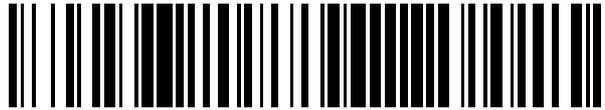


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 507**

51 Int. Cl.:

A61P 35/04 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2008 E 08754569 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2162534**

54 Título: **Células madre mesenquimales CD34 negativas modificadas genéticamente para el tratamiento de tumores**

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:
15.10.2014

73 Titular/es:

APCETH GMBH & CO. KG (100.0%)
Max-Lebsche-Platz 30
81377 München, DE

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 507 507 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

Células madre mesenquimales CD34 negativas modificadas genéticamente para el tratamiento de tumores

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

10 A lo largo de esta solicitud se citan varias publicaciones. La divulgación de estas publicaciones, así como de las solicitudes provisionales anteriormente identificadas se usa para describir en más detalle el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

15 Las células madre median en la reproducción y transmisión de información genética a generaciones celulares posteriores. Pueden autorrenovarse y generar progenie diferenciada. En los últimos años se ha progresado en la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a las interacciones entre células madre y sus nichos tisulares. Esto ha conducido a una mejor comprensión de los mecanismos reguladores moleculares en funcionamiento en células madre.

20 Aunque la terapia génica está todavía en un enfoque experimental, la tecnología promete tener un impacto sobre la salud humana. El alcance y la definición de la terapia génica han cambiado y se han expandido a lo largo de los últimos pocos años. Además de corregir trastornos genéticos heredados tales como fibrosis quística, hemofilia y otras entidades, también están desarrollándose enfoques de terapia génica para combatir enfermedades adquiridas tales como cáncer, SIDA, isquemia vascular crónica, osteoartritis, diabetes, enfermedad de Parkinson y de Alzheimer.

25 En la actualidad, no está contemplándose la terapia génica de la línea germinal debido a su naturaleza técnica completa y consideraciones éticas. Sin embargo, la terapia génica de células somáticas exclusivamente para el beneficio de un individuo (que no puede pasarse a generaciones subsiguientes) es un foco principal de la investigación en células madre. Ha llevado más de 15 años de esfuerzo desde la descripción inicial de la transferencia génica satisfactoria a células madre hematopoyéticas murinas hasta los primeros ensayos clínicos inequívocamente satisfactorios en pacientes nacidos con inmunodeficiencia combinada ligada al cromosoma X (SCID) y deficiencia en adenosina desaminasa (ADA) (Aiuti *et al.*, 2002; Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000; Gaspar *et al.*, 2004). Están explorándose muchos aspectos de la terapia con células madre. Por ejemplo, se han usado vectores retrovirales en muchas situaciones para la transferencia de genes a células madre para reparar genes mutados o incompletos. Estos incluyen deficiencia inmunitarias combinadas graves, anemia de Fanconi y otras hemoglobinopatías (Herzog *et al.*, 2006).

40 Un problema central en la modificación por ingeniería genética de células madre es la metodología específica usada para introducir genes terapéuticos en las células progenitoras. Debido a que los retrovirus tienden a insertarse en genes activos (se cree la cromatina condensada se abre en estas regiones), se ha sugerido que su uso puede aumentar también el riesgo de cáncer (Young *et al.*, 2006), porque la inserción de vectores retrovirales próximos a genes implicados en proliferación celular podría generar en teoría una célula madre cancerosa precursora. Sin embargo, el riesgo global de este tipo de acontecimiento es difícil de establecer. Hay ahora muchos ejemplos de éxito completo logrado en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD) en los que se restauró la actividad NADPH oxidasa tras la infusión de células madre sanguíneas genéticamente alteradas (Barese *et al.*, 2004).

50 El requisito mínimo para lograr una terapia génica productiva es la producción sostenida del producto génico terapéutico en el contexto biológico correcto con efectos secundarios perjudiciales mínimos. Para lograr este fin, la aplicación de células madre en terapia génica requerirá el desarrollo de nuevas estrategias para modular la expresión de genes terapéuticos, así como métodos para el suministro eficaz de genes foráneos a células madre. El control selectivo de la expresión de genes terapéuticos por células madre en diferenciación dentro de un entorno tisular definido es un importante objetivo en la modificación por ingeniería genética de células madre. Este enfoque podría ayudar, por ejemplo, en el control de la diferenciación de células madre para dar linajes específicos, el mantenimiento de su estado no diferenciado para su posterior trasplante, proliferación y regulación de la expresión de genes terapéuticos tales como genes suicidas, citocinas o factores de crecimiento en entornos tisulares definidos.

Sumario de la invención

60 Esta invención proporciona células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para su uso en el tratamiento de tumores en sujetos, en donde el tratamiento comprende introducir en el torrente sanguíneo del sujeto un número terapéuticamente efectivo de dichas células, en donde cada una de las células madre CD34⁻ genéticamente modificadas contiene un ácido nucleico exógeno que comprende (i) una región que codifica una proteína citotóxica que está operativamente unida a (ii) un promotor específico de endotelio o combinación de promotor/potenciador, mediante el cual la proteína citotóxica se expresa de manera selectiva cuando las células madre CD34⁻ genéticamente modificadas entran en proximidad con y se diferencian en células de tipo endotelial en

proximidad con tejido tumoral que está sufriendo angiogénesis, y en donde la introducción de las células madre CD34⁺ genéticamente modificadas no se ve precedida, acompañada o seguida por mieloablación.

Otros objetos y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada considerada conjuntamente con los dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que los dibujos están diseñados únicamente para fines de ilustración y no como una definición de los límites de la invención, para los que debe hacerse referencia a las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse además que los dibujos no están necesariamente dibujados a escala y que, a menos que se indique lo contrario, están destinados meramente a ilustrar conceptualmente las estructuras y los procedimientos descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

Figura 1

Fila superior: expresión de insulina en un islote β murino normal antes (izquierda) y después del tratamiento con aloxano (ALX) (derecha) con agotamiento de la insulina casi completo. Fila inferior: tamaño de un islote β normal que produce insulina a diferentes aumentos (20x; 40x); el tratamiento del islote β agotado en insulina tras el tratamiento con ALX con células madre negativas para CD34 (SC) restaura completamente la producción de insulina con signos de hipertrofia (20x y 40x).

Figura 2

Células aisladas de un páncreas murino tras la diabetes inducida por ALX y la restauración con SC de la producción de insulina. Se marcaron las células madre negativas para CD34 trasplantadas con una proteína fluorescente verde expresada de manera constitutiva y las células que producían insulina mostraban una fluorescencia roja. No hubo expresión conjunta de ambos marcadores, lo que sugiere que las células madres trasplantadas no expresan insulina por sí misma sino que más bien facilitan la regeneración endógena.

Figura 3

Izquierda: Niveles de glucemia de ratones tras el tratamiento con ALX sin trasplante de SC (parte superior), con trasplante de SC y sin corrección del nivel de glucemia (parte media) y ratones con un nivel de glucemia normalizado tras el trasplante de SC (parte inferior). Derecha: Sólo los ratones que revelaron la presencia de células madre en sus páncreas (homogeneizados para el análisis de FACS y la detección de la fluorescencia verde) (E3; círculo de color rojo) mostraron un nivel de glucemia normalizado, lo que sugiere el papel fundamental de las células trasplantadas en la corrección de la producción de insulina.

Figura 4

Presentación esquemática del desarrollo de un tumor maligno epitelial desde un carcinoma *in situ* hasta cáncer invasivo y la conexión con el sistema de vasos sanguíneos endógenos. Las células madre negativas para CD34 se dirigen a un sitio de neo-angiogénesis tal como se demuestra en el presente documento y por tanto pueden utilizarse como caballo de Troya para suministrar agentes moduladores inmunitarios o citotóxicos.

Figura 5

Detección de células positivas para RFP en tumores mamarios. Células madre transfectadas con Tie2-RFP se diferencian a endoteliales y transcriben el RFP. (A) Contrateñidas con DAPI. (B) Células positivas para RFP que forman vasos.

Figura 6

Reducción de la progresión tumoral con tratamiento con GCV. (A) Protocolo de aplicación de células madre-GCV. Se aplicaron la suspensión celular (día 0) y la disolución de GCV (día 5-8) respectivamente tal como se muestra. El aumento del peso corporal durante el tratamiento de los ratones reflejó la carga tumoral total ya que estaban implicadas todas las mamas. Se midió el peso corporal en el día 0 y 5 de cada ciclo de terapia y el día de la disección. (B) Grupos de ratones, tratamiento que comienza en la semana 22, promedio que muestra la desviación estándar. Se clasificaron los ratones en un grupo de tratamiento y dos grupos control. El primer grupo control recibió 1xPBS en lugar de una suspensión de células madre y ninguna inyección de fármaco (línea discontinua); el segundo grupo control recibió una suspensión de células madre transfectadas con Tie2-RFP pero no GCV (línea de puntos). El grupo de tratamiento recibió células madre y GCV tal como se muestra en A, (línea continua). (C) Grupos de tratamiento que comienza en la semana 18, promedio y desviación estándar.

Figura 7

Edad en la disección. Controles frente a grupo de tratamiento de ratones comenzando el tratamiento en la semana 22. Obsérvese la diferencia significativa en el tiempo hasta alcanzar tamaños tumorales similares (véase la tabla 1) y la vida útil prolongada de los ratones tras el tratamiento satisfactorio con vehículos de MSC TK y GCV.

Figura 8

Modelo de recrecimiento tumoral: Se reseco el tumor de mama primario a las 18 semanas y se inició el tratamiento con MSC / tk durante el recrecimiento del tumor.

Figura 9

MSC que expresan proteína fluorescente verde (GFP) se dirigen al tumor pancreático en crecimiento. En experimentos paralelos, MSC modificadas por ingeniería genética para expresar proteína fluorescente roja (RFP) bajo el control del promotor/potenciador de Tie2 muestran una expresión dirigida en la vasculatura tumoral. Fila superior: MSC modificadas por ingeniería genética para expresar GFP bajo el control del promotor de CMV se

dirigen al tumor tras la inyección i.v. Fila inferior: MSC modificadas por ingeniería genética para expresar RFP bajo el control del Tie2.

Figura 10

Se evaluó entonces el efecto del tratamiento con tk/GCV tras la inyección de las células C57Bl/6 MSC (Tie2-tk). El régimen de tratamiento fue esencialmente tal como se describió para el estudio de cáncer de mama. Se inyectaron 500.000 células en el día uno, seguido por tres días en los que se dejó que las células se reclutaran al tumor en crecimiento y se diferenciaran a células que expresan Tie2 de tipo endotelial que expresan por tanto el gen suicida TK. Entonces se trataron los ratones durante cuatro días con GVC. Tras un día de descanso, se repitió el ciclo durante la duración del experimento.

Figura 11

La figura muestra un ejemplo adicional del efecto del tratamiento del tumor pancreático ortotópico con células madre terapéuticas junto con GCV. Se observó una drástica reducción en el tamaño tumoral (50 %) así como una reducción de la carcinosis peritoneal en comparación con el grupo no tratado.

Descripción detallada de las realizaciones actualmente preferidas

Términos

En esta solicitud, se usan determinados términos que tendrán los significados expuestos a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, "cicatrización de heridas aguda" incluirá, sin limitación, un proceso celular y molecular que se activa para reparar tejido desde el momento de la lesión bajo el control de señales biológicas y mecánicas. Se produce cicatrización de heridas aguda satisfactoria cuando se alcanza un equilibrio dinámico entre las cargas colocadas a través de una matriz provisional y la retroalimentación de células de reparación.

Tal como se usa en el presente documento, una célula es "alogénica" con respecto al sujeto si ella o cualquiera de sus células precursoras son de otro sujeto de la misma especie.

Tal como se usa en el presente documento, una célula es "autóloga" con respecto a un sujeto si ella o sus células precursoras son del mismo sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, "célula madre mesenquimal CD34-" significará una célula madre mesenquimal que carece de CD34 en su superficie. Se describen células madre mesenquimales CD34-, y métodos para aislar las mismas, por ejemplo, en Lange C. *et al.*, Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. J. Cell Physiol. 25 de abril de 2007 [publicación electrónica antes de la impresión].

Tal como se usa en el presente documento, "proliferación celular" significará la división, el crecimiento en tamaño y/o la diferenciación de células.

Tal como se usa en el presente documento, "proteína citotóxica" significará una proteína que, cuando está presente en, sobre y/o en proximidad con una célula, provoca la muerte de esa célula directa y/o indirectamente. Las proteínas citotóxicas incluyen, por ejemplo, proteínas suicidas (por ejemplo VHS-tk) e inductores de la apoptosis. Los genes citotóxicos incluyen genes nulos, ARNip o ARNmi para la inactivación de genes (por ejemplo CCR5-/-). Se han identificado varios sistemas de genes suicidas, incluyendo el gen de timidina cinasa del virus del herpes simple, el gen de citosina desaminasa, el gen de timidina cinasa del virus de la varicela zóster, el gen de nitrorreductasa, el gen gpt de *Escherichia coli* y el gen Deo de *E. coli*. Citosina desaminasa; citocromo P450; nucleósido de purina fosforilasa; carboxipeptidasa G2; nitrorreductasa. Tal como se detalla en: Yazawa K, Fisher WE, Brunnicardi FC: Current progress in suicide gene therapy for cancer. World J Surg. Julio de 2002; 26(7):783-9. Los factores citotóxicos incluyen los siguientes: (i) factores de direccionamiento tales como quimiocinas y fusiones mucina-quimiocina-GPI (pueden usarse agentes derivados de quimiocinas para facilitar el reclutamiento dirigido de células madre modificadas por ingeniería genética, véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional PCT n.º PCT/EP2006/011508, referente a fusiones de mucina ancladas con GPI); (ii) antígenos virales (sarampión, varicela) como proteínas citotóxicas; y (iii) antígenos Her2/neu que pueden presentarse sobre las superficies de células madre modificadas por ingeniería genética, seguido por la administración de anticuerpo frente a her-2/neu, y CamPath® (alemtuzumab) dirigido contra un epítipo de CD52.

Tal como se usa en el presente documento, "célula endotelial" incluirá, sin limitación, una célula que forma el revestimiento interno de la íntima en vasos sanguíneos durante o después de un proceso denominado angiogénesis. Los factores que controlan este proceso se denominan factores angiogénicos. Las células endoteliales también actúan con células sanguíneas circulantes por medio de interacciones receptor-ligando.

Tal como se usa en el presente documento, un "promotor específico del endotelio o combinación de promotor/potenciador" es un promotor o combinación de promotor/potenciador, respectivamente, que cuando está en una célula endotelial en o en proximidad con células endoteliales, provoca la expresión de una región codificante

operativamente unida más de lo que lo haría en cualquier otro medio en el sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, un ácido nucleico es “exógeno” con respecto a una célula si se ha introducido artificialmente en esa célula o cualquiera de las células precursoras de esa célula.

Tal como se usa en el presente documento, una célula madre se “modifica por ingeniería genética” si o bien ella o bien cualquiera de sus células precursoras ha tenido ácido nucleico introducido artificialmente en la misma. Los métodos para generar células madre genéticamente modificadas incluyen el uso de transferencia génica viral o no viral (por ejemplo, transferencia de plásmidos, integrasa de fagos, transposones, AdV, AAV y lentivirus).

Tal como se usa en el presente documento, “inmediatamente antes de” un acontecimiento incluye, por ejemplo, en el plazo de 5, 10 ó 30 minutos antes de, o 1, 2, 6, 12 ó 24 horas antes del acontecimiento. “Inmediatamente tras” un acontecimiento incluye, por ejemplo, en el plazo de 5, 10 ó 30 minutos después, o 1, 2, 6, 12 ó 24 horas después del acontecimiento.

