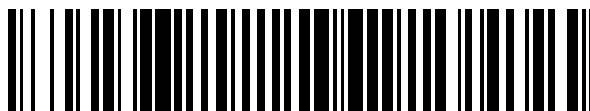


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 608**

51 Int. Cl.:

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2008 E 10163663 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2229948**

54 Título: **Blastocitos CD34 mesenquimales para uso en terapia génica de diabetes**

30 Prioridad:

24.05.2007 US 931622 P

14.11.2007 US 3050 P

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

23.04.2013

73 Titular/es:

**APCETH GMBH & CO. KG (100.0%)
MAX-LEBSCH-PLATZ 30
81377 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

**HUSS, RALF;
NELSON, PETER;
RAGGI, MATTHIAS y
STANGL, MANFRED**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 401 608 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

Blastocitos CD34 mesenquimales para uso en terapia génica de diabetes

Antecedentes de la invención

1. Campo de la Invención

- 5 A través de esta solicitud, se citan diversas publicaciones. La descripción de estas publicaciones, así como también de las solicitudes provisionales identificadas previamente, se utiliza para describir el estado más completo de la técnica a la que pertenece esta invención.

Los blastocitos son mediadores en la reproducción y transmisión de la información genética a generaciones celulares posteriores. Estos se pueden auto-renovar y generar progenie diferenciada. En años recientes se han hecho progresos en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen en las interacciones entre los blastocitos y sus nichos de tejido. Esto ha conducido a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares reguladores en la función de los blastocitos.

15 Aunque la terapia génica es aún un método experimental, la tecnología promete hacer un impacto en la salud humana. El alcance y definición de la terapia génica ha cambiado y se ha expandido en años recientes. Además de los trastornos genéticos correctamente heredados tal como fibrosis quística, hemofilia y otras enfermedades, también se han desarrollado métodos de terapia génica para combatir las enfermedades adquiridas tal como cáncer, SIDA, isquemia crónica vascular, osteoartritis, diabetes, enfermedad de Parkinson y Alzheimer.

Actualmente, la terapia génica de estirpe reproductora no se contempla debido a su naturaleza técnica y consideraciones éticas. Sin embargo, la terapia génica de células somáticas exclusivamente para el beneficio de un individuo (que no se puede pasar en generaciones sucesivas) es un foco principal de la investigación de blastocitos. Durante 15 años se ha hecho un esfuerzo de descripción inicial de transferencia génica exitosa en blastocitos hematopoyéticos de murino, a los primeros ensayos clínicos no ambiguamente exitosos en pacientes nacidos con inmunodeficiencia combinada ligada a x (SCID) y deficiencia de desaminasa adenosina (ADA) (Aiuti et al., 2002; Cavazzana-Calvo et al., 2000; Gaspar et al., 2004). Se exploran muchos aspectos de la terapia de blastocitos. Por ejemplo, se han utilizado vectores retrovíricos en muchas configuraciones para la transferencia de genes en los blastocitos para reparar genes incompletos o mutados. Estos incluyen severas deficiencias inmunes combinadas, anemia Fanconi y otras hemoglobinopatías (Herzog et al., 2006).

Un tema central en la ingeniería genética de los blastocitos es la metodología específica utilizada para introducir genes terapéuticos en las células progenitoras. Debido a que los retrovirus tienden a insertarse en los genes activos (se considera que la cromatina condensada se abre en estas regiones), se ha sugerido que su uso también puede aumentar el riesgo de cáncer (Young et al., 2006), debido a que la inserción de los factores retrovíricos cercanos a los genes implicados en la proliferación celular puede en teoría generar un blastocito precursor de cáncer. Sin embargo, el riesgo general de este tipo de evento es difícil de establecer. Ahora existen muchos ejemplos de éxito completo logrado en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD) en donde la actividad de oxidasa NADPH se restaura luego de la infusión de los blastocitos sanguíneos alterados genéticamente (Barese et al., 2004).

El requerimiento mínimo para la terapia génica productiva es la producción sostenida del producto génico terapéutico en el contexto biológico correcto con mínimos efectos colaterales perjudiciales. Para lograr este fin, la aplicación de los blastocitos en terapia genética requerirá el desarrollo de nuevas estrategias para modular la expresión terapéutica del gen, así como también métodos para el suministro eficiente de genes exógenos en los blastocitos. El control selectivo de la expresión terapéutica del gen al diferenciar los blastocitos dentro de un ambiente de tejido definido es un objetivo importante en la ingeniería de los blastocitos. Este método, por ejemplo, puede ayudar en el control de la diferencia de los blastocitos en linajes específicos, el mantenimiento de su estado no diferenciado para trasplante final, proliferación, y la regulación de la expresión de genes terapéuticos tal como genes suicidas, citoquinas o factores de crecimiento en ambientes de tejido definidos.

45 Resumen de la invención

Esta invención proporciona blastocitos CD34 genéticamente modificados, en donde cada uno de los blastocitos CD34 genéticamente modificados contiene un ácido nucleico exógeno que comprende (i) una región que codifica una proteína que mejora el crecimiento celular endotelial, cuya región se liga funcionalmente a (ii) un promotor específico de endotelio o combinación de promotor/mejorador para el uso en el tratamiento de un sujeto diabético o prediabético en donde la introducción de los blastocitos CD34 genéticamente modificados dentro del torrente sanguíneo del sujeto no está precedido, acompañado o seguido por mieloablación.

Otros objetos y características de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada considerado en conjunto con los dibujos que acompañan. Se entiende, sin embargo, que los dibujos se diseñan únicamente para propósitos de ilustración y no como una definición de los límites de la invención, para los que se puede hacer referencia a las reivindicaciones adjuntas. Se entiende adicionalmente que los dibujos no se grafican

necesariamente a escala y que, a menos que se indique otra cosa pretenden únicamente ilustrar conceptualmente las estructuras y procedimientos descritos aquí.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

5 Figura 1

Fila superior: expresión de insulina en un islote β de murino normal antes (izquierda) y después de tratamiento de aloxano (ALX) (derecha) con casi agotamiento de insulina completo. Fila inferior: tamaño de un islote β que produce insulina normal en diferente magnificación (20x; 40x); el tratamiento de islote β agotada de insulina después del tratamiento ALX con blastocitos negativos CD34 (SC) restaura completamente la producción de insulina con signos de hipertrofia (20x y 40x).

10

Figura 2

Células aisladas de páncreas de murino después de diabetes inducida por ALX y restauración SC de la producción de insulina. Los blastocitos negativos CD34 trasplantados se marcan con una proteína fluorescente verde expresada constitutivamente, y las células que producen insulina muestran una fluorescencia roja. No existe co-expresión de ambos marcadores, lo que sugiere que los blastocitos trasplantados no expresan insulina en sí mismos pero a diferencia facilitan la regeneración endógena.

15

Figura 3

Izquierda: Niveles de glucosa en sangre de los ratones después de tratamiento ALX sin trasplante SC (superior), con trasplante SC y sin corrección del nivel de glucosa en sangre (medio) y ratones con un nivel de glucosa en sangre normalizado después de trasplante SC (inferior). Derecha: Solo ratones que revelan la presencia de blastocitos en su páncreas (homogenizado para análisis FACS y detección de fluorescencia verde) (E3; círculo rojo) muestra un nivel de glucosa en sangre normalizado, que sugiere la función pivote de células trasplantadas en la corrección de la producción de insulina.

20

Figura 4

Presentación esquemática del desarrollo de un cáncer epitelial de un carcinoma in-situ en cáncer invasivo y la conexión al sistema de vaso sanguíneo endógeno. Los blastocitos negativos CD34 buscan un sitio de neoangiogenia como se demuestra aquí y por lo tanto se pueden utilizar como Caballo de Troya para suministrar agentes moduladores inmunes o citotóxicos.

25

Figura 5

Detección de células positivas RFP en tumores mamarios. Los blastocitos transfectados Tie2-RFP se diferencian de células endoteliales y transcriben el RFP. (A) Contrateñido con DAPI. (B) células positivas RFP que forman vasos.

30

Figura 6

Evolución de tumor reducida bajo tratamiento GCV. (A) Protocolo de aplicación GCV de blastocitos. La suspensión celular (día 0) y la solución GCV (día 5-8) respectivamente se aplican como se muestra. El aumento de peso corporal durante el tratamiento de ratones refleja la carga de tumor total cuando se involucran todas las mamas. El peso corporal se mide en el día 0 y 5 de cada ciclo de terapia y el día de disección. (B) Grupos de ratones, el tratamiento inicia en la semana 22, que muestra la desviación estándar y promedio. Los ratones se clasifican en un grupo de tratamiento y dos grupos de control. El primer grupo de control recibió 1xPBS en lugar de una suspensión de blastocitos y sin inyección de fármaco (línea punteada); el segundo grupo de control recibió una suspensión de blastocitos transfectada con Tie2-RFP pero no con GCV (línea punteada). El grupo de tratamiento recibió los blastocitos y GCV como se muestra en A, (línea sólida). (C) Grupos de tratamiento partiendo de la semana 18, desviación estándar y promedio.

35

40

Figura 7

Edad de disección. Grupo de ratones de tratamiento vs. control iniciando tratamiento en la semana 22. Observe la diferencia significativa en tiempo para lograr tamaños de tumor similares (ver tabla 1) y tiempo de vida prolongado de ratones después de tratamiento exitoso con vehículos MSC TK y GCV.

45

Figura 8

Modelo de reaparición de tumor: El tumor de mama principal se extirpa a las 18 semanas y se inicia tratamiento MSC / tk durante reaparición de tumor.

50

Figura 9

MSC que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) busca el tumor pancreático en crecimiento. En experimentos paralelos, el MSC diseñado por ingeniería expresa la proteína fluorescente roja (RFP) bajo el control del promotor/mejorador Tie2 que muestra una expresión directa en la vasculatura del tumor. Fila superior: MSC diseñado por ingeniería que expresa GFP bajo el control del promotor CMV busca el tumor luego de inyección i.v.. Fila inferior: MSC diseñado por ingeniería que expresar RFP bajo el control de Tie2.

Figura 10

El efecto del tratamiento tk/GCV luego se evalúa después de la inyección de células C57Bl/6 MSC (Tie2-tk).

El régimen de tratamiento es esencialmente como se describe para el estudio de cáncer de mama. Se inyectan 500,000 células en el día uno, seguido por tres días en donde se permiten vincular células al tumor en crecimiento y diferenciar en células que expresan Tie2 similares a células endoteliales expresando así el gen suicida TK. Luego se tratan los ratones durante cuatro días con GVC. Después de un día de descanso, el ciclo se repite para la duración del experimento.

Figura 11

La Figura muestra un ejemplo adicional del efecto de tratamiento del tumor pancreático ortotópico con blastocitos terapéuticos junto con GCV. Una reducción dramática en el tamaño de tumor (50%) así como también se observa carcinosis peritoneal reducida en comparación con el grupo no tratado.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas actuales

Términos

En esta solicitud, se utilizan ciertos términos que tienen los significados establecidos como sigue.

Como se utiliza aquí, "curación de heridas agudas" incluirá, sin limitación, un proceso celular y molecular que se activa para reparar el tejido en el momento de lesión bajo el control de señales biológicas y mecánicas. La curación exitosa de heridas agudas ocurre cuando se encuentra un balance dinámico entre las cargas puestas a través de una matriz provisional y la retroalimentación de las células reparadas.

Como se utiliza aquí, una célula es "alogénica" con respecto a un sujeto si ésta o cualquiera de sus células precursoras son de otro sujeto de la misma especie.

Como se utiliza aquí, una célula es "autóloga" con respecto a un sujeto si ésta o sus células precursoras son del mismo sujeto.

Como se utiliza aquí, "Blastocito mesenquimal CD34" significará un blastocito mesenquimal que carece de CD34 en su superficie. Los blastocitos mesenquimales CD34, y métodos para aislarlos, se describen, por ejemplo, en Lange C. et al., Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal células in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. J. Cell Physiol. 2007, Abr. 25 [Epub ahead of print].

Como se utiliza aquí, "proliferación celular" significará la división, crecimiento en tamaño y/o la diferenciación de células.

Como se utiliza aquí, "célula endotelial" incluirá, sin limitación, una célula que forma el recubrimiento interno de la íntima en los vasos sanguíneos durante o después de un proceso llamado angiogenia. Los factores que controlan este proceso se denominan factores angiogénicos. Las células endoteliales también actúan con glóbulos circulantes por medio de interacciones de receptor-ligando.

Como se utiliza aquí, un "promotor específico de endotelio o combinación de promotor/mejorador" es un promotor o combinación de promotor/ mejorador, respectivamente, que cuando en una célula endotelial en o en proximidad con células endoteliales, provoca la expresión de una región codificante ligada funcionalmente más de lo que lo haría en cualquier otro medio en el sujeto.

Como se utiliza aquí, un ácido nucleico es "exógeno" con respecto a una célula si se ha introducido artificialmente dentro de esta célula o cualquiera de las células precursoras de esta célula.

Como se utiliza aquí, un blastocito mesenquimal se "modifica genéticamente" si éste o cualquiera de sus células precursoras han introducido artificialmente el ácido nucleico allí. Los métodos para generar blastocitos genéticamente modificados incluyen el uso de transferencia génica vírico o no vírico (por ejemplo, transferencia de plásmido, integrasa de fago, transposones, AdV, AAV y Lentivirus).

Como se utiliza aquí, "inmediatamente antes de" un evento incluye, por ejemplo, dentro de 5, 10 o 30 minutos antes de, o 1, 2, 6, 12 o 24 horas antes del evento. "Inmediatamente después de" un evento incluye, por ejemplo, dentro de 5, 10 o 30 minutos después, o 1, 2, 6, 12 o 24 horas después del evento.

Como se utiliza aquí, "integración" de un ácido nucleico dentro de una célula puede ser transitoria o estable.

Como se utiliza aquí, "introducir" blastocitos mesenquimales CD34 "en el torrente sanguíneo del sujeto" incluirá, sin limitación, introducir dichas células dentro de una de la venas del sujeto o arterias por medio de inyección. Dicha administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces, y/o durante uno o más periodos extendidos. Se prefiere una inyección única, pero pueden ser necesarias inyecciones repetidas durante el tiempo (por ejemplo, trimestralmente, semestralmente o anualmente) en algunos casos. Dicha administración también se realiza preferiblemente utilizando una mezcla de blastocitos mesenquimales CD34 y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, 0.01-0.1 M y preferiblemente 0.05 M regulador de fosfato o 0.8% de solución salina. Adicionalmente, dichos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, y emulsiones. Ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones y suspensiones, que incluyen solución salina y medio regulador. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluido y nutrientes, regeneradores de electrolitos tal como dextrosa de Ringer, aquellos con base en dextrosa de Ringer, y similares. Los fluidos utilizados comúnmente para administración i.v. se encuentran, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., p. 808, Lippincott Williams & Wilkins (2000). También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tal como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, y similares.

Como se utiliza aquí, "microcirculación" incluirá, sin limitación, el flujo sanguíneo desde arteriolas hasta capilares o sinusoides hasta vénulas. Bajo ciertas circunstancias, el término microcirculación también se aplica a vasos linfáticos.

Como se utiliza aquí, "mieloablación" significará el agotamiento severo o completo de células de médula ósea provocado por, por ejemplo, la administración de altas dosis de quimioterapia o terapia de radiación. La mieloablación es un procedimiento estándar y se describe, por ejemplo, en Deeg HJ, Klingemann HG, Philips GL, A Guide to Bone Marrow Transplantation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992.

