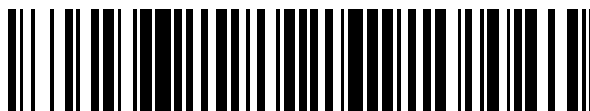


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 008**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016** **PCT/EP2016/054091**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016** **WO16135295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016** **E 16707696 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019** **EP 3262159**

54 Título: **Células madre mesenquimatosas modificadas genéticamente que expresan klotho**

30 Prioridad:

27.02.2015 EP 15156974

18.09.2015 EP 15185805

22.10.2015 EP 15191062

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

24.03.2020

73 Titular/es:

APCETH GMBH & CO. KG (100.0%)

Max-Lebsche-Platz 30

81377 München, DE

72 Inventor/es:

GÜNTHER, CHRISTINE;

STANGL, MANFRED y

HERMANN, FELIX

74 Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E

INVENCIONES, SLP

ES 2 750 008 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 mesenquimatosas modificadas genéticamente que expresan klotho

- 5 La invención se refiere a una célula madre mesenquimatosa (MSC, por sus siglas en inglés) modificada genéticamente, en la que dicha célula madre comprende un ácido nucleico exógeno que comprende una región que codifica Klotho unida operativamente a un promotor o una combinación de promotor/potenciador, en la que la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente presenta una expresión aumentada de Klotho en comparación con una célula madre mesenquimatosa no modificada. La invención se refiere al uso médico de dichas MSC para el tratamiento de cáncer, fibrosis de órganos, insuficiencia renal, patologías orgánicas relacionadas con la edad, arterioesclerosis, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson y/o esquizofrenia, o demencia, diabetes mellitus, sepsis, disfunción eréctil, enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunitarias.

15 Antecedentes de la invención

- Las células madre mesenquimatosas (MSC) son células de origen no hematopoyético que residen en la médula ósea y otros tejidos. Las MSC habitualmente se consideran células progenitoras adultas multipotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en un número limitado de linajes celulares, tales como osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Se han realizados estudios sobre el uso de MSC como entidad terapéutica basándose en esta capacidad de diferenciarse directamente en estos fenotipos de fase final, incluyendo el uso de MSC para promover o aumentar la reparación ósea y para la reparación de defectos del cartílago (Vilquin y Rosset, *Regenerative Medicine* 2006: 1,4, pág. 589, y Veronesi et al., *Stem Cells and Development* 2013; 22, pág. 181). El aislamiento y cultivo de MSC para varias indicaciones terapéuticas se ha descrito y representa una estrategia prometedora hacia el tratamiento de trastornos asociados con inflamación (por ejemplo, documento WO 2010/119039).

- Se sabe que las MSC muestran propiedades evasivas inmunitarias después de su administración a un paciente. Se ha demostrado que las MSC muestran un efecto inmunomodulador beneficioso en casos de trasplante de material donador alógeno (Le Blanc et al., *Lancet* 2004: 363, pág. 1439), reduciendo de este modo una alorreactividad potencialmente patógena y rechazo. Además, se sabe que las MSC muestran efectos antitumorigénicos, por ejemplo, contra sarcoma de Kaposi (Khakoo et al., *J Exp Med* 2006: 203, pág. 1235). El tratamiento con MSC también puede desempeñar una función terapéutica en la curación de heridas. El suministro terapéutico de MSC puede realizarse por inyección sistémica, seguida de migración dirigida de MSC a e injerto en sitios de lesión (Kidd et al., *Stem Cells* 2009: 27, pág. 2614). Aunque está claro que las MSC tienen un efecto regenerativo sobre tejido lesionado, su uso como vehículo de entrega para proteínas terapéuticas de interés aún no se ha explorado completamente.

- El gen de Klotho humana codifica una proteína transmembrana de tipo 1 de 1012 aminoácidos, que también puede expresarse como una forma secretada por corte y empalme alternativo. Ambas formas tienen actividad biológica incluyendo efectos reguladores sobre el metabolismo general. Klotho es una β -glucuronidasa (número de EC 3.2.1.31) capaz de hidrolizar β -glucurónidos esteroideos.

- La pérdida de Klotho en ratones da como resultado la aparición precoz de varios fenotipos patológicos que se asemejan al envejecimiento humano, incluyendo una esperanza de vida corta, infertilidad, arterioesclerosis/calcificación vascular, osteoporosis, atrofia de la piel, enfisema pulmonar, lesión renal aguda, enfermedad renal crónica, fibrosis renal, diabetes y cáncer (Kuro-o, M. et al. *Nature* 1997, 390, pág. 45). Por el contrario, se ha demostrado que la sobreexpresión de Klotho aumenta la esperanza de vida de los ratones (Kurosui, H. et al. *Science* 2005, 309, pág. 1829).

