

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 937**

51 Int. Cl.:

A61K 35/36 (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.1999 E 07009031 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 1839667**

54 Título: **Terapia génica basada en fibroblastos y células endoteliales para el sistema pulmonar**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2015

73 Titular/es:
**NORTHERN THERAPEUTICS INC. (100.0%)
General Campus 501 Smyth Road Sprott Centre
for Stem Cell Research Critical Care Wing, 5th
Floor, Room 5206
Ottawa, ON K1H 8L6, CA**

72 Inventor/es:
STEWART, DUNCAN J.

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 546 937 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

Terapia génica basada en fibroblastos y células endoteliales para el sistema pulmonar

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a tratamientos médicos y a composiciones y procedimientos útiles en los mismos. Más específicamente, se refiere a sistemas de transferencia génica basados en células para la administración al sistema pulmonar de un paciente mamífero. Por consiguiente, la invención se refiere al uso de células de mamíferos transfectadas viables, seleccionadas de fibroblastos y células endoteliales, conteniendo dichas células de mamíferos transfectadas al menos un transgen expresable que codifica un factor angiogénico o vasoactivo para la preparación de una composición farmacéutica para aliviar un trastorno pulmonar en un paciente o síntomas del mismo, en donde
10 dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar de un paciente mamífero.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La transferencia génica basada en células es una técnica conocida, aunque relativamente nueva y experimental, para llevar a cabo una terapia génica en un paciente. En este proceso, las secuencias de ADN que contienen los genes, que se desean introducir en el cuerpo del paciente (los transgenes) se preparan extracelularmente, p. ej.,
15 utilizando la escisión enzimática y la subsiguiente recombinación de ADN con secuencias de ADN de inserto. Células de mamíferos tales como las propias células del paciente se cultivan entonces in vitro y se tratan de manera que recojan el transgen en una forma expresable. Los transgenes pueden ser extraños para la célula de mamífero, estando ya presentes en la célula copias adicionales de genes para aumentar la cantidad de producto de expresión del gen o copias de genes normales que pueden ser defectuosas o estar ausentes en un paciente particular. A
20 continuación, las células que contienen el transgen se introducen en el paciente, de modo que el gen puede expresar los productos génicos requeridos en el cuerpo, con fines terapéuticos. La recogida del gen extraño por parte de las células en cultivo puede llevarse a cabo mediante técnicas de ingeniería genética, p. ej., haciendo que la transfección de las células con un virus que contiene el ADN del gen a ser transferido mediante lipofección, por electroporación o por otros medios aceptados para obtener células transfectadas. Esto va seguido a veces de un
25 cultivo selectivo de las células que han recogido con éxito el transgen en una forma expresable, de modo que la administración de las células al paciente puede ser limitada a las células transfectadas que expresan el transgen. En otros casos, se administran todas las células sometidas al proceso de recogida.

En el pasado este procedimiento ha requerido la administración de las células que contienen el transgen directamente al órgano del cuerpo que requiere tratamiento con el producto de expresión del transgen. Por lo tanto,
30 las células transfectadas en un medio apropiado han sido inyectadas directamente en el hígado o en el músculo que requiere el tratamiento, o a través de la circulación arterial sistémica para entrar en el órgano que requiere tratamiento.

Intentos previos para la introducción de células modificadas genéticamente de este tipo en la circulación arterial sistémica de un paciente se han encontrado con una serie de problemas. Por ejemplo, hay dificultad para asegurar una asimilación lo suficientemente alta de las células modificadas genéticamente por el órgano o parte del cuerpo específico en donde se requiere que el producto de expresión del gen para el mejor beneficio terapéutico. Esta falta de especificidad conduce a la administración de cantidades excesivas de las células modificadas genéticamente, que no es solamente ineficiente y costosa, sino que también aumenta los riesgos de efectos secundarios. Además,
35 muchas de las células trasplantadas, modificadas genéticamente, no sobreviven cuando se administra a la circulación arterial sistémica, ya que se encuentran con presiones arteriales relativamente altas. La infusión de materiales en partículas, incluyendo las células, a otras circulaciones sistémicas tales como el cerebro y el corazón, puede dar lugar a consecuencias adversas debido a la embolización, es decir, isquemia e incluso infarto.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo procedimiento de transferencia génica, basado en células, a mamíferos.

45 Es un objeto adicional y más específico de la invención proporcionar nuevos procedimientos de terapia génica basada en células que utilicen células fibroblastos dérmicos (u otras).

Es un objeto adicional de la invención proporcionar nuevas células tratadas mediante ingeniería genética que contiene transgenes que expresan factores angiogénicos.

SUMARIO DE LA INVENCION

50 La invención se refiere a las realizaciones según se definen en las reivindicaciones.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el sistema pulmonar de un mamífero, incluyendo un ser humano, ofrece medios potencialmente atractivos de introducir en el cuerpo células genéticamente alteradas, para fines de terapia génica, es decir, la transferencia génica basada en células, utilizando fibroblastos o células endoteliales del paciente como los soportes de los transgenes. El sistema pulmonar tiene un cierto número de características únicas de que le hacen particularmente adecuado para la transferencia génica basada en células. Por lo tanto, una presión arterial baja y una alta superficie específica con una cizalladura relativamente baja en la micro-circulación de los pulmones aumentan las posibilidades de supervivencia de las células trasplantadas. Una alta oxigenación en la micro-circulación del pulmón ventilado también mejora la viabilidad de las células trasplantadas.

Además de ello, la circulación pulmonar funciona como un filtro natural, y es capaz de retener las células infundidas con eficiencia y eficacia. Además, el pulmón tiene una doble circulación (arterial pulmonar y bronquial). Esto es en contraposición a otras circulaciones sistémicas tales como el cerebro y el corazón, en donde la infusión de materiales en partículas tales como células podría conducir a las consecuencias adversas mencionadas anteriormente. El pulmón presenta un sistema vascular masivo. La alta superficie específica del endotelio pulmonar permite la migración de las células trasplantadas atrapados en la micro-circulación a través de la capa endotelial para establecer su residencia dentro del espacio perivascular.

La circulación pulmonar, a diferencia de cualquier otra circulación en el cuerpo, recibe todo el gasto del corazón. Por consiguiente, ofrece la mayor oportunidad para liberar un producto génico a la circulación. Esta propiedad distinta del pulmón es particularmente útil para la terapia génica pulmonar y para el tratamiento de trastornos sistémicos, así como un trastorno pulmonar.

Se cree que las células transfectadas quedan alojadas en las pequeñas regiones de transición arterial-capilar del sistema de circulación pulmonar, después de la simple inyección intravenosa de las células transfectadas al paciente. Los productos administrados por vía intravenosa se mueven con la circulación venosa hacia el lado derecho del corazón y luego a los pulmones. Las células transfectadas, administradas de acuerdo con la invención, parecen alojarse en las pequeñas regiones de transición arteriolar-capilar del sistema circulatorio de los pulmones, y luego transmigran del espacio intraluminal al espacio perivascular, desde donde suministran productos de expresión de los transgenes a los pulmones, haciendo que el procedimiento de la presente invención sea especialmente aplicable al tratamiento de trastornos pulmonares. Algunos factores, especialmente factores estables, pueden ser secretados a la circulación general para el tratamiento de trastornos de otros órganos del cuerpo.

Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto descrito en esta memoria, se proporciona un procedimiento para llevar a cabo una terapia génica en un paciente mamífero, que comprende administrar al sistema pulmonar del paciente, células de mamífero genéticamente modificadas, seleccionadas de fibroblastos y células endoteliales, conteniendo dichas células al menos un transgen expresable que es capaz de producir al menos un producto génico en la circulación pulmonar después de la administración a la misma.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan células de mamíferos genéticamente modificadas, seleccionados de fibroblastos, células endoteliales y células progenitoras, conteniendo dichas células al menos un transgen expresable que codifica un factor terapéutico.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona el uso en la preparación de un medicamento para la administración a un paciente mamífero para aliviar los síntomas de un trastorno, de células de mamífero transfectadas, viables, seleccionadas de fibroblastos y células endoteliales, conteniendo dichas células transfectadas de mamífero al menos un transgen expresable que codifica un factor terapéutico. Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de células de mamífero genéticamente modificadas ex vivo, seleccionadas de fibroblastos dérmicos y células endoteliales, que contienen al menos un transgen expresable, que es capaz de expresar al menos un producto génico en la circulación pulmonar después de la administración a la misma, siendo dicho transgen uno que codifica un factor angiogénico, óxido nítrico sintasa, una lipoproteína, una sustancia vasoactiva, un antioxidante, un agente depurador de radicales libres, un receptor de citoquina soluble, una molécula de adhesión soluble, un receptor soluble para un virus o una citoquina, o el gen de la fibrosis quística para la preparación de una composición farmacéutica para llevar a cabo una terapia génica en un paciente mamífero, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar del paciente mamífero. Además, la presente invención proporciona el uso de células fibroblastos dérmicos modificadas genéticamente ex vivo que contienen un transgen expresable que codifica un factor angiogénico para la preparación de una composición farmacéutica que comprende células tratadas mediante ingeniería genética, para aliviar los síntomas de la hipertensión pulmonar en un paciente mamífero que padece la misma, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar del paciente mamífero. Además de ello, la presente invención se refiere al uso de fibroblastos de mamífero transfectados, viables, que contienen al menos un transgen de la fibrosis quística expresable, para la preparación de una composición farmacéutica para aliviar un trastorno pulmonar o síntomas del mismo en un paciente, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar de un paciente mamífero. En esta memoria se proporciona el uso de fibroblastos de mamífero genéticamente modificados ex vivo que contienen al menos un transgen de la fibrosis quística expresable, que es

capaz de expresar al menos un producto génico en el pulmón después de la administración al mismo, para la preparación de una composición farmacéutica para llevar a cabo una terapia génica en un paciente mamífero, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar del paciente mamífero.

- 5 Aún otro aspecto de la presente invención es un procedimiento de preparar modificaciones genéticas de células de mamífero seleccionadas de fibroblastos y células endoteliales, que comprende transfectar dichas células de mamífero con al menos un gen que codifica un factor terapéutico, para producir células transfectadas capaces de expresar dicho factor terapéutico in vivo.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

- 10 En los procedimientos y productos de la presente invención se puede utilizar una amplia variedad de transgenes que codifican factores terapéuticos. Mientras que el tratamiento de trastornos del sistema pulmonar es un foco principal de la invención, ésta no se limita a tratamientos de este tipo. Factores terapéuticos expresadas por los transgenes y suministrados por la circulación de otros órganos del cuerpo aguas abajo de los pulmones están dentro del alcance de esta invención. Se pueden utilizar transgenes que expresan factores terapéuticos tales como el Factor VIII para el
15 tratamiento de hemofilia clásica y otros factores de coagulación para el tratamiento de diversos trastornos de la coagulación. Otros ejemplos incluyen:

- transgenes que expresan hormonas, por ejemplo la hormona del crecimiento para el tratamiento de la disfunción hipopituitaria, insulina, hormona estimulante del tiroides (TSH) para el tratamiento del hipotiroidismo tras insuficiencia pituitaria, y otras hormonas;
- 20 transgenes que expresan lipoproteínas beneficiosas tales como Apo 1 y otras proteínas/enzimas que participan en el metabolismo de lípidos tales como la lipoproteína lipasa;
- transgenes que expresan prostaciclina y otras sustancias vasoactivas;
- transgenes que expresan antioxidantes y depuradores de radicales libres;
- transgenes que expresan receptores de citoquinas solubles para neutralizar las acciones de los niveles dañinos de mediadores inmunes, por ejemplo receptor soluble de TNF α , o antagonistas de los receptores
25 de citoquinas, por ejemplo IL1ra;
- transgenes que expresan moléculas de adhesión solubles, por ejemplo ICAM-1, para interrumpir los procesos de adhesión celular patológicos tales como los que se producen en enfermedades inflamatorias;
- transgenes que expresan receptores solubles para virus para inhibir la infección de las células, p. ej., CD4, CXCR4, CCR5 para el VIH;
- 30 transgenes que expresan citoquinas, por ejemplo IL-2, para activar respuestas inmunes para combatir infecciones;

el gen de la fibrosis quística, como transgen.

Las células transfectadas alojadas en el pulmón y que contienen transgenes que expresan factores de este tipo y otros productos actuarán como una fuente sistémica del factor apropiado.

- 35 Un aspecto preferido de la presente invención es el tratamiento de la hipertensión pulmonar (PH). La hipertensión pulmonar primaria (PPH) y otras causas de PH están asociadas con anomalías graves en la función endotelial, que probablemente juegan un papel crítico en su patogénesis. El factor vasodilatador, anti-trombótico y anti-proliferativo, óxido nítrico (NO) han demostrado disminuir las presiones pulmonares en situaciones tanto experimentales como clínicas. Sin embargo, métodos basados en virus a largo plazo pueden provocar una inflamación local significativa.
40 Otros intentos previos para el tratamiento de la PPH han implicado el uso de prostaciclina, utilizando la administración continua, pero esto es un proceso difícil y costoso que puede dar lugar a efectos secundarios.

- La presente invención proporciona, a partir de este segundo aspecto preferido, el uso de células fibroblastos de mamífero transformadas de la dermis o de otros orígenes, incluyendo dichas células transfectadas al menos un transgen expresable que codifica un factor angiogénico para la liberación del mismo en la circulación pulmonar, para
45 la preparación de una composición farmacéutica para aliviar los síntomas de PPH (y otras causas de PH), en donde la composición farmacéutica se ha de administrar al sistema pulmonar de un paciente.