Como se utiliza aquí, un blastocito mesenquimal es "no modificado genéticamente" si ninguno ni cualquiera de las células precursoras han introducido artificialmente ácido nucleico allí.

Como se utiliza aquí, "ácido nucleico" significará cualquier molécula de ácido nucleico, que incluye, sin limitación, ADN, ARN e híbridos de los mismos. Los ácidos nucleicos base que forman las moléculas de ácido nucleico pueden ser las bases A, C, G, T y U, así como también sus derivados. Los derivados de estas bases se conocen bien en la técnica, y se ejemplifican en PCR Systems, Reagents and Consumables (Perkin Elmer Catalogue 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, N.J., USA).

Como se utiliza aquí, un "polipéptido" significa un polímero de residuos de aminoácido. Un "péptido" normalmente se refiere a un polipéptido más corto (por ejemplo, 10 residuos de aminoácido), y una "proteína" normalmente se refiere a un polipéptido mayor (por ejemplo, 200 residuos de aminoácido). Los residuos de aminoácido pueden ser análogos químicos o que ocurren en forma natural o análogos químicos de los mismos. Los polipéptidos también pueden incluir modificaciones tal como glucosilación, unión de lípidos, sulfatación, hidroxilación, y ribosilación ADP.

Como se utiliza aquí, un sujeto "prediabético" incluye, sin limitación, un sujeto que tiene el complejo de síntomas que indican que desarrollará probablemente diabetes dependiente de insulina. Los sujetos prediabéticos tienen niveles de insulina normales que los mayores.

Como se utiliza aquí, un "promotor" incluye, sin limitación, endotelina-1 promotor, promotor pre-proendotelina-1, promotor myoD, promotor NeuroD, promotor CD20, promotor de insulina, promotor Pdx-1, promotor VEGF, promotor VEGF-R, promotor SCL, promotor Sca1, promotor BDNF(-R), promotor NGF(-R) y promotor EGF-R.

Como se utiliza aquí, "promotor/mejorador" incluye, sin limitación, promotor mejorador Tie2, y promotor Flk1 y mejorador intrónico.

Como se utiliza aquí, en "proximidad con" un tejido incluye, por ejemplo, dentro de 1 mm del tejido, dentro de 0.5 mm del tejido y dentro de 0.25 mm del tejido.

Como se utiliza aquí, "sujeto" significará cualquier animal, tal como un humano, primate diferente a humano, ratón, rata, conejillo de indias o conejo.

Como se utiliza aquí, un "número terapéuticamente efectivo de blastocitos CD34" incluye, sin limitación, las siguientes cantidades y rangos de cantidades: (i) de 1×10^2 a 1×10^8 células/kg de peso corporal; (ii) de 1×10^3 a 1×10^7 células/kg de peso corporal; (iii) de 1×10^4 a 1×10^6 células/kg de peso corporal; (iv) de 1×10^4 a 1×10^5 células/kg de peso corporal; (v) de 1×10^5 a 1×10^6 células/kg de peso corporal; (vi) de 5×10^4 a 0.5×10^5 células/kg de peso corporal; (vii) 1×10^3 células/kg de peso corporal; (viii) 1×10^4 células/kg de peso corporal; (ix) 5×10^4

células/kg de peso corporal; (x) 1×10^5 células/kg de peso corporal; (xi) 5×10^5 células/kg de peso corporal; (xii) 1×10^6 células/kg de peso corporal; y (xiii) 1×10^7 células/kg de peso corporal. Los pesos corporales humanos previstos incluyen, sin limitación, aproximadamente 50 kg, aproximadamente 60 kg; aproximadamente 70 kg; aproximadamente 80 kg, aproximadamente 90 kg; y aproximadamente 100 kg. Estos números se basan en experimentos pre-clínicos de animal y protocolos estándar del trasplante de blastocitos hematopoyéticos CD34+. Las células mononucleares (que incluyen células CD34+) usualmente contienen entre 1:23,000 a 1:300,000 células CD34.

Como se utiliza aquí, "tratar" un sujeto afligido con un trastorno significará disminuir, detener o reversar la evolución del trastorno. En la realización preferida, tratar un sujeto afligido con un trastorno significa reversar la evolución del trastorno, idealmente al punto de eliminar el trastorno propiamente dicho. Como se utiliza aquí, aliviar un trastorno y tratar un trastorno son equivalentes.

Como se utiliza aquí, una célula es "xenogénica" con respecto a un sujeto su está o cualquiera de sus células precursoras que son de otro sujeto de una especie diferente.

Realizaciones de la invención

Esta invención proporciona blastocitos CD34 genéticamente modificados, en donde cada uno de los blastocitos CD34 genéticamente modificados contiene un ácido nucleico exógeno que comprende (i) una región que codifica una proteína que mejora el crecimiento celular endotelial, cuya región se liga funcionalmente a (ii) un promotor específico de endotelio o combinación de promotor/mejorador para el uso de tratar un sujeto diabético o prediabético en donde la introducción de los blastocitos CD34 genéticamente modificados dentro del torrente sanguíneo del sujeto no está precedido, acompañado o seguido por mieloablación.

En una realización preferida, el sujeto es pre-diabético, ya sea para diabetes tipo I o diabetes tipo II. En otra realización, el sujeto es diabético, afligido ya sea con diabetes tipo I o diabetes tipo II.

Se prevén para esta realización numerosas combinaciones de promotor/mejorador y de proteínas que mejoran el crecimiento celular endotelial. En una realización, la combinación de promotor/mejorador es el promotor/mejorador Tie2 y la proteína que mejora el crecimiento celular endotelial es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) asociado con angiogenia.

En las realizaciones anteriores que emplean blastocitos mesenquimales CD34 genéticamente modificados, el sujeto tratado puede ser cualquier sujeto. En la realización preferida, el sujeto es humano. Adicionalmente, en los métodos de sujetos que emplean blastocitos mesenquimales CD34 genéticamente modificados, los blastocitos mesenquimales CD34 pueden ser alogénicos, autólogos o xenogénicos con respecto al sujeto, a menos que se indique o esté implicado de otra forma.

En las realizaciones que emplean blastocitos mesenquimales CD34 genéticamente modificados, los genes exógenos se expresan, es decir, "se encienden", cuando los blastocitos (i) están en proximidad con las células apropiadas en tejido objetivo, (ii) diferenciado, y/o (iii) fusionado con las células apropiadas en el tejido objetivo.

Las diversas proteínas y secuencias reguladoras utilizadas en esta invención se pueden obtener fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, se muestra especificidad de célula endotelial del promotor Tie2 mejorador en Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1997 94:3058-63. Se puede utilizar el gen de herpes HSV TK - V00467 para la quinasa timidina (ATP:timidina 5' fosfotransferasa, e.c. 2.7.1.21) (cadena CL101 tipo 1).

Esta invención se entenderá mejor mediante referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero aquellos expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados solo son ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen adelante.

Detalles Experimentales

Parte I

Blastocitos negativos CD34 transgénicos construidos con ingeniería genética para suministro terapéutico de genes

Sinopsis

Los métodos de blastocitos mesenquimales y de terapia génica son promisorios para el desarrollo de nuevas herramientas para tratar muchas enfermedades letales. La vinculación de terapia de blastocitos con terapia génica selectiva mejora las opciones terapéuticas para la regeneración o reemplazo de células enfermas o faltantes. La expresión de gen específica de tejido en el contexto de diferenciación de CD34v negativo, in-vitro adherente del crecimiento de blastocitos se utiliza para generar células progenitoras negativas CD34 transgénicas, que conducirán a selectividad de las células e inducibilidad de la expresión de gen también por razones de seguridad. Se detallan las tecnologías de suministro de genes víricos y no víricos como técnicas para la modulación de la expresión de gen

en el contexto de reclutamiento y diferenciación de los blastocitos. Se describen las aplicaciones clínicas potenciales para esta nueva estrategia terapéutica, exponiendo las células progenitoras transgénicas al cáncer o sitio de regeneración de tejido para inducir terapia anti-neoplásica o promover el remodelamiento de tejido y la curación de heridas. Las células progenitoras transgénicas sirven como vehículo de suministro de gen potente.

5 Blastocitos mesenquimales como vehículos de suministro de gen

Los blastocitos ofrecen el potencial de proporcionar terapias celulares para enfermedades que son refractarias a otros tratamientos. Para cada tipo de blastocito el objetivo final es igual: la célula debe expresar un repertorio específico de genes, modificando por lo tanto la identidad celular para mantener, reemplazar, o rescatar un tejido particular. Para ayudar a soportar la diferenciación en el ambiente específico de tejido se han hecho intentos para modificar la "programación nuclear" de los blastocitos.

10 Los blastocitos multipotentes, los blastocitos mesenquimales y las células progenitoras de adulto multipotentes (MAPC) representan poblaciones de blastocitos promisorias ya que son capaces de diferenciar a lo largo de diferentes linajes. Estos representan los "motores celulares" que impulsan la renovación de tejidos de mamífero adulto. Estas células se dividen continuamente a lo largo de su vida para producir células de nueva progenie que experimentan un programa de diferenciación y maduración para reemplazar las células más viejas de tejidos muertos. El mismo programa de recambio de células es en algunos casos para proporcionar una fuente de células para la reparación y regeneración de tejidos de adulto. El potencial regenerativo de los diferentes tipos de blastocitos resalta el interés actual para adaptar estas células a aplicaciones en terapia de reemplazo celular.

20 Las fuentes potenciales de blastocitos para terapia incluyen médula ósea, sangre periférica, SNC, hígado, páncreas, músculo, piel, pulmón, intestino, corazón y grasa (Koerbling M, Estrov Z, Adult stem cells for tissue repair - anew therapeutic concept?. NEJM 2003 349: 570-582). Para aplicación clínica las fuentes de blastocitos deben ser fácilmente accesibles y se cosechan fácilmente con riesgo mínimo para el paciente y proporcionan células abundantes. A este respecto el tejido graso representa una fuente de tejido promisorio. (blastocitos derivados de tejido adiposo para la regeneración del tejido dañado de Parker M, Adam K, Expert Opin Biol Therap, 2006, 567-568). Los blastocitos derivados de tejido adiposo y los blastocitos derivados de médula ósea comparten cinéticas de crecimiento similares, características con respecto a senescencia celular, eficiencia de transducción de gen, expresión del marcador de superficie CD y perfiles de transcripción de gen (Cells Tissues Organs. 2003; 174 (3) :101-9. La comparación de células multi-linaje de tejido adiposo humano y médula ósea. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH, Mol Biol Cell. 2002 Dec; 13(12):4279-95. El tejido humano adiposo es una fuente de blastocitos multipotentes. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH).

35 Los blastocitos derivados de diferentes fuentes también se evalúan como vehículos potenciales para terapia específica de gen y célula contra la enfermedad. Su potencial de auto-renovación alta los hace candidatos promisorios para la restauración o reemplazo de sistemas de órgano y/o el suministro de productos de gen. Aunque las células progenitoras pueden mostrar buena proliferación y diferenciación potencial *in vitro*, aún se tienen que definir sus propiedades biológicas *in vivo*. Los blastocitos expandidos *in vitro* representan poblaciones heterogéneas que incluyen múltiples generaciones de progenie celular mesenquimal (estromal), que carecen de expresión de más diferenciación de marcadores como CD34. Estas poblaciones pueden haber retenido una proliferación potencial limitada y responsabilidad para diferenciación terminal y maduración a lo largo de los linajes mesenquimales y no mesenquimales. Esperamos en el futuro mejores marcadores para poblaciones de blastocitos multipotentes que mejorarán la capacidad de distinguir estos blastocitos de otras poblaciones de células progenitoras.

Promotores específicos de tejido utilizados para suministrar expresión terapéutica de gen en el contexto biológico correcto.

45 La terapia mediada por blastocitos finalmente implica reprogramación nuclear – la alteración de los patrones de expresión de gen únicos para los tipos celulares en diversos tejidos y órganos. En un número de enfermedades de blastocitos heredadas, un efecto genético imparte una desventaja de supervivencia a la población de blastocitos afectada. En estas enfermedades, el trasplante de una población de blastocitos "correcta" experimenta selección *in vivo espontánea en la ausencia* de cualquier presión selectiva exógenamente aplicada. Por ejemplo, en introducción SCID ligada a X de un transgen terapéutico confiere una proliferación continua y ventaja de supervivencia para la población celular transducida (Neff et al., 2006). Sin embargo, los efectos de selección similares *in vivo* son usualmente no directamente posibles en la mayor parte de enfermedades. En las configuraciones en donde una expresión del gen terapéutico no confiere una ventaja de supervivencia, un segundo gen seleccionable, idealmente bajo regulación farmacológica, se puede incorporar dentro del vector. (Tirona and Kim, 2005). Los sistemas que permiten la selección farmacológicamente regulada incluyen interacción proteína-proteína forzada reversible utilizando los así llamados "inductores químicos de dimerización" (CID). Estos sistemas se basan en dos componentes. El primero es un ligando o fármaco, y el segundo es una proteína de fusión que combina un dominio de proteína de unión a ligando y un dominio efector (usualmente la proporción intracelular de un receptor del factor de crecimiento). El dominio efector se activa mediante la unión de fármaco con conduce a la dimerización de la proteína. La fusión de señalización así sirve como un interruptor que se enciende en la presencia del CID y se apaga luego del retiro de CID. La incorporación de los sistemas como estos en una población de blastocitos puede permitir

el control dependiente de fármaco de proliferación de la población celular transducida (Neff et al., 2006; Neff and Blau, 2001).

5 El uso de los blastocitos como vehículos de suministro para genes terapéuticos se puede observar para ofrecer una serie de ventajas. Los blastocitos frecuentemente se vinculan activamente a tejidos dañados cuando experimentan diferenciación durante la reparación del tejido. Por ejemplo las células progenitoras derivadas de médula ósea CD34+ que contribuyen a la reparación de tejido mediante diferenciación en células endoteliales, células vasculares de tejido liso, células hematopoyéticas, y posiblemente otros tipos celulares. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales las células progenitoras circulantes albergan para remodelar los tejidos permanecen no claros. Jin et al. han demostrado que la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) puede promover el mecanismo de búsqueda para hacer circular las células progenitoras hacia los ligandos $\alpha 4\beta 1$ VCAM y la fibronectina celular se expresa en neovascularización de remodelamiento activo. Se muestran células progenitoras que expresan integrina $\alpha 4\beta 1$ que buscan sitios de neovascularización de tumor activos pero no a tejidos normales. Los antagonistas de integrina $\alpha 4\beta 1$, pero no otras integrinas, bloquean la adhesión de estas células al endotelio y resultan en tipos celulares diferenciados. (Jin et al, 2006)

15 Además de las integrinas, las quimioquinas y sus receptores también parecen cumplir funciones centrales en la búsqueda específica de tejido de blastocitos. Sobre la base de su perfil de expresión del receptor de quimioquina, se predice que los MSC CD34 buscan órganos linfáticos secundarios (CCR7), piel (CCR4, CCR10), intestino delgado (CCR10), y glándulas salivares (CCR10). Después de marcar transitoriamente el MSC CD34 con CMFDA o los plásmidos de expresión de proteína fluorescente verde establemente introducidos (GFP), las células se inyectan en ratones saludables singéneos y la distribución del tejido de las células se determina tres y siete días después. De manera interesante, los blastocitos no buscan de nuevo la médula ósea pero se encuentra que migran a los órganos linfáticos secundarios, glándulas salivares, intestino y piel de acuerdo con su perfil de expresión del receptor de quimioquina.