- Klotho se detectó en 1997 por Makoto Kuro-o, quien descubrió que los ratones a los que les faltaba Klotho presentaban síndromes que se asemejaban al envejecimiento humano, incluyendo una esperanza de vida corta. Se ha demostrado que Klotho está implicada en la supresión de varios fenotipos de envejecimiento. Un defecto en la expresión del gen klotho en el ratón da como resultado infertilidad, arterioesclerosis, atrofia de la piel, osteoporosis y enfisema (Kuro-o, M., et al. (1997), *Nature* 390, 45-51). La proteína Klotho se expresa más altamente en el riñón, el cerebro y la hipófisis, y está presente en niveles más bajos dentro del músculo esquelético, la vejiga urinaria, el ovario y los testículos (Avin, K.G., et al. (2014), *Frontiers in physiology* 5, 189).

- La proteína Klotho existe en dos formas: Klotho de membrana y Klotho secretada. Klotho de membrana funciona como un receptor para una hormona que regula la excreción de fosfato y la síntesis de vitamina D activa en el riñón. Klotho secretada funciona como un factor humoral con actividades pleotrópicas, incluyendo la supresión de la señalización del factor de crecimiento, la supresión del estrés oxidativo y la regulación de los canales iónicos y los transportadores.

- FGF23, un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) se identificó como elevado en pacientes con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (RHAD). De este modo, el FGF23 funciona como una hormona fosfatúrica y una hormona contrarreguladora de la vitamina D (calcitriol) de una manera dependiente de Klotho. La hiperfosfatemia conduce a estenosis de los vasos sanguíneos, infarto de miocardio, ictus y un acortamiento importante en la esperanza de vida en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). La ausencia de señalización

de FGF en el riñón da como resultado un aumento de los niveles séricos de fosfato. Se ha descubierto que la forma de Klotho secretada y la unida a la membrana forman un complejo junto con el receptor de FGF y, por tanto, aumenta la señalización dependiente de FGF23 (Kurosu et al. *Journal of Biological* 2006), 281 (10) págs. 6120-61). La función de Klotho como cofactor para la señalización de FGF23 es importante para la regulación de los niveles séricos de fosfato.

Además, Klotho actúa a través de la modulación de diversas vías de señalización, incluyendo la del factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1). Un efecto de Klotho es el aumento de la resistencia celular al estrés oxidativo, que está implicado en muchos procesos patológicos diferentes. Se ha demostrado que a través de la modulación de la respuesta celular al estrés oxidativo, Klotho también actúa de manera protectora en el contexto de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (Zeldich, E. et al. *J Biol Chem* 2014, 289 (35): 24700) y diabetes mellitus (Lin, Y. et al. *Diabetes* 2014, DB140632). También se ha sugerido que Klotho es un represor de la síntesis de colágeno y, por tanto, podría ser beneficiosa en el contexto de la fibrosis (Ghosh, A.K. et al. *Exp Biol Med* 2013, 238 (5): 461).

Se ha demostrado que la expresión de Klotho está silenciada en varios tipos de células cancerosas, lo que se asocia a un crecimiento celular potenciado y a la formación de metástasis de cáncer (Camilli et al. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011, 24 (1), pág. 75; Wang et al, *Am J Cancer Res* 2011, 1 (1): 111, Lee et al, *Molecular Cancer* 2010, 9: 109). Por el contrario, la sobreexpresión de Klotho en células cancerosas puede inhibir el crecimiento celular y puede promover la apoptosis de las células cancerosas (Chen, B. et al. *J de Exp y Clin Cancer Res* 2010, 29: 99). Además, la regulación positiva de Klotho estimulada indirectamente mediante la administración de inhibidores del sistema renina-angiotensina u otros compuestos puede conducir a la supresión de la fibrosis renal (Ming Chang Hu et al, *Contrib Nephrol* 2013, 180: 47) y parece haber una correlación entre la expresión de Klotho baja en modelos de ratas diabéticas (Meng Fu Cheng et al, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 513853).

