

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 434 257**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2003 E 10011678 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2266543**

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

(30) Prioridad:

06.06.2002 US 386870 P

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

16.12.2013

(73) Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US**

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 434 257 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

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

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

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

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

45 Según un aspecto, la invención es un método para suministrar una sustancia a un individuo. El método comprende administrar a un individuo un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene una sustancia para suministrar la sustancia al individuo.

50 También se describe un método para preparar un sistema de suministro de sustancias de coágulos de células hematopoyéticas no poliméricos. Este método comprende añadir una sustancia a una muestra de células hematopoyéticas y permitir que la muestra de células hematopoyéticas que contiene la sustancia forme un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.

55 Según otro aspecto más, la invención es un sistema de suministro de sustancias que comprende un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico con una sustancia incorporada en el mismo según las reivindicaciones 1 y 2.

60 El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico comprende células de médula ósea. También se describen células sanguíneas o cualquier otro tipo de célula que formaría un coágulo. La sustancia puede comprender un vehículo de transferencia génica, células adicionales, tales como células de ingeniería genética o células no tratadas con ningún tratamiento, proteínas, tales como proteínas recombinantes o solubles, moléculas bioactivas o cualquier otro tipo de sustancia que pudiese afectar a un individuo.

65 El coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se puede suministrar a cualquier tipo de tejido. Por ejemplo, en algunas realizaciones el tejido es hueso, tejidos blandos, cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales o cualquier otra región del cuerpo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La Fig. 1 es una lista ejemplar de genes que se han usado en terapia génica;

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

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

La Fig. 4 es una foto de un coágulo sanguíneo humano de 2 mm de grosor, 30 mm de diámetro (formado en un pocillo de cultivo de tejidos);

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

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

médula ósea de conejo infectadas por Ad TGF- β ;

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

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

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

45 La célula hematopoyética se puede aislar del mismo individuo al que se suministrará el coágulo, a partir de otro individuo al que no se suministrará la sustancia, a partir de una muestra de laboratorio cultivada *in vitro* o a partir de cualquier otra fuente de células hematopoyéticas. Claramente, diferentes situaciones y sustancias favorecerían diferentes fuentes a partir de las que se tomaría el coágulo de células hematopoyéticas. Por ejemplo, si el coágulo de células hematopoyéticas se obtiene del mismo individuo al que se suministrará la sustancia, el coágulo es completamente natural y autólogo para el individuo. Por lo tanto, es menos probable que las células hematopoyéticas interfieran con el suministro de sustancia, inhiban el efecto deseado de la sustancia o produzcan 50 una respuesta inmunitaria.

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

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

- Como se mencionó anteriormente, el coágulo de células hematopoyéticas puede ser útil para la reparación de tejido defectuoso. El coágulo se puede colocar en el tejido para ayudar en el proceso de curación. Preferiblemente, se incorpora al coágulo una sustancia que también es útil en el proceso de reparación. Es posible en algunos casos que el coágulo se use solo para proporcionar simplemente una matriz para crecimiento hacia adentro de las células durante el proceso de reparación, pero preferiblemente se incorpora en la misma una sustancia, tal como una célula, fármaco o vector génico. El tejido defectuoso puede ser cualquier tejido que requiera reparación. Por ejemplo, el tejido puede ser hueso y diversos tejidos blandos, incluyendo pero no limitándose a, cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales. Alternativamente, el coágulo de células hematopoyéticas se puede usar como un sistema *in vitro* para lograr o reparar tejidos para implante posterior. Para formación de tejido *in vitro*, los coágulos de células hematopoyéticas se pueden sembrar con las células y cultivar en el medio apropiado.
- El coágulo de células hematopoyéticas también se puede usar para suministrar fármacos o células a un individuo en ausencia de tejido a reparar. Por ejemplo, el coágulo se puede usar como se usa cualquier otro dispositivo de liberación sostenida, para suministrar un compuesto a un individuo. Los usos específicos dependerán del tipo de fármaco, célula o vector génico que se tenga que suministrar al individuo.
- Como se usa en la presente memoria, un "individuo" es un vertebrado tal como un ser humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor.
- La formación del coágulo de células hematopoyéticas puede tener lugar en diversas condiciones, tal como a temperatura ambiente. Por ejemplo, la coagulación de sangre y aspirado de médula ósea de conejo o ser humano tendrá lugar en aproximadamente 15-30 minutos. Este coágulo se puede generar por lo tanto e implantar de manera intra-operativa, si se desea así.
- Una vez que se ha formado el coágulo de células hematopoyéticas, se puede retirar del coágulo cualquier sustancia no unida. Por ejemplo, el coágulo de células hematopoyéticas se podría lavar en una disolución tal como una disolución salina tamponada con fosfato. Ejemplos de métodos más detallados para preparar los coágulos se explican en la descripción de experimentos presentada a continuación. Los expertos normales en la técnica saben de otros métodos para preparar coágulos con células hematopoyéticas.
- Como se usa en la presente memoria, un "coágulo de células hematopoyéticas no polimérico" es un coágulo de células hematopoyéticas, como se definió anteriormente, en el que no se incorpora una matriz polimérica en el coágulo o se usa como la estructura del coágulo. La mayoría de los dispositivos de suministro de fármacos para reparaciones de tejidos usan una matriz polimérica como una estructura para suministrar el fármaco. Una matriz polimérica se forma de polímeros, tales como polisacáridos modificados o naturales, tales como quitosano, quitina, hialuronano, glucosaminoglucano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano, sulfato de dermatano, heparina o sulfato de heparina. Un polímero puede ser una proteína natural, recombinante o sintética, tal como colágeno soluble o gelatina soluble, o poliaminoácidos, tales como por ejemplo una polilisina. Un polímero también puede ser polí(ácido láctico), polí(ácido glicólico), homopolímeros y copolímeros de bloques sintéticos que contienen funcionalidades carboxílica, amino, sulfónica, fosfónica, fosfénica, con o sin funcionalidades adicionales, tales como, por ejemplo, sin limitación hidroxilo, tiol, alcoxi, ariloxi, aciloxi y aroloxí. Adicionalmente, un polímero puede comprender ortoésteres, anhídridos, propilenocofumaratos o un polímero de uno o más monómeros de ácido alfa-hidroxicarboxílico (por ejemplo, ácido alfa-hidroxiacético (ácido glicólico) y/o ácido alfa-hidroxipropiónico (ácido láctico)).
- Se puede disolver o suspender inicialmente un polímero en un tampón que contiene sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, fosfato, sulfato y carboxilato de potasio, calcio, magnesio. También se puede disolver o suspender un polímero en un tampón que contenga una sal orgánica tal como fosfato de glicerol, fosfato de fructosa, fosfato de glucosa, fosfato de L-serina, fosfato de adenosina, glucosamina, galactosamina, HEPES, PIPES y MES.
- Una sustancia se incorpora en el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico. Como se usa en la presente memoria, una "sustancia" es cualquier composición que tenga un efecto sobre un individuo, incluyendo un efecto de diagnóstico. La sustancia puede ser, por ejemplo, una célula o cualquier otro agente activo, por ejemplo un fármaco o un vector génico capaz de expresar un péptido, una molécula pequeña, etc. La sustancia es una sustancia exógena. Es decir, es aquella que se añade a la muestra de células hematopoyéticas y que no estaba presente en la muestra de células antes de que se tomara de su entorno previo (es decir, un individuo, un entorno *in vitro*, etc.). Son ejemplos de la sustancia vehículos de transferencia génica (víricos y no víricos), células adicionales, de ingeniería genética o sin tratamiento previo, recombinantes, solubles o cualquier otro tipo de proteínas u otras moléculas bioactivas tales como factores de crecimiento.
- Un agente activo, como se usa en la presente memoria, es cualquier compuesto que presenta un efecto de diagnóstico, profiláctico o terapéutico en un organismo biológico. Los agentes activos incluyen compuestos tales como proteínas, péptidos, anticuerpos, polisacáridos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, ADN, APN, múltiples de ellos (por ejemplo, tríplex)), sacáridos, glicoproteínas, aminoácidos, virus, mezclas heterogéneas de macromoléculas (por ejemplo, un extracto de producto natural) y macromoléculas híbridas (por ejemplo, híbridos de proteína/ácido nucleico, proteínas conjugadas con albúmina, fármacos con ligadores, moléculas inorgánicas,

moléculas orgánicas o combinaciones de los mismos).