- Ejemplos específicos de factores angiogénicos útiles en este aspecto preferido de la presente invención incluyen óxido nítrico sintasa (NOS); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en todas sus diversas formas conocidas, es decir, VEGF165 que es el más común y se prefiere para su uso aquí, VEGF205, VEGF189, VEGF121, VEGFB y VEGFC (a los que se alude colectivamente en esta memoria como VEGF); factor de crecimiento de
50 fibroblastos (FGF, de carácter ácido y básico), angiopoyetina-1 y otras angiopoyetinas, factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento hepático (factor de dispersión) y el factor inducible por hipoxia (HIF). Secuencias de ADN que constituyen los genes para estos factores angiogénicos son conocidas, y se pueden preparar por los métodos estándares de tecnologías de ADN recombinante (por ejemplo, escisión enzimática y

recombinación de ADN), y se introducen en células de mamífero, en forma expresable, mediante técnicas estándares de ingeniería genética tales como las mencionadas anteriormente (transfección viral, electroporación, lipofección, uso de proteínas policationicas, etc.). VEGF es el factor angiogénico preferido a causa de la mayor experiencia con este factor y su nivel de expresión efectiva en la práctica.

5 Previamente se han propuesto factores angiogénicos tales como los arriba mencionados para su uso como sustancias terapéuticas en el tratamiento de la enfermedad vascular. No se puede predecir a partir de este trabajo, sin embargo, que factores angiogénicos de este tipo también fuesen útiles en el tratamiento de la hipertensión pulmonar. Aunque no se pretende que el alcance de la presente invención deba limitarse a cualquier teoría o modo de operación particular, parece que los factores de crecimiento angiogénicos también pueden tener propiedades, además de su capacidad para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estas otras propiedades aparentemente incluyen la capacidad de aumentar la producción de óxido nítrico y la actividad, y/o disminuir la producción de endotelina-1, en la circulación pulmonar, con el fin de mejorar el equilibrio de la producción de la célula pulmonar de óxido nítrico o endotelina-1.

15 En la preparación de células para la transfección y la subsiguiente introducción en el sistema pulmonar de un paciente, se prefiere comenzar con fibroblastos dérmicos o células endoteliales obtenidos de receptor final del tratamiento de transferencia génica basado en células de la presente invención. Fibroblastos dérmicos se pueden obtener de forma simple y fácil a partir de capas de piel externas del paciente, preparadas para el cultivo in vitro mediante técnicas estándares. Las células endoteliales se recogen del receptor final, p. ej., por separación de una vena safena, y cultivo de las células endoteliales. Los métodos de cultivo son técnicas estándares de cultivo con precauciones especiales para el cultivo de células humanas con la intención de la re-implantación.

25 Se prefiere ampliamente, de acuerdo con la presente invención, utilizar fibroblastos dérmicos del paciente como células para la transferencia génica. Teniendo en cuenta el hecho de que la elección lógica de los tipos de células que haría un experto en la técnica sería un tipo de célula que se encuentra de forma natural en el sistema pulmonar del paciente, tal como células de la musculatura lisa, el uso de fibroblastos es contrario a la intuición. Sorprendentemente, se ha encontrado que los fibroblastos son eminentemente adecuados para este trabajo, exhibiendo ventajas significativas e inesperadas frente a células tales como las células de la musculatura lisa. Resulta que son más fáciles de desarrollo en cultivo, y más fáciles de transfectar con un transgen, dada la adecuada selección en la técnica. Proporcionan una mayor proporción de transfectantes, y un mayor grado de expresión de los factores angiogénicos in vivo, después de la introducción en el sistema pulmonar del paciente. No se ha materializado el mayor riesgo anticipado con los fibroblastos de posiblemente provocar una fibrosis en el sistema pulmonar, en comparación con las células de la musculatura lisa.

35 La transferencia génica somática in vitro a las células receptoras, es decir, la ingeniería genética, se realiza por métodos estándares y comercialmente disponibles para lograr la transferencia génica tal como se esboza anteriormente. Preferiblemente, el método incluye el uso de proteínas policationicas (p. ej., SUPERFECT*) o lipofección (p. ej., mediante el uso de GENEFECTOR), agentes comercialmente disponibles y que potencian la transferencia génica. Sin embargo, se pueden emplear otros métodos además de la lipofección y el uso de proteínas policationicas tales como electroporación, métodos virales de transferencia génica, incluyendo adenovirus y retrovirus. Estos métodos y técnicas son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se adaptan fácilmente para su uso en el procedimiento de la presente invención. La lipofección es la técnica más preferida, para su uso con células huésped de fibroblastos dérmicos.

45 La re-introducción de las células tratadas mediante ingeniería genética en la circulación pulmonar se puede lograr mediante la infusión de las células ya sea en una vena periférica o una vena central, desde donde se desplazan con la circulación al sistema pulmonar tal como se describió previamente, y quedan alojadas en las arteriolas más pequeñas del lecho vascular de los pulmones. También se puede adoptar la inyección directa en la circulación pulmonar, aunque esto es menos conveniente. La infusión se puede hacer ya sea en forma de bolo, es decir, inyección de todas las células durante un corto período de tiempo, o puede conseguirse mediante una infusión continua de pequeños números de células durante un largo período de tiempo, o, alternativamente, mediante la administración de bolos limitados en tamaño en varias ocasiones a lo largo de un período de tiempo determinado.

50 Mientras que las células transfectadas por sí mismas quedan en gran parte o totalmente retenidas en la circulación pulmonar, y especialmente en las arteriolas de los pulmones del paciente, los productos de expresión de los transgenes de las mismas no están restringidos de esta manera. Pueden ser expresadas y secretadas de las células transfectadas, y se desplazan a través de la circulación normal del paciente a otros órganos del cuerpo, aguas abajo, en donde pueden ejercer un efecto terapéutico. Por lo tanto, mientras que un uso preferido del procedimiento de la invención se encuentra en el tratamiento de trastornos pulmonares, dado que los productos de expresión contactan inicialmente con el sistema pulmonar del paciente, no se limita a este tipo de tratamientos. Los transfectantes pueden contener transgenes que expresan productos diseñados para el tratamiento de otros órganos del cuerpo del paciente. Productos de este tipo expresados en el sistema pulmonar fijarán como objetivo los otros órganos predeterminados y serán suministrados a los mismos por el sistema de circulación natural del paciente.

La invención se describe adicionalmente con fines ilustrativos, en los siguientes Ejemplos específicos, no limitantes.

EJEMPLO 1 – CULTIVO POR EXPLANTE DE FIBROBLASTOS DE LA PIEL

Se obtuvieron ratas Fisher 344 (Charles River Co.) de 21 días de edad y se sacrificaron por sobredosis con ketamina y xilazina. El pelo se afeitó cuidadosamente y la piel de la espalda se escindió y se transfirió inmediatamente a una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 2% de penicilamina y estreptomicina (Gibco BRL, Burlington, Ontario). La epidermis y la grasa profunda y el tejido conjuntivo se retiraron utilizando un bisturí. El tejido dérmico se cortó en trozos cuadrados de aproximadamente 4 milímetros que se colocaron sobre placas de cultivo tisular (Falcon, Becton Dickinson Canada, Mississauga, Ontario) recubiertas con fibronectina (Sigma Chemical Co., Mississauga, Ontario) individuales. Los explantes se cultivaron después en medio Eagle modificado por Dulbecco con suero de ternero fetal (FCS) al 20% y 2% de penicilamina y estreptomicina (todos de Gibco BRL) en un entorno humidificado con 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37°C, cambiando los medios cada dos días. Los explantes se hicieron pasar utilizando tripsina al 0,05%/EDTA (Gibco BRL) una vez, se podían ver claramente muchas células delgadas, en forma de huso, creciendo a partir del explante dérmico y se retiró el tejido explantado restante. Las células se cultivaron después en DMEM con FCS al 20% y 2% de penicilamina y estreptomicina hasta que se utilizaron en experimentos adicionales.