Tal como se usa en el presente documento, la “integración” de un ácido nucleico en una célula puede ser transitoria o estable.

Tal como se usa en el presente documento, “introducir” células madre mesenquimales CD34⁺ “en el torrente sanguíneo del sujeto” incluirá, sin limitación, introducir tales células en una de las venas o arterias del sujeto mediante inyección. Tal administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o a lo largo de uno o más periodos prolongados. Se prefiere una única inyección, pero en algunos casos pueden ser necesarias inyecciones repetidas a lo largo del tiempo (por ejemplo, cada tres meses, cada medio año o cada año). Tal administración también se realiza preferiblemente usando una mezcla de células madre mesenquimales CD34⁺ y un portador farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen bien portadores farmacéuticamente aceptable e incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferiblemente 0,05 M o solución salina al 0,8 %. Adicionalmente, tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones y suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos tales como dextrosa de Ringer, los basados en dextrosa de Ringer, y similares. Se encuentran fluidos usados comúnmente para administración i.v., por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed., pág. 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.

Tal como se usa en el presente documento, “mieloablación” significará el agotamiento grave o completo de células de la médula ósea provocado por, por ejemplo, la administración de altas dosis de quimioterapia o radioterapia. La mieloablación es un procedimiento convencional y se describe, por ejemplo, en Deeg HJ, Klingemann HG, Philips GL, A Guide to Bone Marrow Transplantation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992.

Tal como se usa en el presente documento, una célula madre mesenquimal no está “genéticamente modificada” si ni ella ni ninguna de sus células precursoras ha tenido ácido nucleico introducido artificialmente en la misma.

Tal como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” significará cualquier molécula de ácido nucleico, incluyendo, sin limitación, ADN, ARN e híbridos de los mismos. Las bases de ácido nucleico que forman las moléculas de ácido nucleico pueden ser las bases A, C, G, T y U, así como derivados de las mismas. Se conocen bien en la técnica derivados de estas bases, y se muestran a modo de ejemplo en PCR Systems, Reagents and Consumables (Perkin Elmer Catalogue 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, N.J., EE.UU.).

Tal como se usa en el presente documento, una región de ácido nucleico que codifica para proteína citotóxica está “operativamente unida” a un promotor o combinación de promotor/potenciador específicos de endotelio si tal promotor o combinación de promotor/potenciador provoca la expresión de la proteína citotóxica.

Tal como se usa en el presente documento, un “polipéptido” significa un polímero de residuos de aminoácido. Un “péptido” se refiere normalmente a un polipéptido más corto (por ejemplo, 10 residuos de aminoácido), y una “proteína” se refiere normalmente a un polipéptido más largo (por ejemplo, 200 residuos de aminoácido). Los residuos de aminoácido pueden producirse de manera natural o ser análogos químicos de los mismos. Los polipéptidos también pueden incluir modificaciones tales como glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, hidroxilación y ADP-ribosilación.

Tal como se usa en el presente documento, un “promotor” incluye, sin limitación, promotor de endotelina-1, promotor de pre-proendotelina-1, promotor de myoD, promotor de NeuroD, promotor de CD20, promotor de insulina, promotor de Pdx-1, promotor de VEGF, promotor de VEGF-R, promotor de SCL, promotor de Sca1, promotor de BDNF(-R),

promotor de NGF(-R) y promotor de EGF-R.

Tal como se usa en el presente documento, "promotor/potenciadores" incluyen, sin limitación, promotor potenciador de Tie2, y promotor Flk1 y potenciador intrínico.

5 Tal como se usa en el presente documento, 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.

10 Tal como se usa en el presente documento, una proteína citotóxica se "expresa selectivamente" cuando una célula madre CD34⁻ genéticamente modificada que codifica para la misma se pone en proximidad con, y se diferencia en proximidad con, tejido tumoral que experimenta angiogénesis, si la proteína citotóxica se expresa en ese medio más de lo que se expresa en cualquier otro medio en el sujeto. Preferentemente, la proteína citotóxica se expresa en ese medio al menos 10 veces más de lo que se expresa en cualquier otro medio en el sujeto.

15 Tal como se usa en el presente documento, "sujeto" significará cualquier animal, tal como un ser humano, primate no humano, ratón, rata, cobaya o conejo.

20 Tal como se usa en el presente documento, un "número terapéuticamente eficaz de células madre mesenquimales CD34⁻" incluye, sin limitación, las siguientes cantidades e intervalos de cantidades: (i) desde 1×10^2 hasta 1×10^8 células/kg de peso corporal; (ii) desde 1×10^3 hasta 1×10^7 células/kg de peso corporal; (iii) desde 1×10^4 hasta 1×10^5 células/kg de peso corporal; (iv) desde 1×10^4 hasta 1×10^5 células/kg de peso corporal; (v) desde 1×10^5 hasta 1×10^5 células/kg de peso corporal; (vi) desde 5×10^4 hasta $0,5 \times 10^5$ 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 en animales preclínicos y protocolos convencionales para el trasplante de células madre hematopoyéticas CD34⁺. Las células mononucleares (incluyendo células CD34⁺) contienen habitualmente entre 1:23.000 y 1:300.000 células CD34⁺.

30 Tal como se usa en el presente documento, "tratar" a un sujeto aquejado de un trastorno significará ralentizar, detener o revertir la progresión del trastorno. En la realización preferida, tratar a un sujeto aquejado de un trastorno significa revertir la progresión del trastorno, idealmente hasta el punto de eliminar el propio trastorno. Tal como se usa en el presente documento, mejorar un trastorno y tratar un trastorno son equivalentes.

35 Tal como se usa en el presente documento, "tumor" incluirá, sin limitación, un tumor vascularizado tal como un tumor de próstata, un tumor pancreático, un carcinoma de células escamosas, un tumor de mama, un melanoma, un carcinoma de células basales, un carcinoma hepatocelular, cáncer testicular, un neuroblastoma, un glioma o un tumor astrocítico maligno tal como glioblastoma multiforme, un tumor colorrectal, un carcinoma endometrial, un carcinoma de pulmón, un tumor de ovario, un tumor de cuello uterino, un osteosarcoma, un rabdo/leiomioma, un sarcoma sinovial, un angiosarcoma, un sarcoma de Ewing/PNET y un linfoma maligno. Estos incluyen tumores primarios así como enfermedades metastásicas.

45 Tal como se usa en el presente documento, una célula es "xenogénica" con respecto a un sujeto si ella o cualquiera de sus células precursoras son de otro sujeto de una especie diferente.

Realizaciones de la invención

50 Esta invención proporciona células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1.

55 Se prevén todos los tipos de tumor para este método incluyendo, por ejemplo, un tumor de próstata, un tumor pancreático, un carcinoma de células escamosas, un tumor de mama, un melanoma, un carcinoma de células basales, un carcinoma hepatocelular, cáncer testicular, un neuroblastoma, un glioma o un tumor astrocítico maligno tal como un glioblastoma multiforme, un tumor colorrectal, un carcinoma endotelial, un carcinoma de pulmón, un tumor ovárico, un tumor de cuello de útero, un osteosarcoma, un rabdo/leiomioma, un sarcoma sinovial, un angiosarcoma, un sarcoma de Ewing/PNET y un linfoma maligno.

60 También se prevén numerosas combinaciones de promotor/potenciador específicos de endotelio y proteínas citotóxicas para este método. En una realización, la combinación de promotor/potenciador es el promotor/potenciador Tie2, la proteína citotóxica es la timidina cinasa de Herpes simplex, y el sujeto se trata con ganciclovir® de tal modo que permite que la timidina cinasa viral de Herpes simplex haga que el ganciclovir® sea citotóxico. El ganciclovir® y sus métodos de uso son bien conocidos en la técnica.

65 En los usos anteriores que emplean células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas, el sujeto tratado puede ser cualquier sujeto. En la realización preferida, el sujeto es un ser humano. Además, en los métodos

objeto que emplean células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas, las células madre mesenquimales CD34⁻ pueden ser alogénicas, autólogas o xenogénicas con respecto al sujeto, a menos que se establezca o implique lo contrario.

- 5 En los presentes usos que emplean células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas, los genes exógenos se expresan, es decir, “se activan”, cuando las células madre (i) se ponen en proximidad con las células apropiadas en un tejido diana, (ii) se diferencian y/o (iii) se funden con las células apropiadas en un tejido diana.

10 Las diversas proteínas y secuencias reguladoras usadas en esta invención pueden obtenerse fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, se muestra la especificidad de células endoteliales del promotor potenciador de Tie2 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 U S A. 1997 94:3058-63. El gen de herpes VHS TK - V00467 puede usarse para timidina cinasa (ATP:timidina 5' fosfotransferasa, e.c. 2.7.1.21) (cepa CL101 de tipo 1).

15 Esta invención se entenderá mejor en referencia a los detalles experimentales que siguen, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que las realizaciones específicas detalladas son sólo ilustrativas de la invención tal como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen después de esto.

20 Detalles experimentales

Parte I

25 Células madre negativas para CD34 transgénicas modificadas por ingeniería genética para suministro de genes terapéuticos

Sinopsis

30 Los enfoques de células madre mesenquimales y terapia génica son muy esperanzadores para el desarrollo de nuevas herramientas para tratar muchas enfermedades potencialmente mortales. La vinculación de la terapia de células madre con la terapia génica selectiva potencia las opciones terapéuticas para la regeneración o el reemplazo de células enfermas o que faltan. La expresión génica específica de tejido en el contexto de diferenciación de células madre en crecimiento adherente *in vitro*, negativas para CD34 se usa para generar células progenitoras negativas para CD34, que conducirán a selectividad de células e inducibilidad de expresión génica también por motivos de seguridad. Se detallan tecnologías de suministro de genes virales y no virales como técnicas para la modulación de la expresión génica en el contexto del reclutamiento y diferenciación de células madre. Se describen posibles aplicaciones clínicas de esta nueva estrategia terapéutica, que llevan las células progenitoras transgénicas al cáncer o sitio de regeneración tisular para inducir terapia antitumoral o promover remodelación tisular y cicatrización de heridas. Las células progenitoras transgénicas sirven como potente vehículo de suministro de genes.

40 Células madre mesenquimales como vehículos de suministro de genes

45 Las células madres ofrecen el potencial de proporcionar terapias celulares para enfermedades que son resistentes a otros tratamientos. Para cada tipo de célula madre, el objetivo último es el mismo: la célula debe expresar un repertorio de genes específico, modificando de ese modo la identidad celular para mantener, reemplazar o rescatar un tejido particular. Para ayudar a soportar la diferenciación en el entorno tisular específico, están haciéndose intentos de modificar la “programación nuclear” de células madre.

50 Células madre multipotentes, células madre mesenquimales y células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) representan poblaciones de células madre prometedoras que pueden diferenciarse a lo largo de diferentes linajes. Representan los “motores celulares” que impulsan la renovación de tejidos de mamíferos adultos. Estas células se dividen de manera continua a lo largo de toda la vida produciendo células de una nueva progenie que experimentan un programa de diferenciación y maduración para reemplazar células de tejidos caducados más antiguas. Se cree que el mismo programa de recambio celular en algunos casos proporciona una fuente de células para la reparación y regeneración de tejidos adultos. El potencial regenerativo de los diferentes tipos de células madre subyace al interés actual en la adaptación de estas células para aplicaciones en terapia de reemplazo celular.

60 Las posibles fuentes de células madre 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 – a new therapeutic concept?) NEJM 2003 349: 570-582). Para aplicaciones clínicas las fuentes de células madre deben ser fácilmente accesibles y recogerse fácilmente con riesgo mínimo para el paciente y proporcionar abundantes células. En este sentido el tejido adiposo representa una fuente tisular prometedora. (Adipose derived stem cells for the regeneration of damaged tissue Parker M, Adam K, Expert Opin Biol Therap, 2006, 567-568). Las células madre derivadas del tejido adiposo y las células madre derivadas de la médula ósea comparten cinéticas de crecimiento, características referentes a la senescencia celular, eficacia de transducción génica, expresión de marcadores de superficie CD y perfiles de transcripción génica similares (Cells Tissues Organs. 2003; 174(3):101-9. Comparison of

multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. 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. Diciembre de 2002; 13(12):4279-95. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH).

5 También están evaluándose células madre derivadas de diferentes fuentes como posibles vehículos para terapia celular y génica específica frente a una enfermedad. Su alto potencial de autorrenovación las convierte en candidatos prometedores para la restauración o el reemplazo de sistemas de órganos y/o el suministro de productos génicos. Aunque las células progenitoras pueden mostrar buen potencial de proliferación y diferenciación *in vitro*, sus propiedades biológicas *in vivo* siguen por definirse. Las células madre expandidas *in vitro* representan poblaciones heterogéneas que incluyen múltiples generaciones de progenie de células mesenquimales (estromales), que carecen de expresión de la mayoría de los marcadores de diferenciación como CD34. Estas poblaciones pueden haber conservado un potencial de proliferación limitado y receptividad por diferenciación y maduración terminales a lo largo de los linajes mesenquimales y no mesenquimales. Con suerte en el futuro mejores marcadores para poblaciones de células madre multipotentes mejorarán la capacidad para distinguir estas células madre de otras poblaciones de células progenitoras.

Promotores específicos de tejido usados para suministrar expresión de genes terapéuticos en el contexto biológico correcto.

20 La terapia mediada por células madre supone en última instancia reprogramación nuclear, la alteración de los patrones de expresión génica únicos para tipos celulares en diversos tejidos y órganos. En varias enfermedades de células madre heredadas, un defecto genético confiere una desventaja de supervivencia a la población de células madre afectadas. En estas enfermedades, se cree que el trasplante de una población de células madre "corregidas" produce una selección *in vivo* espontánea en ausencia de cualquier presión selectiva aplicada de manera exógena. Por ejemplo, en SCID ligada al cromosoma X, la introducción de un transgén terapéutico confiere una ventaja de proliferación y supervivencia continua a la población celular transducida (Neff *et al.*, 2006). Sin embargo, habitualmente no son directamente posibles efectos de selección *in vivo* similares en una mayoría de enfermedades. En situaciones en las que una sobreexpresión del gen terapéutico no confiere una ventaja de supervivencia, puede incorporarse en el vector un segundo gen seleccionable, idealmente bajo regulación farmacológica. (Tirona y Kim, 2005). Los sistemas que permiten la selección regulada farmacológicamente incluyen interacción proteína-proteína forzada reversible usando los denominados "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 proteico de unión a ligando y un dominio efector (habitualmente la porción intracelular de un receptor de factor de crecimiento). El dominio efector se activa por la unión al fármaco que conduce a dimerización de proteínas. La fusión de señalización sirve por tanto como interruptor que se activa en presencia del CID y se desactiva tras la retirada del CID. La incorporación de sistemas como éste en una población de células madre puede permitir un control dependiente de fármaco de la proliferación de la población celular transducida (Neff *et al.*, 2006; Neff y Blau, 2001).