- Un agente bioactivo es cualquier compuesto que tiene un efecto profiláctico o terapéutico en un organismo biológico. En algunas realizaciones, el agente bioactivo es cualquiera de los siguientes agentes: agente adrenérgico; esteroide adrenocortical; supresor adrenocortical; agentes para el tratamiento del conocimiento, antiplaquetas; antagonista de la aldosterona; aminoácido; anabólico; analéptico; analgésico; anestésico; anoréctico; agente anti-acné; anti-adrenérgico; anti-alérgico; anti-Alzheimer, anti-amébico; anti-anémico; anti-anginal; anti-artrítico; anti-asmático; anti-aterosclerótico; antibacteriano; anticolinérgico; anticoagulante; anticonvulsivo; antidepressivo; antidiabético; antidiarreico; antidiurético; anti-emético; anti-epiléptico; antifibrinolítico; antifúngico; antihemorrágico; antihistamina; 5 antihiperlipidemia; antihipertensivo; antihipotensivo; anti-infeccioso; anti-inflamatorio; antimicrobiano; antimigraña; antimitótico; antimicótico, antináuseas, antineoplásico; antineutropénico; antiparasitario; antiproliferativo; antisíntetico; antireumático; antiseborreico; antisecretor; antiespasmódico; antitrombótico; anti-ulcero; antivírico; anxiolíticos; supresor del apetito; regulador de glucosa en sangre; inhibidor de la resorción ósea; broncodilatador; 10 agente cardiovascular; colinérgico; inhibidores de la COX1, inhibidores de la COX2, inhibidores de trombina directos, depresores; auxiliares de diagnóstico; diuréticos; agentes dopaminérgicos; agonista de los receptores de estrógeno; fibrinolítico; agente fluorescente; eliminador de radicales libres de oxígeno; efecto de la motilidad gastrointestinal; glucocorticoide; antagonistas de GPIIbIIIa, estimulante del crecimiento del cabello; hemostático; antagonistas de los receptores de histamina H₂; hormona; hormona del crecimiento humano, hipocolesterolémico; hipoglucémico; hipolipidémico; hipnóticos, hipotensivo; agente formador de imágenes; agentes inmunológicos tales como agentes 15 inmunitantes, inmunomoduladores, inmunorreguladores, inmunoestimulantes e inmunosupresores; queratolíticos; agonista de LHRH; regulador del humor; mucolítico; midriático; descongestionante nasal; agente de bloqueo neuromuscular; neuroprotector; antagonista de NMDA; derivado de esterol no hormonal; activador de plasminógeno; antagonista del factor de activación de plaquetas; inhibidor de la agregación de plaquetas; inhibidores de la bomba de protones; psicotrópico; agente radioactivo; escabicida; agente esclerosante; sedante; sedante-hipnótico; 20 antagonista de adenosina A1 selectivo; antagonista de la serotonina; inhibidor de la serotonina; antagonista de los receptores de serotonina; estatinas; esteroide; hormona tiroidea; inhibidor tiroideo; tiromimético; tranquilizante; agente de esclerosis lateral amiotrófica; agente de isquemia cerebral; agente de la enfermedad de Paget; agente de angina inestable; vasoconstrictor; vasodilatador; agente de curación de heridas; inhibidor de la xantina oxidasa.
- 25 Un uso preferido del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico es reparar defectos óseos y de tejidos. Las proteínas que es más probable que estén ligadas a reparación de cartílago, huesos y tejido blando son los miembros de la superfamilia de factor β de crecimiento transformante (TGF-β), incluyendo TGF-β S 1-3, diversas proteínas morfogenéticas óseas (las BMP), factores de crecimiento de fibroblastos, hormona del crecimiento y factores de crecimiento de tipo insulina (los IGF). 30
- 30 La administración in vivo de proteínas recombinantes para mejorar la formación de cartílago y reparación de cartílago así como la de hueso y tejido blando se ha investigado en diversos modelos de defectos y animales experimentales. A pesar de los resultados prometedores, la aplicación clínica de las proteínas recombinantes está 35 impedida por las semivididas biológicas cortas de estas moléculas y la ausencia de un método eficaz para suministro diana, sostenido. La inyección directa de factores de crecimiento de proteínas a ²Hunziker, 2.001; Nixon et al., 1.999; Sellers et al., 1.997 sitios de daño de tejidos ha conducido a resultados decepcionantes debido a que los factores se diluyen mediante fluidos corporales, se metabolizan rápidamente o se diseminan a otros tejidos. Así, el mantenimiento de concentraciones terapéuticas requiere dosis de carga muy altas o administración repetida. Esto 40 disminuye la eficacia de reparación, al tiempo que aumentan los costes, la complejidad y el riesgo de generar efectos secundarios indeseados de la exposición de órganos no diana. Los coágulos de células hematopoyéticas no poliméricos descritos en la presente memoria superan muchos de estos problemas, como se demuestra en los ejemplos presentados a continuación.
- 45 El coágulo es también útil para suministrar genes a un individuo, en general o a un tejido específico de un individuo. Como se usa en la presente memoria, un "gen" es una molécula de ácido nucleico aislada de más de treinta nucleótidos, más típicamente cien nucleótidos o más, de longitud. En general estará bajo el control de un promotor apropiado, que puede ser inducible, reprimible o constitutivo. Cualquier gen que sería útil sustituyendo o 50 enriqueciendo una función deseada, o logrando un efecto deseado, tal como la inhibición del crecimiento tumoral, se podría introducir usando los coágulos descritos en la presente memoria. Los promotores pueden ser promotores generales, que proporcionan expresión en una variedad de células de mamíferos, o específicos de células, o incluso específicos nucleares frente a citoplasmáticos. Son conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden construir usando protocolos de biología molecular estándar.
- 55 Cualquier tipo de gen es útil según los métodos de la invención. Los genes específicos usados en una circunstancia particular dependerán de la afección que se esté tratando y/o del resultado terapéutico deseado. Una lista ejemplar de genes que se han usado en tratamiento génico se proporciona en la Figura 1. En algunas realizaciones de la invención, se puede incorporar uno cualquiera o cualquier combinación de los genes enumerados en la Figura 1 al dispositivo de suministro de la invención.
- 60 La transferencia génica ofrece un enfoque que puede superar las muchas limitaciones de suministro de proteínas a tejidos dañados. La invención descrita en esta descripción presenta un nuevo sistema para la aplicación de 65

vehículos de suministro génica, células y proteínas solubles para la curación de tejidos dañados. Suministrando los ADNc que codifican proteínas con potencial reparador o terapéutico a células específicas en sitios de lesión o enfermedad, las células genéticamente modificadas se convierten en factores locales para producción de fármacos, permitiendo la síntesis prolongada de la proteína específica.