Se verificó la pureza de las células en cuanto a tipo efectivo, utilizando anticuerpos y técnicas de tinción estándares, para determinar el número aproximado de células disponibles y eficaces de linaje de fibroblastos.

EJEMPLO 2 – MARCAJE DE CÉLULAS FLUORESCENTES

Células entre el quinto y noveno pasajes se cultivaron hasta un 80% de confluencia y luego se marcaron con el fluoróforo, rodamina-trimetil-clorometilo (CMTMR, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon). CMTMR proporciona un método muy preciso de detectar células marcadas ex vivo, dado que la molécula se somete a esterificación irreversible y glucuronidación después del paso al citoplasma de una célula y con ello genera un producto final impermeable para la membrana. Este fluoróforo activo es, por lo tanto, incapaz de difundir desde la célula original marcada en células o estructuras adyacentes, y puede ser detectado in vivo durante varios meses, según el fabricante. La sonda fluorescente se preparó disolviendo el producto liofilizado en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración 10 milimolar. Esta disolución se almacenó a 20 grados C y se diluyó a una concentración final 25 micromolar en DMEM libre de suero inmediatamente antes del uso. Las células se expusieron al agente de marcado durante 45 minutos, y luego se lavaron con PE S dos veces y se reemplazaron los medios regulares (DMEM con FCS al 10% y 2% de penicilina y estreptomicina). Las células se cultivaron durante la noche y se recogieron 24 horas más tarde para la inyección en la vena yugular interna de ratas Fisher 344 receptoras.

También se realizó una serie de experimentos in vitro sembrando las células en portaobjetos e incubándolas con el fluoróforo para determinar la calidad y la duración de la fluorescencia a lo largo del tiempo. Inmediatamente después de la incubación con el fluoróforo, CMTMR, a una concentración 25 micromolar, se encontró que el 100% de las células cultivadas tenía una fluorescencia intensa cuando se examinan bajo un filtro de rodamina. Las células también se examinaron 48 horas y 7 días después del marcaje, y pese a las numerosas divisiones celulares, el 100% de las células presentes en el portaobjetos continuaron con una fluorescencia brillante (datos no mostrados).

EJEMPLO 3 – TRANSFECCIÓN CELULAR EX VIVO CON EL PLÁSMIDO CMV-βGAL

El vector CMV-βGal (Clontech Inc., Palo Alto, California), que contiene el gen de la beta-galactosidasa bajo el control de la secuencia de potenciador/promotor de citomegalovirus se utilizó como un gen informador para seguir el curso de la expresión del transgen in vivo. Los fibroblastos se cultivaron hasta un 70 a 80% de confluencia. Se determinó que la relación óptima de liposoma a ADN era 6 µg de liposoma / 1 µg de ADN. Las células se lavaron con medio DMEM (sin aditivos) y a cada una de las placas de 100 mm se añadieron 6,4 ml de DMEM. 200 µl de Genefector (Venova Inc., Pablo Beach Fla) se diluyeron en 0,8 ml de DMEM y se mezclaron con 16 µg de ADN (CMV-βgal) también diluidos en 0,8 ml de DMEM. Después se añadió gota a gota la disolución de liposomas sobre toda la superficie de la placa, que se agitó suavemente y se incubó a 30°C durante ocho horas. Este método se utilizó para evitar el uso de vectores virales y para obtener simultáneamente eficacias de transfección in vitro significativas. El producto Genefector es una preparación de liposomas optimizada. Este complejo Genefector-ADN interactúa entonces con la superficie celular y es transportado al citoplasma, después de lo cual el ADN del plásmido puede trasladarse al núcleo.

A continuación, el medio de transfección fue reemplazado por FBS al 20%, con 2% de penicilina / estreptomicina en medios M199 y se incubó durante 24 a 48 horas. Este método dio como resultado eficacias de transfección entre 40 y 60%.

EJEMPLO 4 - CIRUGÍA DE LOS ANIMALES Y DETECCIÓN DE CÉLULAS MARCADAS DE MODO FLUORESCENTE-EN TEJIDO

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales del Hospital St. Michael, Toronto, Canadá. Ratas Fisher 344 (Charles River Co., St. Constant, Quebec) de seis semanas de edad se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de xilazina (4,6 miligramos/kilogramo) y ketamina (70 miligramos/kilogramo), y se rasuró la zona cervical y se limpió con yodo y etanol. Se practicó una incisión cervical media con un bisturí y se identificaron las venas yugulares interna, externa y común derechas. Un tubo de plástico de 0,02 milímetros de diámetro externo se conectó a una aguja de calibre 23 y se inundó con solución salina estéril (Baxter). Por lo tanto, el tubo se utilizó a continuación para canular la vena yugular externa y se introdujo aproximadamente 5 centímetros en la vena a lo que se estimó que era el nivel de la vena cava superior, y se utilizó un rápido retorno de la sangre venosa para confirmar la ubicación del catéter.

Para los experimentos para determinar el transcurso del tiempo de la supervivencia de las células y la expresión del transgen en el pulmón, células fibroblastos dérmicos que habían sido marcadas con el fluoróforo CMTMR, o transfectadas con el vector de plásmido CMV-βGal, se tripsinizaron y se centrifugaron a 850 rpm durante 5 minutos. El medio en exceso se retiró y el sedimento de células se resuspendió en un volumen total de 2 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación, se tomó una parte alícuota de 50 microlitros de estas células resuspendidas y se contó en una cuadrícula de hemocitómetro para determinar el número total de células presentes por mililitro de PBS. Después, la disolución se dividió en partes alícuotas de 1 mililitro de aproximadamente 500.000 células y se transfirió de una manera estéril a la instalación para el cuidado de los animales. Estas células se resuspendieron luego mediante agitación suave y se inyectaron en los animales a través del catéter de la vena yugular externa. La disolución se infundió lentamente durante uno a dos minutos y luego el catéter se lavó de nuevo con solución salina estéril antes de la extracción. La vena yugular externa se ligó, la incisión se cerró con suturas 3-0 absorbibles interrumpidas, y se permitió que los animales se recuperaran de la cirugía.

A los 30 minutos o 24 horas después del suministro de células marcadas ($n = 3$ para cada instante) o de la inyección de solución salina (control negativo, $n = 3$), los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico, y se abrió la cavidad torácica. La arteria pulmonar y la tráquea se lavaron con solución salina, y se extirparon los pulmones derecho e izquierdo. Rebanadas transversales se tomaron de los segmentos basal, medial y apical de los dos pulmones, y se obtuvieron muestras del hígado, bazo, riñón y músculo gastrocnemio. Muestras de tejido fueron embebidas incorporados en compuesto OCT (Sakura Finetek U.S.A. Inc. Torrance, California) en face, y luego se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de diez micras a partir de estos bloques congelados en 2 niveles diferentes de tejidos separados por al menos 200 micras, y estas secciones fueron examinadas bajo un microscopio de fluorescencia utilizando un filtro de rodamina, y se contó el número de células intensamente fluorescentes en cada una de las muestras de tejido en face.