25 Dado que los blastocitos pueden mostrar una migración selectiva a diferentes microambientes de tejido en configuraciones normales así como también de enfermedad, el uso de promotores específicos de tejido vinculados a la ruta de diferenciación iniciada en los blastocitos vinculados en teoría se puede utilizar para impulsar la expresión selectiva de genes terapéuticos solo dentro de un contexto biológico definido. Los blastocitos que se vinculan a otros nichos de tejido, pero no experimentan el mismo programa de diferenciación, no deben expresar el gen terapéutico. Este método permite un grado significativo de control potencial para la expresión selectiva del gen terapéutico dentro de un microambiente definido y se ha aplicado exitosamente para regular la expresión terapéutica del gen durante neovascularización.

35 Se ha caracterizado un gran número de promotores para su expresión específica de tejido. Se puede encontrar una buena fuente para esta información en la literatura de transgen, o por ejemplo en las diversas bases de datos que enumeran la actividad del promotor específico de tejido para la expresión de los transgenes CRE utilizados para dirigir los modelos de eliminación de gen objetivo CRE/Lox específico de tejido en ratones (por ejemplo: <http://www.mshri.on.ca/nagy/Creworks.htm>). Se pueden introducir promotores que se regulan selectivamente en el contexto de inflamación o neovascularización. A este respecto el promotor Tie2-, promotor Flk1 y mejorador intrónico, promotor endotelina-1 y el promotor pre-proendotelina-1 se han estudiado para expresión específica endotelial (Huss et al., 2004). La aplicación de genes indicadores específicos y nuevas técnicas de formación de imágenes se pueden utilizar para definir la expresión específica de tejido del promotor candidato dentro del contexto de trasplante de blastocitos. Otras opciones con respecto al suministro de genes incluye la aplicación de una señal en el sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para la expresión de múltiples genes de un promotor único (Jackson, 2005), por ejemplo, un gen terapéutico en conjunto con un gen indicador se puede utilizar para seguir mejor la distribución de la expresión del gen terapéutico en un contexto experimental.

45 De manera importante, muchos promotores pueden mostrar "escape" de expresión en otros tipos de tejido o una expresión basal de menor nivel en las células diseñadas por ingeniería. La ingeniería del promotor es una nueva tecnología que puede permitir al promotor "sintonizar" especificidad para limitar la actividad cruzada de tejido permitiendo así una expresión más restrictiva a los tipos celulares específicos (Fessele et al., 2002; Werner et al., 2003).

50 Métodos de suministro de gen

Los diversos métodos de suministro de gen que se aplican actualmente a la ingeniería de blastocitos incluyen vectores víricos y no víricos, así como también métodos de transfección biológicos y químicos. Los métodos pueden producir expresión de gen estable o transitoria en el sistema utilizado.

Sistemas de suministro de gen vírico

55 Debido a su alta eficiencia de transfección, se han aplicado ampliamente virus genéticamente modificados para el suministro de genes en los blastocitos.

Vectores de virus de ADN

(i) Adenovirus

Los adenovirus son virus de hebra doble, sin envoltura e icosaédricos que contienen el genoma vírico 36 kb (Kojaoghlanian et al., 2003). Sus genes se dividen en genes tempranos (E1A, E1B, E2, E3, E4), retrasados (IX, IVa2) y tardíos principales (L1, L2, L3, L4, L5) dependiendo de si ocurre su expresión antes o después de replicación del ADN. Hasta la fecha, se han descrito 51 serotipos de adenovirus humano que pueden infectar y replicar en un amplio rango de órganos. Los virus se clasifican en los siguientes subgrupos: A – induce tumor con alta frecuencia y corta latencia, B – son débilmente oncogénicos, y C – no son oncogénicos (Cao et al., 2004; Kojaoghlanian et al., 2003).

Estos virus se han utilizado para generar una serie de vectores para ingeniería celular de transferencia de gen. La regeneración inicial de los vectores de adenovirus se producen al eliminar el gen E1 (requerido para replicación vírica) generando un vector con una capacidad de clonación 4kb. Una eliminación adicional de E3 (responsable de respuesta inmune anfitriona) permite una capacidad de clonación 8kb (Bett et al., 1994; Danthinne and Imperiale, 2000; Danthinne and Werth, 2000). La segunda generación de los vectores se produce para eliminar la región E2 (requerido para aplicación vírica) y/o la región E4 (participando en la inhibición de apoptosis de célula anfitriona) en conjunto con eliminaciones E1 o E3. Los vectores resultantes tienen una capacidad de clonación de 10-13 kb (Armentano et al., 1995). La tercera generación de vectores "sin genes originales" se produce mediante eliminación de la secuencia vírica completa con la excepción de repeticiones terminales invertidas (ITR) y las señales de empaque de acción cis. Estos vectores tienen una capacidad de clonación de 25 kb (Kochanek et al., 2001) y han retenido su alta eficiencia de transfección en células en división y en reposo.

De manera importante, los vectores de adenovirus no se integran normalmente dentro del genoma de la célula anfitriona, pero muestran eficacia para el suministro transitorio de gen en blastocitos adultos. Estos vectores tienen una serie de ventajas y desventajas. Una ventaja importante es que se pueden amplificar en títulos mayores y pueden infectar un amplio rango de células (Benihoud et al., 1999; Kanerva and Hemminki, 2005). Los vectores son fáciles de manipular de manera general debido a su estabilidad en diversas condiciones de almacenamiento. El adenovirus tipo 5 (Ad5) se ha utilizado exitosamente en el suministro de genes en blastocitos humanos y de ratón (Smith-Arica et al., 2003). La carencia de integración de adenovirus dentro del material genético de la célula anfitriona pueden en muchos casos parecer como una desventaja, cuando su uso permite solo la expresión transitoria del gen terapéutico.

Por ejemplo en un estudio para evaluar la capacidad de los blastocitos mesenquimales para experimentar condrogenia cuando se suministran TGF-beta y proteína-2 morfogénica ósea (BMP-2) mediante expresión mediada adenovírica, se encuentra que la condrogenia se correlaciona cercanamente con el nivel y duración de las proteínas transitoriamente expresadas. La expresión del transgen en todos los agregados es altamente transitoria, lo que muestra una reducción marcada después de 7 días. Se inhibe la condrogenia en agregados modificados para expresar >100 ng/ml TGF-beta o BMP-2; sin embargo, esto se debe parcialmente al efecto inhibidor de exposición a altas cargas adenovíricas (Mol Ther. 2005 Aug; 12(2):219-28. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, Betz O, Johnstone B, Evans CH, Ghivizzani SC.) En un segundo modelo utilizan blastocitos derivados de tejido adiposo de rata transducidos con adenovirus que llevan el gen de la proteína 7 morfogénica ósea humana recombinante (BMP-7) que muestra resultados promisorios para una fuente autóloga de blastocitos para terapia génica BMP. Sin embargo, la actividad evaluada al medir la fosfatasa alcalina *in vitro* es transitoria y alcanza un pico en la semana 8. Así los resultados son similares a aquellos encontrados en el modelo de condrogenia (Cytotherapy. 2005; 7 (3) :273-81) .

Así para terapias o experimentos que no requieren vectores de adenovirus de expresión estable de gen pueden ser una buena opción. Un problema importante adicional al utilizar vectores de adenovirus es que estos pueden provocar una respuesta inmune fuerte dirigida contra células diseñadas por ingeniería luego de transferencia en el anfitrión. Claramente puede ser un hecho importante cuando se considera la aplicación de células diseñadas por ingeniería en una configuración terapéutica (J. N. Glasgow et al., Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications. Curr Gene Ther. 2004 Mar; 4 (1) :1-14). *In vitro and in vivo* induction of bone formation based on *ex vivo* gene therapy using rat adipose-derived adult stem cells expressing BMP-7, Yang M, Ma QJ, Dang GT, Ma K, Chen P, Zhou CY.)

Los vectores de adenovirus con base en Ad tipo 5 se han mostrado que introducen eficientemente y transitoriamente un gen exógeno por medio del receptor primario, coxsackievirus, y receptor de adenovirus (CAR). Sin embargo, algunos tipos de blastocitos, tal como MSC y blastocitos hematopoyéticos, evidentemente no se pueden transducir eficientemente con vectores de adenovirus convencionales basados en Ad serotipo 5 (Ad5), debido a la carencia de expresión CAR. Para superar este problema, se han desarrollado vectores de adenovirus modificados con fibra y un vector de adenovirus con base en otro serotipo de adenovirus. (Mol Pharm. 2006 Mar-Apr; 3(2):95-103. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. Kawabata K, Sakurai F, Koizumi N, Hayakawa T, Mizuguchi H. Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japón.)

(ii) Adenovirus asociado

Los virus asociados adeno (AAV) son miembros incompetentes de replicación, no citopáticos, muy extendidos, de virus de animal ssADN de la familia parvoviridae (G. Gao et al., New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther.* 2005 Jun; 5(3):285-97). El AAV es un virus icosaédrico pequeño en el genoma 4.7 kb. Estos virus tienen un terminal característico que consiste de repeticiones palindrómicas que se pliegan en una horquilla. Estos replican con la ayuda de un virus auxiliar, que es usualmente uno de los muchos serotipos de adenovirus. En la ausencia del virus auxiliar estos se integran dentro del genoma humano en un sitio específico (AAVS1) en el cromosoma 19 y persiste en forma latente hasta que ocurre infección del virus auxiliar (Atchison et al., 1965, 1966). El AAV puede transducir los tipos celulares de las diferentes especies que incluyen ratón, rata y mono. Entre los serotipos, el AAV2 es el más estudiado y ampliamente aplicado como un vector de suministro de gen. Su genoma codifica dos marcos de lectura abierta grandes (ORF) rep y cap. El gen rep codifica cuatro proteínas Rep78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40 que cumplen funciones importantes en varias etapas del ciclo de vida vírico (por ejemplo replicación de ADN, control transcripcional, integración específica de sitio, acumulación del genoma de hebra sencilla utilizado para empaque vírico). El gen cap codifica tres proteínas de cápsido vírico VP1, VP2, VP3 (Becerra et al., 1988; Buning et al., 2003). El extremo genómico 3' sirve como el cebador para la segunda síntesis de hebra y tiene sitios de resolución terminal (TRS) que sirven como la secuencia de integración para el virus cuando la secuencia es idéntica a la secuencia en el cromosoma 19 (Young and Samulski, 2001; Young et al., 2000).

Estos virus son similares a los adenovirus en que son capaces de infectar un amplio rango de células divididas y no divididas. A diferencia del adenovirus, tienen la capacidad de integrarse dentro del genoma anfitrión en un sitio específico en el genoma humano. Desafortunadamente, debido a su genoma voluminoso, los vectores tienen una capacidad limitada AAV para la transferencia de insertos de gen externo (Wu and Ataa, 2000).

Vectores de virus de ARN

(i) Retrovirus

Los genomas de retrovirus consisten de dos copias idénticas de ARN codificantes positivos de única hebra, 7-10 kb en longitud que codifica tres genes; *gag*, *pol* y *env*, flanqueado por repeticiones de terminal largo (LTR) (Yu and Schaffer, 2005). El gen *gag* codifica la matriz que codifica el cápsido de proteína núcleo y los elementos de nucleocápsido que dividen los productos de la proteína precursora *gag*. El gen *pol* codifica una proteasa vírica, transcriptasa inversa y enzimas de integrasa derivadas del gen precursor *gag-pol*. El gen *env* codifica la glucoproteína de envoltura que media la entrada vírica. Una característica importante del genoma retrovírico es la presencia de LTR en cada extremo del genoma. Estas secuencias facilitan el inicio de la síntesis vírica de ADN, la integración moderada del ADN provírico dentro del genoma anfitrión, y actúa como promotores en la regulación de transcripción del gen vírico. Los retrovirus se subdividen en tres grupos generales: los oncoretrovirus (Maloney Murine Leukemia Virus, MoMLV), los lentivirus (VIH), y los espumavirus (virus espumoso) (Trobridge et al., 2002).

Los vectores basados en retrovirus son los vectores integrantes utilizados comúnmente para terapia de gen. Estos vectores tienen de manera general una capacidad de clonación de aproximadamente 8 kb y se generan mediante una eliminación completa de la secuencia vírica con la excepción de los LTR y las señales de empaque de acción *cis*.

Los vectores retrovíricos se integran a los sitios aleatorios en el genoma. Los problemas asociados con esto incluyen mutagenia insercional potencial, y actividad oncogénica potencial conducida desde el LTR. La región U3 del LTR aloja el promotor y los elementos mejoradores, por lo tanto se evita esta región cuando se elimina del vector conduce a un vector auto-inactivante cuando el LTR conduce la transcripción. Luego se puede utilizar un promotor interno para dirigir la expresión del transgen.

Los estudios iniciales de la transferencia génica de blastocitos en ratones aumenta la esperanza de que la transferencia génica en humanos sería igualmente eficiente (O'Connor and Crystal, 2006). Desafortunadamente la transferencia génica utilizando sistemas de vector retrovírico disponibles para transfectar los blastocitos de repoblación a largo plazo multi-linaje es aún significativamente más eficiente en el ratón. La eficacia reducida de la transferencia génica en humanos, así como también la integración no controlada del vector retrovírico representa obstáculos importantes para la aplicación de estos vectores como una modalidad de tratamiento en el contexto de ingeniería de blastocitos.

(ii) Lentivirus

Los lentivirus son miembros de la familia Retroviridae de virus (M. Scherr et al., Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Curr Gene Ther.* 2002 Feb; 2(1):45-55.) Estos tienen un genoma más complejo y ciclo de replicación cuando se compara con oncoretrovirus (Beyer et al., 2002). Estos difieren de retrovirus más simples en que poseen genes y elementos reguladores adicionales, tal como el gen *tat*, que media la transactivación de la transcripción vírica (Sodroski et al., 1996) y *rev*, que media la exportación nuclear del ARN vírico no dividido (Cochrane et al., 1990; Emerman and Temin, 1986).

Los vectores de lentivirus se derivan del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) al retirar los genes necesarios para replicación vírica que hace el virus inerte. Aunque están desprovistos de genes de replicación, el vector aún se puede integrar eficientemente dentro del genoma anfitrión que permite la expresión estable del transgen. Estos

vectores tienen la ventaja adicional de una baja citotoxicidad y una capacidad de infectar diversos tipos celulares. También se han desarrollado vectores lentivíricos de origen de Simios, Equinos y Felinos pero los vectores derivados de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) son los más comunes (Young et al., 2006).

5 Los vectores lentivirus se generan mediante la eliminación de la secuencia vírica completa con la excepción de las señales de empaque de acción LTR y *cis*. Los vectores resultantes tienen una capacidad de clonación de aproximadamente 8 kb. Una característica que distingue estos vectores de los vectores retrovíricos es su capacidad de transducir células divididas y no divididas así como también células terminalmente diferenciadas (Kosaka et al., 2004). El sistema de suministro lentivírico es capaz de altos índices de infección en blastocitos embrionicos y mesenquimales humanos. En un estudio por Clements et al., se modifica la estructura principal lentivírica para
 10 expresar mono- y bi- transgenes cistrónicos y también se utiliza para suministrar ácido ribonucleico de horquilla corta para la inactivación específica de la expresión de gen los blastocitos humanos. (Tissue Eng. 2006 Jul; 12 (7):1741-51. Lentiviral manipulation of gene expression in human adult y embryonic stem cells. Clements MO, Godfrey A, Crossley J, Wilson SJ, Takeuchi Y, Boshoff C.).

Tabla 1 resume los vectores víricos descritos anteriormente.