5 Se publican en la bibliografía promotores, potenciadores, vectores, etc., adecuados, para dichos genes. En general, los genes útiles sustituyen o enriquecen la función, incluyendo los genes que codifican enzimas ausentes tales como adenosina desaminasa (ADA) que se ha usado en ensayos clínicos para tratar la deficiencia de ADA y cofactores tales como insulina y factor VIII de coagulación. También se pueden administrar genes que afectan a la regulación, 10 solos o en asociación con un gen que enriquece o sustituye una función específica. Por ejemplo, mediante los coágulos de la invención se puede administrar un gen que codifica una proteína que suprime la expresión de un gen codificador de proteína particular. Los genes se pueden obtener o derivar de una variedad de fuentes, incluyendo referencias bibliográficas, Genbank, o proveedores comerciales. Se pueden sintetizar usando síntesis en fase sólida 15 si son relativamente pequeños, se pueden obtener de muestras depositadas tales como las depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD, o se pueden aislar de novo usando información publicada de secuencias.

Además de genes, la sustancia puede ser un oligonucleótido corto, tal como antisentido, y ribozimas que se distinguen de los genes por su longitud y función. A diferencia de dichos oligonucleótidos cortos, los genes codifican 20 proteínas y por lo tanto tendrán típicamente un mínimo de más de 100 pares de bases en longitud, más típicamente en los centenares de pares de bases.

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

25 También se reconocerá que los genes en vectores de expresión se pueden transferir en células hospedantes y estirpes celulares, por ejemplo procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo, células dendríticas, células B, células CHO, células COS, sistemas de expresión de levaduras y expresión de baculovirus recombinante en células de insectos) *in vitro*. Estas células se pueden incorporar después a los coágulos. Son especialmente útiles 30 las células de mamíferos tales como ser humano, ratón, hámster, cerdo, cabra, primate, etc. Pueden ser de una amplia variedad de tipos de tejidos, e incluyen células primarias y estirpes celulares. Los ejemplos específicos incluyen queratinocitos, leucocitos sanguíneos periféricos, células madre de médula ósea y células madre embrionarias. Los vectores de expresión requieren que la secuencia génica pertinente esté ligada de manera operativa a un promotor.

35 En algunas realizaciones, se selecciona un vector de virus para suministrar un gen del grupo que consiste en: adenovirus, virus adeno-asociados, poxvirus, incluyendo virus de la vacuna y poxvirus atenuados, virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana, retrovirus, virus Sindbis, y partícula semejante al virus Ty. Ejemplos de virus y partículas semejantes a virus que se han usado para suministrar ácidos nucleicos exógenos 40 incluyen: adenovirus de replicación defectuosa (por ejemplo, Xiang et al., Virology 219: 220-227, 1.996; Eloit et al., J. Virol. 7: 5375-5381, 1997; Chengalvala et al., Vaccine 15: 335-339, 1997), un retrovirus modificado (Townsend et al., J. Virol. 71: 3.365-3374, 1997), un retrovirus no replicado (Irwin et al., J. Virol. 68: 5036-5044, 1994), un virus del bosque Semliki de replicación defectuosa (Zhao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3009-3013, 1995), virus de la viruela del canario y derivado de virus de la vacuna muy atenuado (Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11349-45 11353, 1996), virus de la vacuna no replicado (Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11341-11348, 1996), virus de la vacuna replicado (Moss, Dev. Biol. Stand. 82: 55-63, 1994), virus de la encefalitis equina venezolana (Davis et al., J. Virol. 70: 3781-3787, 1996), virus Sindbis (Pugachev et al., Virology 212: 587-594, 1995) y partícula semejante al virus Ty (Allsopp et al., Eur. J. Immunol 26: 1951-1959, 1996). En realizaciones preferidas, el vector vírico es un adenovirus o un alfavirus.

50 Otro virus preferido para ciertas aplicaciones es el virus adeno-asociado, un virus de ADN bícatenario. El virus adeno-asociado es capaz de infectar un amplio intervalo de tipos celulares y especies, y se puede manipular mediante ingeniería para que sea de replicación deficiente. Además presenta ventajas, tales como estabilidad del disolvente al calor y a los lípidos, altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células 55 hematopoyéticas, y carece de inhibición de superinfección permitiendo así múltiples series de transducciones. El virus adeno-asociado puede integrarse en ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando de ese modo la posibilidad de mutagénesis de inserción, y variabilidad de expresión de genes insertados. Además, las infecciones por virus adeno-asociados de tipo salvaje se han seguido en cultivo de tejidos durante más de 100 pasadas en ausencia de presión selectiva, que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un suceso relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de un modo extracromosómico.

60 En general, otros vectores víricos preferidos se basan en virus de eucariotas no citopáticos en el que los genes no esenciales se han sustituido por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa de ARN vírico genómico en ADN con la integración provírica posterior en ADN celular hospedante. Se han aprobado adenovirus y retrovirus para ensayos de terapia génica humana. En general, los retrovirus son de replicación deficiente (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero

- incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovíricos genéticamente alterados presentan utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Los protocolos estándar para producir retrovirus de replicación deficiente (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una estirpe celular empaquetada con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la estirpe celular empaquetada, colección de partículas víricas de medios de cultivo de tejidos, e infección de las células diana con partículas víricas) se proporcionan en Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual," W. H. Freeman Co., Nueva York (1990) y Murry, E. J. Ed. "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, Nueva Jersey (1991).
- 5 10 Preferiblemente, los vectores de suministro de ácidos nucleicos anteriores: (1) contienen material genético exógeno que se puede transcribir y traducir en una célula de mamífero, y (2) opcionalmente pueden contener sobre una superficie un ligando que se une selectivamente a un receptor sobre la superficie de una célula diana, tal como una célula de mamífero, y gana de ese modo entrada en la célula diana.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Se pueden emplear diversas técnicas para introducir los ácidos nucleicos de la invención en células, dependiendo de si los ácidos nucleicos se introducen *in vitro* o *in vivo* en un hospedante. Dichas técnicas incluyen la transfección de precipitados de ácido nucleico-CaPO₄, transfección de ácidos nucleicos asociados con DEAE, transfección o infección con los virus anteriores que incluyen el ácido nucleico de interés, transfección mediada por liposomas, y similares. Para algunos usos, se puede preferir dirigir el ácido nucleico a células particulares, especialmente si el coágulo se implanta o se administra en un sitio distante de la célula diana. En dichos casos, un vehículo usado para suministrar un ácido nucleico de la invención a una célula (por ejemplo, un retrovirus u otro virus; un liposoma) después de la liberación del coágulo puede tener una molécula diana unida al mismo. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo específico para una proteína superficial de membrana en la célula diana o un ligando para un receptor en la célula diana se puede unir a, o incorporar en, el vehículo de suministro de ácidos nucleicos. En el caso de que se empleen liposomas para suministrar los genes, las proteínas que se unen a una proteína superficial de membrana asociada con la endocitosis se pueden incorporar a la formulación de liposomas para dirigir y/o facilitar la absorción. Dichas proteínas incluyen proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas, trópicos para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, proteínas que dirigen la localización intracelular y mejoran la semivida intracelular, y similares.
- La sustancia puede estar en cualquier estado, tal como una disolución, sólido, vector, gas o cualquier otro estado que permitiría que la sustancia se mezcle con la célula hematopoyética para formar un coágulo.
- Para transferencia génica directa, la sangre o la médula ósea cosechada se puede añadir a una disolución que contenga un vector de transferencia génica (vírico o no vírico) o una proteína en un recipiente de tamaño y forma apropiados o en cualquier recipiente que permita que la muestra celular se mezcle con la sustancia. Esta mezcla se puede titular usando una pipeta o cualquier otro dispositivo o sistema que mezcle la sustancia con la muestra celular.
- Para un enfoque de suministro génico ex vivo, la célula hematopoyética, por ejemplo, sangre o aspirado de médula ósea, se puede mezclar con una suspensión de células sin tratamiento previo o genéticamente modificadas, con o sin un vector adicional. Las células se incorporan después en el coágulo y se devuelven al cuerpo.
- La invención también incluye productos. Los productos son sistemas de suministro de sustancias según las reivindicaciones 1 y 2. Como se usa en la presente memoria, un "sistema de suministro de sustancias" es un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene una sustancia de manera que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico puede suministrar la sustancia a un individuo.
- Cuando se administran, las composiciones (coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene la sustancia) se pueden administrar en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Dichas preparaciones pueden contener de manera rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos no incorporados.
- Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía convencional, incluyendo inyección o por infusión intravenosa gradual con el tiempo. La administración puede ser, por ejemplo, inyección o implantación directa, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, intrapulmonar, mucosal (es decir, rectal, vaginal, ocular, dérmica, intranasal, etc.), subcutánea, aerosol o transdérmica. La administración puede ser sistémica o local.
- Las composiciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" es esa cantidad de una composición que sola o junto con dosis adicionales, produce la respuesta deseada. La respuesta deseada, por supuesto, dependerá de la afección particular que esté tratando y del tipo de célula o agente activo que se esté administrando en el coágulo. Estos factores son conocidos para los expertos en la técnica, y se pueden aplicar con no más que experimentación de rutina. Se prefiere en general que se use una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis segura más alta según el buen criterio médico. Se entenderá por los expertos en la técnica, sin embargo, que un paciente puede insistir en una dosis menor o dosis tolerable por razones médicas, razones sicológicas o por virtualmente cualquier otra razón. Las composiciones usadas en los métodos anteriores son preferiblemente estériles y contienen una cantidad eficaz de la sustancia para

producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para administración a un paciente.

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

15 Ejemplos

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

20 *In Vitro:*

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

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

30 Para determinar si un coágulo sanguíneo humano es capaz de incorporar células, se cultivaron células de médula ósea de conejo en monocapa y se infectaron con un vector de adenovirus que posee un gen que codifica una proteína fluorescente verde (GFP). Después de 24 h, se tripsinizaron aproximadamente 600.000 células fluorescentes y se recuperaron por centrifugación. Se volvió a suspender cada uno de los peletes de células en 450 µl de sangre humana. Estos constructos de células sanguíneas formaron coágulos entonces en tubos de microcentrifuga. Después de 1 h, los coágulos se extrajeron, se sumergieron en 1 ml de PBS y se cultivaron durante 24 h en medio F12 de Ham, cada uno en una placa de 12 pocillos.

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

Ejemplo 2: Forma del coágulo

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

50 Ejemplo 3: Siembra de coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea con células genéticamente modificadas (para simular un enfoque de suministro génico ex vivo)

Para simular un enfoque de suministro génico ex vivo, se examinaron 4 grupos de coágulos sanguíneos de conejo in vitro:

55 1. 450 µl de sangre de conejo sólo.

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

60 3. 450 µl de sangre de conejo mezclada con una suspensión de 400.000 de células de médula ósea de conejo modificadas genéticamente con adenovirus recombinante para expresar GFP.

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

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

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

10 **Ejemplo 4: Transducción directa de células en coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea (para simular el enfoque de suministro génico directo)**

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

- 15 1. 450 μ l de sangre de conejo sólo.
2. 450 μ l de sangre de conejo y 10 μ l de Ad GFP.

- 20 3. 450 μ l de sangre de conejo y 10 μ l de Ad TGF- β .
4. 450 μ l de aspirado de médula ósea de conejo sólo.

- 25 5. 450 μ l de aspirado de médula ósea de conejo y 10 μ l de Ad GFP.

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

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

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

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

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

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

- 45 1. Sangre de conejo (450 μ l).
2. Médula ósea de conejo (450 μ l).
3. Sangre de conejo (450 μ l) y Ad TGF- β (10 μ l).

- 50 4. Médula ósea de conejo (450 μ l) y TGF- β (10 μ l).

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

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

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

Se realizó un estudio adicional para determinar si los vectores víricos infecciosos podían ser retenidos y permanecen transduciéndose en los coágulos, cuyos resultados se pueden ver en la Fig. 9.

5 Se infectaron coágulos sanguíneos y coágulos de médula ósea con Ad GFP y se cultivaron como se describió anteriormente. En diversos puntos de tiempo, los coágulos se disgregaron de manera mecánica y se centrifugaron para eliminar el desecho celular. Se recogieron los sobrenadantes y se usaron para infectar cultivos monocapa de células 293. Después de 24 horas, las células se analizaron por fluorescencia.

- 10 Las células fluorescentes estuvieron presentes de hecho en cultivos que habían sido infectados con los sobrenadantes a partir de coágulos rotos desde los días 1, 3 y 7.
- 15 Este hallazgo demostró que el vector vírico, Ad GFP, atrapado en los coágulos, fue capaz de retener su infecciosidad durante al menos 7 días en cultivo.

In Vivo:

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

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

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

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

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

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

55 Los coágulos fueron cultivados en medio F12 de Ham durante 6 semanas. Tras la cosecha, se fijaron, se embebieron en parafina, se seccionaron y se examinaron para histología. Se colorearon las secciones con hematoxilina-eosina y Kit Tricromo de Gomori (Coloración Azul de Colágeno). Se examinaron las secciones mediante tres individuos diferentes de una manera ciega.

60 En los coágulos de médula ósea que no fueron modificados genéticamente con factores de crecimiento (médula ósea sólo y médula ósea mezclada con Ad GFP), la naturaleza pluripotente de las células endógenas fue manifiesta. Se encontraron áreas de tejido semejante a músculo, semejante a grasa y fibroso en todos estos coágulos después de 6 semanas, como se representa en la Fig. 11. Los coágulos de médula ósea enriquecidos con Ad TGF-β mostraron una diferenciación más homogénea, no observándose tejido semejante a músculo. En su lugar, se

observó tejido más fibroso, como se representa en la Fig. 12.

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

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

Ejemplo 8: El uso de los coágulos de médula ósea modificados con Ad.TGF-β1 para reparar tejido cartilaginoso

Este estudio investiga el uso de coágulos de médula ósea en la reparación de tejido cartilaginoso. Se creó un defecto osteocartilaginoso taladrando orificios de 3 mm de ancho y 8 mm de profundidad a través del cartílago y en el hueso y la médula de rodillas de conejo. Los defectos de control se dejaron sin tratar (defecto vacío) o recibieron un coágulo de médula ósea no modificado. Un coágulo de médula ósea, que se pre-infectó con adenovirus que contenía el gen para transformar factor de crecimiento beta-1 (TGF-β1), se implantó en los defectos osteocartilaginosos restantes.

Se tomaron portaobjetos seis semanas después de cirugía y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y azul de toluidina. H&E es una tinción histológica ácido-base común; el azul de toluidina actúa como un indicador de glucosaminoglucanos (los GAG).

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

El defecto que se trató con el coágulo de médula ósea pre-infectado que contenía TGF-β1 tenía un aspecto condrogénico, mostrando una matriz extracelular robusta. En la mayor parte de la reparación, la matriz de reparación se coloreó azul oscuro, indicando que los GAG estaban presentes. Las células en la matriz de reparación se parecen a condrocitos morfológicamente, pero aparecen en racimos. Debajo del tejido de reparación de cartílago hubo una formación ósea robusta. También, la capa de cartílago fue de aproximadamente la misma profundidad que el tejido flanqueante.