Para proporcionar una estimación del número total de células marcadas presentes dentro de todo el pulmón, se hizo un recuento del número total de células fluorescentes en cada una de las secciones de pulmón y se promedió sobre el número de secciones contadas. Podría hacerse una aproximación matemática del número total de células presentes dentro del pulmón utilizando la regla de Simpson para el volumen de un cono truncado. Esta ecuación basa el volumen total de un cono en las áreas relativas de 3 secciones diferentes, tal que:

$$\text{volumen} = [(\text{área}^{\text{sección basal}} + \text{área}^{\text{sección media}} \times \text{altura del pulmón})/3 + [\text{área}^{\text{sección apical}}/2 \times \text{altura del pulmón}]/3 + \Lambda/6 \times (\text{altura c f del pulmón}/3)^3]$$

La altura del pulmón se midió después de la recogida de órganos, y el área de cada una de las secciones transversales se determinó mediante planimetría. El número medio de células presentes en las tres secciones, dividido por el volumen total de estas secciones proporcionó una estimación del número de células por unidad de volumen. Al multiplicar este número por el volumen total del pulmón se podría obtener una estimación del número total de células en el pulmón. Para corregir la aparición de una sola célula en múltiples secciones de pulmón adyacentes, a las ratas se les inyectaron 500.000 células marcadas con CMTMR y se las sacrificó de forma aguda. Se prepararon los pulmones, se recogieron y se embebieron de la forma habitual, y veinte secciones en serie, cada una de 5 micras de grosor, fueron tomadas a través del parénquima pulmonar. Cada una de las secciones fue examinada utilizando un filtro de rodamina y se identificaron distintas células individuales y se determinó su presencia en secciones adyacentes. Se contó el número de secciones de 5 micras en el que se podía identificar una sola célula y se obtuvieron las dimensiones medias de una célula del músculo liso de la arteria pulmonar in vivo. El diámetro medio observado fue de $16,4 \pm 1,22$ micras. Por lo tanto, el número total de células, calculado utilizando la fórmula de Simpson se multiplicó por 0,61 para corregir la presencia de 1 célula, en promedio, en cada una de diez secciones de 1,64 micras.

30 minutos después del suministro de los fibroblastos, se identificaron 373 ± 36 células marcadas con CMTMR/cm² dentro de las secciones de los pulmones, lo que representaba aproximadamente el 60% del número total de células inyectadas. Después de 24 horas sólo hubo una ligera disminución en las células marcadas con CMTMR a 317 ± 4

cm² u 85% del valor de 30 minutos, lo que indica una excelente supervivencia de las células trasplantadas. También se evalúa la supervivencia de células marcadas con CMTMR en instantes posteriores de 2, 4, 7 y 14 días y 1, 2, 3 y 6 meses para establecer el transcurso del tiempo de supervivencia de células trasplantadas en los pulmones de ratas receptoras. No se observaron señales brillantemente fluorescentes en ninguno de los pulmones a los que se inyectaron células de la musculatura lisa no marcadas.

En el tejido del bazo, hígado y músculo esquelético no se identificaron señales fluorescentes. En 2 de 4 riñones examinados, podían identificarse señales fluorescentes irregulares. Ninguna de éstas parecía ajustarse a la forma de una célula entera, y se presumió que representan a las células que fueron cortadas o destruidas durante la inyección de células o poco después. Además, no se identificaron señales fluorescentes en órgano alguno fuera del pulmón 7 días después de la inyección.

EJEMPLO 5 - DETECCIÓN DE EXPRESIÓN DE BETA-GALACTOSIDASA EN TEJIDO

En varios instantes después de la transferencia génica basada en células, se sacrificó a los animales y se les abrió el pecho. La arteria pulmonar se lava con solución salina y la tráquea se canula y se lava con 2% de paraformaldehído hasta que los pulmones están bien inflados. Se toman cortes transversales de los segmentos basal, medio y apical de los dos pulmones, y se obtienen muestras del hígado, bazo, riñón y músculo gastrocnemio de determinados animales. Las muestras se incuban en 2% de paraformaldehído con 0,2% de glutaraldehído durante 1 hora, y luego se enjuagan en PBS. El tejido se incubaba a continuación durante 18 horas a 37°C con una disolución de cromógeno que contiene 0,2% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal, Boehringer Mannheim, Laval, Quebec), ferrocianuro de potasio 5 milimolar (Sigma), ferricianuro de potasio 5 milimolar (Sigma) y cloruro de magnesio 2 milimolar (Sigma), todos disueltos en solución salina tamponada con fosfato. Las muestras se enjuagan luego en PBS, se embeben en compuesto OCT (Miles Laboratories), se cortan en secciones de 10 micras y se tiñen para contraste con rojo neutro.

Luego se examinan al microscopio secciones vistas, y se pueden estimar el número de células que se tiñen intensamente de azul. Dado que se utiliza una placa de células para la tinción in vitro para determinar la eficiencia de la transfección para cada una de las series de reacción, se puede hacer para cada animal una estimación del porcentaje de células que fueron transfectadas con el plásmido de gen informador pCMV-βGal. Utilizando esta información y el cálculo matemático descrito para aproximar el número de células T fluorescentes presentes, puede hacerse una estimación del número total de células transfectadas restantes en el momento del sacrificio de los animales.

En un cierto número de reacciones de transfección separadas utilizando el plásmido pCMV-βGal, se puede obtener una eficiencia media de la transfección del orden de 40 - 50% con los fibroblastos dérmicos in vitro. No se observa tinción alguna en cultivos transfectados simulados.

Tras la incubación con la disolución de cromógeno X-Gal, se puede observar una evidencia microscópica de la expresión transgénica basada en células a las 48 horas después de la inyección de células fibroblastos dérmicos transfectadas con pCMV-βGal en la vena yugular interna, observándose múltiples células que se tiñen de azul intenso a lo largo del pulmón, lo que representa al menos el 30% de las células transfectadas originales que fueron inyectadas. Al igual que con las células marcadas por fluorescencia, la mayoría de las células que expresan beta-galactosidasa parecen estar alojadas dentro de la microvasculatura distal del pulmón. No se detecta evidencia de expresión alguna de beta-galactosidasa en cualquiera de los pulmones de los animales a los que se inyectaron células de fibroblastos dérmicos no transfectadas. No se observa evidencia alguna de patología pulmonar, tal como se determina por la presencia de un infiltrado polimorfonuclear anormal o linfocítico, engrosamiento septal o destrucción alveolar.