Vector	Capacidad de inserto (kb)	Tropismo	Forma de genoma de vector	de	Expresión	Potencial inflamatorio	Eficiencia
Con envoltura							
Retrovirus	8	Solo células divididas	Integrado		estable	Bajo	Alto
Lentivirus	8	Dividido y no dividido	Integrado		estable	Bajo	Alto
Sin envoltura							
Adenovirus asociado	<5	Dividido y no dividido	Episomal e integrado		Estable	Bajo	Alto
Adenovirus	4-25	Dividido y no dividido	Episomal		Transitorio	Alto	Alto

15

Sistemas de suministro de gen no vírico

(i) Métodos para la integración facilitada de genes

Además de los vectores basados víricos discutidos anteriormente, otros sistemas de vector que carecen de secuencia vírica se encuentran actualmente en desarrollo. Las estrategias alternativas incluyen transferencia de
 20 plásmido convencional y la aplicación de la integración de gen objetivo a través del uso de tecnologías de integrasa o transposasa. Estas representan nuevos métodos importantes para la integración del vector y tienen la ventaja de ser eficientes, y frecuentemente específicos de sitio en su integración. Actualmente están disponibles tres sistemas de recombinasa para ingeniería genética: recombinasa cre del fago P1 (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992), FLP (flipasa) del plásmido de levadura de 2 micras (Dymecki, 1996; Rodriguez et al., 2000), y una integrasa aislada de fago estreptomises ÎC31 (Ginsburg and Calos, 2005). Cada una de estas recombinasas reconocen sitios de
 25 integración objetivo específicos. La recombinasa Cre y FLP catalizan la integración de la secuencia palindrómica 34 bp llamada *lox P* (sitio para cruzar) y FRT (objetivo recombinasa FLP) respectivamente. La integrasa de fago cataliza la recombinación unidireccional, específica de sitio entre dos sitios de reconocimiento att cortos en genomas de mamífero. La recombinación resulta en integración cuando están presentes sitios att en dos moléculas de ADN
 30 diferentes y eliminación o inversión cuando los sitios att son de la misma molécula. Se ha encontrado que funciona el células de cultivo de tejido (*in vitro*) así como también en ratones (*in vivo*).

El transposón Bella Durmiente (SB) está comprendido de dos repeticiones terminales invertidas de 340 pares base cada uno (Izsvak et al., 2000). El sistema dirige la transferencia precisa de las construcciones específicas de un plásmido donante en un cromosoma de mamífero. La escisión e integración del transposón de un vector de plásmido dentro del sitio cromosómico está mediado por la transposasa SB, que se puede suministrar a las células en una forma *cis* o *trans* (Kaminski et al., 2002). Se puede expresar un gen en un transposón cromosómicamente integrado

35

durante el tiempo de vida de una célula. Los transposones SB se integran aleatoriamente los pares base de TA-dinucleótido aunque las secuencias de flanqueo pueden influenciar la integración. Aunque los resultados hasta la fecha no sugieren que las inserciones aleatorias de los transposones SB representan el mismo nivel de los riesgos vistos con vectores víricos, se requieren más datos antes que el sistema se puede aplicar en forma segura a ensayos de humano.

Métodos físicos para introducir los vectores en células

(i) Electroporación

La electroporación se basa en el uso de breves pulsos eléctricos de alto voltaje que crean poros transitorios en la membrana al superar su capacidad. Una ventaja de este método es que se puede utilizar para la expresión de gen estable y transitoria en la mayor parte de tipos celulares. La tecnología se basa en la naturaleza relativamente débil de las interacciones hidrófobas e hidrófilas en la membrana de fosfolípido y su capacidad de recuperar su estado original después de disturbio. Una vez se permeabiliza la membrana, se pueden suministrar moléculas polares dentro de la célula con alta eficiencia. Las moléculas grandes cargadas como ADN y ARN se mueven en la célula a través de un proceso dirigido por su gradiente electroforético. La amplitud del pulso gobierna el área total que se impermeabilizaría sobre la superficie celular y la duración del pulso determina el grado de permeabilización (Gabriel and Teissie, 1997). El estado permeabilizado de la célula depende de la resistencia de los pulsos. Los pulsos fuertes pueden conducir a permeabilización irreversible, daño irreparable a la célula y finalmente muerte celular. Por esta razón la electroporación es probablemente el más difícil de los métodos de suministro de gen y requiere generalmente grandes cantidades de ADN y células. La efectividad de este método depende de muchos factores cruciales como el tamaño de la célula, replicación y temperatura durante la aplicación de pulso (Rols and Teissie, 1990).

La característica más ventajosa de esta técnica es que el ADN se puede transferir directamente al núcleo aumento su probabilidad de ser integrado dentro del genoma anfitrión. Incluso las células difíciles de transfectar pueden transfectar establemente utilizando este método (Aluigi et al., 2005; Zernecke et al., 2003). La modificación del procedimiento de utilizado durante electroporación conduce al desarrollo de un método de transferencia génica eficiente llamado nucleofección. La tecnología Nucleofector™, es una técnica de transferencia génica con base en electroporación no vírica que ha probado ser una herramienta eficiente para transfectar las estirpes celulares difíciles de transfectar y las células primarias incluyen MSC (Michela Aluigi, Stem cells Vol. 24, No. 2, Febrero 2006, pp. 454-461).

Métodos basados en biomolécula

(i) Dominios de transducción de proteína (PTD)

El PTD son péptidos cortos que se transportan dentro de la célula sin el uso de la ruta endocitótica o canales de proteína. El mecanismo involucrado en su entrada no se entiende bien, pero puede ocurrir incluso a baja temperatura (Derossi et al. 1996). Los dos PDT más comúnmente utilizados que ocurren en forma natural son el activador transactivante del dominio de transcripción (TAT) del virus de inmunodeficiencia humana y el homeodominio delfactor de transcripción *Antennapedia*. Además de estos PTD que ocurren en forma natural, existe un número de péptidos artificiales que tienen la capacidad de cruzar espontáneamente la membrana celular (Joliot and Prochiantz, 2004). Estos péptidos se pueden unir covalentemente a la estructura principal de pseudo-péptido de PNA (ácidos nucleicos de péptido) para ayudar a suministrarlos dentro de la célula.

(ii) Liposomas

Los liposomas son vesículas sintéticas que semejan la membrana celular. Cuando se agitan las moléculas de lípido con agua forman espontáneamente compartimientos de membrana doble esférica que rodean un centro acuoso que forma las liposomas. Estas se pueden fusionar con células y permiten la transferencia de material "empacado" dentro de la célula. Las liposomas se han utilizado exitosamente para suministrar los genes, fármacos, proteínas indicadoras y otras biomoléculas dentro de las células (Felnerova et al., 2004). La ventaja de las liposomas es que se hacen de biomoléculas naturales (lípidos) y no son inmunogénicas.

Se pueden incorporar diversas moléculas hidrófilas en ellas durante formación. Por ejemplo, cuando los lípidos con el grupo superior cargado positivamente se mezclan con ADN recombinante que pueden formar lipoplexos en los que el ADN cargado negativamente se compleja con los grupos superiores positivos de las moléculas de lípido. Estos complejos luego pueden ingresar a la célula a través de la ruta endocitótica y suministra el ADN en los compartimientos lisosomales. Las moléculas de ADN pueden escapar de este compartimiento con la ayuda de dioleiletanolamina (DOPE) y se transportan en el núcleo en donde se pueden transcribir (Tranchant et al., 2004).

A pesar de esta simplicidad, las liposomas sufren de baja eficiencia de transfección debido a que se eliminan rápidamente mediante el sistema reticuloendotelial debido a adsorción de las proteínas de plasma. Se han utilizado muchos métodos para estabilizar las liposomas que incluyen la modificación de la superficie liposómica con oligosacáridos, estabilizando por lo tanto estéricamente las liposomas (Xu et al., 2002).

5 (iii) Inmunoliposomas

Las inmunoliposomas son liposomas con anticuerpos específicos insertados dentro de sus membranas. Los anticuerpos se unen selectivamente los anticuerpos a las moléculas de superficie específica en la célula objetivo para facilitar la absorción. Las moléculas de superficie objetivo por los anticuerpos son aquellos que se internalizan preferiblemente por las células de tal manera que luego de unión, se toma el complejo completo. Este método
10 aumenta la eficiencia de transfección al mejorar la liberación intracelular de los componentes liposómicos. Estos anticuerpos se pueden insertar en la superficie liposómica a través de diversos anclajes de lípido o se unen al terminal de polietilenglicol injertado en la superficie liposómica. Además de proporcionar especificidad para el suministro de gen, los anticuerpos también pueden proporcionar un recubrimiento protector a las liposomas que ayuda a limitar su degradación después de absorción mediante ARNasas endógenas o proteinasas (Bendas, 2001).
15 Para evitar adicionalmente la degradación de las liposomas y sus contenidos en el compartimiento lisosomal, se pueden emplear inmunoliposomas sensibles de pH (Torchilin, 2006). Estas liposomas mejoran la liberación del contenido liposómico en el citosol al fusionar con la membrana endosómica dentro del organelo cuando se desestabilizan y son propensos a la fusión a pH ácido.

En general los sistemas de suministro de gen no vírico no se han aplicado ampliamente como un medio de suministro de gen en los blastocitos como sistemas de suministro de gen vírico. Sin embargo, los resultados promisorios se demuestran en un estudio que busca la viabilidad en la transfección, proliferación y diferenciación de células progenitoras/blastocitos neurales de adulto en las tres neuronas de linajes. Los sistemas de suministro de gen no liposómicos no víricos (ExGen500 y FuGene6) tienen una eficiencia de transfección de entre 16 % (ExGen500) y 11 % (FuGene6) de células. Las células tratadas con FuGene6 no difieren de las células no transfectadas en su viabilidad o índice de proliferación, mientras que estas características se reducen significativamente luego de transfección de ExGen500. De manera importante, ningún agente afectado el patrón de diferenciación luego de transfección. Ambos agentes se pueden utilizar para marcar genéticamente células, y rastrear su diferenciación en tres linajes neurales, después de injerto en cultivos de corte de hipocampo organotípicos *ex vivo* (J Gene Med. 2006 Jan; 8(1):72-81. La transfección no vírica eficiente de blastocitos neuronales/células progenitoras de adulto, sin afectar la viabilidad, proliferación o diferenciación. Tinsley RB, Fajerson J, Eriksson PS).
20
25
30

(iv) Métodos con base de polímero

Los grupos amino ϵ protonado de poli L-lisina (PLL) interactúa con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar complejos que se pueden utilizar para el suministro de gen. Estos complejos pueden ser inestables y muestran una tendencia a agregado (Kwoh et al., 1999). La conjugación de polietilenglicol (PEG) se encuentra que conduce a una estabilidad aumentada de los complejos (Lee et al., 2005, Harada-Shiba et al., 2002). Para conferir un grado de especificidad de tejido, dirigir las moléculas tal como anticuerpos específicos de tejido también se han empleado (Trubetsky et al., 1992, Such et al., 2001).
35

Se ha utilizado un portador de gen adicional se ha utilizado para transfectar las células es polietilenimina (PEI) que también forma complejos de ADN. Debido a la presencia de aminas con diferentes valores pKa, es la capacidad de escapar el comportamiento endosómico (Boussif et al., 1995). El PEG injertado en los complejos PEI se encuentra que reduce la citotoxicidad y agregación de estos complejos. Esto también se puede utilizar en combinación con anticuerpos conjugados para conferir especificidad de tejido (Mishra et al., 2004, Shi et al., 2003, Chiu et al., 2004, Merdan et al., 2003).
40

45 Implicaciones para la medicina

Los blastocitos no solo tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tejidos, sino debido a su capacidad inherente de buscar tejidos dañados, tienen el potencial de suministrar la expresión de genes terapéuticos a ambientes de tejido específicos. A través del uso de métodos de ingeniería molecular, los blastocitos se pueden utilizar como vehículos para expresar selectivamente los genes en áreas de defectos o necesidad, liberando por lo tanto el producto terapéutico de la transfección solo cuando se requiera. Las enfermedades en donde los blastocitos diseñados con ingeniería genética pueden tener una función en el futuro son aquellas en donde una proteína o una enzima completa desaparece o no es funcional o en donde ciertos factores proporcionan función mejorada en un tejido específico.
50

Ya se ha conducido una serie de estudios utilizando blastocitos en configuraciones terapéuticas para el tratamiento de un rango diverso de enfermedades que incluyen cáncer, trastornos neurodegenerativos tal como enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer, enfermedad isquémica del corazón, y distrofias del músculo.

5 La transferencia de genes de resistencia de fármaco en los blastocitos hematopoyéticos muestra promesa para el tratamiento de una variedad de enfermedades heredadas. Estos incluyen, deficiencia inmune combinada severa ligada a X, deficiencia de desaminasa de adenosina, talasemia.

10 El método de blastocitos combinado y de terapia génica tiene el potencial de ser adaptado a los trastornos adquiridos tal como cáncer de mama, linfomas, tumores cerebrales, y cáncer testicular. A este respecto, los estudios utilizando el método combinado para el tratamiento de cáncer que se va a iniciar. Este rango de estudios para mejorar la resistencia al fármaco de blastocitos hematopoyéticos trasplantados utilizando modificar genéticamente los blastocitos para dirigir el cáncer.

15 Los genes de resistencia al fármaco se han transferido en blastocitos hematopoyéticos para mejorar la mieloprotección contra la mielosupresión inducida por quimioterapia o para seleccionar blastocitos hematopoyéticos que se transducen concomitantemente con otro gen para la corrección de un transporte heredado. (Cancer Gene Ther., 2005 Nov; 12(11):849-63. Hematopoietic stem cell gene therapy with drug resistance genes: an update. Budak-Alpdogan T, Banerjee D, Bertino JR).

20 Ejemplos para utilizar los blastocitos para dirigirse al cáncer incluyen la mejora de terapia génica mediada por el efecto espectador utilizando blastocitos neurales construidos con ingeniería genética para el tratamiento de gliomas, y utilizando blastocitos hematopoyéticos que el gen de inhibidor ribonucleasa para dirigir la vasculatura de los melanomas.

25 Un método adicional para el cáncer hace uso de la capacidad de los blastocitos que se van a vincular a la vasculatura de tumor y para diferenciar células similares a endotelial. Dependiendo del tipo de tumor, aproximadamente 30% de nuevas células endoteliales vasculares en tumores se puede derivar de progenitores de médula ósea (Hammerling and Ganss, 2006). Así, el uso de células progenitoras genéticamente modificadas vinculadas para la circulación periférica pueden representar un vehículo potencial para terapia génica de tumores (Reyes et al., 2002). El gel suicida de quinasa timidina del virus herpes simplex 1 (HSV) (tk) junto con ganciclovir® (GCV) ha utilizado exitosamente el tratamiento *in vivo* de diversos tumores sólidos (Dancer et al., 2003; Pasanen et al., 2003). La expresión selectiva de HSV-tk mediante células endoteliales durante neovascularización en combinación con modificación tk de GCV que conduce a un ambiente letal para proliferar las células. Se ha identificado una serie de promotores que se inducen durante neovascularización que permite la activación selectiva del gen suicida luego de la vinculación y la diferenciación de las células precursoras diseñadas por ingeniería.