Antecedentes de la enfermedad renal crónica (ERC):

La ERC es un problema sanitario internacional creciente, que afecta a más de 26 millones de estadounidenses. En pacientes con ERC el ARN de Klotho renal está disminuido. Esta observación clínica se confirmó en numerosos modelos preclínicos, que muestran que la nefrectomía unilateral y la lesión por isquemia-reperfusión contralateral regulan negativamente la proteína klotho renal y la expresión de ARNm. La misma reducción en la expresión de klotho se mostró en un modelo de glomerulonefritis crónica. La sobreexpresión de Klotho mejoró la función renal y mejoró la histología renal en este modelo (Hu, M.C., et al. (2011), *Journal of the American Society of Nephrology*: 22, 124-136, Haruna, Y., et al. (2007) *PNAS*, 104, 2331-2336).

En los pacientes con ERC, existe una muy alta prevalencia de calcificación de la arteria coronaria, lo que aumenta la morbilidad y mortalidad cardiovasculares. El eje klotho FGF 23 desempeña una función importante en la mineralización vascular (Stompor, T. (2014) *World journal of cardiology* 6, 115-129). El aumento de la morbilidad y mortalidad cardiovasculares (CV) está bien documentado en la enfermedad renal crónica (ERC). En una encuesta entre 1.120.295 adultos en el área de la Bahía de San Francisco, se descubrió una fuerte correlación entre la función renal (tasa de filtración glomerular estimada, TFG) y los eventos cardiovasculares (Go, A.S., et al. (2004) *The New England journal of medicine* 351, 1296-1305).

En el Estudio de ERC del Instituto de Investigación Renal (IRR) de adultos con ERC moderada a grave (Etapas 3-5), inscritos entre junio de 2000 y febrero de 2006 (n = 834), los autores descubrieron que la variabilidad de la frecuencia cardíaca es predictiva para el resultado clínico y la enfermedad cardiovascular (ECV) (Chandra, P., et al. (2012) publicación oficial de la Asociación Europea de Diálisis y Trasplante - Asociación Renal Europea 27, 700-709). La enfermedad renal crónica (ERC) es, por tanto, un factor de riesgo importante para la enfermedad cardiovascular que conduce a una mayor morbilidad y un acortamiento de la esperanza de vida. La expresión de Klotho se reduce notablemente en los riñones de pacientes que padecen ERC. Restablecer la expresión de Klotho por infusión de MSC-Klotho puede mejorar la función renal y, por tanto, reducir el riesgo de muerte cardiovascular.

Antecedentes de la enfermedad cardiovascular:

La enfermedad cardiovascular (ECV) es una afección prevalente en la población general y la primera causa de muerte en general. Se ha propuesto Klotho como un regulador clave del desarrollo de ECV. En los pocos estudios clínicos realizados, se ha observado una relación entre los niveles bajos de Klotho soluble y la aparición y la gravedad de la ECV, así como una reducción del riesgo cardiovascular cuando son altos. Además, se han relacionado diferentes polimorfismos del gen de Klotho humana con la incidencia de eventos cardiovasculares. Además, varios estudios experimentales indican que esta proteína actúa en el mantenimiento de la homeostasis vascular (Yamamoto M. et al., *J Biol Chem*. 2005; 280: 38029-38034). Klotho mejora la disfunción endotelial a través de la promoción de la producción de NO y media efectos antiinflamatorios y antienvjecimiento, tales como la supresión de la expresión de moléculas de adhesión, la atenuación del factor nuclear-kappa B o la inhibición de la señalización de Wnt. Klotho regula los niveles de expresión de la NO sintasa endotelial (eNOS). Six et al observaron recientemente que la atenuación mediada por Klotho de FGF23 o la vasoconstricción inducida por fosfato se suprimen mediante la adición de nitro-L-arginina, un inhibidor competitivo de NOS. Además, observaron que la exposición de HUVEC a Klotho aumentó la

producción de NO e indujo la fosforilación de eNOS y la expresión de iNOS. Curiosamente, Klotho fue capaz de aumentar la producción de H₂O₂ en VSMC humanas cultivadas (HVSMC), lo que sugiere un efecto más complejo de esta proteína sobre la regulación del tono vascular a través de la mediación de un equilibrio ROS/NO (Six I et al. (2014), PLoS One. 2014; 9: e93423.).

Además, esta proteína se relaciona con la atenuación de la calcificación vascular y con la prevención de la hipertrofia cardíaca. La expresión de esta proteína en la pared vascular implica un nuevo escenario para el tratamiento de los trastornos vasculares. Por tanto, la proteína Klotho se relaciona con la ECV y desempeña una función en el mantenimiento de la integridad vascular funcional (Martin-Núñez, M. (2014) *World J Cardiol.* 6(12): 1262-1269.).