EJEMPLO 6 - ESTUDIOS DE PREVENCIÓN DE MONOCROTALINA

Para determinar si la transferencia génica basada en células de VEGF₁₆₅ sería capaz de inhibir el desarrollo de la hipertensión pulmonar en un modelo animal de la enfermedad, se prepararon como se describe anteriormente fibroblastos dérmicos que habían sido transfectados con pVEGF o pcDNA 3.1 (un vector vacío). La secuencia codificadora de longitud completa de VEGF₁₆₅ se generó realizando una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa utilizando ARN total extraído de células de la musculatura lisa aórtica humana y los siguientes cebadores específicos para la secuencia siguiente: sentido 5' TCGGGCCTCCGAAACCATGA 3', antisentido 5' CCTGGTGAGAGATCTGGTTC 3'. Esto generó un fragmento de 649 pb que se clonó en el vector pGEM-T (Promega, Madison, Wisconsin) y se secuenció para confirmar la identidad. El fragmento fue clonado después en el vector de expresión pcDNA 3.1 en el sitio de restricción EcoR1, y la orientación correcta se determinó utilizando un digesto diferencial. El vector deficiente en inserto (pcDNA 3.1) se utilizó como un control para los experimentos de monocrotalina. Todo el ADN del plásmido se introdujo en una cepa JM 109 de *E. coli* a través del método de transformación por choque térmico, y las bacterias se cultivaron durante la noche en medio LB que contenía 100 microgramos/mililitro de ampicilina. El plásmido se purificó después utilizando un kit de purificación libre de

endotoxinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Endotoxin-Free Maxi Kit de Qiagen, Qiagen Inc., Mississauga, Ontario), la producción de ADN de plásmido con una relación A_{260}/A_{280} mayor que 1,75, y una concentración de al menos 1,0 microgramos/microlitro.

5 Fibroblastos dérmicos transfectados se tripsinizaron y se dividieron en partes alícuotas de 500.000 células. Ratas Fisher 344 de seis a ocho semanas de edad se anestesiaron después y se les inyectaron por vía subcutánea 80 miligramos/kilogramo de monocrotalina ($n = 13$) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin) sola, o con monocrotalina y, a través de un catéter en la vena yugular externa, 500.000 células transfectadas con pVEGF ($n = 5$) o pcDNA 3.1 ($n = 3$).

10 Monocrotalina es un alcaloide vegetal, un metabolito de la cual daña el endotelio pulmonar, proporcionando un modelo animal de hipertensión pulmonar.

15 La vena se ató, la incisión se cerró de una manera normal y a los animales se les permitió recuperarse. A los 28 días después de la inyección, los animales fueron re-anestesiados y se les volvió a insertar un catéter micropunta Millar a través de la vena yugular interna derecha en el ventrículo derecho. Se registró la presión sistólica del ventrículo derecho, y luego el catéter se insertó en la aorta ascendente y se registró la presión arterial sistémica. Los animales fueron entonces sacrificados y se les extirparon los corazones. Se determinaron las relaciones en peso (relación de RV / LV) ventricular derecha (RV) a ventricular izquierda más septal (LV) como un indicador de la respuesta hipertrófica a la hipertensión pulmonar prolongada. Los pulmones se lavaron a través de la arteria pulmonar con solución salina estéril tamponada con fosfato, y fueron insuflados suavemente con 2% de paraformaldehído a través de la tráquea. Segmentos pulmonares fueron entonces congelados repentinamente en nitrógeno líquido para posterior extracción de ARN, o se fijaron mediante inmersión en 2% de paraformaldehído para inclusión en parafina y el seccionamiento. Las presiones sistólicas ventriculares derecha y las relaciones RV/LV se compararon entre los grupos de pVEGF, pcDNA 3.1 y monocrotalina sola.

25 Se cuantificó ARN extraído de pulmones de ratas, y 5 microgramos de ARN total de cada uno de los animales se transcribieron inversamente utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney, y una parte alícuota del ADNc resultante fue amplificada con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores específicos para la secuencia: sentido 5' CGCTACTGGCTTATCGAAATTAAT ACGACTCAC 3', antisentido 5' GGCCTTGGTGAGGTTTGATCCGCATAAT 3', durante 30 ciclos con una temperatura de reasociación de 65°C. Diez microlitros de una reacción de cincuenta microlitros se ejecutaron en un gel de agarosa al 1,5%. El cebador de aguas arriba se encuentra dentro del sitio del cebador T7 del vector pcDNA 3.1 y, por lo tanto, no debería reasociarse con cualquier transcrito de ARN endógeno, y el cebador aguas abajo está localizado dentro del exón 4 de la región codificadora de VEGF. Por lo tanto, la reacción PCR con éxito sería amplificar selectivamente solamente ARN VEGF exógeno. Para controlar la cantidad de ARN y la calidad de una segunda parte alícuota de la misma reacción de transcripción inversa se amplificó con los siguientes cebadores para el gen GAPDH expresado constitutivamente: sentido 5' CTCTAAGGCTGTGGGCAAGGTCAT 3', antisentido 5' GAGATCCACCCCTGTTGCTGTA 3'. Esta reacción se llevó a cabo durante 25 ciclos con una temperatura de reasociación de 58°C. Diez microlitros de una reacción de cincuenta microlitros se ejecutaron en un gel de agarosa al 1,5%, y se compararon con la señal obtenida de la PCR de VEGF.

40 Pulmones de ratas fijados con paraformaldehído se cortaron perpendicularmente a su eje mayor y se embebieron en parafina en face. Se obtuvieron secciones y se tiñeron utilizando la técnica de la elastina de von Giessen (EVG). Las secciones fueron evaluadas por un observador ciego quien midió todos los recipientes con medios perceptibles dentro de cada una de las secciones transversales bajo 40 X aumentos, utilizando el sistema de formación de imágenes por ordenador C⁺. Se determinó el área medial de cada uno de los recipientes y se obtuvo una media para cada uno de los tamaños de recipiente de 0 a 30, 30 a 60, 60 a 90, 90 a 120, y mayor que 120 micrómetros de diámetro externo, para cada uno de los animales. Se compararon las medias de cada uno de los tamaños entre los grupos de pVEGF, pcDNA 3.1 y monocrotalina sola.

50 Cuatro semanas después de la inyección de monocrotalina ($n = 11$) sola, se aumentó la presión sistólica del ventrículo derecho a 48 ± 2 mm Hg, y no existía mejora en los animales que recibieron las células transfectadas con pcDNA 3.1 ($n = 3$) con el RVSP media remanente de 48 ± 2 mm Hg. Sin embargo, en los animales tratados con los fibroblastos transfectados con pVEGF ($n = 5$) la presión del RV se redujo significativamente a 32 ± 2 mm Hg ($p < 0,0001$).

55 Como era de esperar de la hipertensión pulmonar de larga duración, la relación RV/LV se elevó significativamente desde el punto de referencia después de la inyección de monocrotalina ($n = 13$) para 0,345 $\pm$ 0,015 y era muy similar en el grupo transfectado con pcDNA 3.1 ($n = 3$). Después de la transferencia génica de VEGF ($n = 5$) la relación era significativamente menor que el grupo transfectado con pcDNA 3.1. No se observó diferencia alguna en la presión aórtica. Cuatro semanas después de la inyección de la toxina endotelial pulmonar monocrotalina y células transfectadas, la relación LV/RV es significativamente elevada en el grupo de MCT y en el grupo de 3.1 pcDNA, pero era menor en los animales transfectados con pVEGF.