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

40 SUMARIO – ASPECTOS

La presente descripción también se refiere a:

Aspecto 1. Un método para suministrar una sustancia a un individuo, comprendiendo el método:

45 administrar a un individuo un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que contiene una sustancia para suministrar al individuo.

Aspecto 2. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico comprende células de médula ósea.

50 Aspecto 3. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico comprende células sanguíneas.

Aspecto 4. El método según el aspecto 1, en el que la sustancia comprende un vehículo de transferencia génica.

Aspecto 5. El método según el aspecto 1, en el que la sustancia comprende células adicionales.

Aspecto 6. El método según el aspecto 5, en el que las células adicionales comprenden células genéticamente manipuladas mediante ingeniería.

55 Aspecto 7. El método según el aspecto 5, en el que las células adicionales comprenden células sin tratamiento previo.

Aspecto 8. El método según el aspecto 1, en el que la sustancia comprende proteínas.

- Aspecto 9. El método según el aspecto 1, en el que la sustancia comprende proteínas recombinantes.
- Aspecto 10. El método según el aspecto 1, en el que la sustancia comprende proteínas solubles.
- Aspecto 11. El método según el aspecto 1, en el que la sustancia comprende moléculas bioactivas.
- 5 Aspecto 12. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se suministra al hueso.
- Aspecto 13. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se suministra a tejidos blandos.
- Aspecto 14. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se suministra a al menos uno de cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales.
- 10 Aspecto 15. El método según el aspecto 1, en el que la forma y tamaño del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se determina mediante un molde.
- Aspecto 16. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se homogeneiza con la sustancia.
- 15 Aspecto 17. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se modifica genéticamente para expresar al menos uno de factores de crecimiento y otros productos génicos que facilitan la reparación de tejidos.
- Aspecto 18. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico tiene un volumen que se determina por el tamaño de un tejido a reparar.
- 20 Aspecto 19. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se recoge de un individuo.
- Aspecto 20. El método según el aspecto 2, en el que las células de médula ósea se cosechan de crestas ilíacas.
- Aspecto 21. El método según el aspecto 2, en el que las células de médula ósea se cosechan de defectos osteocartilaginosos que exponen médula ósea subyacente.
- Aspecto 22. El método según el aspecto 1, en el que el sustrato está en forma de una disolución.
- 25 Aspecto 23. El método según el aspecto 1, en el que se titula la sustancia que contiene el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.
- Aspecto 24. El método según el aspecto 23, en el que la titulación se lleva a cabo usando una pipeta.
- 30 Aspecto 25. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se mezcla con una suspensión de al menos una de células sin tratamiento previo y células genéticamente modificadas, formando una suspensión celular.
- Aspecto 26. El método según el aspecto 25, en el que la suspensión celular contiene al menos un vector genético.
- Aspecto 27. El método según el aspecto 25, en el que la suspensión celular no contiene vectores génicos adicionales.
- 35 Aspecto 28. Un método según el aspecto 1, en el que el suministro es una liberación localizada, lenta, de la sustancia a partir del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.
- Aspecto 29. Un método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se conforma de manera que permita un suministro eficaz de la sustancia.
- Aspecto 30. Un método según el aspecto 1, que comprende además regenerar tejido en el área de suministro de la sustancia.
- 40 Aspecto 31. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico producido a partir de una muestra de células hematopoyéticas que se deja coagular durante 15-30 minutos.
- Aspecto 32. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico producido a partir de una muestra de células hematopoyéticas que se deja coagular a temperatura ambiente.
- 45 Aspecto 33. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico producido a partir de una muestra de células hematopoyéticas que se coloca en un recipiente para que coagule.

- Aspecto 34. El método según el aspecto 33, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se cosecha a partir del recipiente.
- 5 Aspecto 35. El método según el aspecto 1, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico producido a partir de una muestra de células hematopoyéticas que se lava en una disolución salina tamponada con fosfato.
- Aspecto 36. El método según el aspecto 1, en el que cualquier sustancia no unida se elimina del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.
- 10 Aspecto 37. Un método para preparar un sistema de suministro de sustancia de coágulo de células hematopoyéticas no polimérico, comprendiendo el método:
- añadir una sustancia a una muestra de células hematopoyéticas; y
permitir que la muestra de células hematopoyéticas que contiene la sustancia forme un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.
- Aspecto 38. Un método según el aspecto 37, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se implante en un individuo.
- 15 Aspecto 39. Un método según el aspecto 37, en el que la sustancia se suministra al individuo.
- Aspecto 40. Un método según el aspecto 39, en el que el suministro es una liberación lenta, localizada de la sustancia a partir del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.
- 20 Aspecto 41. Un método según el aspecto 37, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se conforma de manera para permitir un suministro eficaz de la sustancia.
- Aspecto 42. Un método según el aspecto 37, en el que el sistema de suministro del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se usa para regenerar tejido.
- 25 Aspecto 43. Un método según el aspecto 37, en el que la muestra de células hematopoyéticas se recoge de un individuo.
- Aspecto 44. Un método según el aspecto 37, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se forma en un recipiente.
- Aspecto 45. Un método según el aspecto 44, que comprende además cosechar el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico del recipiente.
- 30 Aspecto 46. Un método según el aspecto 37, que comprende además lavar el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.
- Aspecto 47. Un método según el aspecto 46, en el que cualquier sustancia no ligada se elimina por lavado.
- Aspecto 48. Un método según el aspecto 46, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se lava en una Disolución Salina de Tampón de Fosfato.
- 35 Aspecto 49. El método según el aspecto 37, en el que se permite que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico coagule durante 15-30 minutos.
- Aspecto 50. El método según el aspecto 37, en el que se permite que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico coagule a temperatura ambiente.
- 40 Aspecto 51. El método según el aspecto 37, en el que las células hematopoyéticas comprenden células de médula ósea.
- Aspecto 52. El método según el aspecto 37, en el que las células hematopoyéticas comprenden células sanguíneas.
- 45 Aspecto 53. El método según el aspecto 37, en el que la sustancia comprende un vehículo de transferencia génica.
- Aspecto 54. El método según el aspecto 37, en el que la sustancia comprende células adicionales.
- Aspecto 55. El método según el aspecto 54, en el que las células adicionales comprenden células genéticamente manipuladas mediante ingeniería.