40 El uso de células madre como vehículos de suministro para genes terapéuticos puede observarse para ofrecer una serie de ventajas. A menudo se reclutan de manera activa células madre a tejidos dañados en los que experimentan diferenciación durante la reparación tisular. Por ejemplo, células progenitoras derivadas de la médula ósea CD34+ contribuyen a la reparación tisular diferenciándose en células endoteliales, células de músculo liso vasculares, células hematopoyéticas y posiblemente otros tipos celulares. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales células progenitoras circulantes se dirigen a tejidos en remodelación siguen sin estar claros. Jin *et al.* han demostrado que la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) puede promover el direccionamiento de células progenitoras circulantes a los ligandos de $\alpha 4\beta 1$ VCAM y fibronectina celular expresados en neovasculatura en remodelación activa. Se mostró que células progenitoras que expresan la integrina $\alpha 4\beta 1$ se dirigen a sitios de neovascularización tumoral activa pero no a tejidos normales. Antagonistas de la integrina $\alpha 4\beta 1$, pero no otras integrinas, bloquearon la adhesión de estas células a endotelios y sobrecrecieron para dar tipos celulares diferenciados. (Jin *et al.*, 2006)

55 Además de las integrinas, las quimiocinas y sus receptores también parecen desempeñar papeles centrales en el direccionamiento específico de tejido de células madre. Basándose en su perfil de expresión de receptores de quimiocinas, se predijo que MSC CD34⁻ se dirigen a órganos linfáticos secundarios (CCR7), piel (CCR4, CCR10), intestino delgado (CCR10) y glándulas salivales (CCR10). Tras el marcaje transitorio de MSC CD34⁻ con CMFDA o la introducción estable de plásmidos de expresión de proteína fluorescente verde (GFP), se inyectaron las células en ratones sanos singénicos y se determinó la distribución tisular de las células uno, tres y siete días más tarde. De manera interesante, las células madre no se dirigieron de nuevo a la médula ósea sino que se encontró que migraban a órganos linfáticos secundarios, glándulas salivales, intestino y piel según su perfil de expresión de receptores de quimiocinas.

65 Dado que las células madre muestran una migración selectiva a diferentes microentornos tisulares en situaciones normales así como de enfermedad, el uso de promotores específicos de tejido vinculados a la ruta de diferenciación iniciada en la célula madre reclutada podría usarse en teoría para impulsar la expresión selectiva de genes terapéuticos sólo dentro de un contexto biológico definido. Las células madre que se reclutan a otros nichos

tisulares, pero que no experimentan el mismo programa de diferenciación, no deben expresar el gen terapéutico. Este enfoque permite un grado significativo de posible control para la expresión selectiva del gen terapéutico dentro de un microentorno definido y se ha aplicado satisfactoriamente para regular la expresión de genes terapéuticos durante la neovascularización.

5 Se ha caracterizado un gran número de promotores por su expresión específica de tejido. Una buena fuente para esta información puede encontrarse en la bibliografía de transgenes, o por ejemplo en las diversas bases de datos que enumeran actividad promotora específica de tejido para la expresión de los transgenes CRE usados para dirigir modelos de delección génica dirigida de CRE/Lox específica de tejido en ratón (por ejemplo: <http://www.mshri.on.ca/nagy/Creworks.htm>). Pueden introducirse promotores que se regulan selectivamente en el contexto de inflamación o neovascularización. En este sentido, se han estudiado el promotor Tie2-, promotor Flk1 y promotor intrónico, promotor de endotelina-1 y el promotor de pre-proendotelina-1 para expresión específica endotelial (Huss *et al.*, 2004). La aplicación de genes indicadores específicos y nuevas técnicas de obtención de imágenes pueden usarse para definir la expresión específica de tejido del promotor candidato dentro del contexto del trasplante de células madre. Otras opciones referentes al suministro de genes incluyen la aplicación de una señal de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para la expresión de múltiples genes a partir de un único promotor (Jackson, 2005), por ejemplo, puede usarse un gen terapéutico conjuntamente con un gen indicador para seguir mejor la distribución de la expresión del gen terapéutico en un contexto experimental.

20 De manera importante, muchos promotores pueden mostrar “fuga” de expresión en otros tipos de tejidos o una expresión basal de bajo nivel en las células modificadas por ingeniería genética. La ingeniería genética de promotores es una nueva tecnología que puede permitir “afinar” la especificidad de promotor para limitar la actividad tisular cruzada permitiendo así una expresión más restrictiva a tipos celulares específicos (Fessele *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2003).

25 Métodos de suministro de genes

Los diversos métodos de suministro de genes que están aplicándose actualmente a la modificación por ingeniería genética de células madre incluyen vectores virales y no virales, así como métodos de transfección químicos o biológicos. Los métodos pueden producir expresión génica o bien estable o bien transitoria en el sistema usado.

Sistemas de suministro de genes virales

35 Debido a su alta eficacia de transfección, se han aplicado ampliamente virus genéticamente modificados para el suministro de genes a células madre.

Vectores de virus de ADN

40 (i) Adenovirus

Los adenovirus son virus bicatenarios, sin envuelta e icosaédricos que contienen un genoma viral de 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 su expresión se produce antes o después de la replicación del ADN. Hasta la fecha, se han descrito 51 serotipos de adenovirus humanos que pueden infectar a y replicarse en una amplia gama de órganos. Los virus se clasifican en los siguientes subgrupos: A – induce tumor con alta frecuencia y baja latencia, B – son débilmente oncogénicos y C – son no oncogénicos (Cao *et al.*, 2004; Kojaoghlanian *et al.*, 2003).

50 Estos virus se han usado para generar una serie de vectores para ingeniería genética celular por transferencia de genes. La generación inicial de vectores de adenovirus se produjo delecionando el gen E1 (requerido para la replicación viral) generando un vector con una capacidad de clonación de 4 kb. Una delección adicional de E3 (responsable de la respuesta inmunitaria del huésped) permitió una capacidad de clonación de 8 kb (Bett *et al.*, 1994; Danthinne e Imperiale, 2000; Danthinne y Werth, 2000). La segunda generación de vectores se produjo delecionando la región E2 (requerida para la replicación viral) y/o la región E4 (que participa en la inhibición de la apoptosis de células huésped) conjuntamente con delecciones de E1 o E3. Los vectores resultantes tienen una capacidad de clonación de 10-13 kb (Armentano *et al.*, 1995). La tercera generación “vaciada” de vectores se produjo mediante delección de toda la secuencia viral con la excepción de las repeticiones terminales invertidas (ITR) y las señales de empaquetamiento de actuación en cis. Estos vectores tienen una capacidad de clonación de 25 kb (Kochanek *et al.*, 2001) y han conservado su alta eficacia de transfección en células tanto quiescentes como en división.

65 De manera importante, los vectores de adenovirus no se integran normalmente en el genoma de la célula huésped, sino que han mostrado eficacia para el suministro de genes transitorio a células madre adultas. Estos vectores tienen una serie de ventajas y desventajas. Una ventaja importante es que pueden amplificarse a altos títulos y pueden infectar a una amplia gama de células (Benihoud *et al.*, 1999; Kanerva y Hemminki, 2005). Los vectores son generalmente fáciles de manejar debido a su estabilidad en diversas condiciones de almacenamiento. Se han usado

satisfactoriamente adenovirus de tipo 5 (Ad5) en el suministro de genes en células madre humanas y de ratón (Smith-Arica *et al.*, 2003). La falta de integración del adenovirus en el material genético de la célula huésped puede observarse en muchos casos como una desventaja, ya que su uso permite sólo una expresión transitoria del gen terapéutico.

Por ejemplo, en un estudio que evalúa la capacidad de células madre mesenquimales para experimentar condrogénesis cuando se suministraron TGF-beta 1 y proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) mediante expresión mediada por adenovirus, se encontró que la condrogénesis estaba estrechamente relacionada con el nivel y la duración de las proteínas expresadas de manera transitoria. La expresión transgénica en todos los agregados era altamente transitoria, mostrando una disminución marcada tras 7 días. Se inhibió la condrogénesis en agregados modificados que expresaban BMP-2 o TGF-beta 1 >100 ng/ml; sin embargo, esto se debía en parte al efecto inhibitorio de la exposición a altas cargas de adenovirus (Mol Ther. Agosto de 2005; 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 usando células madre derivadas de tejido adiposo de rata transducidas con adenovirus que portan el gen de la proteína morfogenética ósea-7 (BMP-7) humano recombinante se mostraron resultados prometedores para una fuente autóloga de células madre para terapia génica con BMP. Sin embargo, la actividad evaluada midiendo la fosfatasa alcalina *in vitro* era transitoria y alcanzó un pico en el día 8. Por tanto, los resultados eran similares a los encontrados en el modelo de condrogénesis (Cytotherapy. 2005; 7 (3):273-81).

Por tanto, para terapias o experimentos que no requieren expresión génica estable, los vectores de adenovirus pueden ser una buena opción. Un problema importante adicional al usar vectores de adenovirus es que pueden provocar una fuerte respuesta inmunitaria dirigida contra las células modificadas por ingeniería genética tras su transferencia al huésped. Claramente, esto puede ser una cuestión importante cuando se considera la aplicación de células modificadas por ingeniería genética en una situación 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.)

Se ha mostrado que vectores de adenovirus basados en Ad de tipo 5 introducen de manera eficaz y transitoria un gen exógeno mediante el receptor primario, virus de Coxsackie y receptor de adenovirus (CAR). Sin embargo, algunas clases de células madre, tales como MSC y células madre hematopoyéticas, aparentemente no pueden transducirse eficazmente con vectores de adenovirus convencionales basados en Ad serotipo 5 (Ad5), debido a la falta de expresión de CAR. Para superar este problema, se han desarrollado vectores de adenovirus modificados con fibras y un vector de adenovirus basado en otro serotipo de adenovirus. (Mol Pharm. Marzo-abril de 2006; 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) Virus adenoasociados

Los virus adenoasociados (VAA) son miembros ubicuos, no citopáticos, de replicación no competente de virus animales de ADNmc de la familia parvoviridae (G. Gao *et al.*, New recombinant serotypes of AAV vectors. Curr Gene Ther. Junio de 2005; 5(3):285-97). VAA es un virus icosaédrico pequeño con un genoma de 4,7 kb. Estos virus tienen extremos terminales característicos que consisten en repeticiones palindrómicas que se pliegan en una horquilla. Se replican con la ayuda de un virus auxiliar, que normalmente son uno de los muchos serotipos de adenovirus. En ausencia de virus auxiliar, se integran en el genoma humano en un locus específico (AAVS1) en el cromosoma 19 y persisten en forma latente hasta que se produce la infección por el virus auxiliar (Atchison *et al.*, 1965, 1966). VAA puede transducir tipos celulares de diferentes especies incluyendo ratón, rata y mono. Entre los serotipos, VAA2 es el más estudiado y ampliamente aplicado como vector de suministro de genes. Su genoma codifica para dos marcos de lectura abiertos (ORF) grandes rep y cap. El gen rep codifica para cuatro proteínas Rep78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40 que desempeñan papeles importantes en diversos estadios del ciclo de vida viral (por ejemplo replicación del ADN, control transcripcional, integración específica de sitio, acumulación de genoma monocatenario usado para el empaquetamiento viral). El gen cap codifica para tres proteínas de la cápsida viral VP1, VP2, VP3 (Becerra *et al.*, 1988; Buning *et al.*, 2003). El extremo 3' genómico sirve como cebador para la síntesis de la segunda hebra y tiene sitios de resolución terminales (TRS) que sirven como secuencia de integración para el virus ya que la secuencia es idéntica a la secuencia en el cromosoma 19 (Young y Samulski, 2001; Young *et al.*, 2000).

Estos virus son similares a adenovirus porque pueden infectar a una amplia gama de células en división y que no están en división. A diferencia de los adenovirus, tienen la capacidad para integrarse en el genoma del huésped en un sitio específico en el genoma humano. Desafortunadamente, debido a su genoma bastante voluminoso, los vectores de VAA tienen una capacidad limitada para la transferencia de insertos de genes foráneos (Wu y Atai, 2000).

Vectores de virus de ARN

(i) Retrovirus

Los genomas retrovirales consisten en dos copias idénticas de ARN de sentido positivo bicatenarios, de 7-10 kb de longitud que codifican para tres genes; *gag*, *pol* y *env*, flanqueados por repeticiones terminales largas (LTR) (Yu y Schaffer, 2005). El gen *gag* codifica para la cápsida proteica núcleo que contiene la matriz y elementos de la nucleocápsida que son productos de escisión de la proteína precursora *gag*. El gen *pol* codifica para las enzimas proteasa viral, transcriptasa inversa e integrasa derivadas del gen precursor *gag-pol*. El gen *env* codifica para la glicoproteína de la envuelta que media en la entrada viral. Una característica importante del genoma retroviral es la presencia de LTR en cada extremo del genoma. Estas secuencias facilitan la iniciación de la síntesis de ADN viral, moderan la integración del ADN proviral en el genoma del huésped y actúan como promotores en la regulación de la transcripción génica viral. Los retrovirus se subdividen en tres grupos generales: los oncoretrovirus (virus de la leucemia murina de Maloney, MoMLV), los lentivirus (VIH) y los espumavirus (virus espumoso) (Trobridge *et al.*, 2002).

Los vectores basados en retrovirus son los vectores de integración más comúnmente usados para terapia génica. Estos vectores tienen generalmente una capacidad de clonación de aproximadamente 8 kb y se generan mediante una delección completa de la secuencia viral con la excepción de las LTR y las señales de empaquetamiento de actuación en *cis*.

Los vectores retrovirales se integran en sitios aleatorios en el genoma. Los problemas asociados con esto incluyen la posible mutagénesis por inserción y la posible actividad oncogénica dirigida a partir de la LTR. La región U3 de la LTR alberga elementos promotores y potenciadores, por tanto esta región, cuando se deleciona del vector, conduce a una autoinactivación del vector en el que se impide la transcripción dirigida por LTR. Entonces puede usarse un promotor interno para dirigir la expresión del transgén.

Los estudios iniciales de la transferencia génica de células madres en ratones generaron la esperanza de que la transferencia génica a seres humanos sería igualmente tan eficaz (O'Connor y Crystal, 2006). Desafortunadamente, la transferencia génica usando sistemas de vectores retrovirales disponibles para transfectar células madres en repoblación a largo plazo de múltiples linajes es todavía significativamente más eficaz en el ratón. La eficacia reducida de la transferencia génica en seres humanos, así como la integración no controlada del vector retroviral representan obstáculos importantes para la aplicación de estos vectores como modalidad de tratamiento en el contexto de la modificación por ingeniería genética de células madre.

(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.* Febrero de 2002; 2(1):45-55.) Tienen un ciclo de replicación y genoma más complejos en comparación con los oncoretrovirus (Beyer *et al.*, 2002). Difieren de los retrovirus más sencillos en que poseen elementos y genes reguladores adicionales, tales como el gen *tat*, que media en la transactivación de la transcripción viral (Sodroski *et al.*, 1996) y *rev*, que media en la exportación nuclear de ARN viral no cortado ni empalmado (Cochrane *et al.*, 1990; Emerman y Temin, 1986).

Los vectores de lentivirus se derivan del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) eliminando los genes necesarios para la replicación viral haciendo que el virus sea inerte. Aunque carecen de genes de replicación, el vector todavía puede integrarse eficazmente en el genoma del huésped permitiendo la expresión estable del transgén. Estos vectores tienen la ventaja adicional de una baja citotoxicidad y una capacidad para infectar diferentes tipos celulares. También se han desarrollado vectores lentivirales a partir de origen de simio, equino y felino pero los vectores derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son los más comunes (Young *et al.*, 2006).

Los vectores de lentivirus se generan mediante la delección de toda la secuencia viral con la excepción de las LTR y las señales de empaquetamiento de actuación en *cis*. Los vectores resultantes tienen una capacidad de clonación de aproximadamente 8 kb. Una característica distintiva de estos vectores a partir de vectores retrovirales es su capacidad para transducir células en división y células que no están en división así como células diferenciadas de manera terminal (Kosaka *et al.*, 2004). El sistema de suministro lentiviral puede producir altas tasas de infección en células madre embrionarias y mesenquimales humanas. En un estudio de Clements *et al.*, se modificó la estructura principal lentiviral para que expresase transgenes mono y bicistronicos y también se usó para suministrar ácido ribonucleico en horquilla corto para el silenciamiento específico de la expresión génica en células madre humanas. (Tissue Eng. Julio de 2006; 12 (7):1741-51. Lentiviral manipulation of gene expression in human adult and embryonic stem cells. Clements MO, Godfrey A, Crossley J, Wilson SJ, Takeuchi Y, Boshoff C.)