El análisis morfométrico de las secciones de tejido reveló que en los grupos tratados tanto con monocrotalina sola y como con pcDNA 3.1, el área medial para los grupos de los vasos de 0 a 30, 30 a 60 y 60 a 90 micras aumentaba significativamente en comparación con los animales tratados con VEGF. Resultados similares se observaron en animales transfectados con el vector de control, pcDNA 3.1. Después de la transferencia génica basada en células de VEGF, se observó una disminución significativa en el espesor y área mediales en vasos de 0 a 90 micras de diámetro externo.

Utilizando los cebadores basados en plásmidos, el transcrito de VEGF exógeno se amplificó selectivamente utilizando la reacción en cadena de polimerasa. La calidad del ARN y la carga se evaluaron mediante la amplificación del gen GAPDH constitutivo, que estaba constantemente presente en todas las muestras. Esto demostró que el ARN extraño estaba siendo transcrito 28 días después de la transferencia génica basada en células y que, potencialmente, la presencia del transcrito, y presumiblemente la proteína traducida, estaban causalmente relacionadas con la disminución de la RVSP en los animales tratados con VEGF.

La sangre tomada de los animales mediante punción del ventrículo izquierdo inmediatamente antes del sacrificio se analizó en cuanto al pH, la carga de oxígeno (pO₂), la carga de dióxido de carbono (pCO₂) y el % de saturación. Los resultados se dan más adelante.

DATOS ANÁLISIS DE LA SANGRE

Animales transfectados con VEGF/fibroblastos

	pH	pCO ₂	pO ₂	%de sat.
Media (de 5 animales)	7,374	51,2	78,3	86,58
Desviación estándar, SD	0,0502	5,699	17,89	9,867

Animales transfectados con pcDNA/fibroblastos

	pH	pCO ₂	pO ₂	%de sat
Media (de 3 animales)	7,35	58,333	60,8	74,4
SD	0,02	3,761	7,615	7,882

Estos resultados indican preliminarmente que la tensión arterial de O₂ y la saturación son mejores en el grupo transfectado con VEGF que en los animales que recibieron células cero-transfectadas. Esto es consistente con la mejora de la hemodinámica pulmonar y la morfología vascular pulmonar, y argumenta en contra de un desplazamiento significativo de derecha a izquierda como podría ocurrir en cortocircuitos arterial pulmonar a venosos.

La creación de la formación de "cortocircuitos" de nuevos pasajes entre las arterias y los capilares del sistema pulmonar, sin pasar por las venas y limitando así la absorción de oxígeno por la sangre, no se produce en grado problemático alguno, según indicaciones preliminares.

EJEMPLO 7 - ESTUDIOS DE INVERSIÓN DE MONOCROTALINA

Para determinar si la transferencia génica basada en células fibroblastos dérmicos de VEGF 165 sería capaz de invertir o prevenir el progreso de la hipertensión pulmonar establecida en un modelo animal de la enfermedad, a ratas Fisher 344 de seis a ocho semanas de edad se las inyectan subcutáneamente 80 miligramos/kilogramo de monocrotalina. Catorce días después de la inyección de monocrotalina los animales son anestesiados y se hace pasar un catéter Millar al ventrículo derecho y se registra la presión del RV. Células fibroblastos dérmicos transfectadas con pVEGF o pcDNA 3.1 se inyectan entonces en partes alícuotas de 500.000 células en la vena yugular externa, y se deja que los animales se recuperen. A los 28 días después de la inyección de monocrotalina y 14 días después de la transferencia génica basada en células, los animales son re-anestesiados, y un catéter micropunta Millar se reinserta a través de la vena yugular interna derecha en el ventrículo derecho. Se registra la presión sistólica del ventrículo derecho (RVSP), y el catéter se inserta entonces en la aorta ascendente y se registra la presión arterial sistémica. Los animales se sacrifican a continuación y se extirparon los corazones. Las relaciones RV/LV se determinan como un indicador de la respuesta hipertrófica a la hipertensión pulmonar de larga duración. Cuando las presiones sistólicas del ventrículo derecho y las relaciones RV/LV se comparan entre los grupos de pVEGF y pcDNA 3.1, se encontró, dos semanas después de la inyección de monocrotalina, la RVSP es elevada, y

en los animales que recibieron células transfectadas con pcDNA 3.1 la presión aumentó adicionalmente a 55,5 mm Hg a cuatro semanas después del suministro de monocrotalina. Sin embargo, en los animales tratados con pVEGF la RVSP sólo aumenta una pequeña cantidad. Cuatro semanas después de la inyección de la toxina pulmonar endotelial monocrotalina, los RVSP aumentan significativamente en el grupo de pcDNA 3.1, pero se reduce significativamente en los animales transfectados con pVEGF.

La relación RV/LV era significativamente elevada en el grupo de pcDNA, pero tras la transferencia génica de VEGF la relación se redujo significativamente. No se observa diferencia en la presión aórtica. Cuatro semanas después de la inyección de monocrotalina, la relación se incrementa adicionalmente en el grupo de pcDNA 3.1, pero disminuye significativamente en los animales transfectados con pVEGF.

DISCUSIÓN

La presente invención representa una evidencia de la transferencia génica no viral con éxito a la vasculatura pulmonar utilizando fibroblastos transfectados, y proporciona una demostración de la eficacia terapéutica potencial de una estrategia angiogénica en el tratamiento de PH utilizando este enfoque. Este método de suministro se asoció con un alto porcentaje de células que quedan retenidas dentro del pulmón a las 48 horas, tal como se determina tanto por la técnica de marcaje de fluorescencia como por los estudios de genes informadores utilizando beta-galactosidasa, y con una expresión génica moderada pero persistente a lo largo de 14 días. Estos resultados son más o menos paralelos a lo que previamente se ha demostrado con un método basado en virus del suministro de genes intravasculares a la vasculatura pulmonar (véase Schachtner, S.K., J.J. Roma, R.F. Hoyt, Jr., K.D. Newman, R. Virman, D.A. Dichek, 1995. In vivo adenovirus-mediated gene transfer via the pulmonary artery of rats. *Circ. Res.* 76:701-709; and Rodman, D.M., H. San, R. Simari, D. Stephan, F. Tanner, Z. Yang, G.J. Nabel, E.G. Nabel, 1997. In vivo gene delivery to the pulmonary circulation in rats: transgene distribution and vascular inflammatory response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16:640-649).

Sin embargo, la técnica basada en células proporcionada por la presente invención evita el uso de un constructo viral potencialmente inmunogénico, no se asoció con inflamación pulmonar o sistémica significativa alguna, y permite una expresión más selectiva del transgen dentro de la microvasculatura pulmonar y, en particular, la fijación como objetivo de la expresión del transgen localizada en la región pulmonar arteriolar distal, que es principalmente la responsable de la determinación de la resistencia vascular pulmonar y, por lo tanto, de la PH.