Antecedentes de la enfermedad de Alzheimer (AD):

Las enfermedades neurodegenerativas, especialmente la enfermedad de Alzheimer (EA), están aumentando en el mundo occidental. La asociación de la enfermedad de Alzheimer estima que en los EE.UU. la enfermedad de Alzheimer es la 6ª causa de muerte en importancia, que cada 67 segundos a una persona se le diagnostica la enfermedad de Alzheimer y que el coste del tratamiento médico y el cuidado de estos pacientes superará los 1,1 billones de dólares en 2050. La EA se caracteriza a través de la pérdida de neuronas y sinapsis, pero también a través de la generación de péptidos beta amiloides neurotóxicos (placas Aβ) y su depósito junto con la formación de ovillos neurofibrilares. Cada vez hay más pruebas de que el depósito de amiloide es el indicio principal de la enfermedad. Los astrocitos activados inician una reacción inflamatoria produciendo citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 y TNF-α. Todo esto comienza con una reacción inadecuada al estrés oxidativo, la acumulación de radicales libres de oxígeno, la hiperglucemia y la resistencia a la insulina (Rosales-Corral, S., et al. (2015) *Oxidative medicine and cellular longevity*, 985845).

Recientemente se demostró que en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA, la concentración de la proteína antienvjecimiento klotho es significativamente menor que en pacientes más jóvenes o en pacientes de edad avanzada sin EA (Semba, R.D., et al. (2014) *Neuroscience letters* 558, 37-40).

En el cerebro, proteína Klotho se localiza en el plexo coroideo, donde la proteína se localiza predominantemente en la membrana plasmática apical de los endotelios. En el cerebro de ratón *kl-/-*, la reducción de las sinapsis fue evidente en el hipocampo, lo que sugiere una función de Klotho como factor humoral en el líquido cefalorraquídeo. La proteína Klotho en el riñón se localiza en los túbulos renales distales (Li SA, et al. (2004) *Cell Structure and Function* 29, 91-99).

Chen et al demostraron que la pérdida de la expresión de Klotho conduce a déficits cognitivos. Descubrieron efectos significativos de Klotho sobre las funciones de los oligodendrocitos, incluyendo la maduración inducida de células progenitoras oligodendrocíticas (OPC) primarias de rata *in vitro* y mielinización. Klotho aumentó la maduración de OPC. Estudios *in vivo* de ratones con el gen de Klotho inactivado y compañeros de camada de control revelaron que los ratones con el gen inactivado tienen una reducción significativa en la proteína principal de la mielina y la expresión génica. Mediante inmunohistoquímica, el número de oligodendrocitos totales y maduros fue significativamente menor en ratones con el gen de Klotho inactivado. Al nivel ultraestructural, los ratones con el gen inactivado presentaron una mielinización significativamente alterada del nervio óptico y el cuerpo calloso (Chen, C.D., et al. (2013) *The Journal of Neuroscience* 33, 1927-1939).

Antecedentes de la esclerosis múltiple (EM):

La EM es una enfermedad compleja del SNC que se caracteriza por patologías heterogéneas compuestas de componentes tanto inflamatorios como neurodegenerativos. La característica histopatológica más común en las etapas precoces de la enfermedad incluye episodios intermitentes de inflamación aguda dentro de parches de materia blanca, dando como resultado desmielinización. La mielina es crítica para mantener una conducción axónica eficiente y los oligodendrocitos, el productor de mielina y el mantenedor de la salud axónica dentro del SNC, están dañados o destruidos en pacientes con EM. Se ha descubierto que las células precursoras de oligodendrocitos endógenos (OPC) se dispersan universalmente dentro del SNC humano y pueden encontrarse en alta densidad dentro de algunas lesiones subagudas durante las primeras etapas de la EM.

La EM progresiva es la última etapa de la enfermedad, caracterizada por un empeoramiento gradual de los síntomas sin remisión. Las alteraciones neurológicas graves reducen drásticamente la calidad de vida del individuo y esto se atribuye principalmente a la expansión de las lesiones corticales que afectan la función motora. Patológicamente, existe una degeneración axónica generalizada y neuropatía de la materia gris. Se ha informado una inflamación difusa de la materia blanca y gris, que se correlaciona, en parte, con la activación microglial global, así como con la presencia de linfocitos T, células B y macrófagos cargados de mielina. Además, hay una insuficiencia general de las OPC para remielinizar eficientemente las áreas dañadas de materia blanca y gris, reduciendo drásticamente la posibilidad de recuperación (Chang, A., et al. (2002) *The New England journal of medicine* 346, 165-173). Klotho potencia la maduración de las OPC en oligodendrocitos maduros (Chen, C.D., et al. (2013) *The Journal of Neuroscience* 33, 1927-1939).

