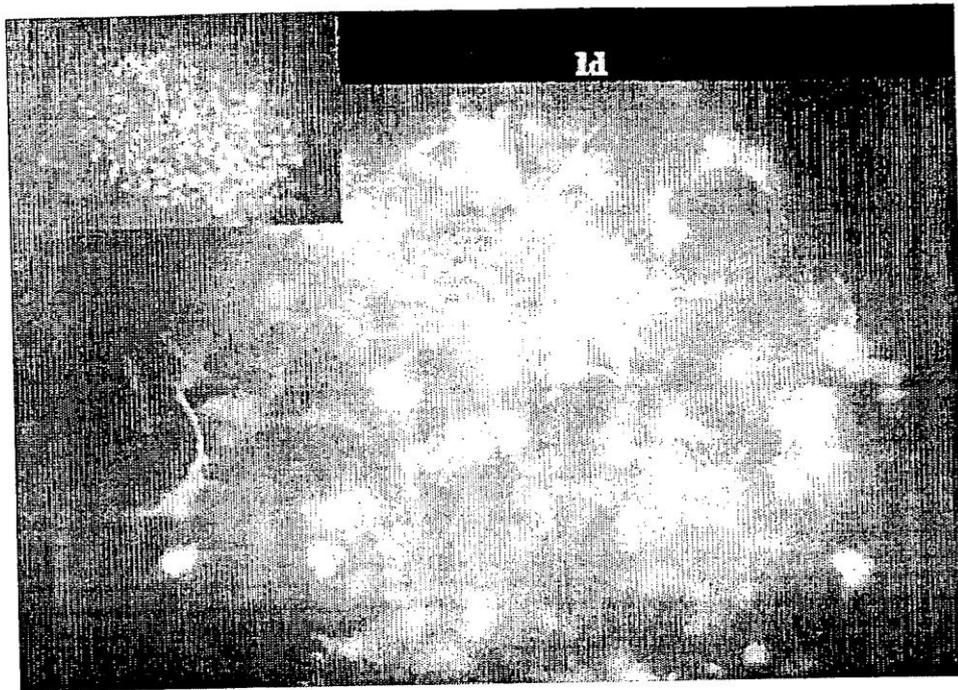


FIGURA 5b

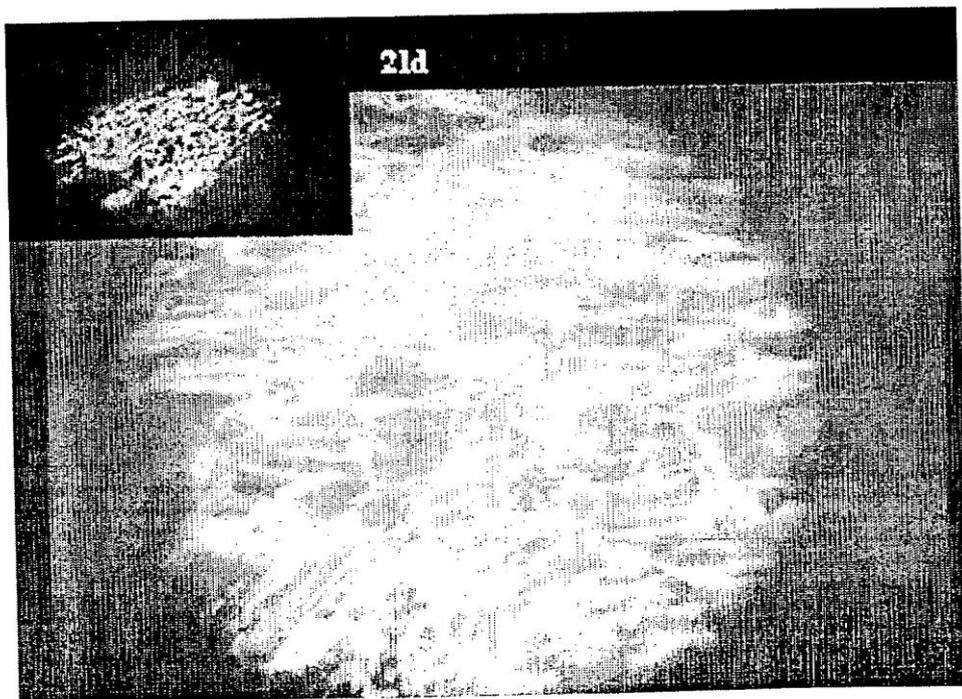


FIGURA 6

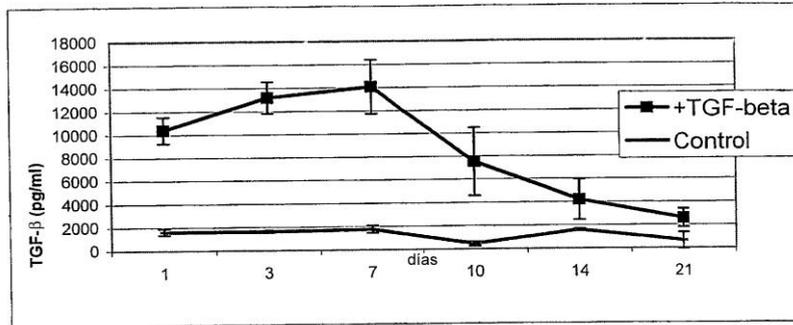


FIGURA 7