La presente invención aborda varias cuestiones claves relacionadas con la viabilidad de un enfoque de transferencia de genes basado en células para la circulación pulmonar, incluyendo la supervivencia de células tratadas mediante ingeniería genética y la selectividad de su localización y la expresión de los transgenes dentro de los pulmones. Las células implantadas quedaron retenidas de manera eficiente por los pulmones.

El hallazgo de que la mayoría de las células parecían estar alojadas dentro de las pequeñas arteriolas pulmonares es consistente con el papel fisiológico normal que juega el pulmón como un filtro anatómico y, por lo tanto, sería de esperar que partículas relativamente grandes tales como células resuspendidas queden alojadas dentro de la microvasculatura pulmonar. Sin embargo, esta 'fijación como objetivo' de las células al lecho vascular de resistencia pre-capilar de una manera altamente selectiva puede resultar muy útil en el tratamiento de determinados trastornos vasculares pulmonares. La sobre-expresión de un gen vasoactivo a nivel arteriolar distal podría proporcionar un efecto altamente localizado en una región vascular crítica en el control de la resistencia vascular pulmonar y podría amplificar las consecuencias biológicas de la transferencia génica. De hecho, la reducción localizada en RVSP observada en animales tratados con monocrotalina que recibieron células transfectadas con VEGF se produjo sin una disminución correspondiente en las presiones sistémicas, destacando la especificidad de este método de transfección. Este enfoque puede, por tanto, ofrecer ventajas significativas frente a otras estrategias de transferencia génica selectiva pulmonar tales como el suministro de genes endotraqueal, lo que resulta en la sobre-expresión predominantemente bronquial, o la transferencia génica vascular pulmonar basada en catéter, que produce una sobre-expresión macrovascular difusa y sistémica (véase Rodman, D.M., H. San, R. Simari, D. Stephan, F. Tanner, Z. Yang, G.J. Nabel, E.G. Nabel, 1997. In vivo gene delivery to the pulmonary circulation in rats: transgene distribution and vascular inflammatory response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16:640-649; and Nabel, E.G., Z. Yang, D. Muller, A.E. Chang, X. Gao, L. Huang, K.J. Cho, G.J. Nabel, 1994. Safety and toxicity of catheter gene delivery to the pulmonary vasculature in a patient with metastatic melanoma. *Hum. Gene Ther.* 5:1089-1094).

Este efecto significativo se produjo a pesar de una relativamente baja masa total de la transfección específica para órganos, y se debía probablemente al hecho de que las células transfectadas fueron fijadas como objetivo en base a su tamaño, a los vasos de resistencia pulmonar precapilar que juegan un papel crítico en el control de la presión pulmonar. Este método de transferencia génica vascular pulmonar puede tener ventajas frente a las técnicas existentes, minimizando la "carga" global de un transgen extraño que es suministrado al cuerpo y puede reducir con ello, en teoría, la incidencia de efectos secundarios no deseados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AN-GO-GEN INC.

<120> Terapia génica basada en células para el sistema pulmonar

<130> G1557 EP/1 s3

5 <140> EP07009031

<141> 23-09-1999

<160> 6

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

10 <211> 20

<212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> secuencia del cebador

15 <400> 1

tcgggcctcc gaaacatga 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia del cebador

<400> 2

cctggtgaga gatctggtc 20

25 <210> 3

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 546 937 T3

<220>
 <223> secuencia del cebador

 <400> 3

 cgctactggc ttatcgaaat taatacgact cac 33

 5 <210> 4

 <211> 28

 <212> ADN

 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> secuencia del cebador

 <400> 4

 ggcccttggtg aggtttgatc cgcataat 28

 <210> 5

 <211> 24

 15 <212> ADN

 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia del cebador

 <400> 5

 20 ctctaaggct gtgggcaagg tcat 24

 <210> 6

 <211> 24

 <212> ADN

 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> secuencia del cebador

 <400> 6

 gagatccacc accctgttgc tgta 24

REIVINDICACIONES

1. Uso de células de mamífero transfectadas, viables, seleccionadas de fibroblastos y células endoteliales, conteniendo dichas células de mamífero transfectadas al menos un transgen expresable que codifica un factor angiogénico o vasoactivo para la preparación de una composición farmacéutica para aliviar un trastorno pulmonar en un paciente o síntomas del mismo, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar de un paciente mamífero.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células de mamífero son fibroblastos dérmicos.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el factor angiogénico es óxido nítrico sintasa, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, angiopoyetina-1, factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento hepático (factor de dispersión) y factor inducible por hipoxia (HIF).
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el factor angiogénico es factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF.
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células de mamífero proceden del receptor final de las células transfectadas.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno pulmonar es hipertensión pulmonar.
7. Uso de células de mamífero genéticamente modificadas ex vivo, seleccionadas de fibroblastos dérmicos y células endoteliales, que contienen al menos un transgen expresable, que es capaz de expresar al menos un producto génico en la circulación pulmonar después de la administración a la misma, siendo dicho transgen uno que codifica un factor angiogénico, óxido nítrico sintasa, una lipoproteína, una sustancia vasoactiva, un antioxidante, un agente depurador de radicales libres, un receptor de citoquina soluble, una molécula de adhesión soluble, un receptor soluble para un virus o una citoquina, o el gen de la fibrosis quística para la preparación de una composición farmacéutica para llevar a cabo una terapia génica en un paciente mamífero, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar del paciente mamífero.
8. El uso de la reivindicación 7, en donde las células genéticamente modificadas son células fibroblastos dérmicos.
9. El uso de la reivindicación 7 u 8, en donde el transgen expresable es un gen que codifica un factor angiogénico.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el gen expresable es un gen que codifica un factor angiogénico seleccionado de óxido nítrico sintasa, un factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, angiopoyetina-1, factor de crecimiento transformante beta y factor de crecimiento hepático.
11. El uso de la reivindicación 10, en donde el factor angiogénico es factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF.
12. Uso de células fibroblastos dérmicos modificadas genéticamente ex vivo que contienen un transgen expresable que codifica un factor angiogénico para la preparación de una composición farmacéutica que comprende células tratadas mediante ingeniería genética, para aliviar los síntomas de la hipertensión pulmonar en un paciente mamífero que padece la misma, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar del paciente mamífero.
13. Uso de fibroblastos de mamífero transfectados, viables, que contienen al menos un transgen de la fibrosis quística expresable, para la preparación de una composición farmacéutica para aliviar un trastorno pulmonar o síntomas del mismo en un paciente, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar de un paciente mamífero.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde las células de mamífero proceden del receptor final de las células transfectadas.
15. Uso de fibroblastos de mamífero modificados genéticamente ex vivo que contienen al menos un transgen de la fibrosis quística expresable, que es capaz de expresar al menos un producto génico en el pulmón tras la administración al mismo, para la preparación de una composición farmacéutica para llevar a cabo una terapia génica en un paciente mamífero, en donde dicha composición farmacéutica se ha de administrar a la circulación pulmonar del paciente mamífero.