35 Se describe un "efecto espectador" como la capacidad de las células de mediar el daño celular a células distantes. En un estudio reciente por Li et al. el se examina el efecto espectador de blastocitos neurales transducidos con el gen HSV-tk (NSCtk) en células de glioma de rata células. Los experimentos de co-implantación intracranial en ratones sin pelo atímicos o ratas Sprague-Dawley, muestran que los animales se co-implantan con NSCtk y células de glioma y luego se tratan con ganciclovir® (GCV) no muestran tumores intracraniales y sobreviven más de 100 días, mientras que aquellos tratados con solución salina fisiológica (PS) mueren de evolución del tumor. (Cancer Gene Ther., 2005 Jul; 12(7):600-7. Bystander effect-mediated gene therapy of gliomas using genetically engineered neural stem cells. Li S, Tokuyama T, Yamamoto J, Koide M, Yokota N, Namba H).

40 El inhibidor de ribonucleasa humana (hRI) puede inhibir la actividad de RNasa pancreática (RNasa A) y se ha sugerido que el RI puede actuar como agente antiangiogénico latente. Fu et al. examina la factibilidad de transfectar el gen RI en células hematopoyéticas de murino y luego inducir la expresión para bloquear la angiogenia en tumores sólidos. El RI de la placenta humana se clona y se inserta dentro del vector retrovírico pLNCX. Luego se infectan células hematopoyéticas de médula ósea de murino con el vector retrovírico pLNCX-RI. Las células infectadas luego se inyectan en ratones letalmente irradiados. Después de la administración de células hematopoyéticas que llevan el gen RI, los ratones se implantan con melanomas B16 y el tumor se cultiva durante 21 días. Los tumores de los grupos de control se vuelven grandes y bien vascularizados. En contraste, los tumores de ratones tratados con células hematopoyéticas que llevan el gen RI son pequeños y poseen una densidad relativamente baja de los vasos sanguíneos. (Cancer Gene Ther. 2005 Mar; 12(3):268-75. Anti-tumor effect of hematopoietic cells carrying the gene of ribonuclease inhibitor. Fu P, Chen J, Tian Y, Watkins T, Cui X, Zhao B.)

55 Muchos estudios que se enfocan la enfermedad de Parkinson utilizan trasplante de célula o terapia génica (Gene Ther., 2003 Sep; 10 (20): 1721-7. Gene therapy progress and prospects: Parkinson's disease. Burton EA, Glorioso JC, Fink DJ). Sin embargo, pocos estudios hasta la fecha han combinado los dos métodos. Liu et al. utiliza células estromales derivadas de médula ósea para suministrar genes terapéuticos al cerebro. Los autores utilizan el vector de adenovirus asociado (AAV) para suministrar el gen de hidroxilasa tirosina (TH) a células estromales de médula ósea. Los MSC que expresan el gen TH luego se trasplantan en el cuerpo estriado de ratas con enfermedad de Parkinson. La eficiencia de expresión de gen se encuentra que es aproximadamente 75%. La mejora funcional en

las ratas enfermas se detecta después de injerto de células estromales de médula ósea construidas con ingeniería TH. El examen histológico muestra que el gen TH se expresa alrededor de los puntos de trasplante, y que los dominios de dopamina en el cuerpo estriado lesionado de las ratas que son mayores que los controles. Se observa mejora funcional de los animales (Brain Res Brain Res Protoc., 2005 May; 15(1): 46-51. Epub 2005, Apr 22. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. Lu L, Zhao C, Liu Y, Sun X, Duan C, Ji M, Zhao H, Xu Q, Yang H.)

La enfermedad cardiovascular isquémica es un objetivo adicional para la terapia de blastocitos construidos por ingeniería. Chen et al., que utilizan células CD34 (+) purificadas obtenidas de la sangre del cordón umbilical humano, transfectadas con genes de angiopoyetina-1 humana (Ang1) y genes VEGF(165) utilizando un vector AAV. Se inyectan células diseñadas por ingeniería junto con VEGF intramiocardialmente en la pared libre izquierda anterior, lo que conduce a tamaño reducido de infarto, y densidad capilar significativamente aumentada después de tratamiento, así como también desempeño cardíaco a largo plazo mejorado medido utilizando ecocardiografía 4 semanas después de infarto del miocardio. (Eur J Clin Invest., 2005 Nov; 35(11):677-86. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction. Chen HK, Hung HF, Shyu KG, Wang BW, Sheu JR, Liang YJ, Chang CC, Kuan P.)

Las distrofias de músculo representan un grupo heterogéneo de trastornos neuromusculares caracterizado por deterioro progresivo de músculo. Hasta la fecha no existe modalidad de tratamiento adecuada para estos pacientes. Las poblaciones de blastocitos en adultos, que incluyen MSC, así como también blastocitos embrionicos se han evaluado por su capacidad de corregir el fenotipo distrófico. Hasta la fecha, los métodos descritos no han mostrado mucha promesa. Las razones descritas no ejemplifican las dificultades encontradas por los investigadores cuando utilizan blastocitos genéticamente modificados: el mecanismo fundamental responsable de potencial miogénico en los blastocitos aún no se ha aclarado completamente, es frecuentemente inadecuada la búsqueda de la población donante para el músculo, y las respuestas inmunitarias pobremente comprendidas en el receptor pueden conducir a éxito limitado de tratamiento (*Stem cell based therapies to treat muscular dystrophies. Price, Kuroda, Rudnicki*). Un método utilizado para el tratamiento de distrofia muscular Duchenne (DMD) utiliza trasplante de células autólogo de blastocitos miogénicos que se han transducido con un casete de expresión terapéutica. La realización de este método se ha visto obstaculizada por una serie de problemas que incluyen; una baja frecuencia de injerto celular funcional, dificultad en trazar células trasplantadas, pérdida rápida de células autólogas que llevan genes marcadores, y dificultad para introducir la transferencia estable del gen de distrofina grande en blastocitos miogénicos.

Un gen de fusión mini Dys-GFP se diseña por ingeniería al reemplazar el dominio de terminal C de distrofina (DeltaCT) con una secuencia codificante eGFP y retirar la mayor parte del dominio de la barra central de distrofina (DeltaH2-R19). En un ratón mdx transgénico (4Cv) que expresa la proteína de fusión miniDys-GFP bajo el control de un promotor específico de músculo esquelético, la proteína de fusión verde localizada en el sarcolema, en donde se ensambla el complejo de distrofilinoproteína y se evita el desarrollo de distrofia en músculos transgénicos mdx(4Cv). (Hum Mol Genet., 2006 May 15; 15(10):1610-22. Epub 2006 Apr 4. A highly functional mini-dystrophin/GFP fusion gene for cell and gene therapy studies of Duchenne muscular dystrophy. Li S, Kimura E, Ng R, Fall BM, Meuse L, Reyes M, Faulkner JA, Chamberlain JS.)

El síndrome de Wiskott-Aldrich está caracterizado por trombocitopenia, desregulación y propensión hacia el desarrollo de linfoma final en la vida y representa un objetivo potencial para terapia de blastocitos construidos por ingeniería (Dupre et al., 2006). La anemia de Fanconi, se considera una "enfermedad de blastocito" y ha sido objeto de investigación intensiva para tratamiento utilizando terapia de gen. Esta enfermedad representa el defecto congénito bien caracterizado de blastocitos hematopoyéticos. Esta es una enfermedad rara hereditaria caracterizada por falla de médula ósea y anormalidades en el desarrollo; una alta incidencia de mielodisplasia, leucemia no linfocítica aguda, y tumores sólidos. La base genética para anemia Fanconi se basa en mutaciones selectivas en uno cualquiera de los genes de anemia Fanconi conocido, haciendo de esta enfermedad un candidato para terapia de gen. Pero la enfermedad es compleja como se han descritos 12 subtipos genéticos (FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M) y todos, con la excepción de FA-I se ha ligado a un gen distinto. La mayoría de las proteínas FA forman un complejo que activa la proteína FANCD2 por medio de monoubiquitinación, mientras que FANCI y FANCD1/BRCA2 funcionan en la dirección 3 de esta etapa. Las proteínas FA normalmente carecen de los dominios funcionales, excepto para FANCI/BRIP1 y FANCM, que son helicasas de ADN, y FANCL, que es probablemente una enzima conjugada con ubiquitina E3. Con base en la hipersensibilidad a los agentes de entrecruzamiento, las proteínas FA funcionan en la reparación de entrecruzamientos interhebra de ADN, que bloquean la evolución de horquillas de replicación de ADN. (Cell Oncol. 2006;28(1-2):3-29. La ruta de anemia Fanconi de mantenimiento genómico. Levitus M, Joenje H, de Winter JP.)

Los defectos de blastocitos heredados adicionales que son candidatos potenciales para terapia génica incluyen trombocitopenia amegacariocítica, disqueratosis congénita y síndrome de Shwachman-Diamond. Talasemias y anemia Drepanocítica pertenecen al grupo de anemias hemolíticas hereditarias que representan las enfermedades heredadas más comunes alrededor del mundo y así son candidatos importantes para terapia génica de blastocitos (Persons and Tisdale, 2004).

Un buen ejemplo utilizando blastocitos mesenquimales modificados genéticamente en una configuración clínica es la corrección de la mutación genética en la enfermedad de osteogenia imperfecta. La osteogenia imperfecta provoca huesos frágiles debido a mutaciones en los genes que codifican colágeno I, COLIA1 o COLIA2. Chamberlain et al. obtiene blastocitos mesenquimales (MSC) de los huesos de pacientes con osteogenia imperfecta e identifica las mutaciones de punto en el gen COLIA1 (Chamberlain et al., 2004). Los MSC se infectan exitosamente con un adenovirus asociado para dirigir y desactivar el gen COLIA1 mutado. Los MSC corregidos luego se trasplantan en ratones inmunodeficientes y células dañadas demostrando estabilidad mejorada y procesamiento de colágeno.

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1

Se aíslan blastocitos multipotentes de adulto de la médula ósea y otras fuentes de un paciente o donante utilizando crecimiento adherente in-vitro para determinar la actividad celular y la función biológica. En esta etapa in-vitro la célula de crecimiento adherente no expresan el "marcador de blastocito" CD34 y por lo tanto se considera CD34 negativo durante cultivo in-vitro. En esta etapa, el CD34 negativo, los blastocitos de crecimiento adherente son transitorios o establemente transfectados por tecnologías víricas o no víricas y se expanden selectivamente in-vitro antes de aplicación in-vivo. Para la generación de células progenitoras de CD34 negativas transgénicas se utilizan para selección e inducibilidad específica de órgano/ objetivo del gen terapéutico. El sistema de transferencia génica se selecciona con base en su transfección e integración (si se desea) combinado con selectividad de adhesión. Como este ejemplo, el mejorador de promotor tie2 se dirige al gen HSV-TK, que se expresa solo en el contexto de diferenciación endotelial, que corre durante neo-angiogenia de tumor. Mientras circulan los blastocitos endógenos así como también los blastocitos sistémicamente administrados se vinculan fisiológicamente al sitio del tumor que crece para participar en la neo-angiogenia de tumor (independientemente de si es el sitio de tumor principal o metástasis), los blastocitos se diferencian en células endoteliales de tumor. Durante este proceso de diferenciación específica de órgano, los blastocitos expresan el gen HSV-TK dirigido por la activación de tie2 relacionada con angiogenia. Ahora el profármaco ganciclovir® se puede dar al paciente y se convierte por el HSV-TK en la sustancia citotóxica en el sitio de angiogenia de tumor. Este método se ha mostrado exitosamente en modelos pre-clínicos para cáncer de mama, cáncer colo-rectal metastásico, carcinoma de páncreas y glioblastoma. Se puede prever una aplicación para cualquier neoplasia (maligna) que se basa en neo-angiogenia de tumor. Este método ayuda en la interrupción de angiogenia de tumor.

Ejemplo comparativo 2

Como en el EJEMPLO 1, pero en lugar de expresar HSV-TK, se expresan las sustancias se vinculan como proteínas citotóxicas.

Ejemplo 3

La angiogenia también es un proceso biológico pivotal en remodelamiento de tejido y curación de heridas. Esto no solo aplica a lesiones de la piel o mucosa sino también a otros tejidos, como la carencia de células beta que producen insulina en el páncreas, que conduce a Diabetes Mellitus dependiente de insulina (IDDM). La aplicación sistémica de las células progenitoras CD34 negativas transgénicas también puede inducir la activación de células progenitoras de islote en reposo en el páncreas, reposición del páncreas endocrino y corregir el estado de hiperglicemia en pacientes IDDM. El promotor mejorador tie-2 activa el gen para sustancias vasoactivas similares a VEGF que promueven el remodelamiento de tejido y curación de heridas.

Ejemplo 4

Como en el EJEMPLO 3, pero en combinación con el trasplante de células islote alogénicas si la regeneración endógena ya no es suficiente.

Ejemplo comparativo 5

Como en el EJEMPLO 1, pero las células transgénicas con capacidades de búsqueda mejoradas al sitio de crecimiento de tumor, remodelamiento de tejido o curación de heridas aplicando biología de quimioquina. Los blastocitos de crecimiento adherente negativo CD34, se diseñan por ingeniería utilizan quimioquinas GPI-mucina. Estos agentes permitirán la expresión selectiva de quimioquinas específicas ligadas al dominio mucina tomado de CX3CL1 o CXCL16 fusionado a un anclaje GPI. La expresión de estos agentes quimioquina-mucina vincula leucocitos complementarios que expresan el receptor quimioquina. Por ejemplo, la expresión de CXCL10-mucina-GPI bajo el control del promotor mejorador tie2 en el contexto de terapia de tumor facilitará la vinculación de las células efectoras T en el ambiente de tumor. Este actuará como un adyuvante para terapia inmune de tumor. También se puede utilizar el mismo método en remodelación de tejido para facilitar la vinculación paralela de poblaciones seleccionadas de leucocitos.

Ejemplo comparativo 6

5 Como en el EJEMPLO 1, pero los blastocitos negativos CD34 construidos por ingeniería que pueden modular el ambiente inflamatorio, por ejemplo en trastornos autoinmunes como enfermedad inflamatoria del intestino crónica o enfermedad de injerto-versus-anfitrión después de trasplante de blastocito/médula ósea alogénico. Esto también se puede facilitar por la expresión específica de sitio de las sustancias anti-inflamatorias como interleuquinas (IL-10).

Ejemplo comparativo 7

Como en el EJEMPLO 1, pero con la expresión específica de sitio de los antígenos víricos comunes por ejemplo que inducen un refuerzo de vacunación interno en el sitio de crecimiento de tumor, por ejemplo sarampión o varicela.

Ejemplo comparativo 8

10 Como en el EJEMPLO 1, pero se suprime la activación terapéutica del gen por genes de una etapa de desarrollo temprano (*por ejemplo Noggin*), que se regula por disminución eventualmente durante la diferenciación de las células progenitoras transgénicas en tejido maduro en el sitio del tumor o remodelación/regeneración de tejido.

Ejemplo comparativo Parte II

Modelos de Tumor Pancreático y de Mama

15 Sinopsis

La angiogenia de tumor representa un objetivo promisorio para el suministro selectivo de terapéuticos de cáncer. Se desarrollan blastocitos mesenquimales derivados de médula ósea para dirigir selectivamente genes exógenos a ambientes de angiogenia de tumor. Los resultados de estos experimentos muestran que el MSC agregado espontáneamente busca tumores en donde experimentan diferenciación. Los genes tal como el gen indicador RFP así como también el gen suicida HSV-tk se expresan selectivamente durante diferenciación bajo el control del promotor/mejorador Tie2. La administración del profármaco ganciclovir® se relaciona con la expresión tk que dirige efectivamente el tumor y resulta en la supresión del crecimiento de tumor.