Tabla 1

Resume los vectores virales descritos anteriormente.						
Vector	Capacidad del inserto (kb)	Tropismo	Forma de genoma del vector	Expresión	Potencial inflamatorio	Eficacia
Con envuelta						
Retrovirus	8	Sólo células en división	Integrado	Estable	Bajo	Alta
Lentivirus	8	En división y que no están en división	Integrado	Estable	Bajo	Alta
Sin envuelta						
Virus adenoasociado	<5	En división y que no están en división	Episomal e integrado	Estable	Bajo	Alta
Adenovirus	4 -25	En división y que no están en división	Episomal	Transitoria	Alto	Alta

5 Sistemas de suministro de genes no virales

(i) Métodos para la integración facilitada de genes

10 Además de los vectores basados en virus comentados anteriormente, están actualmente en desarrollo otros sistemas de vectores que carecen de secuencia viral. Las estrategias alternativas incluyen transferencia de plásmidos convencionales y la aplicación de integración génica dirigida a través del uso de tecnologías de integrasa o transposasa. Estos representan nuevos enfoques importantes para la integración de vectores y tienen la ventaja de ser tanto eficaces como específicos de sitio a menudo 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 2 micrómetros de levaduras (Dymecki, 1996; Rodriguez *et al.*, 2000) y una integrasa aislada del fago λ C31 de estreptomicos (Ginsburg y Calos, 2005). Cada una de estas recombinasas reconoce sitios de integración diana específicos. Las recombinasas Cre y FLP catalizan la integración en una secuencia palindrómica de 34 pb denominada *lox P* (locus para reticulación) y FRT (diana de 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 da como resultado integración cuando los sitios att están presentes en dos moléculas de ADN diferentes y delección o inversión cuando los sitios att están en la misma molécula. Se ha encontrado que funciona en células en cultivo tisular (*in vitro*) así como en ratones (*in vivo*).

25 El transposón Sleeping Beauty (SB) está compuesto por dos repeticiones terminales invertidas de 340 pares de bases cada una (Izsvak *et al.*, 2000). Este sistema dirige la transferencia precisa de constructos específicos desde un plásmido donador a un cromosoma de mamífero. La escisión e integración del transposón desde un vector de plásmido a un sitio cromosómico está mediada por la SB transposasa, que puede suministrarse a las células de una manera o bien cis o bien trans (Kaminski *et al.*, 2002). Un gen en un transposón integrado cromosómicamente puede expresarse a lo largo de toda la vida de una célula. Los transposones SB se integran aleatoriamente en pares de bases de dinucleótidos TA aunque las secuencias flanqueantes pueden influir en la integración. Aunque los resultados hasta la fecha no sugieren que inserciones al azar de transposones SB representen el mismo nivel de riesgos observado con vectores virales, se requieren más datos antes de que el sistema pueda aplicarse de manera segura en ensayos en seres humanos.

35 Métodos físicos para introducir vectores en células

(i) Electroporación

40 La electroporación se basa en el uso de pulsos eléctricos de alto voltaje, breves que crean poros transitorios en la membrana al superar su capacitancia. Una ventaja de este método es que puede utilizarse para expresión génica tanto estable como transitoria en la mayoría de los tipos celulares. La tecnología se basa en la naturaleza relativamente débil de las interacciones hidrófobas e hidrófilas en la membrana de fosfolípidos y en su capacidad para recuperar su estado original tras la alteración. Una vez que se permeabiliza la membrana, pueden suministrarse moléculas polares a la célula con alta eficacia. Moléculas cargadas grandes como ADN y ARN se desplazan al interior de la célula a través de un proceso impulsado por su gradiente electroforético. La amplitud del pulso rige el área total que se permeabilizaría sobre la superficie celular y la duración del pulso determina el grado de permeabilización (Gabriel y Teissie, 1997). El estado permeabilizado de la célula depende de la fuerza de los pulsos. Pulsos fuertes pueden conducir a permeabilización irreversible, daño irreparable a la célula y en última

instancia a muerte celular. Por este motivo, la electroporación es probablemente el más duro de los métodos de suministro de genes y requiere generalmente mayores cantidades de ADN y células. La eficacia de este método depende de muchos factores cruciales como el tamaño de la célula, la replicación y la temperatura durante la aplicación del pulso (Rols y Teissie, 1990).

5 La característica más ventajosa de esta técnica es que puede transferirse ADN directamente al núcleo aumentando su probabilidad de integrarse en el genoma del huésped. Incluso células difíciles de transfectar pueden transfectarse de manera estable usando este método (Aluigi *et al.*, 2005; Zernecke *et al.*, 2003). La modificación del procedimiento de transfección usado durante la electroporación ha conducido al desarrollo de un método de transferencia génica eficaz denominado nucleofección. La tecnología Nucleofector™ es una técnica de transferencia génica basada en electroporación no viral que se ha demostrado que es una herramienta eficaz para transfectar líneas celulares difíciles de transfectar y células primarias incluyendo MSC (Michela Aluigi, Stem Cells vol. 24, nº 2, febrero de 2006, págs. 454-461).

15 Métodos basados en biomoléculas

(i) Dominios de transducción de proteínas (PTD)

20 Los PTD son péptidos cortos que se transportan al interior de la célula sin el uso de la ruta endocítica o canales de proteínas. El mecanismo implicado en su entrada no se entiende bien, pero puede producirse incluso a baja temperatura (Derossi *et al.* 1996). Los dos PTD que se producen de manera natural más comúnmente usados son el activador de transactivación del dominio de transcripción (TAT) del virus de la inmunodeficiencia humana y el homeodominio del factor de transcripción de Antennapedia. Además de estos PTD que se producen de manera natural, hay varios péptidos artificiales que tienen la capacidad para cruzar espontáneamente la membrana celular (Joliot y Prochiantz, 2004). Estos péptidos pueden unirse covalentemente a la estructura principal pseudopeptídica de PNA (ácidos nucleicos peptídicos) para ayudar a suministrarlos al interior de la célula.

(ii) Liposomas

30 Los liposomas son vesículas sintéticas que se asemejan a la membrana celular. Cuando se agitan moléculas lipídicas con agua, forman espontáneamente compartimentos de doble membrana esféricos que rodean un centro acuoso formando liposomas. Pueden fundirse con células y permitir la transferencia de material “empaquetado” al interior de la célula. Se han usado satisfactoriamente liposomas para suministrar genes, fármacos, proteínas indicadoras y otras biomoléculas al interior de células (Felnerova *et al.*, 2004). La ventaja de los liposomas es que están hechos de biomoléculas naturales (lípidos) y no son inmunogénicos.

Pueden incorporarse diversas moléculas hidrófilas al interior de los mismos durante su formación. Por ejemplo, cuando se mezclan lípidos con grupos de cabeza cargados positivamente con ADN recombinante, pueden formar lipoplexos en los que el ADN cargado negativamente se compleja con los grupos de cabeza positivos de moléculas lipídicas. Estos complejos pueden entrar entonces en la célula a través de la ruta endocítica y suministrar el ADN a compartimentos lisosómicos. Las moléculas de ADN pueden escapar de este compartimento con la ayuda de dioleiletanolamina (DOPE) y se transportan al interior del núcleo en el que pueden transcribirse (Tranchant *et al.*, 2004).

45 A pesar de su simplicidad, los liposomas padecen baja eficacia de transfección porque se aclaran rápidamente por el sistema reticuloendotelial debido a adsorción de proteínas plasmáticas. Se han usado muchos métodos de estabilización de liposomas incluyendo la modificación de la superficie del liposoma con oligosacáridos, estabilizando estéricamente de ese modo los liposomas (Xu *et al.*, 2002).

50 (iii) Inmunoliposomas

Los inmunoliposomas son liposomas con anticuerpos específicos insertados en sus membranas. Los anticuerpos se unen selectivamente a moléculas de superficie específicas sobre la célula diana para facilitar la captación. Las moléculas de superficie seleccionadas como diana por los anticuerpos son las que se internalizan preferiblemente por las células de modo que, tras la unión, se capta el complejo completo. Este enfoque aumenta la eficacia de transfección potenciando la liberación intracelular de componentes del liposoma. Estos anticuerpos pueden insertarse en la superficie del liposoma a través de diversos anclajes lipídicos o unirse al extremo terminal de polietilenglicol injertado sobre la superficie del liposoma. Además de proporcionar especificidad al suministro de genes, los anticuerpos también pueden proporcionar una cubierta protectora a los liposomas que ayuda a limitar su degradación tras la captación por ARNasas o proteinasas endógenas (Bendas, 2001). Para prevenir adicionalmente la degradación de liposomas y su contenido en el compartimento lisosómico, pueden emplearse inmunoliposomas sensibles al pH (Torchilin, 2006). Estos liposomas potencian la liberación del contenido del liposoma al citosol fusionándose con la membrana endosomal dentro del orgánulo a medida que se desestabilizan y son propensos a la fusión a pH ácido.

65 En general, no se han aplicado sistemas de suministro de genes no virales como medios de suministro de genes al

interior de células madre tan ampliamente como los medios de suministro de genes virales. Sin embargo, se demostraron resultados prometedores en un estudio que consideraba la viabilidad de transfección, la proliferación y la diferenciación de células progenitoras/madre neurales adultas en los tres linajes neurales de neuronas. Los sistemas de suministro de genes no virales, no liposómicos (ExGen500 y FuGene6) tuvieron una eficacia de transfección de entre el 16 % (ExGen500) y el 11 % (FuGene6) de las células. Las células tratadas con FuGene6 no diferían de las células no transfectadas en su viabilidad o tasa de proliferación, mientras que estas características se redujeron significativamente tras la transfección con ExGen500. De manera importante, ningún agente afectó al patrón de diferenciación tras la transfección. Ambos agentes podían usarse para marcar genéticamente células, y seguir su diferenciación en los tres linajes neurales, tras el injerto sobre cultivos de corte de hipocampo organotípicos *ex vivo* (J Gene Med. Enero de 2006; 8(1):72-81. Efficient non-viral transfection of adult neural stem/progenitor cells, without affecting viability, proliferation or differentiation. Tinsley RB, Fajerson J, Eriksson PS).

(iv) Métodos basados en polímeros

Los grupos ϵ -amino de poli L-lisina (PLL) interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente formando complejos que pueden usarse para el suministro de genes. Estos complejos pueden ser bastante inestables y mostraron una tendencia a agregarse (Kwoh *et al.*, 1999). Se encontró que la conjugación de polietilenglicol (PEG) conducía a un aumento en la estabilidad de los complejos (Lee *et al.*, 2005, Harada-Shiba *et al.*, 2002). Para conferir un grado de especificidad de tejido, también se han empleado moléculas de direccionamiento tales como anticuerpos específicos de tejido (Trubetskoy *et al.*, 1992, Suh *et al.*, 2001).

Un portador génico adicional que se ha usado para transfectar células es polietilenoimina (PEI) que también forma complejos con el ADN. Debido a la presencia de aminas con valores de pKa diferentes, tiene la capacidad de escapar del compartimento endosomal (Boussif *et al.*, 1995). Se encontró que PEG injertado sobre complejos de PEI reducía la citotoxicidad y la agregación de estos complejos. Esto también puede usarse 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).

Implicaciones para la medicina

Las células madre no sólo tienen la capacidad para diferenciarse en diversos tejidos, sino que debido a su capacidad inherente para dirigirse al tejido dañado, tienen el potencial de suministrar la expresión de genes terapéuticos a entornos tisulares específicos. A través del uso de enfoques de ingeniería molecular, pueden usarse células madre como vehículos para expresar selectivamente genes en zonas de defectos o necesidad, liberando de ese modo el producto terapéutico de la transfección sólo donde se requiere. Enfermedades en las que células madre modificadas por ingeniería genética podrían desempeñar un papel en el futuro son aquellas en las que una proteína o una enzima completa falta o no es funcional o cuando determinados factores proporcionan una función mejorada en un tejido específico.

Se ha realizado ya una serie de estudios usando células madre en situaciones terapéuticas para el tratamiento de una gama diversa de enfermedades que incluyen cáncer, trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer, enfermedad isquémica del corazón y distrofias musculares.

La transferencia de genes de resistencia a fármacos al interior de células madre hematopoyéticas es prometedora para el tratamiento de varias enfermedades heredadas. Éstas incluyen; deficiencia inmunitaria combinada grave ligada al cromosoma X, deficiencia en adenosina desaminasa, talasemia.

El enfoque de células madre y terapia génica combinado tiene el potencial de adaptarse a trastornos adquiridos tales como cáncer de mama, linfomas, tumores cerebrales y cáncer testicular. En este sentido, se han iniciado estudios usando el enfoque combinado para el tratamiento de cáncer. Estos estudios oscilan entre la mejora de la resistencia a fármacos de células madre hematopoyéticas trasplantadas y el uso de células madre genéticamente modificadas para seleccionar como diana el cáncer.

Se han transferido genes de resistencia a fármacos al interior de células madre hematopoyéticas para proporcionar mieloprotección frente a la mielosupresión inducida por quimioterapia o para seleccionar células madre hematopoyéticas que se transducen de manera concomitante con otro gen para la corrección de un trastorno heredado. (Cancer Gene Ther., noviembre de 2005; 12(11):849-63. Hematopoietic stem cell gene therapy with drug resistance genes: an update. Budak-Alpdogan T, Banerjee D, Bertino JR).

Los ejemplos comparativos del uso de células madre para seleccionar como diana cáncer incluyen la potenciación de la terapia génica mediada por efecto inespecífico usando células madre neurales modificadas por ingeniería genética para el tratamiento de gliomas, y usando células madre hematopoyéticas que portan el gen de inhibidor de ribonucleasa para seleccionar como diana la vasculatura de melanomas.

Un enfoque comparativo adicional para el cáncer hace uso de la capacidad de las células madre para reclutarse a la vasculatura tumoral y para diferenciarse en células de tipo endotelial. Dependiendo del tipo de tumor,

aproximadamente el 30 % de las nuevas células endoteliales vasculares en tumores pueden derivarse de progenitores de la médula ósea (Hammerling y Ganss, 2006). Por tanto, el uso de células progenitoras genéticamente modificadas reclutadas desde la circulación periférica puede representar un posible vehículo para terapia génica de tumores (Reyes *et al.*, 2002). El gen suicida de timidina cinasa (tk) del virus del herpes simple 1 (VHS) junto con ganciclovir® (GCV) se ha usado satisfactoriamente para el tratamiento *in vivo* de diversos tumores sólidos (Dancer *et al.*, 2003; Pasanen *et al.*, 2003). La expresión selectiva de VHS-tk por células endoteliales durante la neovascularización en combinación con modificación por tk de GCV conduce a un entorno letal para células en proliferación. Se ha identificado una serie de promotores que se inducen durante la neovascularización que permiten la activación selectiva del gen suicida tras el reclutamiento y la diferenciación de células precursoras modificadas por ingeniería genética.

Un “efecto inespecífico” se describe como la capacidad de las células para mediar en el daño celular a células distantes. En un reciente estudio de Li *et al.* se examinó el efecto inespecífico de células madre neurales transducidas con el gen de VHS-tk (NSCtk) sobre células de glioma de rata. Experimentos de coimplantación intracraneal en ratas Sprague-Dawley o ratones desnudos atímicos mostraron que los animales coimplantados con NSCtk y células de glioma y luego tratados con ganciclovir® (GCV) no mostraban tumores intracraneales y sobrevivieron más de 100 días, mientras que los tratados con solución salina fisiológica (PS) murieron debido a la progresión tumoral. (Cancer Gene Ther., julio de 2005; 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).