Antecedentes de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA):

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa de las neuronas motoras sin tratamiento eficaz. La señalización de Wnt desempeña una función importante en el desarrollo y la función del sistema nervioso, incluyendo la guía del axón, la formación de sinapsis y la plasticidad, y también se ha asociado a enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la ELA. La degeneración axónica es una etapa importante en la progresión de la enfermedad.

Los mecanismos subyacentes a la muerte de las neuronas motoras y la degeneración axónica en la ELA siguen siendo esquivos. Tury et al descubrieron que dos componentes de señalización de Wnt no canónicos, aPKC y Ryk, que son importantes reguladores del crecimiento y la plasticidad del axón tanto en embriones en desarrollo como en el sistema nervioso adulto, estaban claramente regulados positivamente en la médula espinal de ratones SOD1 (G93A), proporcionando pruebas de que la señalización de Wnt está alterada en la ELA y podría estar implicada en la etiología y la patogenia de la enfermedad (Tury, A., et al. (2014) *Developmental neurobiology* 74, 839-850). Un estudio de coinmunoprecipitación indicó que la klotho soluble se une a diversos miembros de la familia de Wnt, incluyendo Wnt1, Wnt3, Wnt4 y Wnt5a, suprime la transcripción de Wnt e inhibe la actividad biológica de Wnt en la piel. Una sobreexpresión de klotho antagoniza eficazmente la actividad de Wnt endógena y exógena, lo que induce una senescencia celular acelerada tanto *in vitro* como *in vivo* (Liu, H., et al. (2007) *Science* 317, 803-806).

Antecedentes de la enfermedad de Parkinson (EP):

La EP es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado clínicamente por los síntomas cardinales de temblor en reposo, bradicinesia, rigidez en rueda dentada e inestabilidad postural. La capacidad de respuesta a la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y las imágenes del cerebro distinguen la EP de otros trastornos. Los indicios patológicos de la EP son la pérdida de células dopaminérgicas en la parte compacta de la sustancia negra y la consiguiente pérdida de inervación de dopamina en el cuerpo estriado. Los síntomas motores son la consecuencia más obvia de esta neurodegeneración nigroestriatal. Sin embargo, no solo se ven afectados los ganglios basales sino también otras partes del sistema nervioso central, así como del sistema nervioso autónomo. Una amplia gama de síntomas no motores resultantes puede afectar a la calidad de vida del paciente. También existe un amplio consenso de que los procesos neurodegenerativos en la EP comienzan muchos años antes de la aparición real de los síntomas clínicos. El solapamiento fenotípico entre la EP familiar e idiopática es suficiente para diseccionar las vías habitualmente implicadas. Estas incluyen disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, plegamiento erróneo de proteínas, degradación de proteínas, agregación de proteínas e inflamación.

Kosakai et al demostraron que el número de neuronas dopaminérgicas positivas para tirosina-hidroxilasa en la parte compacta de la sustancia negra y el área tegmentaria ventral y el nivel de dopamina estriatal en ratones con insuficiencia de klotho disminuyeron significativamente en función de la edad. Estas características fenotípicas fueron completamente rescatadas por la restricción de la vitamina D, lo que indica que el aumento anormal de la biosíntesis de vitamina D activa por la insuficiencia de Klotho induce la degeneración de neuronas dopaminérgicas (Kosakai, A., et al. (2011) *Brain research* 1382, 109-117).

Debido a sus diversos roles funcionales en sistemas de múltiples órganos y su posible efecto beneficioso en diversas enfermedades, los nuevos tratamientos que incorporan la administración de Klotho pueden representar enfoques terapéuticos prometedores. Hasta la actualidad, la administración terapéutica de Klotho permanece en gran parte sin explorar. Las pautas posológicas terapéuticas eficaces, especialmente aquellas que permiten la administración local o la expresión local de Klotho en nichos fisiológicos afectados por la enfermedad, o métodos para proporcionar la expresión continua de la proteína Klotho *in vivo*, no se han descrito en la técnica.

Sumario de la invención

A la luz de la técnica anterior, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar medios alternativos y/o mejorados para el tratamiento de enfermedades, en particular cáncer, fibrosis de órganos, insuficiencia renal, patologías orgánicas relacionadas con la edad, arterioesclerosis, demencia, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson y/o esquizofrenia, diabetes mellitus, sepsis, disfunción eréctil o enfermedades autoinmunitarias.