20

Modelo de cáncer de mama en ratón endógeno

25 Se utiliza un modelo de cáncer de mama de murino previamente establecido por el Dr. Christoph Klein para estudiar el uso del MSC construido por ingeniería en angiogenia de tumor. Este modelo se aplica ampliamente al cáncer de mama humano. En este modelo, los ratones transgénicos que llevan el oncogen activado c-neu de rata bajo el control transcripcional del promotor MMTV se han retrocruzado con ratones BALB/c con el objetivo de desarrollar un modelo ampliamente aplicable para terapia de cáncer. Los ratones transgénicos HER-2/neu (neu-N) hembra, que expresan el proto-oncógeno de rata no transformante, desarrolla espontáneamente adeno-carcinomas mamarios focales al inicio de los 5-6 meses de edad. El desarrollo y la histología de estos tumores se asemejan a la observada en pacientes con cáncer de mama.

30

Expresión de genes RFP y GFP en imMSC bajo el control de promotores específicos endoteliales en el contexto de angiogenia de tumor

35 Para evaluar el control de la expresión de gen específica de tejido en imMSC en el contexto de angiogenia de tumor, y para seguir la distribución de los imMSC durante periodos más largos microscópicamente, se han clonado genes de proteína fluorescente verde y roja (RFP, GFP) en vectores de expresión modificados para detección *in vivo*.

Ratones

40 Ratones transgénicos HER-2/neu hembra (neu-N) que expresan el proto-oncogen de rata no transformante, se sabe que desarrollan adeno-carcinomas mamarios focales espontáneos en 5-6 meses de edad. Los ratones transgénicos BALB-neuT se mantienen de acuerdo con las Directrices del Acuerdo de la Unión Europea. Se seleccionan ratones por hemocigosidad (neuT+/neuT-). Las glándulas mamarias de ratones hembra Balb-neuT se inspeccionan dos veces a la semana y se miden los tumores que aparecen.

45 Se inyectan células modificadas genéticamente en ratones modelo de cáncer de mama luego de rechazo quirúrgico del tumor primario. Cuando el tumor residual crece nuevamente, las células precursoras proporcionadas imMSC agregadas exógenamente para neovascularización. Se encuentra que el Tie-2-RFP (promotor específico endotelial dirige la proteína de fluorescencia roja) transfecta establemente los imMSC para buscar fácilmente el tumor, a diferencia de las células endoteliales, y expresa el gen indicador RFP (Figura 5). En estos experimentos se evalúa la

integración de las células mesenquimales en los tumores mamarios primarios de ratones Balb-neuT. Después de tres aplicaciones de células que expresan RFP, transfectadas con RFP se pueden detectar en regiones similares a vaso en todas las secciones. Los resultados demuestran que las células buscan sitios de neovascularización y expresan genes marcadores a través del promotor/mejorador Tie2 activado.

5 Inhibir el crecimiento de tumor al dirigir un gen suicida en el endotelio

El protocolo luego se altera para evaluar el efecto del gen suicida HSV-tk. El producto génico tk en combinación con el profármaco ganciclovir® (GCV) produce una toxina potente que afecta las células replicativas. Los ImMSC se transfectan establemente con plásmidos que llevan el gen quinasa timidina de virus de herpes simplex (tk) mediante el promotor/mejorador vascular endotelial Tie2. Para este fin, el modelo de murino de angiogenia de cáncer de mama se utiliza de nuevo para evaluar la estirpe MSC diseñada por ingeniería en terapia de anti-angiogenia.

Método I. Inyección de MSC construido por ingeniería y tratamiento de ganciclovir® en la fase de crecimiento de tumor exponencial a la edad de 18 o 22 semanas

El tratamiento de Balb-neuT trsg

Los ratones inician en el día 0 (semana 22), con inyección de 0.2 ml células (500,000 células) y 0.2 ml de PBS como control. En los días 5 a 8, se aplica ganciclovir® en una dosis diaria de 30 mg/g BW, por ejemplo 100 ml para un ratón con 21 g de BW. Después del día 9, se repiten los ciclos de tratamiento de los ratones hasta disección. Durante el tratamiento de evolución de tumor, se registran el peso corporal (medido en el día 0 y 6 de cada ciclo de terapia) y el comportamiento.

Para obtener una impresión general del efecto del tratamiento con células transfectadas con Tie2-Tk-as y GCV respectivamente comparado con los grupos de control, el valor macroscópico de peso corporal se registra durante el tratamiento hasta disección. Los puntos medidos son los días 0 y 5 de cada ciclo de terapia y el día de disección. Los experimentos incluyen un tratamiento y dos grupos de control de ratones e inician en dos puntos de tiempo diferentes, 18 y 22 semanas de edad. Tabla 2. Datos de grupos de tratamiento después de disección, incluyendo peso corporal, carga de tumor absoluta y relativa.

25 Método II. Evaluación de la terapia en el contexto de recrecimiento de tumor luego de rechazo quirúrgico

En pacientes luego de la eliminación quirúrgica de un tumor, el tumor residual que se pierde durante cirugía frecuentemente crece, lo que conduce a una recurrencia de cáncer. Para probar la eficacia de la terapia de MSC/tk diseñada por ingeniería en este contexto, el tejido de mama de ratones transgénicos Balb/c neu-N es rechazado a las 18 semanas de edad, lo que conduce a un inicio retrasado del tumor primario. Luego de cirugía, los ratones se tratan con el régimen MSC-tk y GCV como se describió anteriormente. El tratamiento resulta en una reducción dramática en el crecimiento de tumor en los ratones tratados (Figura 8).

Modelo de tumor pancreático

Luego se desarrolla un modelo de carcinoma pancreático ortotópico en ratones C57Bl/6 para evaluar la eficacia de terapia basada en MSC en un sistema de tumor diferente. El sistema se ha establecido previamente por Christiane Bruns y Claudius Conrad (Surgery Department, LMU). En este modelo, se inyectan células singeneicas de carcinoma pancreático Panc02 a ratones C57Bl/6 subcapsularmente en una región del páncreas justo por debajo del bazo para crear tumores pancreáticos primarios. Las construcciones con GFP bajo el control del promotor CMV, y RFP y tk bajo el control del promotor/mejorador Tie2, se introducen en el MSC aislado de ratones C57Bl/6. Los blastocitos transfectados se dan sistemáticamente por medio de inyecciones i.v. En un experimento preliminar, el MSC construido por ingeniería para expresar constitutivamente el GFP (bajo el control del promotor CMV) se inyectan en ratones con tumores que crecen. Se encuentran que las células buscan eficientemente los tumores (Figura 9).

En experimentos paralelos, los ratones con tumores que crecen se inyectan con el MSC construido por ingeniería Tie2-RFP. Después de cinco días, los animales se sacrifican y los tumores se examinan para la expresión de RFP. Los resultados muestran una regulación por aumento fuerte de RFP en el contexto del tumor (Figura 9). No se detecta RFP en otros órganos (bazo, nodos linfáticos y timo).

Referencias

Aiuti, A, Slavin, S, Aker, M, Ficara, F, Deola, S, Mortellaro, A, Morecki, S, Andolfi, G, Tabucchi, A, Carlucci, F, Marinello, E, Cattaneo, F, Vai, S, Servida, P, Miniero, R, Roncarolo, MG, Bordignon, C (2002) Correction of ADASCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. Science 296: 2410-2413.

- Aluigi, MG, Angelini, C, Falugi, C, Fossa, R, Genever, P, Gallus, L, Layer, PG, Prestipino, G, Rakonczay, Z, Sgro, M, Thielecke, H, Trombino, S (2005) Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. *Chem Biol Interact* 157-158: 305-316.
- 5 Armentano, D, Sookdeo, CC, Hehir, KM, Gregory, RJ, St George, JA, Prince, GA, Wadsworth, SC, Smith, AE (1995) Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing an E4 deletion. *Hum Gene Ther* 6: 1343-1353.
- Atchison, RW, Casto, BC, Hammon, WM (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149: 754-756.
- Atchison, RW, Casto, BC, Hammon, WM (1966) Electron microscopy of adenovirus-associated virus (AAV) in cell cultures. *Virology* 29: 353-357.
- 10 Baekelandt, V, De Strooper, B, Nuttin, B, Debyser, Z (2000) Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Mol Ther* 2: 540-554.
- Barese, CN, Goebel, WS, Dinauer, MC (2004) Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther* 4: 1423-1434.
- 15 Becerra, SP, Koczot, F, Fabisch, P, Rose, JA (1988) Synthesis of adenovirus associated structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol* 62: 2745-2754.
- Bendas, G (2001) Immunoliposomes: a promising método to targeting cancer therapy. *BioDrugs* 15: 215-224.
- Benihoud, K, Yeh, P, Perricaudet, M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10: 440-447.
- Bett, AJ, Haddara, W, Prevec, L, Graham, FL (1994) An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions o deletions in early regions 1 y 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8802-8806.
- 20 Beyer, WR, Westphal, M, Ostertag, W, von Laer, D (2002) Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* 76: 1488-1495.
- Bradfute, SB, Goodell, MA (2003) Adenoviral transduction of mouse hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 7: 334-340.
- 25 Buning, H, Nicklin, SA, Perabo, L, Hallek, M, Baker, AH (2003) AAV-based gene transfer. *Curr Opin Mol Ther* 5: 367-375.
- Cao, H, Koehler, DR, Hu, J (2004) Adenoviral vectors for gene replacement therapy. *Viral Immunol* 17: 327-333.
- Cavazzana-Calvo, M, Hacein-Bey, S, de Saint Basile, G, Gross, F, Yvon, E, Nusbaum, P, Selz, F, Hue, C, Certain, S, Casanova, JL, Bousso, P, Deist, FL, Fischer, A (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672.
- 30 Chamberlain, JR, Schwarze, U, Wang, PR, Hirata, RK, Hankenson, KD, Pace, JM, Underwood, RA, Song, KM, Sussman, M, Byers, PH, Russell, DW (2004) Gene targeting in stem cells from individuals with osteogénesis im. *Science* 303: 1198-1201.
- Cochrane, AW, Chen, CH, Rosen, CA (1990) Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1198-1202.
- 35 Dancer, A, Julien, S, Bouillot, S, Pointu, H, Vernet, M, Huber, P (2003) Expression of thymidine kinase driven by an endothelial-specific promoter inhibits tumor growth of Lewis lung carcinoma cells in transgenic mice. *Gene Ther* 10: 1170-1178.
- Danthinne, X, Imperiale, MJ (2000) Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 7: 1707-1714.
- 40 Danthinne, X, Werth, E (2000) New tools for the generation of E1- and/or E3-substituted adenoviral vectors. *Gene Ther* 7: 80-87.
- Derossi, D, Calvet, S, Trembleau, A, Brunissen, A, Chassaing, G, Prochiantz, A (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271: 18188-18193.

- Dupre, L, Marangoni, F, Scaramuzza, S, Trifari, S, Hernandez, RJ, Aiuti, A, Naldini, L, Roncarolo, MG (2006) Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promotor/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum Gene Ther* 17: 303-313.
- 5 Dymecki, SM (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6191-6196.
- Emerman, M, Temin, HM (1986) Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors. *Mol Cell Biol* 6: 792-800.
- Felnerova, D, Viret, JF, Gluck, R, Moser, C (2004) Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* 15: 518-529.
- 10 Fessele, S, Maier, H, Zischek, C, Nelson, PJ, Werner, T (2002) Regulatory context is a crucial part of gene function. *Trends Genet* 18: 60-63.
- Flierl, A, Chen, Y, Coskun, PE, Samulski, RJ, Wallace, DC (2005) Adenovirus asociado-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* 12: 570-578.
- 15 Gabriel, B, Teissie, J (1997) Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophys J* 73: 2630-2637.
- Gaspar, HB, Parsley, KL, Howe, S, King, D, Gilmour, KC, Sinclair, J, Brouns, G, Schmidt, M, Von Kalle, C, Barington, T, Jakobsen, MA, Christensen, HO, Al Ghonaium, A, White, HN, Smith, JL, Levinsky, RJ, Ali, RR, Kinnon, C, Thrasher, AJ (2004) Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364: 2181-2187.
- 20 Ginsburg, DS,- Calos, MP (2005) Site-specific integration with phiC31 integrase for prolonged expression of therapeutic genes. *Adv Genet* 54: 179-187.
- Giordano, FA, Fehse, B, Hotz-Wagenblatt, A, Jonnakuty, S, del Val, C, Appelt, JU, Nagy, KZ, Kuehlcke, K, Naundorf, S, Zander, AR, Zeller, WJ, Ho, AD, Fruehauf, S, Laufs, S (2006) Retroviral vector insertions in T-lymphocytes used for suicide gene therapy occur in gene groups with specific molecular functions. *Bone Marrow Transplant* 38: 229-235.
- 25 Grill, RJ, Blesch, A, Tuszyński, MH (1997) Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol* 148: 444-452.
- Hagan, M, Wennersten, A, Meijer, X, Holmin, S, Wahlberg, L, Mathiesen, T (2003) Neuroprotection by human neural progenitor cells after experimental contusion in rats. *Neurosci Lett* 351: 149-152.
- 30 Hammerling, GJ, Ganss, R (2006) Vascular integration of endothelial progenitors during multistep tumor progression. *Cell Cycle* 5: 509-511.
- Heegaard, ED, Brown, KE (2002) Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 15: 485-505.
- Heng, BC, Haider, HK, Sim, EK, Cao, T, Tong, GQ, Ng, SC (2005) Comments about possible use of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes to direct autologous adult stem cells into the cardiomyogenic lineage. *Acta Cardiol* 60: 7-12.
- 35 Herzog, RW, Cao, O, Hagstrom, JN, Wang, L (2006) Gene therapy for treatment of inherited haematological disorders. *Expert Opin Biol Ther* 6: 509-522.
- Huss, R, von Lutichau, I, Lechner, S, Notohamiprodjo, M, Seliger, C, Nelson, P (2004) [Chemokine directed homing of transplanted adult stem cells in wound healing and tissue regeneration]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 88: 170-173.
- 40 Izsvak, Z, Ivics, Z, Plasterk, RH (2000) Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* 302: 93-102.
- Jackson, RJ (2005) Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* 33: 1231-1241.