El inhibidor de ribonucleasa humana (hRI) puede inhibir la actividad de ARNasa pancreática (ARNasa A) y se ha sugerido que RI puede actuar como agente antiangiogénico latente. Fu *et al.* examinaron la viabilidad de transfectar el gen de RI al interior de células hematopoyéticas murinas y luego inducir su expresión para bloquear la angiogénesis en tumores sólidos. Se clonó RI de placenta humana y se insertó en el vector retroviral pLNCX. Entonces se infectaron células hematopoyéticas de médula ósea murina con el vector retroviral pLNCX-RI. Entonces se inyectaron células infectadas en ratones irradiados de manera letal. Tras la administración de células hematopoyéticas que portan el gen de RI, se les implantó a los ratones melanomas B16 se hizo crecer el tumor durante 21 días. Los tumores de los grupos control se hicieron grandes y bien vascularizados. En cambio, los tumores de ratones tratados con células hematopoyéticas que portan el gen de RI eran pequeños y tenían una densidad relativamente baja de vasos sanguíneos. (Cancer Gene Ther. Marzo de 2005; 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.)

Muchos estudios que se centran en la enfermedad de Parkinson usan o bien trasplante de células o bien terapia génica (Gene Ther., septiembre de 2003; 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 enfoques. Liu *et al.* usaron células estromales derivadas de la médula ósea para suministrar genes terapéuticos al cerebro. Los autores usaron un vector de virus adenoasociado (VAA) para suministrar el gen de tirosina hidroxilasa (TH) a células estromales de la médula ósea. Entonces se trasplantaron MSC que expresaban el gen de TH al núcleo estriado de una rata con enfermedad de Parkinson. Se encontró que la eficacia de expresión génica era de aproximadamente el 75 %. Se detectó una mejora funcional en las ratas enfermas tras el injerto de células estromales de la médula ósea modificadas por ingeniería genética con TH. El examen histológico mostró que el gen de TH se expresaba alrededor de los puntos de trasplante, y que los niveles de dopamina en el núcleo estriado lesionado de las ratas era superior que en los controles. Se observó una mejora funcional de los animales (Brain Res Brain Res Protoc., mayo de 2005; 15(1):46-51. Publicación electrónica 22 de abril de 2005. 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 una diana comparativa adicional para la terapia con células madre modificadas por ingeniería genética. Chen *et al.* usaron células CD34(+) purificadas obtenidas de sangre de cordón umbilical humano, transfectadas con genes de angiopoyetina-1 (Ang1) y VEGF(165) humanos usando un vector de VAA. Se inyectaron las células modificadas por ingeniería genética junto con VEGF por vía intramiocárdica en la pared libre anterior izquierda, lo que condujo a una disminución del tamaño del infarto, y una densidad capilar significativamente aumentada tras el tratamiento, así como a rendimiento cardíaco a largo plazo mejorado medido usando ecocardiografía 4 semanas tras el infarto de miocardio. (Eur J Clin Invest., noviembre de 2005; 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 musculares representan un grupo heterogéneo de trastornos neuromusculares caracterizados por desgaste muscular progresivo. Hasta la fecha, no existe ninguna modalidad de tratamiento adecuada para estos pacientes. Se han evaluado poblaciones de células madre adultas, incluyendo MSC, así como células madre embrionarias para determinar su capacidad para corregir el fenotipo distrófico. Hasta la fecha, los métodos descritos no han mostrado ser muy prometedores. Los motivos descritos para el fracaso muestran a modo de ejemplo las dificultades con las que se encuentran los investigadores cuando usan células madre genéticamente modificadas: el

mecanismo subyacente responsable de un potencial miogénico en células madre no se ha dilucidado aún completamente, el direccionamiento de la población donadora al músculo es a menudo inadecuado y respuestas inmunitarias escasamente entendidas en el receptor pueden conducir a un éxito del tratamiento limitado (Stem cell based therapies to treat muscular dystrophies. Price, Kuroda, Rudnicki) Un enfoque usado para el tratamiento de distrofia muscular de Duchenne (DMD) utiliza el trasplante celular autólogo de células madre miogénicas que se han transducido con un casete de expresión terapéutico. El desarrollo de este método se ha visto dificultado por una serie de problemas incluyendo: una baja frecuencia de injerto celular, dificultad en el seguimiento de las células trasplantadas, rápida pérdida de células autólogas que portan genes marcadores y dificultad en la introducción de la transferencia estable del gen de distrofina grande en células madre miogénicas.

Se diseñó por ingeniería genética un gen de fusión mini Dys-GFP reemplazando el dominio C-terminal de distrofina (DeltaCT) por una secuencia que codifica para eGFP y eliminando gran parte del dominio de varilla central de distrofina (DeltaH2-R19). En un ratón mdx (4Cv) transgénico que expresa la proteína de fusión miniDys-GFP bajo el control de un promotor específico de músculo esquelético, la proteína de fusión verde se localizaba en el sarcolema, donde se ensabló el complejo distrofina-glicoproteína e impidió el desarrollo de distrofia en músculos mdx(4Cv) transgénicos. (Hum Mol Genet., 15 de mayo de 2006; 15(10):1610-22. Publicación electrónica 4 de abril de 2006. 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 se caracteriza por trombocitopenia, desregulación y propensión al desarrollo de linfoma posteriormente en la vida y representa una posible diana para la terapia con células madre modificadas por ingeniería genética (Dupre *et al.*, 2006). La anemia de Fanconi se considera una "enfermedad de células madre" y ha sido el sujeto de una investigación intensiva para el tratamiento usando terapia génica. Esta enfermedad representa el defecto congénito mejor caracterizado de células madre hematopoyéticas. Es una enfermedad hereditaria poco común caracterizada por insuficiencia de la médula ósea y anomalías en el desarrollo; una alta incidencia de mielodisplasia, leucemia no linfocítica aguda y tumores sólidos. La base genética para la anemia de Fanconi se encuentra en mutaciones selectivas en uno cualquiera de los genes de la anemia de Fanconi, lo que hace que esta enfermedad sea un candidato para la terapia génica. Pero la enfermedad es compleja ya que se han descrito al menos 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 han ligado a un gen distinto. La mayoría de las proteínas de FA forman un complejo que activa la proteína FANCD2 mediante monoubiquitinación, mientras que FANCI y FANCD1/BRCA2 funcionan posteriormente a esta etapa. Las proteínas de FA normalmente carecen de dominios funcionales, excepto para FANCI/BRIP1 y FANCF, que son ADN helicasas, y FANCL, que es probablemente una enzima de conjugación de ubiquitina E3. Basándose en la hipersensibilidad a agentes de reticulación, se cree que las proteínas de FA funcionan en la reparación de los entrecruzamientos entre hebras de ADN, que bloquean la progresión de las horquillas de replicación del ADN. (Cell Oncol. 2006; 28(1-2):3-29. The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. Levitus M, Joenje H, de Winter JP.)

Los defectos de células madre heredados adicionales que son posibles candidatos para terapia génica incluyen trombocitopenia amegacariocítica, disqueratosis congénita y síndrome de Shwachman-Diamond. Las talasemias y la anemia falciforme pertenecen al grupo de anemias hemolíticas hereditarias que representan las enfermedades heredadas más comunes en todo el mundo y por tanto son importantes candidatos para la terapia génica de células madre (Persons y Tisdale, 2004).

Un buen ejemplo comparativo usando células madre mesenquimales genéticamente modificadas en una situación clínica es la corrección de la mutación genética en la enfermedad ósea incapacitante, osteogénesis imperfecta. La osteogénesis imperfecta provoca huesos frágiles debido a mutaciones en los genes que codifican para colágeno-I, COL1A1 o COL1A2. Chamberlain *et al.* obtuvieron células madre mesenquimales (MSC) a partir de los huesos de pacientes con osteogénesis imperfecta e identificaron mutaciones puntuales en el gen COL1A1 (Chamberlain *et al.*, 2004). Se infectaron satisfactoriamente MSC con un virus adenoasociado para seleccionar como diana y desactivar el gen COL1A1 mutado. Entonces se trasplantaron las MSC corregidas en ratones inmunodeficientes y las células dañadas demostraron procesamiento de colágeno y estabilidad mejoradas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se aíslan células madre multipotentes de la médula ósea y otras fuentes de un paciente o donante usando crecimiento adherente *in vitro* para determinar la actividad celular y la función biológica. En esta fase *in vitro*, la célula en crecimiento adherente no expresa el "marcador de células madre" CD34 y se consideran por tanto negativas para CD34 durante el cultivo *in vitro*. En esta fase, se transfectan de manera transitoria o estable células madre en crecimiento adherente, negativas para CD34 mediante tecnologías virales o no virales y se expanden selectivamente *in vitro* antes de la aplicación *in vivo*. Para la generación de células progenitoras negativas para CD34 transgénicas, se usan dos promotores para la selección e inducibilidad específica de órgano/diana del gen terapéutico. Se elige el sistema de transferencia génica basándose en su transfección e integración (si se desea) combinadas con selectividad de adhesión. Como este ejemplo, el promotor potenciador de tie2 está dirigiendo el gen

de VHS-TK, que se expresa sólo en el contexto de diferenciación endotelial, lo que sucede durante la neoangiogénesis tumoral. Aunque se reclutan fisiológicamente células madre endógenas circulantes así como administradas sistémicamente en el sitio de crecimiento tumoral para participar en la neoangiogénesis tumoral (independientemente de si es el sitio tumoral primario o metástasis), las células madre se diferencian en células endoteliales tumorales. Durante este proceso de diferenciación específica de órgano, las células madre expresan el gen de VHS-TK dirigido por la activación de tie2 relacionada con la angiogénesis. Ahora puede administrarse el profármaco ganciclovir® al paciente y se convierte por la VHS-TK en la sustancia citotóxica en el sitio de angiogénesis tumoral. Este enfoque se ha mostrado satisfactorio en modelos preclínicos para cáncer de mama, cáncer colorrectal metastásico, carcinoma de páncreas y glioblastoma. Puede preverse una aplicación para cualquier neoplasia (maligna) que se base en neoangiogénesis tumoral. Este enfoque tiene como objetivo la alteración de la angiogénesis tumoral.

Ejemplo 2

Como en el ejemplo 1, pero en lugar de expresar VHS-TK, expresando sustancias de coagulación como proteínas citotóxicas.

Ejemplo comparativo 3

La angiogénesis es también un proceso biológico fundamental en remodelación tisular y cicatrización de heridas. Esto no sólo se aplica para lesiones de la piel o la mucosa sino también para otros tejidos, como la falta de células beta productoras de insulina en el páncreas, que conduce a diabetes mellitus insulino dependiente (DMID). La aplicación sistémica de células progenitoras negativas para CD34 transgénicas también puede inducir la activación de células progenitoras de los islotes de lo contrario quiescentes en el páncreas, reponiendo el páncreas endocrino y corrigiendo el estado de hiperglucemia en pacientes con DMID. El promotor potenciador de tie-2 activa el gen para sustancias vasoactivas como VEGF que promueven la remodelación tisular y la cicatrización de heridas.

Ejemplo comparativo 4

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

Ejemplo 5

Como en el ejemplo 1, pero células transgénicas con capacidades de direccionamiento potenciadas al sitio de crecimiento tumoral, remodelación tisular o cicatrización de heridas aplicando biología de quimiocinas. Se modifican por ingeniería genética células madre en crecimiento adherente, negativas para CD34 usando GPI-mucina-quimiocinas. Estos agentes permitirán la expresión selectiva de quimiocinas específicas unidas al dominio de mucina tomado o bien de CX3CL1 o bien de CXCL16 fusionado a un anclaje GPI. La expresión de estos agentes de quimiocina-mucina reclutará leucocitos complementarios que expresan el receptor de quimiocinas. Por ejemplo, la expresión de CXCL10-mucina-GPI bajo el control del promotor potenciador de tie2 en el contexto de terapia tumoral facilitará el reclutamiento de células T efectoras al entorno tumoral. Esto actuará como adyuvante para la terapia inmunitaria tumoral. También podría usarse el mismo enfoque en remodelación tisular para facilitar el reclutamiento paralelo de poblaciones de leucocitos selectas.

Ejemplo comparativo 6

Como en el ejemplo 1, pero células madre negativas para CD34 modificadas por ingeniería genética que pueden modular el entorno inflamatorio, por ejemplo en trastornos autoinmunitarios como enfermedad inflamatoria del intestino crónica o enfermedad de injerto contra huésped tras el trasplante de células madre de médula ósea alogénicas. Esto también puede facilitarse mediante la expresión específica de sitio de sustancias antiinflamatorias como interleucinas (IL-10).

Ejemplo comparativo 7

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

Ejemplo 8

Como en el ejemplo 1, pero se suprime la activación génica terapéutica mediante genes de un estadio de desarrollo temprano (por ejemplo *Noggin*), que finalmente se regula por disminución durante la diferenciación de las células progenitoras transgénicas en tejido maduro en el sitio del tumor o regeneración/remodelación tisular.

Parte II

Modelos de tumor pancreático y de mama

Sinopsis

5 La angiogénesis tumoral representa una diana prometedor para el suministro selectivo de agentes terapéuticos para el cáncer. Se desarrollaron células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea para seleccionar como diana selectivamente genes exógenos en entornos de angiogénesis tumoral. Los resultados de estos experimentos muestran que las MSC añadidas de manera exógena se dirigen a tumores en los que experimentan diferenciación. Genes tales como el gen indicador de RFP así como el gen suicida de VHS-tk se expresan selectivamente durante la diferenciación bajo el control del promotor/potenciador de Tie2. La administración del profármaco ganciclovir® conjuntamente con la expresión de tk selecciona como diana eficazmente el tumor y da como resultado la supresión del crecimiento tumoral.

Modelo de cáncer de mama de ratón endógeno

15 Se usó un modelo de cáncer de mama murino previamente establecido por el Dr. Christoph Klein para estudiar el uso de MSC modificadas por ingeniería genética en angiogénesis tumoral. Este modelo puede aplicarse ampliamente a cáncer de mama humano. En este modelo, se han retrocruzado ratones transgénicos que portan el oncogén c-neu de rata activado bajo el control transcripcional del promotor de MMTV con ratones BALB/c con el objetivo de desarrollar un modelo ampliamente aplicable para la terapia del cáncer. Ratones transgénicos HER-2/neu (neu-N) hembra, que expresan el protooncogén de rata no transformante, desarrollan adenocarcinomas mamarios focales espontáneos comenzando a los 5-6 meses de edad. El desarrollo y la histología de estos tumores se asemejan a lo que se observa en pacientes con cáncer de mama.

25 Expresión de genes de RFP y GFP en imMSC bajo el control de promotores específicos endoteliales en el contexto de angiogénesis tumoral

30 Para evaluar el control de la expresión génica específica de tejido en imMSC en el contexto de angiogénesis tumoral, y para seguir la distribución de imMSC a lo largo de periodos de tiempo más largos microscópicamente, se han clonados genes de proteína fluorescente roja y verde (RFP, GFP) en vectores de expresión modificados para detectar *in vivo*.

Ratones

35 Se sabe que ratones transgénicos HER-2/neu (neu-N) hembra que expresan el protooncogén de rata no transformante desarrollan adenocarcinomas mamarios focales espontáneos a los 5-6 meses de edad. Se mantuvieron ratones transgénicos BALB-neuT según el Acuerdo para las Directrices de la Unión Europea. Se examinaron los ratones para detectar hemicigosidad (neuT+/neuT-). Se inspeccionaron las glándulas mamarias de ratones hembra Balb-neuT dos veces a la semana y se midieron los tumores que surgían.