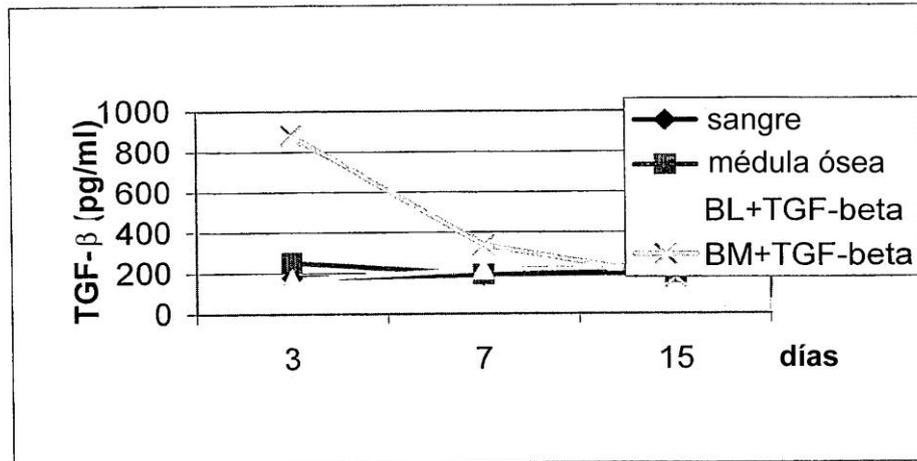


FIGURA 8

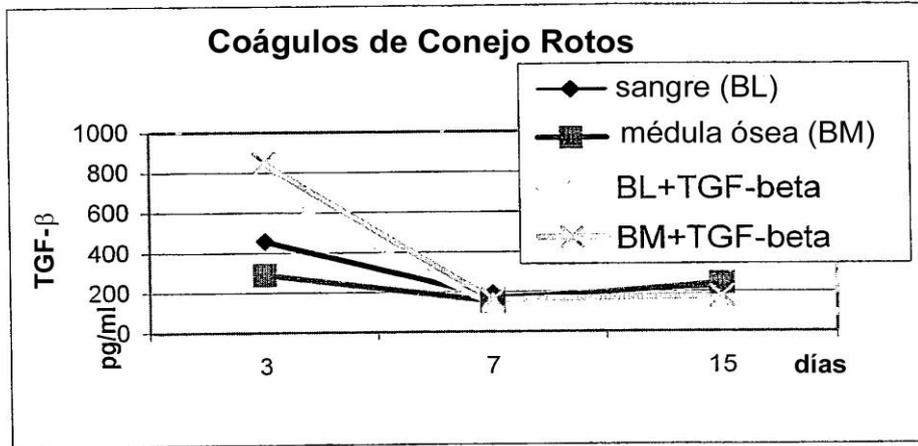


FIGURA 9

Infección de 293 células en Coágulo		
	BL %	BM %
6h	51	57
1d	46,7	44.2
3d	2?	82,6
7d	3,6	5,4