- Aspecto 56. El método según el aspecto 54, en el que las células adicionales comprenden células sin tratamiento previo.
- Aspecto 57. El método según el aspecto 37, en el que la sustancia comprende proteínas.
- Aspecto 58. El método según el aspecto 37, en el que la sustancia comprende proteínas recombinantes.
- 5 Aspecto 59. El método según el aspecto 37, en el que la sustancia comprende proteínas solubles.
- Aspecto 60. El método según el aspecto 37, en el que la sustancia comprende moléculas bioactivas.
- Aspecto 61. El método según el aspecto 38, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se suministra al hueso.
- 10 Aspecto 62. El método según el aspecto 38, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se suministra a tejidos blandos.
- Aspecto 63. El método según el aspecto 38, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se suministra a al menos uno de cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales.
- Aspecto 64. El método según el aspecto 37, en el que la forma y tamaño del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se determina mediante un molde.
- 15 Aspecto 65. El método según el aspecto 37, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se homogeneiza con la sustancia.
- Aspecto 66. El método según el aspecto 37, en el que las células hematopoyéticas se modifican genéticamente para expresar al menos uno de factores de crecimiento y otros productos génicos que facilitan la reparación de tejidos.
- 20 Aspecto 67. El método según el aspecto 37, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico tiene un volumen que se determina por el tamaño de un tejido a reparar.
- Aspecto 68. El método según el aspecto 51, en el que las células de médula ósea se cosechan de crestas ilíacas.
- 25 Aspecto 69. El método según el aspecto 51, en el que las células de médula ósea se cosechan de defectos osteocartilaginosos que exponen médula ósea subyacente.
- Aspecto 70. El método según el aspecto 37, en el que la sustancia está en forma de una disolución.
- Aspecto 71. El método según el aspecto 37, en el que se titula la sustancia que contiene el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.
- 30 Aspecto 72. El método según el aspecto 71, en el que la titulación se lleva a cabo usando una pipeta.
- Aspecto 73. El método según el aspecto 37, en el que las células hematopoyéticas se mezclan con una suspensión de al menos una de células sin tratamiento previo y células genéticamente modificadas, formando una suspensión celular.
- Aspecto 74. El método según el aspecto 73, en el que la suspensión celular contiene al menos un vector genético.
- 35 Aspecto 75. El método según el aspecto 73, en el que la suspensión celular no contiene vectores génicos adicionales.
- Aspecto 76. Un sistema de suministro de sustancias que comprende:
- un coágulo de células hematopoyéticas no polimérico que tiene una sustancia incorporada en él.
- Aspecto 77. Un sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se conforma de manera que permita un suministro eficaz de la sustancia.
- 40 Aspecto 78. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico comprende células de médula ósea.
- Aspecto 79. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico comprende células sanguíneas.
- 45 Aspecto 80. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que la sustancia comprende un vehículo de transferencia génica.

- Aspecto 81. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que la sustancia comprende células adicionales.
- Aspecto 82. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 81, en el que las células adicionales comprenden células genéticamente manipuladas mediante ingeniería.
- 5 Aspecto 83. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 81, en el que las células adicionales comprenden células sin tratamiento previo.
- Aspecto 84. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 81, en el que la sustancia comprende proteínas.
- 10 Aspecto 85. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 81, en el que la sustancia comprende proteínas recombinantes.
- Aspecto 86. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que la sustancia comprende proteínas solubles.
- Aspecto 87. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que la sustancia comprende moléculas bioactivas.
- 15 Aspecto 88. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se formula para el suministro al hueso.
- Aspecto 89. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se formula para el suministro a tejidos blandos.
- 20 Aspecto 90. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se formula para el suministro a al menos uno de cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales.
- Aspecto 91. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que la forma y tamaño del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se determina mediante un molde.
- 25 Aspecto 92. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se homogeneiza con la sustancia.
- Aspecto 93. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se modifica genéticamente para expresar al menos uno de factores de crecimiento y otros productos génicos que facilitan la reparación de tejidos.
- 30 Aspecto 94. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico tiene un volumen que se determina por el tamaño de un tejido a reparar.
- Aspecto 95. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se prepara a partir de una muestra aislada de células hematopoyéticas.
- Aspecto 96. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 78, en el que las células de médula ósea se aíslan de células de médula ósea de crestas ilíacas.
- 35 Aspecto 97. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 78, en el que las células de médula ósea se aíslan de defectos osteocartilaginosos que exponen médula ósea subyacente.
- Aspecto 98. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que la sustancia es al menos una de células sin tratamiento previo y células genéticamente modificadas
- 40 Aspecto 99. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se prepara mediante el procedimiento de permitir que una muestra de células hematopoyéticas coagule durante 15-30 minutos.
- Aspecto 100. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se prepara mediante el procedimiento de permitir que una muestra de células hematopoyéticas coagule a temperatura ambiente.
- 45 Aspecto 101. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se prepara mediante el procedimiento de permitir que una muestra de células hematopoyéticas coagule en un recipiente.
- Aspecto 102. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 101, que comprende además cosechar el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico del recipiente.

Aspecto 103. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, en el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se prepara mediante el procedimiento de lavar el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico en una disolución salina tamponada con fosfato.

5 Aspecto 104. El sistema de suministro de sustancias según el aspecto 76, el que el coágulo de células hematopoyéticas no polimérico se prepara mediante el procedimiento de eliminar cualquier sustancia no unida del coágulo de células hematopoyéticas no polimérico.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de suministro, que comprende:

- 5 un coágulo de células de médula ósea no polimérico que tiene una sustancia exógena seleccionada del grupo que consiste en un vehículo de transferencia génica, una proteína y un agente bioactivo que tiene un efecto profiláctico o terapéutico en un organismo biológico incorporado en él, en el que el coágulo de células de médula ósea no polimérico
- 10 a) se formula para el suministro a tejidos blandos, cartílago, ligamentos, tendones, o meniscos o discos intervertebrales, o
 b) se obtiene de células de médula ósea de crestas ilíacas, y
- 15 en el que no se incorpora una matriz polimérica en el coágulo o se usa como la estructura del coágulo.

2. Un sistema de suministro, que consiste esencialmente en:

- 20 un coágulo de células de médula ósea no polimérico que tiene una sustancia exógena seleccionada del grupo que consiste en un vehículo de transferencia génica, una proteína y un agente bioactivo que tiene un efecto profiláctico o terapéutico en un organismo biológico incorporado en él.

25 3. El sistema de suministro de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la sustancia exógena es un agente bioactivo que tiene un efecto profiláctico o terapéutico en un organismo biológico.

30 4. El sistema de suministro de la reivindicación 2, en el que las células de médula ósea se aíslan de defectos osteocartilaginosos que exponen médula ósea subyacente.

35 5. El sistema de suministro de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el coágulo de células de médula ósea no polimérico se formula para el suministro a al menos uno de cartílago, ligamentos, tendones, meniscos y discos intervertebrales.

40 6. El sistema de suministro de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el coágulo de células de médula ósea no polimérico tiene un volumen que se determina por el tamaño de un tejido a reparar.

45 7. El sistema de suministro de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la sustancia se formula para suministro como una liberación localizada, lenta, de la sustancia del coágulo de células de médula ósea no polimérico.

40 8. Una composición para uso en el suministro de una sustancia exógena a un individuo, que comprende:

el sistema de suministro según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 con el fin de suministrar la sustancia a un individuo.

45 9. La composición de la reivindicación 8, en la que el sistema de suministro se suministra a tejidos blandos.

10. La composición de la reivindicación 8, en la que el sistema de suministro se suministra a cartílago.

11. La composición de la reivindicación 8, en la que el sistema de suministro se suministra a ligamentos.

FIGURA 1

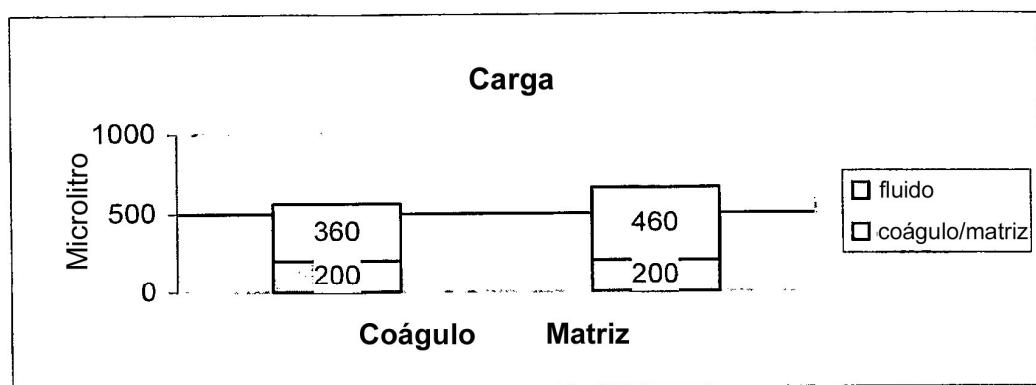
Inmunodeficiencia combinada severa (SCID) debida a deficiencia de adenosina desaminasa (ADA)	Linfocitos autólogos transducidos con gen ADA humano
Cáncer avanzado	Linfocitos de infiltración tumoral transducidos con gen de factor de necrosis tumoral
Cáncer avanzado	Inmunización con células cancerígenas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