40 Se inyectaron las células genéticamente modificadas en los ratones modelo de cáncer de mama tras la resección quirúrgica del tumor primario. A medida que el tumor residual crecía de nuevo, las imMSC añadidas de manera exógena proporcionan células precursoras para la neovascularización. Se encontró que las imMSC transfectadas de manera estable con Tie-2-RFP (promotor específico endotelial que dirige la proteína de fluorescencia roja) se dirigían fácilmente al tumor, se diferenciaban a células endoteliales y expresaban el gen indicador de RFP (figura 5). En estos experimentos, se evaluó la integración de las células mesenquimales en los tumores mamarios primarios de ratones Balb-neuT. Tras tres aplicaciones de células transfectadas con RFP, pudieron detectarse células que expresaban RFP en regiones similares a vasos en todas las secciones. Los resultados demuestran que las células se dirigen a sitios de neovascularización y expresan genes marcadores a través del promotor/potenciador de Tie2 activado.

Inhibición del crecimiento tumoral mediante direccionamiento de un gen suicida en el endotelio

55 Se alteró entonces el protocolo para evaluar el efecto del gen suicida de VHS-tk. El producto génico de tk en combinación con el profármaco ganciclovir® (GCV) produce una potente toxina que afecta a células en replicación. Se transfectaron de manera estable imMSC con plásmidos que portaban el gen de timidina cinasa (tk) del virus del herpes simple dirigido por el promotor/potenciador de Tie2 endotelial vascular. Para este fin, se usó de nuevo el modelo murino de angiogénesis de cáncer de mama para evaluar la línea de MSC modificada por ingeniería genética en la terapia anti-angiogénesis.

Enfoque I. Inyección de MSC modificadas por ingeniería genética y tratamiento con ganciclovir® en la fase de crecimiento tumoral exponencial a la edad de 18 ó 22 semanas

El tratamiento de Balb-neuT trsg

65 Los ratones comenzaron en el día 0 (semana 22) con una inyección de 0,2 ml de células (500.000 células) y 0,2 ml

de PBS como control. En los días 5 a 8, se aplicó ganciclovir® en una dosis diaria de 30 µg/g de peso corporal, por ejemplo 100 µl para un ratón con 21 g de peso corporal. Tras el día 9, se repitieron los ciclos de tratamiento de los ratones hasta la disección. Durante el tratamiento, se registraron la progresión tumoral, el peso corporal (medido en el día 0 y 6 de cada ciclo de terapia) y el comportamiento.

Para obtener una impresión global del efecto del tratamiento con células transfectadas con Tie2-Tk-as y GCV respectivamente en comparación con ambos grupos control, se registró el valor macroscópico del peso corporal durante el tratamiento hasta la disección. Los puntos de medida fueron los días 0 y 5 de cada ciclo de terapia y el día de la disección. Los experimentos incluyeron un grupo de tratamiento y dos grupos control de ratones y comenzaron a dos puntos de tiempo diferentes, 18 y 22 semanas de edad. Tabla 2. Datos de grupos de tratamiento tras la disección, incluyendo el peso corporal, la carga tumoral absoluta y relativa.

Enfoque II. Evaluación de la terapia en el contexto de recrecimiento tumoral tras resección quirúrgica

En pacientes tras la eliminación quirúrgica de un tumor, el tumor residual que se escapa durante la cirugía a menudo crece, conduciendo a recidiva del cáncer. Para someter a prueba la eficacia de la terapia con tk/MSK modificadas por ingeniería genética en este contexto, se reseco el tejido mamario de ratones transgénicos Balb/c neu-N a las 18 semanas de edad, conduciendo a una aparición retrasada del tumor primario. Tras la cirugía, se trataron los ratones con el régimen de MSC-tk y GCV tal como se describió anteriormente. El tratamiento dio como resultado una reducción drástica en el crecimiento tumoral en los ratones tratados (figura 8).

Modelo de tumor pancreático

Se desarrolló entonces un modelo de carcinoma pancreático ortotópico en ratones C57Bl/6 para evaluar la eficacia de la terapia a base de MSC en un sistema tumoral diferente. El sistema se había establecido previamente por Christiane Bruns y Claudius Conrad (Surgery Department, LMU). En este modelo, se inyectaron por vía subcapsular células de carcinoma pancreático Panc02 singénicas para ratones C57Bl/6 en una región del páncreas justo por debajo del bazo para crear tumores pancreáticos primarios. Se introdujeron constructos con GFP bajo el control del promotor de CMV, y RFP y tk bajo el control del promotor/potenciador de Tie2, en las MSC aisladas a partir de ratones C57Bl/6. Se administraron de manera sistémica las células madre transfectadas mediante inyecciones i.v. En un experimento preliminar, se inyectaron MSC modificadas por ingeniería genética para que expresaran constitutivamente GFP (bajo el control del promotor de CMV) en ratones con tumores en crecimiento. Se encontró que las células se dirigían eficazmente a los tumores (figura 9).

En experimentos paralelos, se inyectaron en ratones con tumores en crecimiento las MSC modificadas por ingeniería genética con Tie2-RFP. Tras cinco días, se sacrificaron los animales y se examinaron los tumores para detectar la expresión de RFP. Los resultados muestran una fuerte regulación por incremento de RFP en el contexto de tumor (figura 9). No se detectó RFP en otros órganos (bazo, ganglios linfáticos y timo).

Bibliografía

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.

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.

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.

Becerra, SP, Koczot, F, Fabisch, P, Rose, JA (1988) Synthesis of adeno-associated virus 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 approach to targeting cancer therapy. *BioDrugs* 15: 215-224.
- 5 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 or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8802-8806.
- 10 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.
- 15 Bradfute, SB, Goodell, MA (2003) Adenoviral transduction of mouse hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 7: 334-340.
- Buning, H, Nicklin, SA, Perabo, L, Hallek, M, Baker, AH (2003) AAV-based gene transfer. *Curr Opin Mol Ther* 5: 367-375.
- 20 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.
- 25 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 osteogenesis imperfecta. *Science* 303: 1198-1201.
- 30 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.
- 40 Danthinne, X, Imperiale, MJ (2000) Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 7: 1707-1714.
- Danthinne, X, Werth, E (2000) New tools for the generation of E1- and/or E3-substituted adenoviral vectors. *Gene Ther* 7: 80-87.
- 45 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 promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum Gene Ther* 17: 303-313.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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) Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* 12: 570-578.
- 65

- Gabriel, B, Teissie, J (1997) Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporabilized cell membrane. *Biophys J* 73: 2630-2637.
- 5 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.
- 10 Ginsburg, DS, Calos, MP (2005) Site-specific integration with phiC31 integrase for prolonged expression of therapeutic genes. *Adv Genet* 54: 179-187.
- 15 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.
- Grill, RJ, Blesch, A, Tuszynski, MH (1997) Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol* 148: 444-452.
- 20 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.
- Hammerling, GJ, Ganss, R (2006) Vascular integration of endothelial progenitors during multistep tumor progression. *Cell Cycle* 5: 509-511.
- 25 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.
- 30 Herzog, RW, Cao, O, Hagstrom, JN, Wang, L (2006) Gene therapy for treatment of inherited haematological disorders. *Expert Opin Biol Ther* 6: 509-522.
- 35 Huss, R, von Luttichau, 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.
- 45 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.
- 50 Joliot, A, Prochiantz, A (2004) Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6: 189-196.
- 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.
- 55 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.
- 60 Kojaoghlanian, T, Flomenberg, P, Horwitz, MS (2003) The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 13: 155-171.
- 65 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.

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.

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* 12: 525-531.

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.

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.

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.

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 approaches 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.

Trobridge, G, Vassilopoulos, G, Josephson, N, Russell, DW (2002) Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol* 346: 628-648.

von Luetlichau, 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* 14:329-336, 2005.

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.

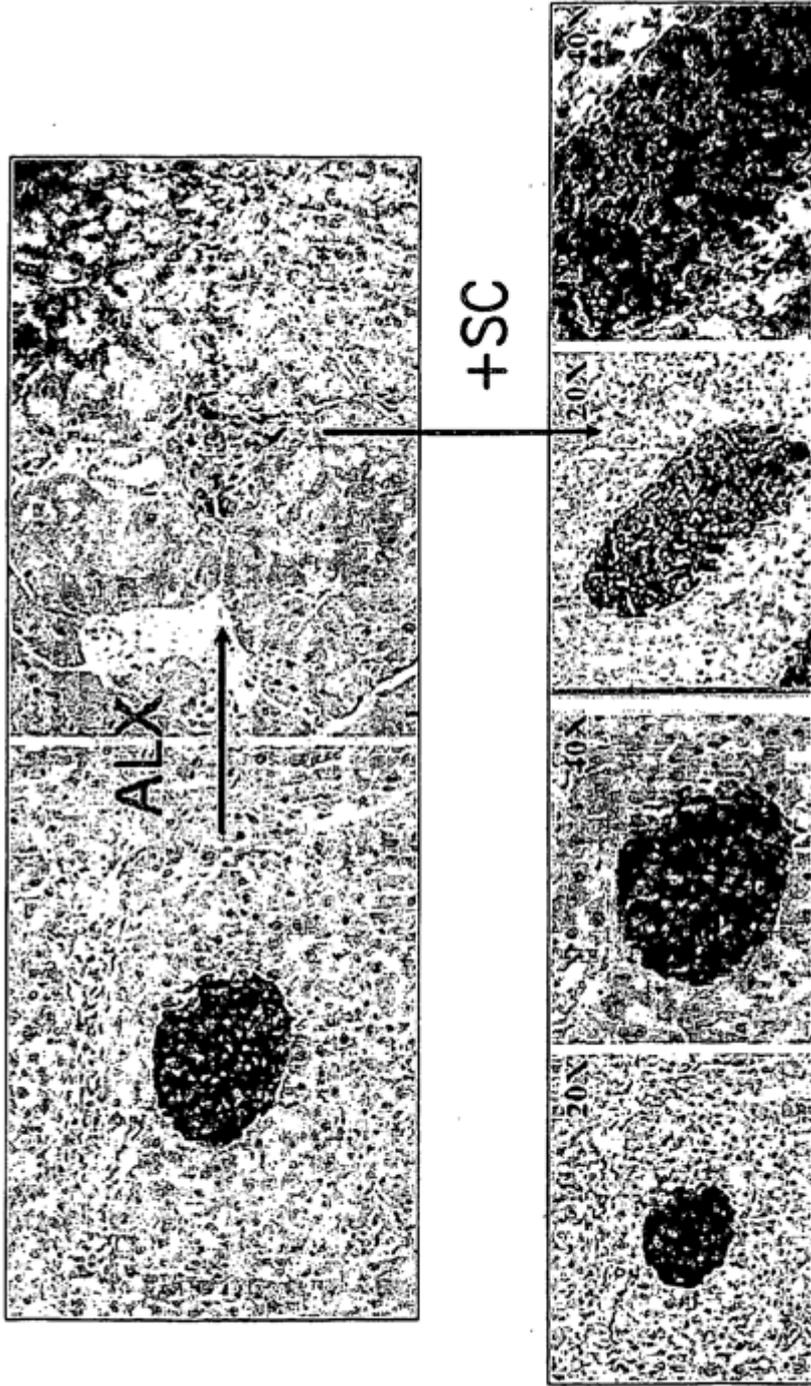
- Werner, T, Fessele, S, Maier, H, Nelson, PJ (2003) Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation. *Faseb J* 17: 1228-1237.
- 5 Wu, N, Ataai, MM (2000) Production of viral vectors for gene therapy applications. *Curr Opin Biotechnol* 11: 205-208.
- Young, LS, Searle, PF, Onion, D, Mautner, V (2006) Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 208: 299-318.
- 10 Young, SM, Jr., Samulski, RJ (2001) Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13525-13530.
- 15 Young, SM, Jr., Xiao, W, Samulski, RJ (2000) Site-specific targeting of DNA plasmids to chromosome 19 using AAV cis and trans sequences. *Methods Mol Biol* 133: 111-126.
- 20 Yu, JH, Schaffer, DV (2005) Advanced targeting strategies for murine retroviral and adeno-associated viral vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99: 147-167.
- Zernecke, A, Erl, W, Fraemohs, L, Lietz, M, Weber, C (2003) Suppression of endothelial adhesion molecule upregulation with cyclopentenone prostaglandins is dissociated from I κ B-alpha kinase inhibition and cell death induction. *Faseb J* 17: 1099-1101.
- 25 Deeg HJ, Klingemann HG, Philips GL, A Guide to Bone Marrow Transplantation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992.
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed., pág. 808, Lippincott Williams & Wilkins (2000).
- 30 Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC: Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J Surg*. Julio de 2002; 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 USA*; 1997 94:3058-63.
- 35 J. Cell Physiol. Abril de 2007. 25 [publicación electrónica antes de la impresión].

REIVINDICACIONES

1. Células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para su uso en el tratamiento de tumores en sujetos, en donde el tratamiento comprende introducir en el torrente sanguíneo de un sujeto un número terapéuticamente efectivo de dichas células, en donde cada una de las células madre CD34⁻ genéticamente modificadas contiene un ácido nucleico exógeno que comprende (i) una región que codifica para una proteína citotóxica unida operativamente a (ii) un promotor o combinación de promotor/potenciador específicos de endotelio, mediante el cual la proteína citotóxica se expresa de manera selectiva cuando las células madre CD34⁻ mesenquimales genéticamente modificadas se sitúan en la proximidad de, y se diferencian en células de tipo endotelial en la proximidad de tejido tumoral que esté sufriendo angiogénesis, y en donde la introducción de un número terapéuticamente efectivo de las células madre CD34⁻ genéticamente modificadas en el torrente sanguíneo del sujeto no está precedido, acompañado o seguido de mieloablación.
2. Las células madre CD34⁻ mesenquimales genéticamente modificadas para el uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto es humano.
3. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en un tumor de próstata, un tumor pancreático, un carcinoma de células escamosas, un tumor de mama, un melanoma, un carcinoma de células basales, un carcinoma hepatocelular, cáncer testicular, un neuroblastoma, un glioma o un tumor astrocítico maligno tal como un glioblastoma multiforme, un tumor colorrectal, un carcinoma endometrial, un carcinoma de pulmón, un tumor ovárico, un tumor de cuello de útero, un osteosarcoma, un rabdo/leiomioma sarcoma, un sarcoma sinovial, un angiosarcoma, un sarcoma de Ewing/PNET y un linfoma maligno.
4. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de la reivindicación 3, en donde el tumor es un tumor pancreático.
5. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de la reivindicación 3, en donde el tumor es un cáncer de mama.
6. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de la reivindicación 2, en donde el tumor es un tumor vascularizado.
7. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de la reivindicación 2, en donde el tumor es un tumor primario.
8. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de la reivindicación 2, en donde el tumor es un tumor metastásico.
9. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la combinación de promotor/potenciador es el promotor/potenciador Tie2, la proteína citotóxica es la timidina cinasa viral de Herpes simplex, y el sujeto se trata con ganciclovir de tal modo que permite que la timidina cinasa viral de herpes simplex haga que el ganciclovir sea citotóxico.
10. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde las células madre CD34⁻ genéticamente modificadas son alogénicas con respecto al sujeto.
11. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde las células CD34⁻ genéticamente modificadas son autólogas con respecto al sujeto.
12. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el número terapéuticamente efectivo de células madre CD34⁻ genéticamente modificadas es de 1×10^3 a 1×10^7 células/kg de peso corporal.
13. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el número terapéuticamente efectivo de células madre CD34⁻ genéticamente modificadas es de 1×10^4 a 1×10^6 células/kg de peso corporal.
14. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de la reivindicación 2, en donde el número terapéuticamente efectivo de células madre CD34⁻ genéticamente modificadas es 1×10^5 células/kg de peso corporal.
15. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde las células madre CD34⁻ genéticamente modificadas se administran mediante una sola inyección.