- Jin, H, Aiyer, A, Su, J, Borgstrom, P, Stupack, D, Friedlander, M, Varner, J (2006) A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest* 116: 652-662.
- Joliot, A, Prochiantz, A (2004) Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6: 189-196.
- 5 Kaminski, JM, Huber, MR, Summers, JB, Ward, MB (2002) Design of a nonviral vector for site-selective, efficient integration into the human genome. *Faseb J* 16: 1242-1247.
- Kanerva, A, Hemminki, A (2005) Adenoviruses for treatment of cancer. *Ann Med* 37: 33-43.
- Kochanek, S, Schiedner, G, Volpers, C (2001) High-capacity 'gutless' adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther* 3: 454-463.
- 10 Kojaoghlanian, T, Flomenberg, P, Horwitz, MS (2003) The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 13: 155-171.
- Kosaka, Y, Kobayashi, N, Fukazawa, T, Totsugawa, T, Maruyama, M, Yong, C, Arata, T, Ikeda, H, Kobayashi, K, Ueda, T, Kurabayashi, Y, Tanaka, N (2004) Lentivirus-based gene delivery in mouse embryonic stem cells. *Artif Organs* 28: 271-277.
- 15 Lakso, M, Sauer, B, Mosinger, B, Jr., Lee, EJ, Manning, RW, Yu, SH, Mulder, KL, Westphal, H (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6232-6236.
- Neff, T, Beard, BC, Kiem, HP (2006) Survival of the fittest: in vivo selection and stem cell gene therapy. *Blood* 107: 1751-1760.
- Neff, T, Blau, CA (2001) Pharmacologically regulated cell therapy. *Blood* 97: 2535-2540.
- 20 O'Connor, TP, Crystal, RG (2006) Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet* 7: 261-276.
- Orban, PC, Chui, D, Marth, JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6861-6865.
- Pasanen, T, Hakkarainen, T, Timonen, P, Parkkinen, J, Tenhunen, A, Loimas, S, Wahlfors, J (2003) TK-GFP fusion gene virus vectors as tools for studying the features of HSV-TK/ganciclovir cancer gene therapy in vivo. *Int J Mol Med* 25: 525-531.
- 25 Persons, DA, Tisdale, JF (2004) Gene therapy for the hemoglobin disorders. *Semin Hematol* 41: 279-286.
- Reyes, M, Dudek, A, Jahagirdar, B, Koodie, L, Marker, PH, Verfaillie, CM (2002) Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109: 337-346.
- 30 Rodriguez, CI, Buchholz, F, Galloway, J, Sequerra, R, Kasper, J, Ayala, R, Stewart, AF, Dymecki, SM (2000) High efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25: 139-140.
- Rols, MP, Teissie, J (1990) Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J* 58: 1089-1098.
- 35 Shindo, T, Matsumoto, Y, Wang, Q, Kawai, N, Tamiya, T, Nagao, S (2006) Differences in the neuronal stem cells survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe experimental traumatic brain injury. *J Med Invest* 53: 42-51.
- Smith-Arica, JR, Thomson, AJ, Ansell, R, Chiorini, J, Davidson, B, McWhir, J (2003) Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors. *Cloning Stem Cells* 5: 51-62.
- Sodroski, J, Wyatt, R, Olshevsky, U, Olshevsky, V, Moore, J (1996) Conformation of the HIV-1 gp 120 envelope glycoprotein. *Antibiot Chemother* 48: 184-187.
- 40 Suhr, ST, Gage, FH (1993) Gene therapy for neurologic disease. *Arch Neurol* 50: 1252-1268.
- Tirona, RG, Kim, RB (2005) Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J Pharm Sci* 94: 1169-1186.

- Torchilin, VP (2006) Recent métodos to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng* 8: 343-375.
- Tranchant, I, Thompson, B, Nicolazzi, C, Mignet, N, Scherman, D (2004) Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S24-35.
- 5 Trobridge, G, Vassilopoulos, G, Josephson, N, Russell, DW (2002) Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol* 346: 628-648.
- von Luetichau, I, Notohamiprodjo, M, Wechselberger, A, Peters, C, Henger, A, Seliger, C, Djafarzadeh, R, Huss, R, Nelson, PJ (2005) Human Adult CD34- Progenitor Cells Functionally Express the Chemokine Receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev*, *Stem Cells Dev* 14:329-336, 2005.
- 10 Wennersten, A, Meier, X, Holmin, S, Wahlberg, L, Mathiesen, T (2004) Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 100: 88-96.
- Werner, T, Fessele, S, Maier, H, Nelson, PJ (2003) Computer modeling of promotor organization as a tool to study transcriptional coregulation. *Faseb J* 17: 1228-1237.
- 15 Wu, N, Ataai, MM (2000) Production of viral vectors for gene therapy applications. *Curr Opin Biotechnol* 11: 205-208.
- Young, LS, Searle, PF, Onion, D, Mautner, V (2006) Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 208: 299-318.
- Young, SM, Jr., Samulski, RJ (2001) Adenovirus asociado (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within of the AAV terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13525-13530.
- 20 Young, SM, Jr., Xiao, W, Samulski, RJ (2000) Site-specific targeting of DNA plasmids to chromosome 19 using AAV cis y trans sequences. *Methods Mol Biol* 133: 111-126.
- Yu, JH, Schaffer, DV (2005) Advanced targeting strategies for murine retroviral and adeno-associated viral vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99: 147-167.
- 25 Zernecke, A, Erl, W, Fraemohs, L, Lietz, M, Weber, C (2003) Suppression of endothelial adhesion molecule upregulation with cyclopentenone prostaglandins is dissociated from IkappaB-alpha kinase inhibition and cell death induction. *Faseb J* 17: 1099-1101.
- Deeg HJ, Klingemann HG, Philips GL, *A Guide to Bone Marrow Transplantation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992.
- Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., p. 808, Lippincott Williams & Wilkins (2000).
- 30 Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC: Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J Surg*. 2002 Jul; 26 (7):783-9.
- Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. Uniform vascular-endothelialcell- specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1997 94: 3058-63. *J. Cell Physiol*. 2007, Apr. 25 [Epub ahead of print].
- 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Blastocitos mesenquimales CD34 genéticamente modificados, en donde cada uno de los blastocitos CD34 genéticamente modificados contiene un ácido nucleico exógeno que comprende (i) una región que codifica una proteína que mejora el crecimiento celular endotelial, cuya región se liga funcionalmente a (ii) un promotor específico de endotelio o combinación de promotor/mejorador para el uso en tratar un sujeto diabético o prediabético en donde la introducción de los blastocitos CD34 genéticamente modificados dentro del torrente sanguíneo del sujeto no está precedido, acompañado o seguido por mieloablación.
2. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es humano.
- 10 3. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el sujeto es pre-diabético.
4. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con la reivindicación previa, en donde el sujeto pre-diabético es pre-diabético para diabetes tipo I.
- 15 5. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el sujeto pre-diabético es pre-diabético para diabetes tipo II.
6. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el sujeto es diabético.
7. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el sujeto diabético está afectado con diabetes tipo I.
- 20 8. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el sujeto diabético está afectado con diabetes tipo II.
9. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la combinación de promotor/mejorador es el promotor/mejorador Tie2 y la proteína que mejora el crecimiento celular endotelial es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) asociado con angiogenia.
- 25 10. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los blastocitos CD34 genéticamente modificados son alogénicos con respecto al sujeto.
11. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 9, en donde los blastocitos CD34 genéticamente modificados son autólogos con respecto al sujeto.
- 30 12. Los blastocitos CD34 genéticamente modificados para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el número terapéuticamente efectivo de blastocitos CD34 genéticamente modificados es de 1×10^3 a 1×10^7 células/kg de peso corporal.

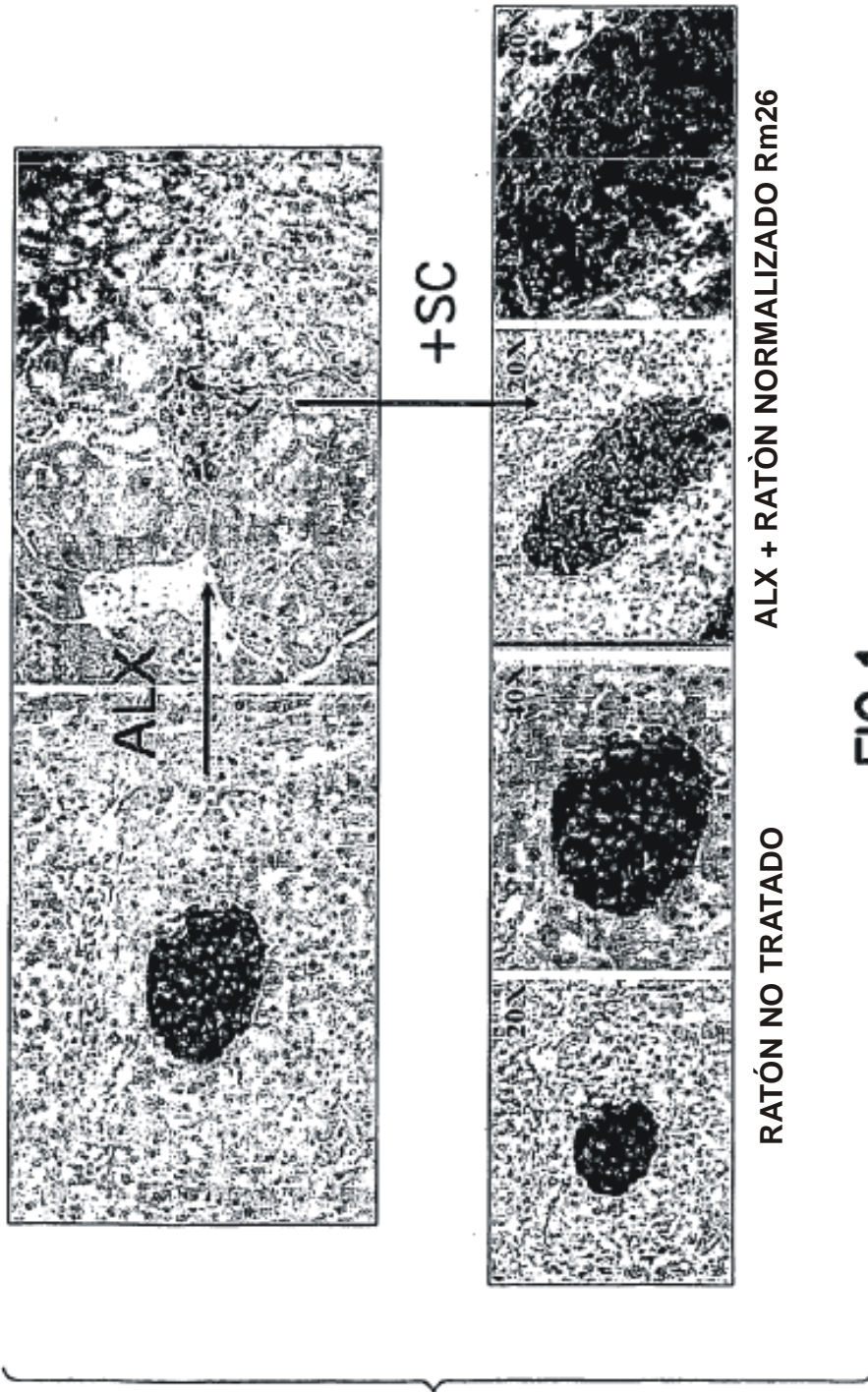
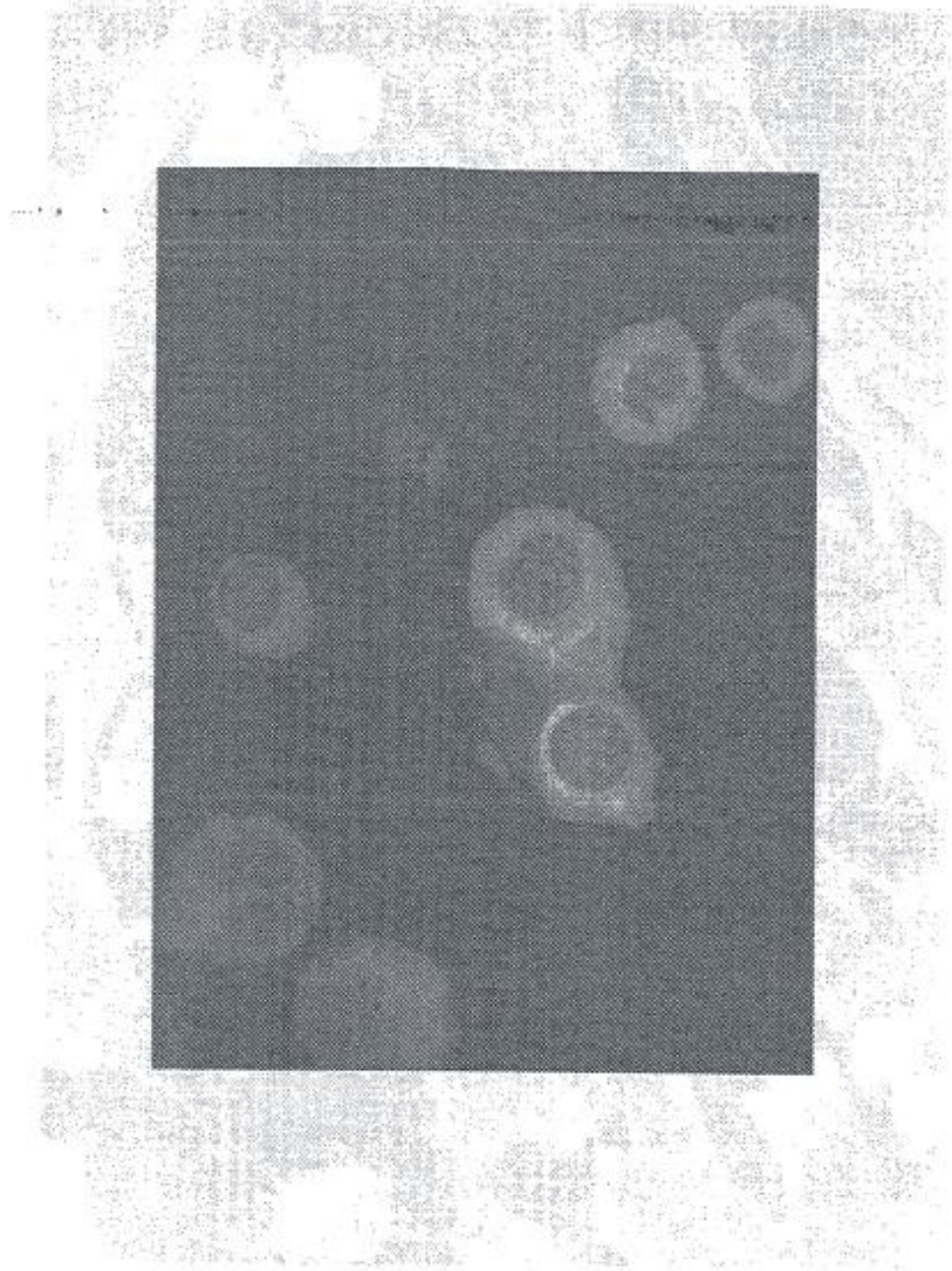