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

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

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

FIGURA 2



ES 2 434 257 T3

FIGURA 3



FIGURA 4

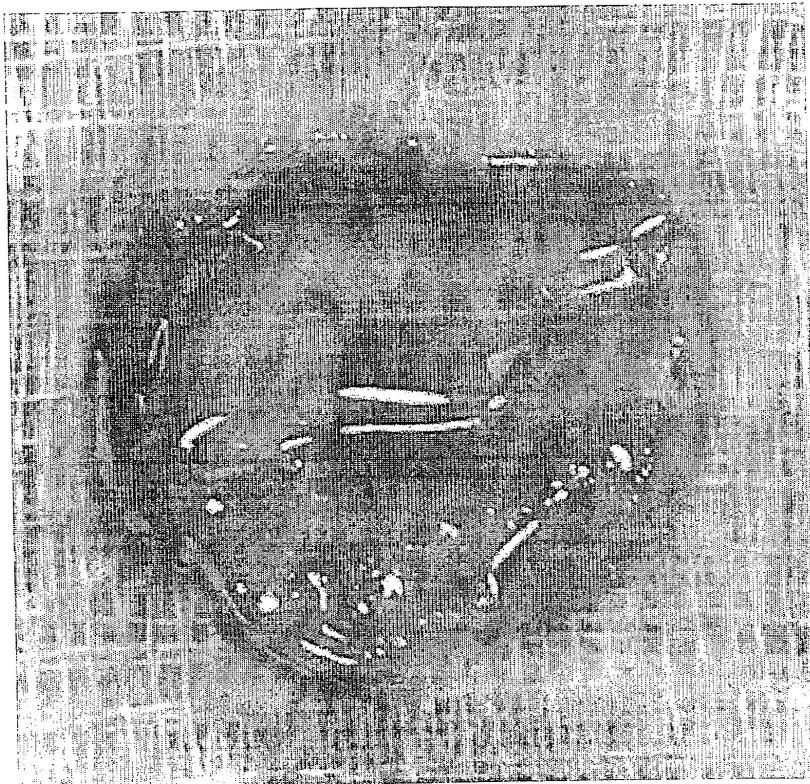


FIGURA 5a

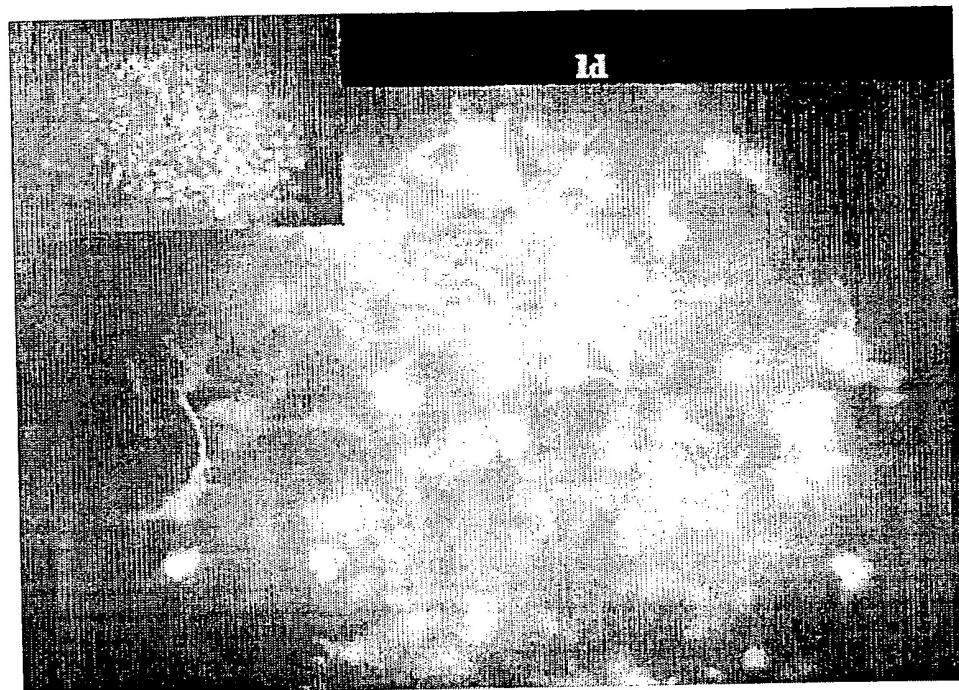


FIGURA 5b

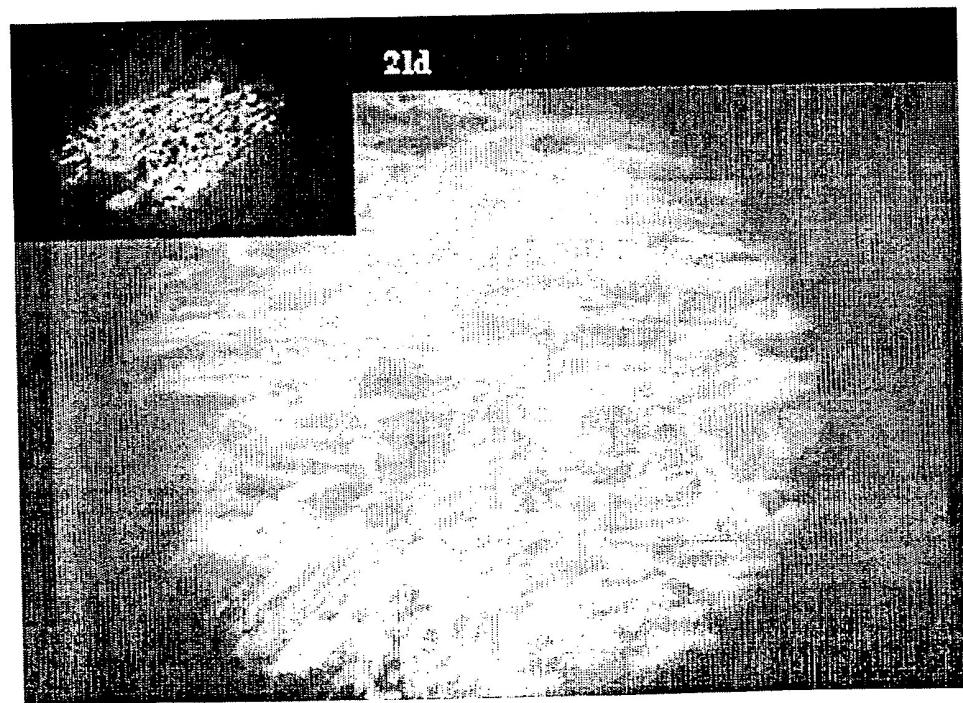


FIGURA 6