FIGURA 10

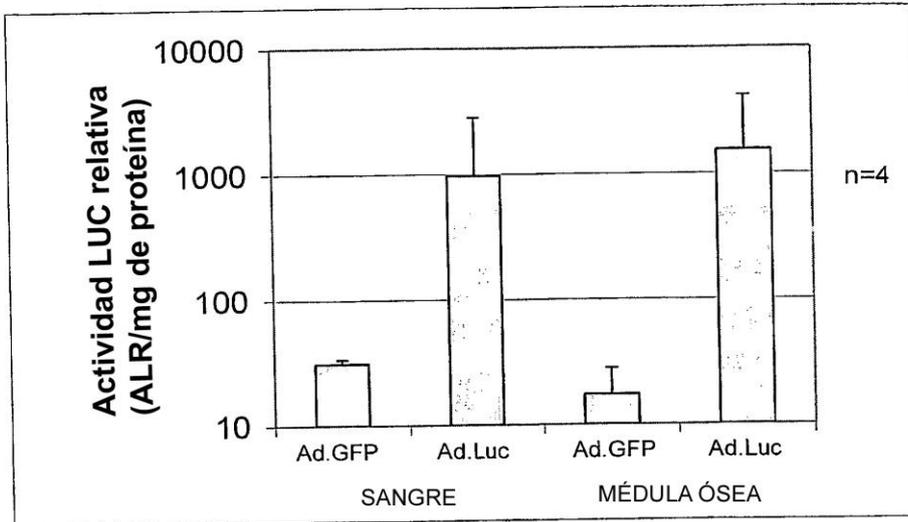


FIGURA 11

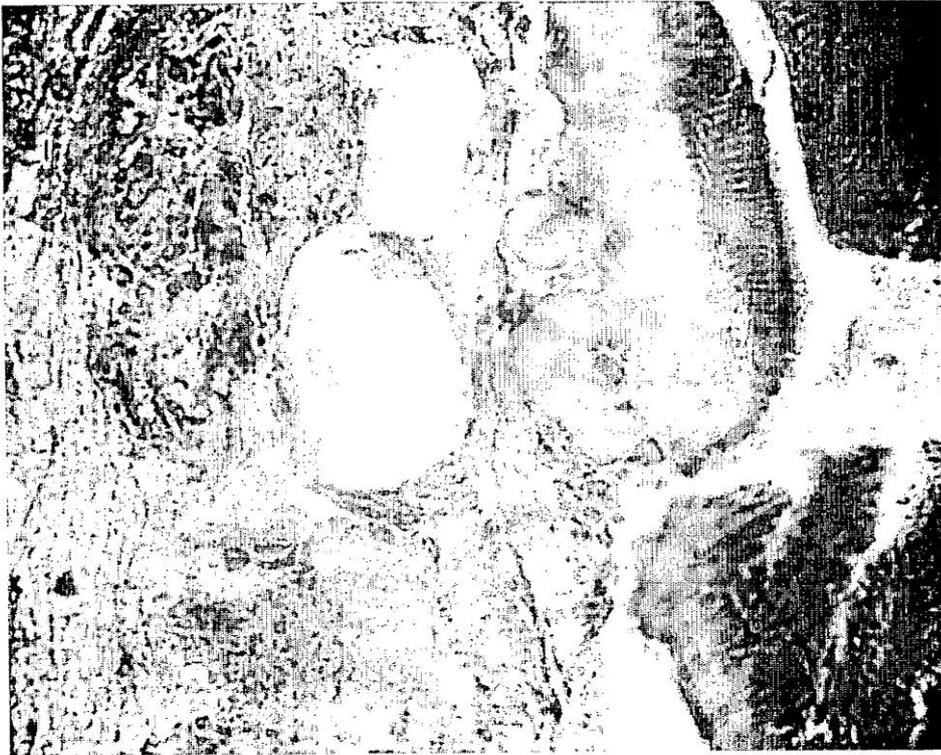


FIGURA 12