Este problema se resuelve por las características de las reivindicaciones independientes. Se proporcionan realizaciones preferidas de la presente invención por las reivindicaciones dependientes.

Por tanto, la invención se refiere a una célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente, en la que dicha célula madre comprende un ácido nucleico exógeno que comprende una región codificante de Klotho unida operativamente a un promotor o una combinación de promotor/potenciador, en la que la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente presenta una expresión aumentada de Klotho en comparación con una célula madre mesenquimatosa no modificada. Dichas MSC pueden denominarse "MSC modificadas con Klotho" o "MSC-Klotho". Una región codificante de Klotho se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique cualquier proteína

Klotho dada, abarcando pero sin limitación las variantes de proteína Klotho que se describen en el presente documento.

Una secuencia de aminoácidos preferida de Klotho está disponible con el número de acceso BAA23382 de la base de datos NCBI. Dicha secuencia de aminoácidos corresponde a la isoforma α -Klotho. Las secuencias de ácido nucleico correspondientes que codifican Klotho pueden ser proporcionadas por un experto en la materia de la biología molecular o la genética. La presente invención también abarca el uso de variantes de secuencia de Klotho que presentan una analogía funcional con la forma humana no modificada.

Además, la invención también se refiere a isoformas adicionales del gen Klotho y abarca β -Klotho y γ -Klotho.

Las secuencias preferidas de la invención se relacionan con las que se proporcionan a continuación en la Tabla 1. La SEQ ID NO 1 se relaciona con una secuencia del gen de Klotho humana completo (ADNc) con la secuencia de origen natural.

La SEQ ID NO 2 se relaciona con una secuencia con codones optimizados (para la traducción en células humanas) del gen de Klotho humana completo (ADNc), como el más preferido de acuerdo con la presente invención. La secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO 1 y la SEQ ID NO 2 son idénticas. La SEQ ID NO 3 se relaciona con una secuencia de la forma soluble del gen de Klotho (ADNc) con la secuencia de origen natural.

La SEQ ID NO 4 se relaciona con una secuencia del gen de β -Klotho humana (ADNc) con la secuencia de origen natural.

La SEQ ID NO 5 se relaciona con una secuencia del gen de γ -Klotho humana (ADNc) con la secuencia de origen natural.

En el presente documento se incorporan variantes de secuencia adicionales en la invención que presentan una secuencia de ácido nucleico alternativa a la SEQ ID NO 1-5 pero codifican la misma secuencia de aminoácidos o una correspondiente o funcionalmente análoga. Se incluyen variantes de secuencia obtenidas a través del uso de la degeneración del código genético. Las secuencias de ácido nucleico de secuencia optimizada de esas secuencias proporcionadas en el presente documento también se incluyen dentro del alcance de la invención.

Tabla 1: Secuencias de Klotho preferidas.

SEQ ID NO 1: Secuencia de ADNc de longitud completa (unida a la membrana) de Klotho humana (Pubmed: NM_004795.3) Péptido señal (Pos. 1-52)	ATGCCCGCCAGCGCCCCGCGCCGCGCCGCGCCGCGCCGCGCCGCGCTCGCTGTC GCTGCTGCTGGTGCTGCTGGGCTGGGCGGCCGCGCCCTGCGTGCGGAGCCG GGCGACGGCGCGCAGACCTGGGCCCCGTTTCTCGCGGCCCTGCCCCGAGG CCGCGGGCTCTTCCAGGGCACCTTCCCCGACGGCTTCTCTGGGCCGTGGGC AGCGCCGCTACCAGACCGAGGGCGGCTGGCAGCAGCACGGCAAGGGTGCG TCCATCTGGGATACGTTACCCACACCCCCCTGGCACCCCCGGGAGACTCCCG GAACGCCAGTCTGCCGTTGGGCGCCCCGTGCGCGCTGCAGCCCGCCACCGGG GACGTAGCCAGCGACAGCTACAACAACGTCTCCGCGACACGGAGGCGCTGC GCGAGCTCGGGTCACTCACTACCGCTTCTCCATCTCGTGGGCGCGAGTGCTC CCCAATGGCAGCGGGGCTCCCAACCGCGAGGGGCTGCGCTACTACCGGC GCCTGCTGGAGCGGCTGCGGGAGCTGGGCGTGACAGCCGTTGTCACCCTGTA CCACTGGGACCTGCCCCAGCGCTGCAGGACGCTACGGCGGCTGGGCCAAC CGCGCCCTGGCCGACCACTTCAGGGATTACGCGGAGCTGCTTCCGCCACTT CGGCGGTCAGGTCAAGTACTGGATCACCATCGACAACCCCTACGTGGTGGCCT GGCACGGCTACGCCACCGGGCGCCTGGCCCCGGCATCCGGGGCAGCCGCG GCTCGGGTACCTGGTGGCGCACAACCTCCTCGGCTCATGCCAAGTCTGGC ATCTCTACAATACTTCTTCCGTCCCACTCAGGGAGGTGAGGTGTCATTGCCC TAAGCTCTCACTGGATCAATCCTCGAAGAATGACCGACCACAGCATCAAAGAA TGTCAAAAATCTCTGGAATTTGTAAGTTGGTTTGCCAAACCGTATTATT GATGGTGACTATCCCGAGAGCATGAAGAATAACCTTTCATCTATTCTGCCTGAT TTTACTGAATCTGAGAAAAAGTTCATCAAAGGAAGTCTGACTTTTTTGTCTT TGCTTTGGACCCACCTTGAGTTTTCACTTTTGGACCTCACATGAAGTCCGC CAATTGGAATCTCCCAACCTGAGGCAACTGCTTTCCTGGATTGACCTGAATTT AACCATCCTCAAATATTTATTGTGGAATGGCTGGTTGTCTCAGGGACCACC AAGAGAGATGATGCCAAATATATGTATTACCTCAAAAAGTTCATCATGGAAC
---	--