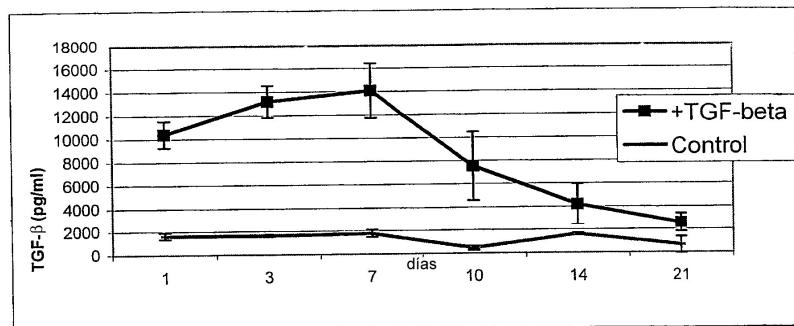


FIGURA 7

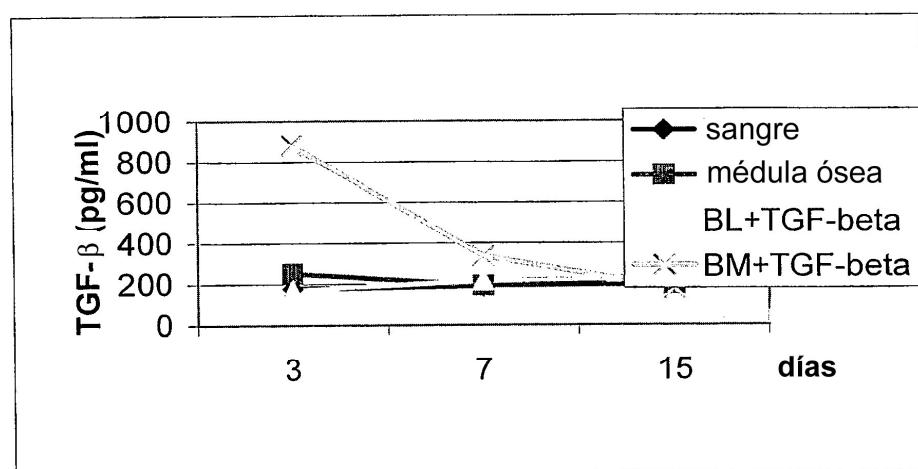


FIGURA 8

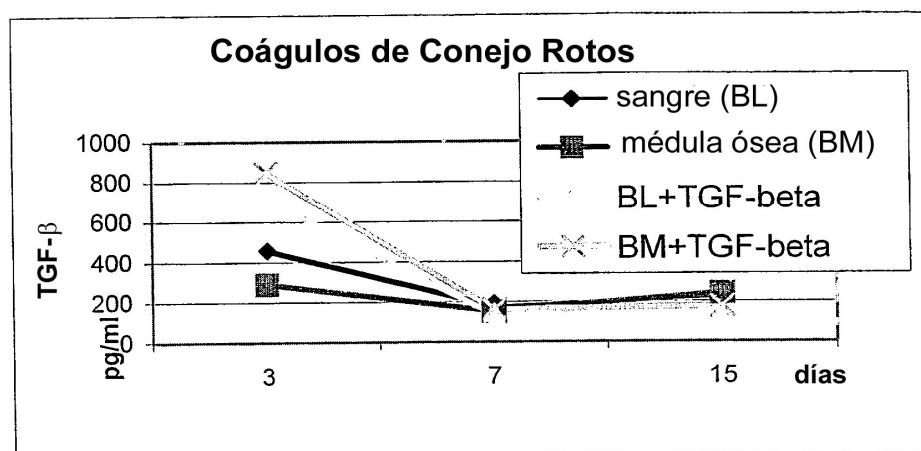


FIGURA 9

Infección de 293 células en Coágulo		
	B L %	B M %
6 h	51	57
1 d	46,7	44,2
3 d	2?	82,6
7 d	3,6	5,4

FIGURA 10

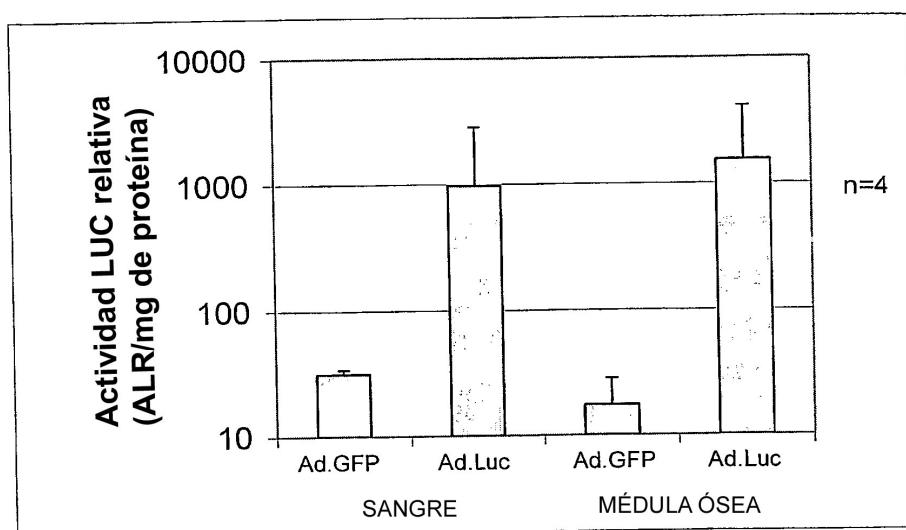


FIGURA 11

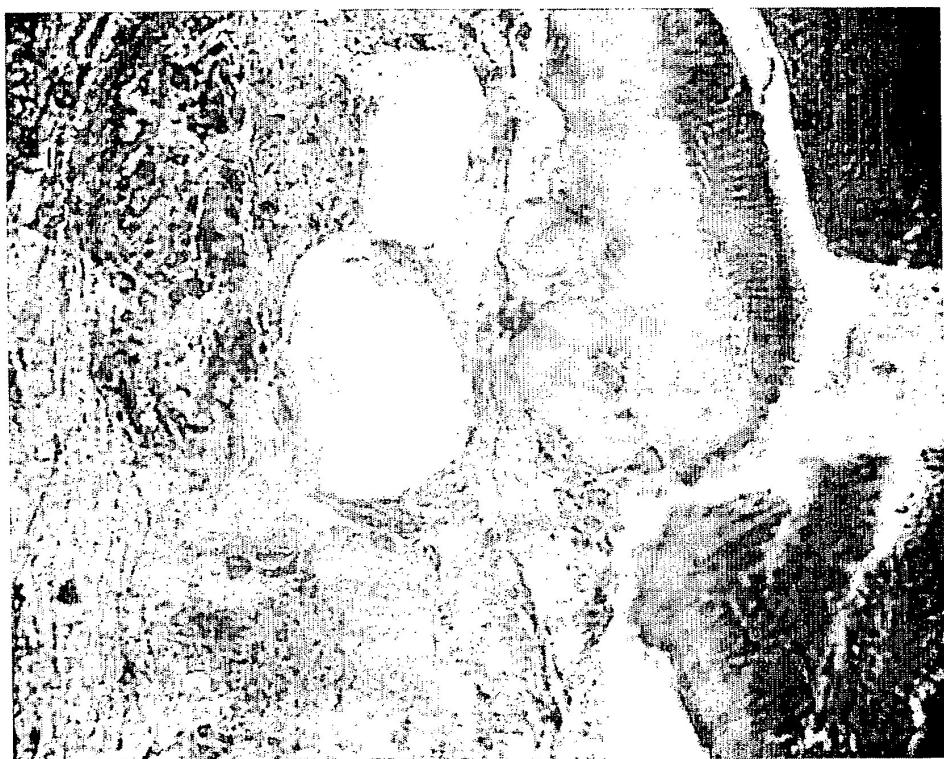


FIGURA 12