FIG.1

FIGURA 2



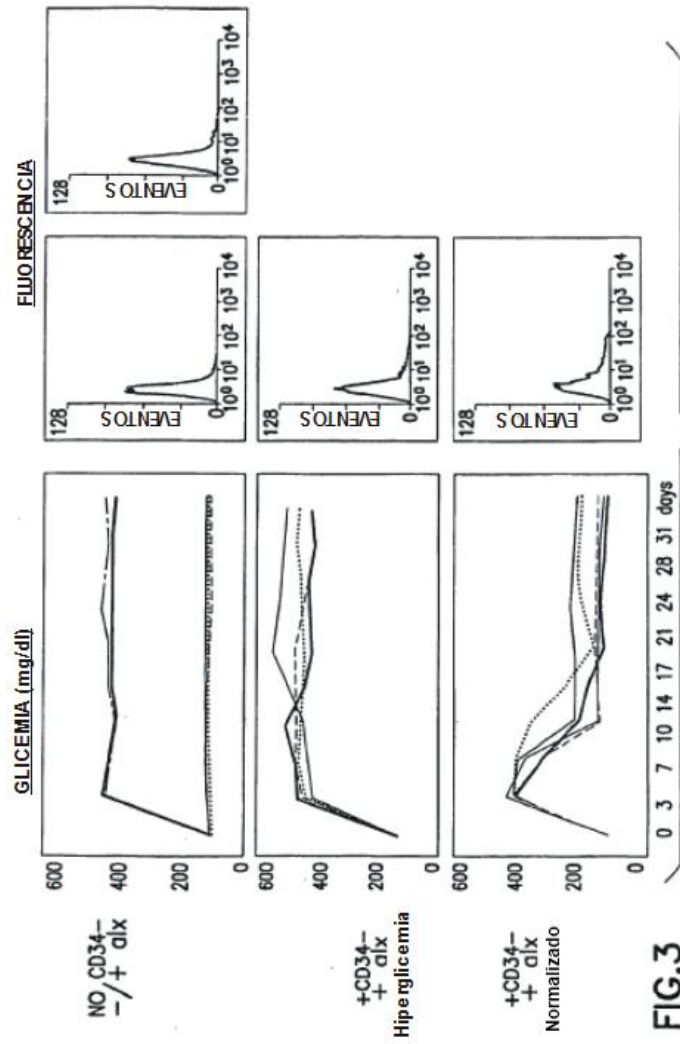


FIG.3

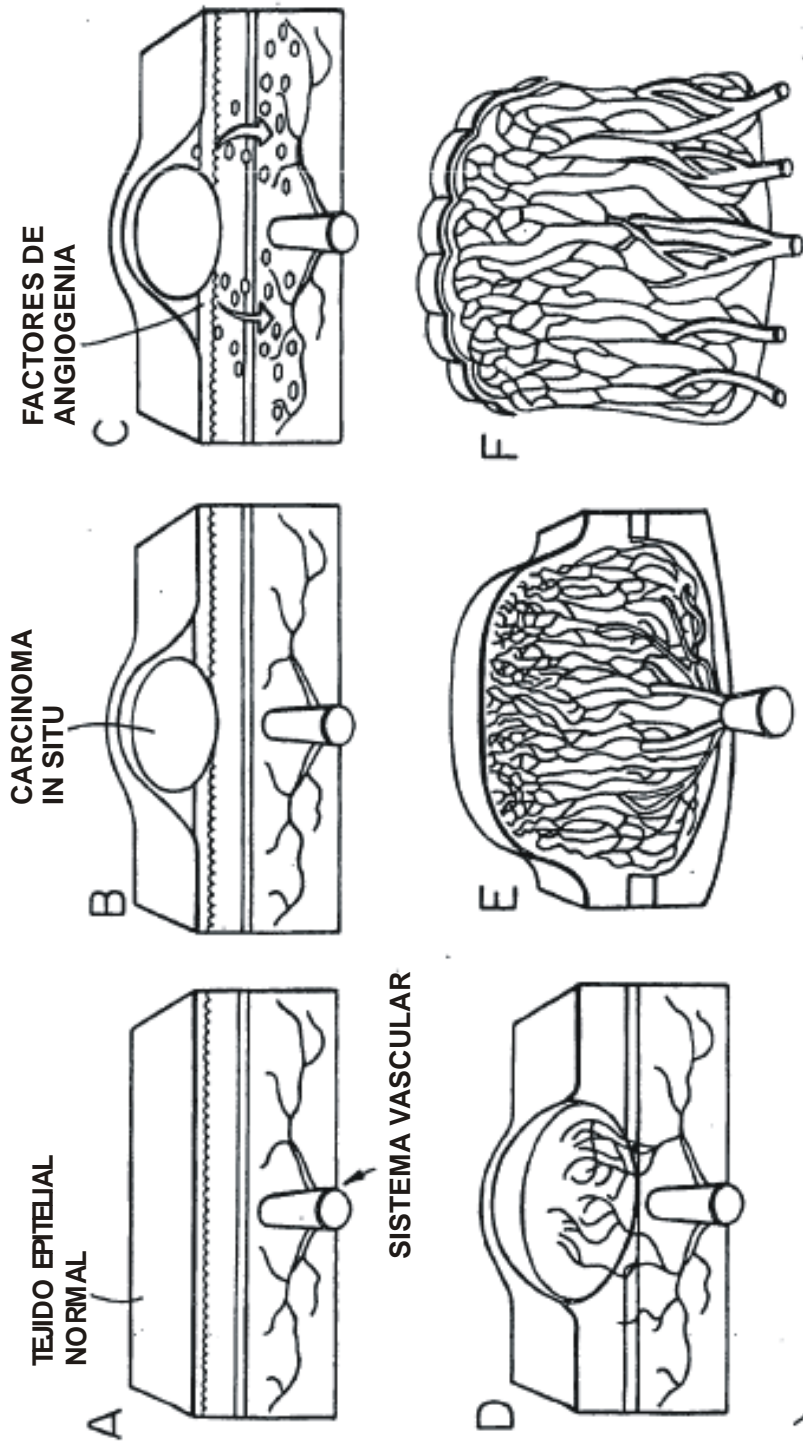
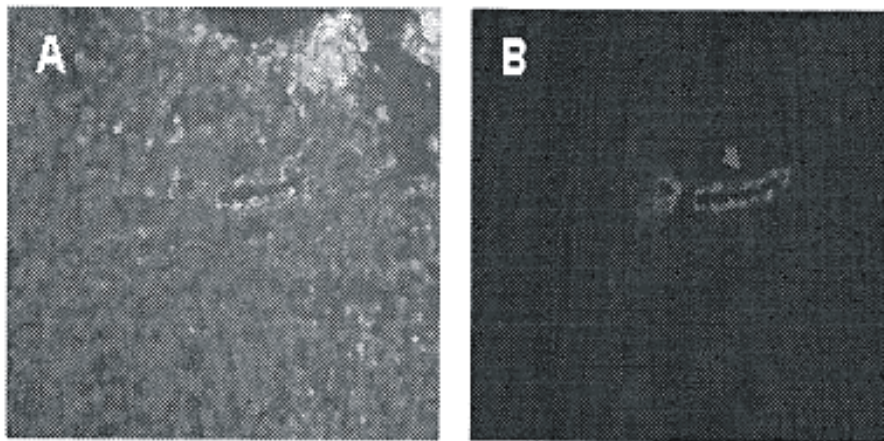


FIGURA 5



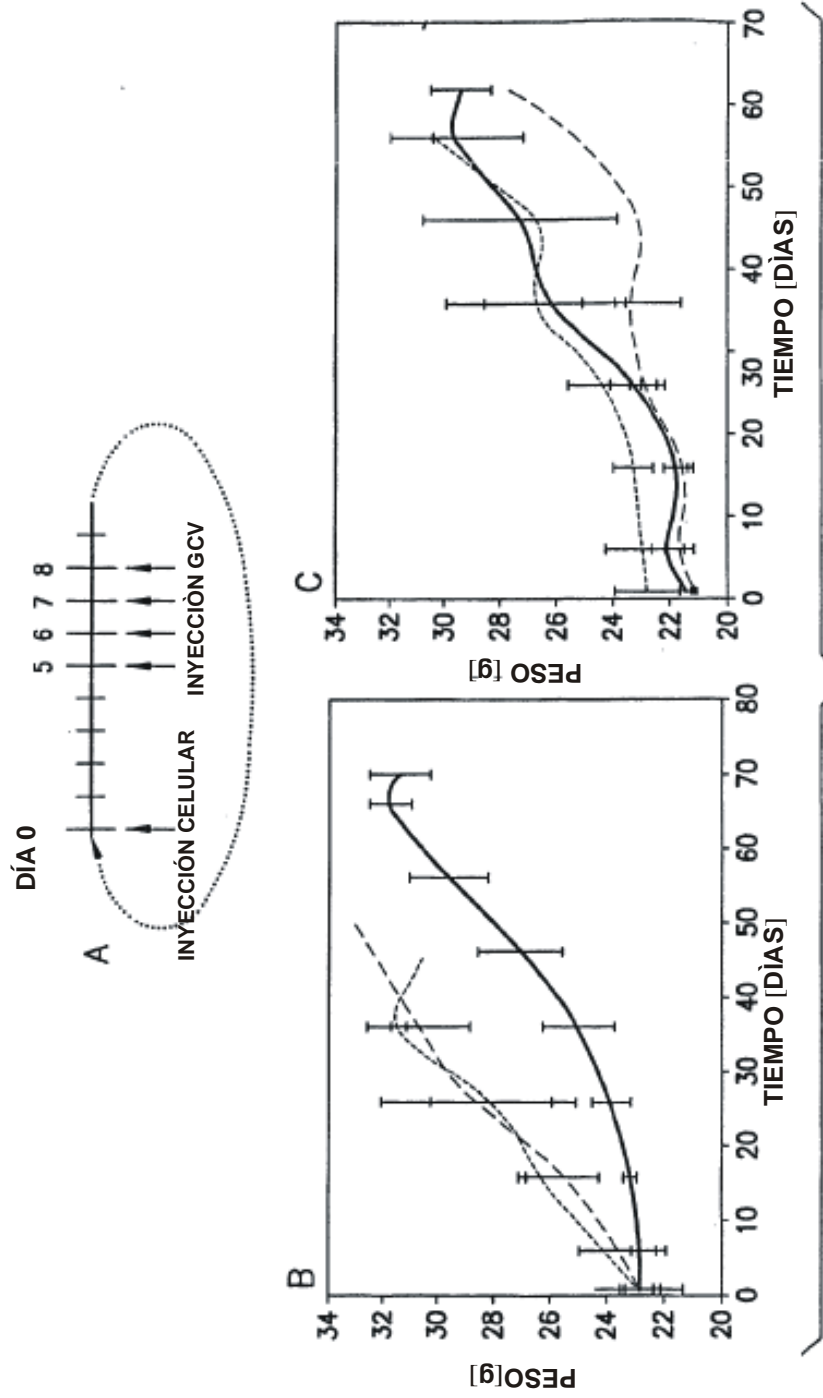


FIG.6

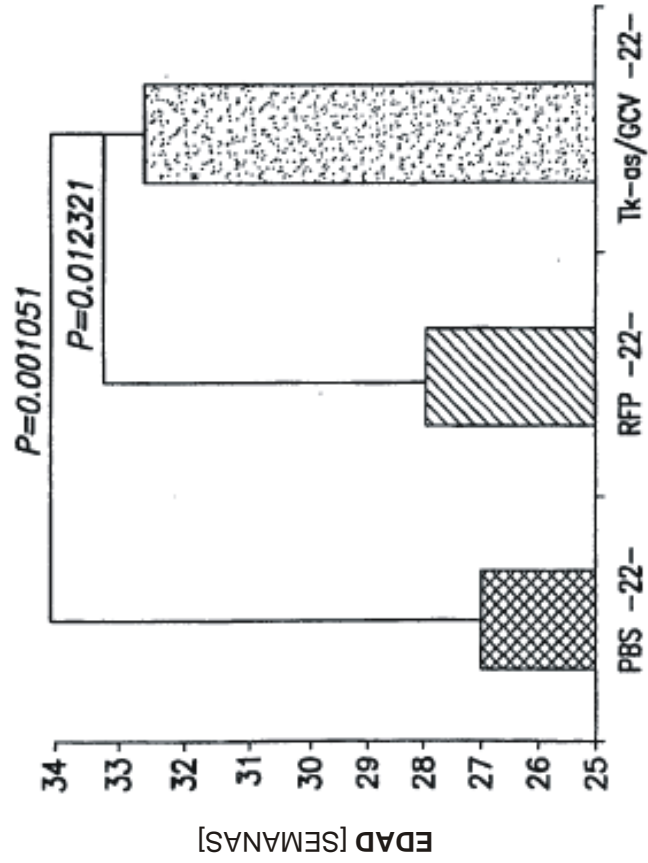
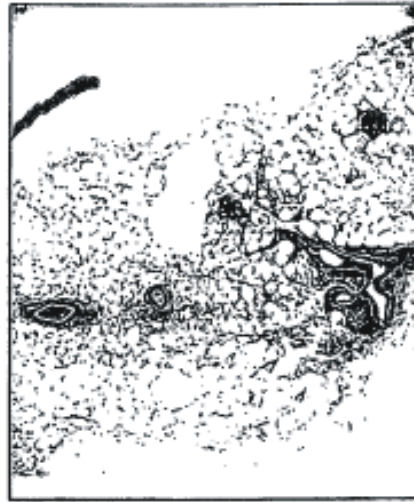


FIG.7

FIG.8



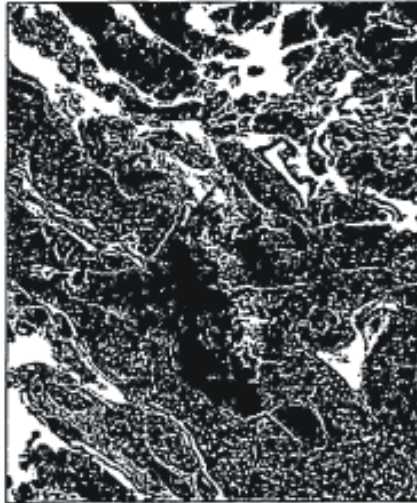
CONTROL DE TUMOR DE MAMA



**TRATADOS POR 4 SEMANAS (18 - 22)
CON imMSC/TK + GV I.V.**



CONTROL DE MAMA NORMAL



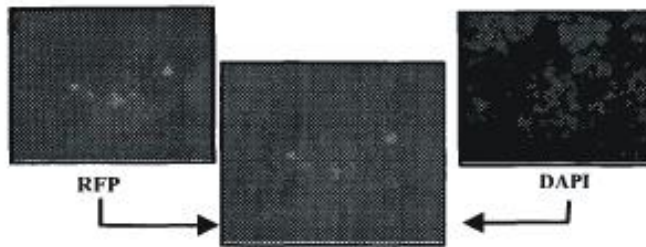
**CONTROL DE TUMOR - ADICIÓN DE
CONTROL imMSC**

FIGURA 9

MSC diseñado con ingeniería para expresar GFP bajo el control del promotor CMV, hogar de la inyección i.v.



MSC diseñado con ingeniería para expresar RFP bajo el control del Tie2



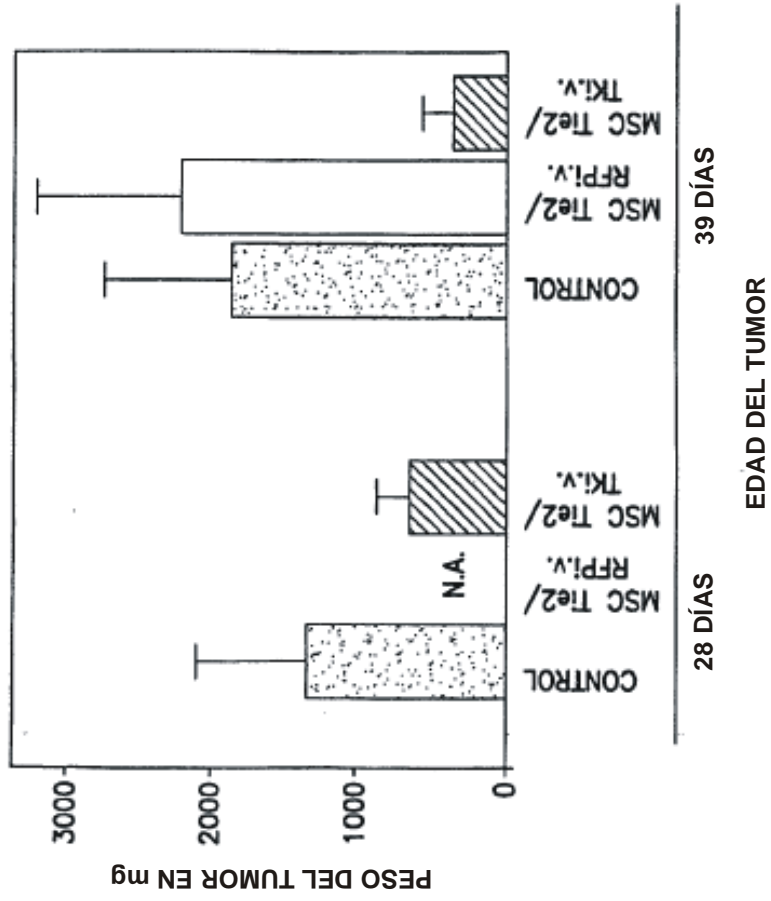


FIG.10

FIGURA 11