16. Las células madre mesenquimales CD34⁻ genéticamente modificadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde las células madre CD34⁻ genéticamente modificadas se administran mediante inyecciones repetidas en el tiempo.

5



ALX + RATÓN NORMALIZADO RM26

RATÓN NO TRATADO

FIG.1

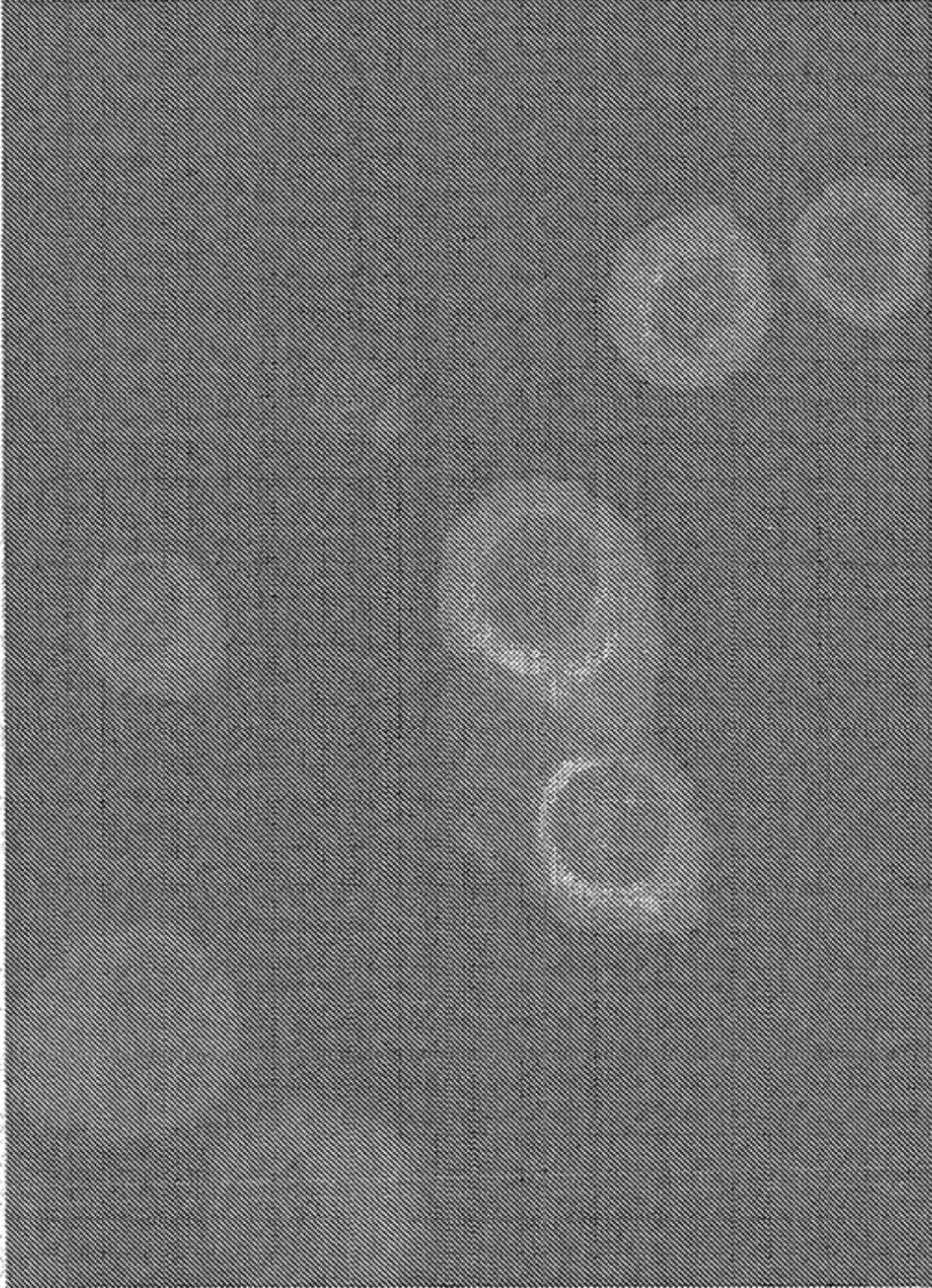


FIG.2

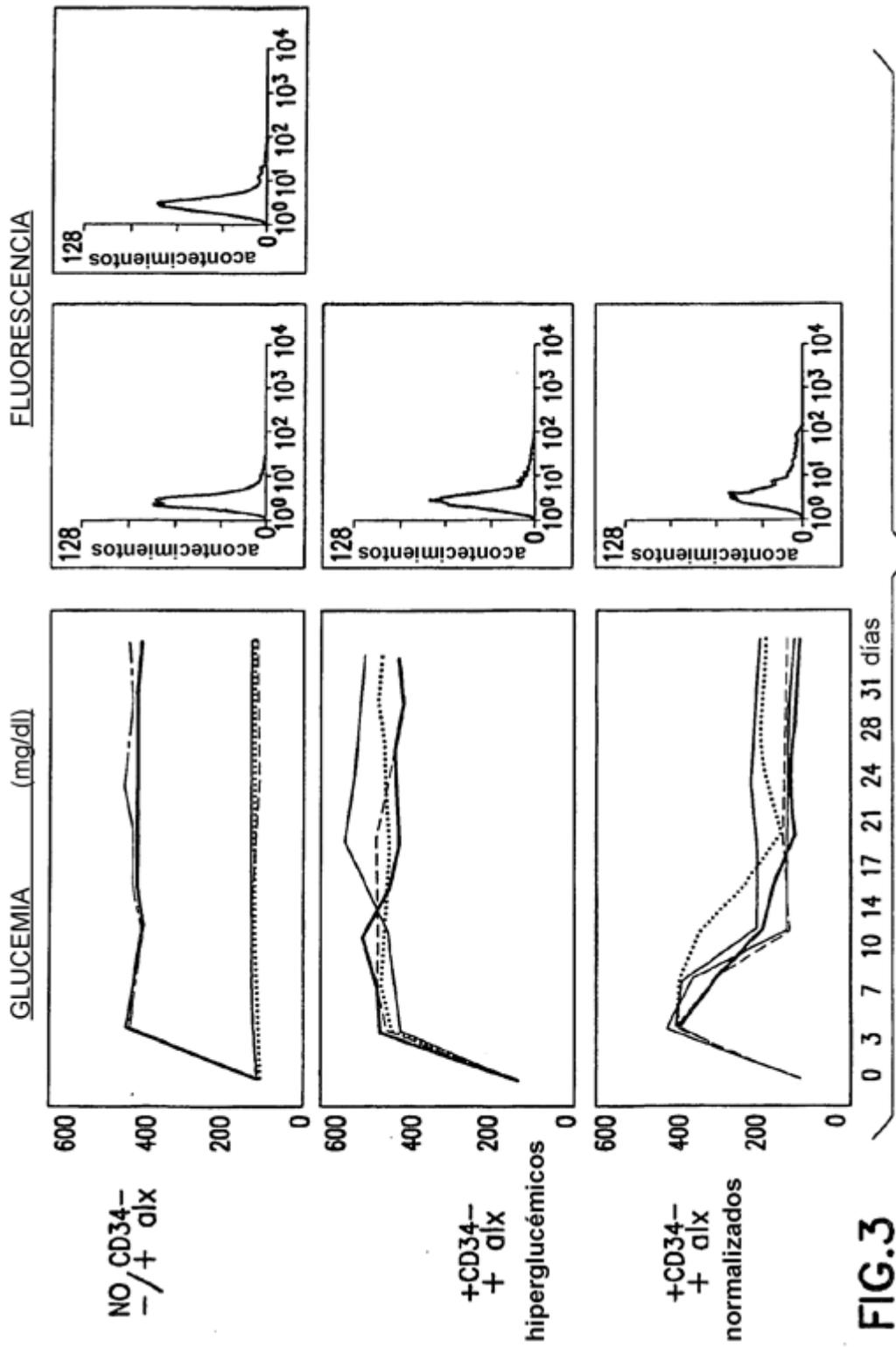
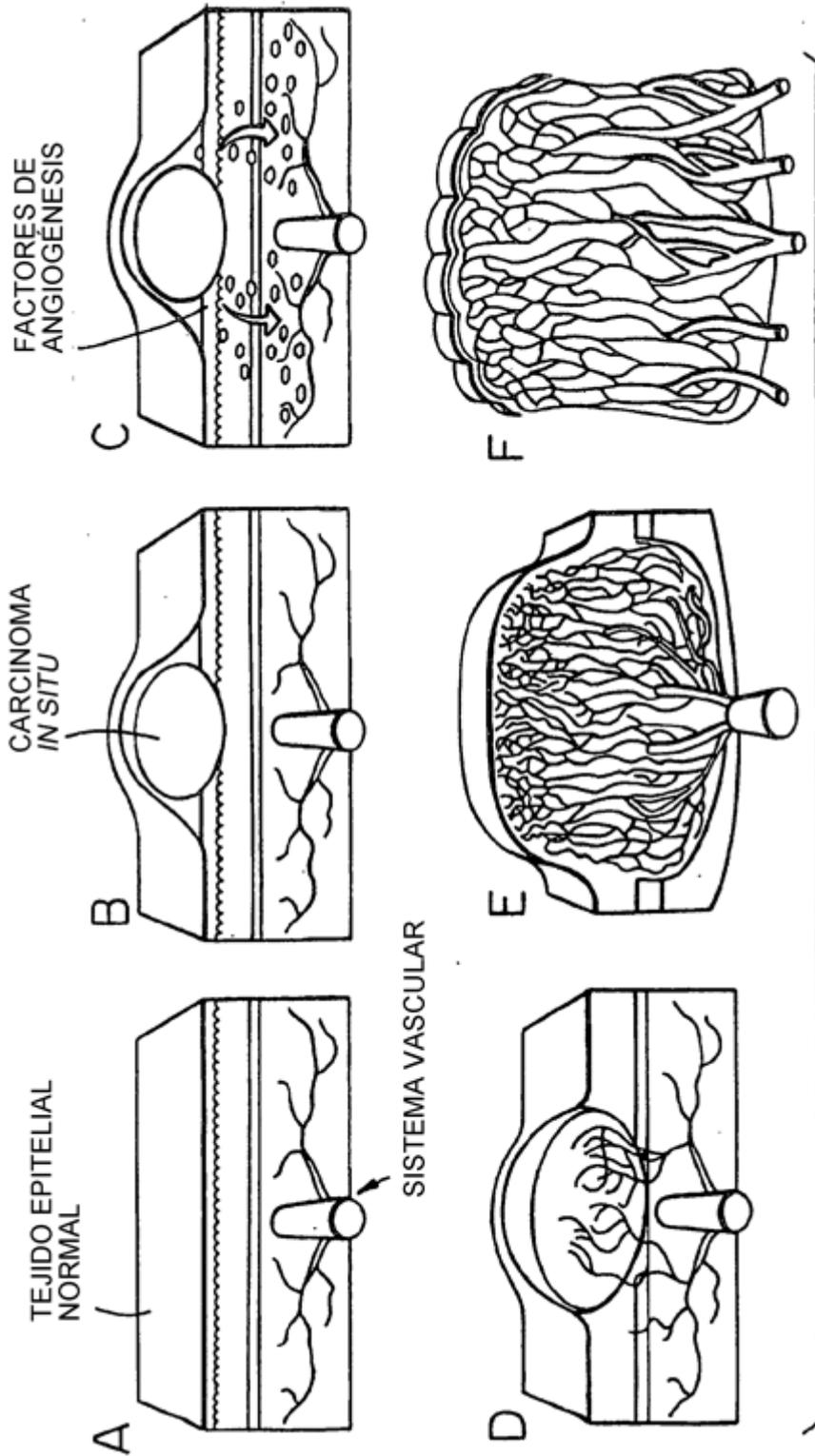


FIG.3



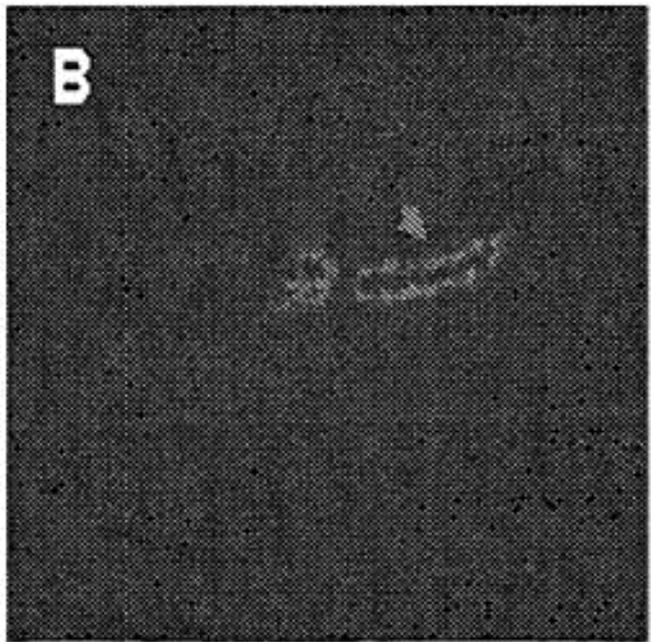
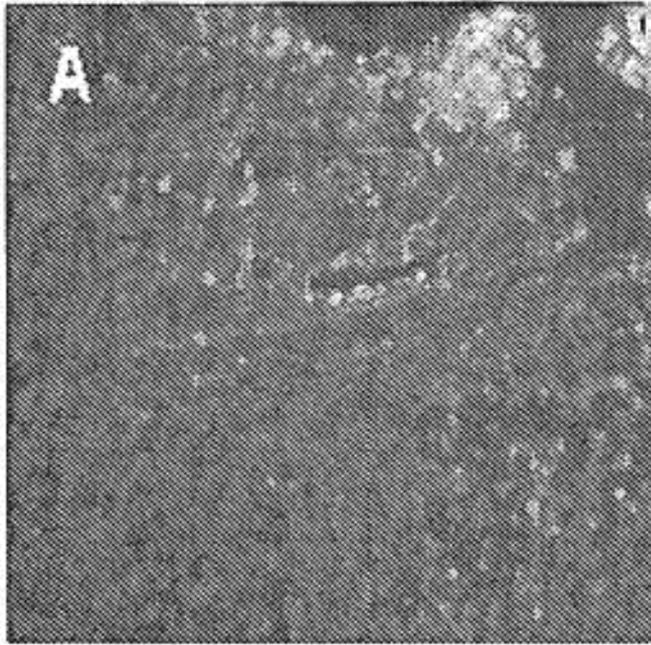