(continuación)

	CTTAAAAGCCATCAAGCTGGATGGGGTGGATGTCATCGGGTATACCGCATGG TCCCTCATGGATGGTTTCGAGTGGCACAGAGGTTACAGCATCAGGCGTGGACT CTTCTATGTTGACTTTCTAAGCCAGGACAAGATGTTGTTGCCAAAGTCTTCAGC CTTGTTCTACCAAAGCTGATAGAGAAAAATGGCTTCCCTCCTTTACCTGAAAA TCAGCCCCTAGAAGGGACATTTCCCTGTGACTTTGCTTGGGGAGTTGTTGACA ACTACATTCAAGTAGATACCACTCTGTCTCAGTTTACCGACCTGAATGTTTACC TGTGGGATGTCCACCACAGTAAAAGGCTTATTAAAGTGGATGGGGTTGTGAC CAAGAAGAGGAAATCCTACTGTGTTGACTTTGCTGCCATCCAGCCCCAGATCG CTTTACTCCAGGAAATGCACGTTACACATTTTCGCTTCTCCCTGGACTGGGCCC TGATTCTCCCTCTGGGTAACCAGTCCCAGGTGAACCACACCATCCTGCAGTACT ATCGCTGCATGGCCAGCGAGCTTGTCCGTGTCAACATCACCCAGTGGTGGCC CTGTGGCAGCCTATGGCCCCGAACCAAGGACTGCCGCGCTCCTGGCCAGGC AGGGCGCCTGGGAGAACCCCTACACTGCCCTGGCCTTTCAGAGTATGCCCG ACTGTGCTTTCAAGAGCTCGGCCATCACGTCAAGCTTTGGATAACGATGAATG AGCCGTATACAAGGAATATGACATACAGTGCTGGCCACAACCTTCTGAAGGCC CATGCCCTGGCTTGGCATGTGTACAATGAAAAGTTTAGGCATGCTCAGAATGG GAAAATATCCATAGCCTTGCAGGCTGATTGGATAGAACCTGCCTGCCCTTCTC CCAAAAGGACAAAGAGGTGGCTGAGAGAGTTTTGGAATTTGACATTGGCTGG CTGGCTGAGCCCATTTTCGGCTCTGGAGATTATCCATGGGTGATGAGGGACTG GCTGAACCAAAGAAACAATTTTCTTCTCCTTATTTCACTGAAGATGAAAAAA GCTAATCCAGGGTACCTTTGACTTTTTGGCTTTAAGCCATTATACCACCATCCTT GTAGACTCAGAAAAAGAAGATCCAATAAAATACAATGATTACCTAGAAGTGC AAGAAATGACCGACATCACGTGGCTCAACTCCCCAGTCAGGTGGCGGTAGT GCCCTGGGGGTTGCGCAAAGTGCTGAACTGGCTGAAGTTCAAGTACGGAGAC CTCCCCATGTACATAATATCCAATGGAATCGATGACGGGCTGCATGCTGAGGA CGACCAGCTGAGGGTGTATTATATGCAGAATTACATAAACGAAGCTCTCAAAG CCCACATACTGGATGGTATCAATCTTTCGGGATACTTTGCTTATTCGTTTAAACG ACCGCACAGCTCCGAGGTTTGGCCTCTATCGTTATGCTGCAGATCAGTTTGAG CCCAAGGCATCCATGAAACATTACAGGAAAAATTATTGACAGCAATGGTTTCCC GGGCCCAGAACTCTGGAAGATTTTGTCCAGAAGAATTCACCGTGTGTACTG AGTGCAGTTTTTTTACACCCGAAAGTCTTTACTGGCTTTCATAGCTTTTCTATT TTTTGCTTCTATTATTTCTCTCCTTATATTTTACTACTCGAAGAAAGGCAGA AGAAGTTACAAATAG
SEQ ID NO 2: Secuencia de ADNc de longitud completa (unida a la membrana) de Klotho humana como se usa preferentemente en las construcciones de la presente invención. La secuencia se ha optimizado con codones y tiene un marcador HA adicional (3037-3063; texto subrayado en la secuencia) para la detección en el extremo 3' de la secuencia, PARADA (3064-3072; proporcionada en negrita dentro de la secuencia)	ATGCCCGCCAGCGCCCTCCAAGAAGGCCTAGACCTCCTCCACCTAGCCTGAG CCTGCTGCTGGTGTCTGCTGGGACTGGGAGGAAGAAGGCTGAGAGCCGAACCT GGGGATGGCGCCAGACATGGGCCAGATTCTCTAGACCACCCGCCCTGAAG CCGCCGACTGTTTCAGGGAAACCTTCCCGATGGCTTCTGTGGGCCGTGGGA TCTGCCGCCTATCAGACTGAAGGGGGCTGGCAGCAGCACGGCAAGGGCGCCT CTATCTGGGACACCTTCACCCACCATCCTCTGGCCCCACCCGGCGACAGCAGA AATGCTTCTCTGCCTCTGGGAGCCCCAGCCCTCTGCAGCCTGCTACAGGGGA TGTGGCCAGCGACAGCTACAACAACGTGTTCCGGGACACAGAGGCCCTGCGG GAACTGGGCGTGACCACTACAGATTGAGCATCAGCTGGGCCAGAGTGCTGC CCAATGGCTCTGCCGGCGTGCCCAATAGAGAGGGCCTGCGGTACTACCGGCG GCTGCTGGAAAGACTGAGAGAACTGGGAGTGAGCCCGTCTGTACCTGTAC CATTGGGACCTGCCCCAGAGACTGCAGGATGCCTATGGCGGTGGGCCAATA GAGCCCTGGCCGACCACTTCAGAGACTACGCCGAGCTGTGCTTCCGGCACTTT GGCGGCCAAGTGAAGTACTGGATCACCATCGACAACCCCTACGTGGTGGCCT GGCACGGCTATGCCACAGGCAGACTGGCCCTGGCATCAGAGGAAGCCCTAG