FIG.5

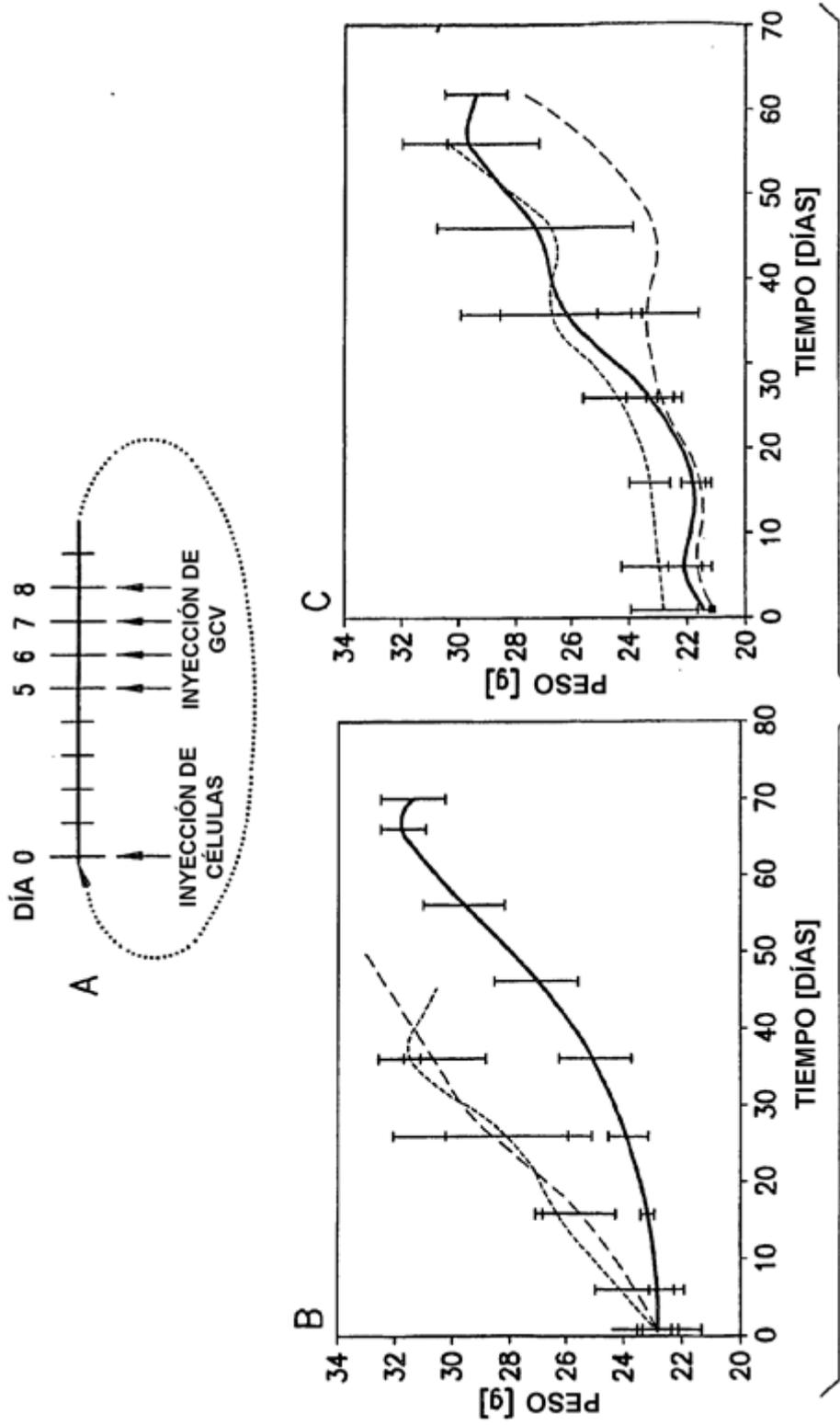


FIG.6

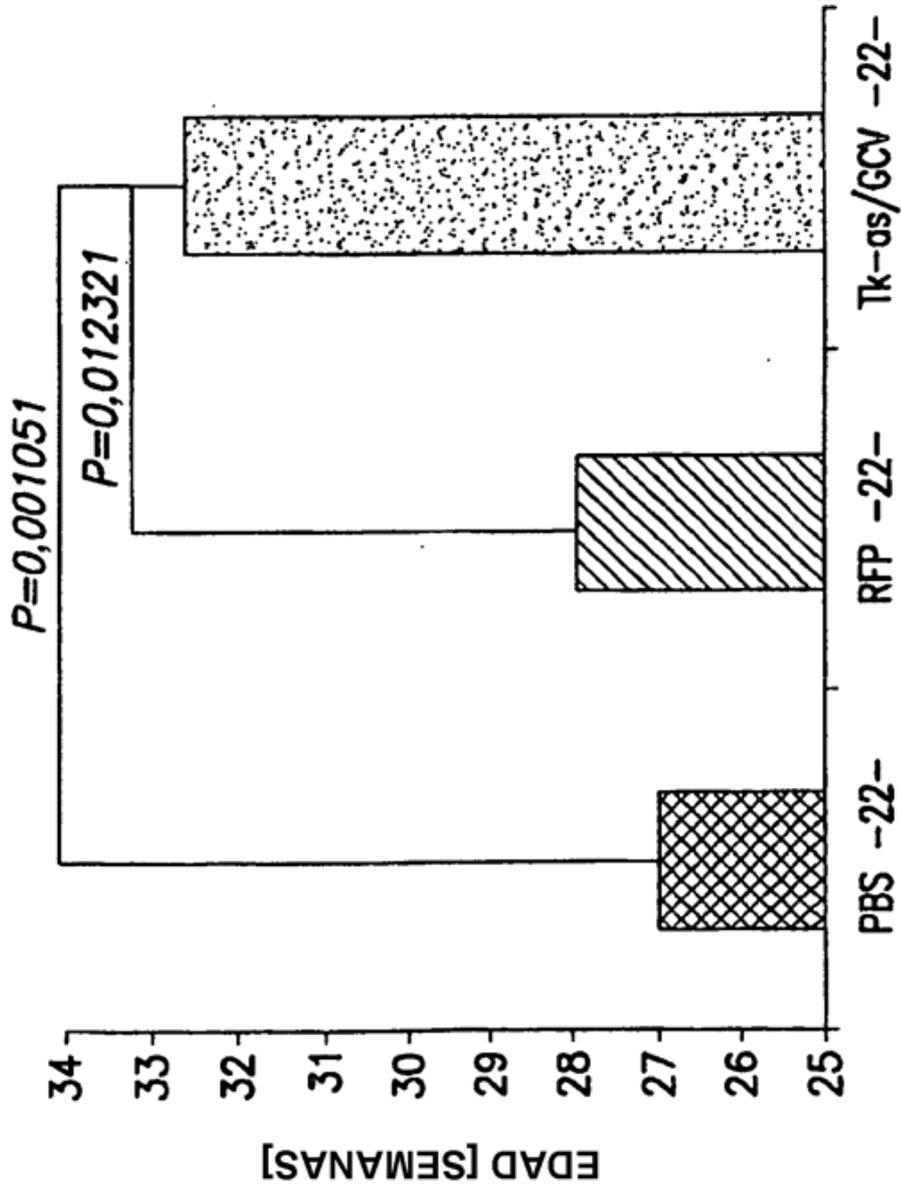


FIG.7

FIG.8



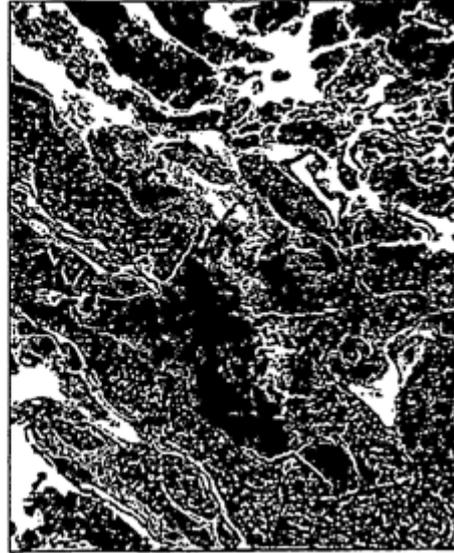
CONTROL DE TUMOR DE MAMA



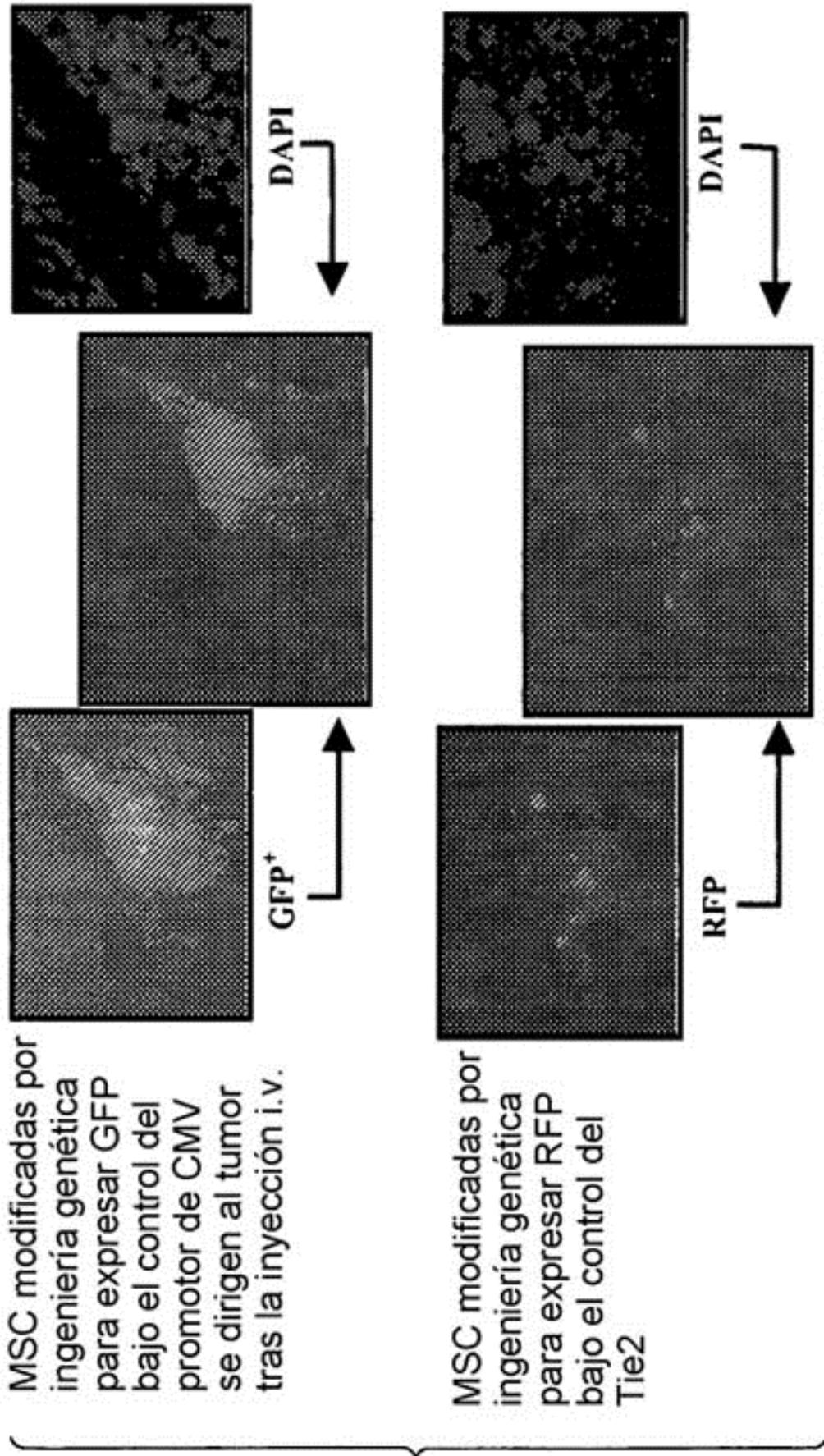
**TRATADO DURANTE CUATRO SEMANAS
(18-22) CON imMSC/TK + GV I.V.**



CONTROL DE MAMA NORMAL



**TUMOR CONTROL - ADICIÓN DE
imMSC CONTROL**



MSC modificadas por ingeniería genética para expresar GFP bajo el control del promotor de CMV se dirigen al tumor tras la inyección i.v.

MSC modificadas por ingeniería genética para expresar RFP bajo el control del Tie2

FIG.9

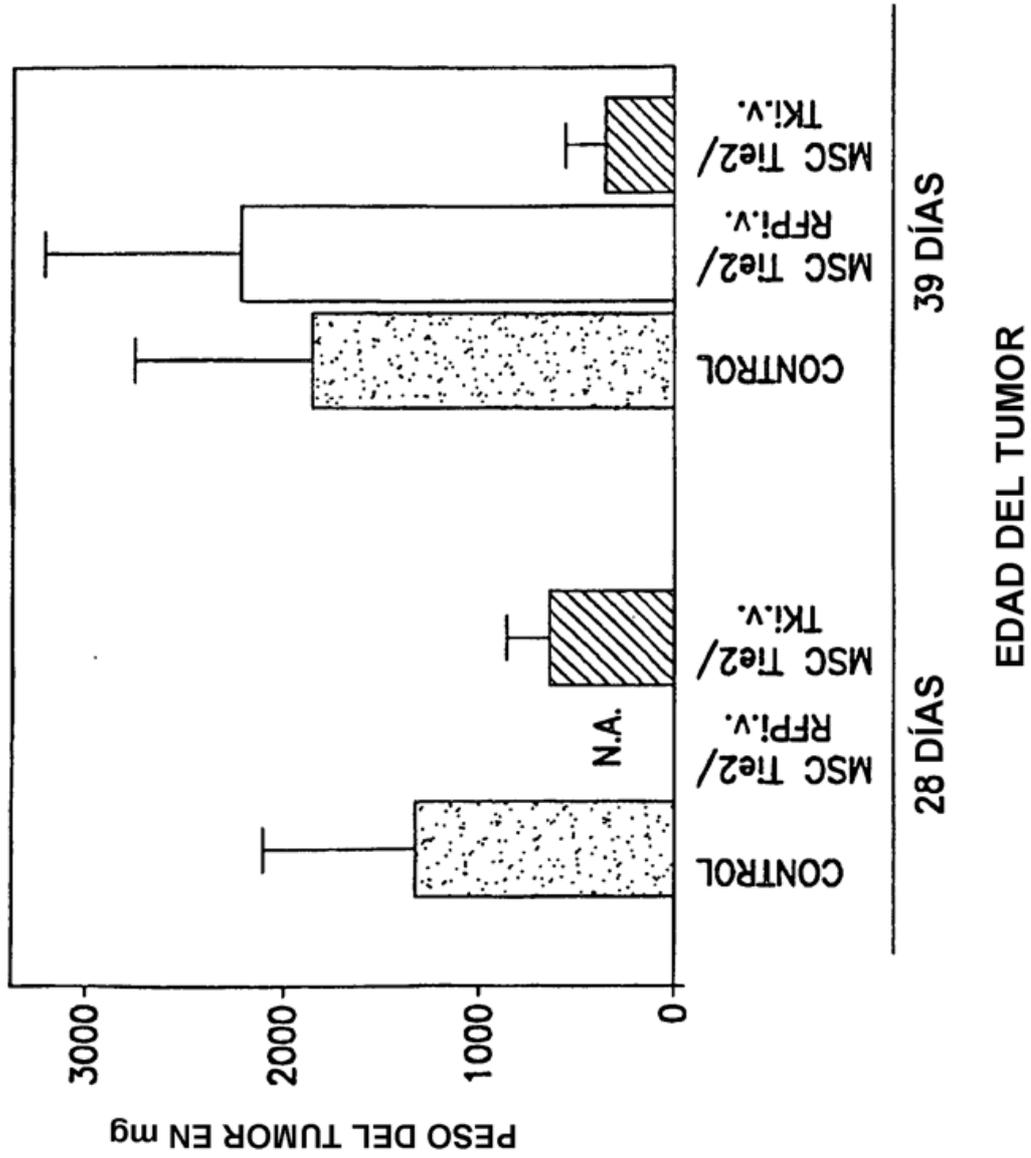
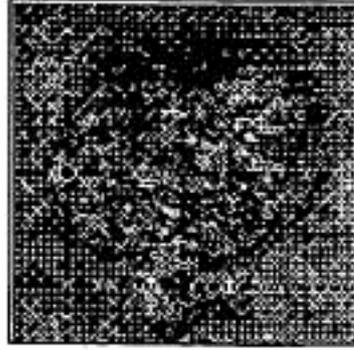


FIG.10

MODELO DE TUMOR Panc02 ORTÓPTICO DÍA 48



CONTROL (PBS I.V.)



SC Tie2/
TK + GCV

FIG.11