(continuación)

Péptido señal (Pos. 1-52)	ACTGGGCTACCTGGTGGCCCAATCTGCTGCTGGCCACGCTAAAGTGTGGC ACCTGTACAACACCAGCTTCCGGCCTACACAGGGCGGCCAGGTGTCCATTGCC CTGAGCAGCCACTGGATCAACCCAGACGGATGACCGACCACAGCATCAAAG AGTGCCAGAAAAGCCTGGACTTCGTGCTGGGATGGTTCGCCAAGCCCGTGTT ATCGACGGCGACTACCCCGAGAGCATGAAGAACAACCTGTCCAGCATCCTGCC CGACTTCACCGAGAGCGAGAAGAAGTTCATCAAGGGCACCGCCGATTCTTCG CCCTGTGCTTCGGCCCTACCCTGAGCTTCCAGCTGCTGGACCCCCACATGAAGT TCAGACAGCTGGAAAGCCCCAACCTGCGGCAGCTGCTGAGCTGGATCGACCT GGAATTC AACCCCCAGATTTTCATCGTGAAAACGGCTGGTTCGTGTCCG GCACCACCAAGAGGGACGACGCCAAGTACATGTATTACCTGAAAAAGTTTATC ATGGAAACCTGAAGGCCATCAAGCTGGACGGCGTGGACGTGATCGGCTACA CAGCCTGGTCCCTGATGGACGGCTTCGAGTGGCACCAGGGGCTACTCTATCAGA CGGGGCCTGTTCTACGTGGACTTCTGAGCCAGGACAAGATGCTGCTGCCTAA GAGCAGCGCCCTGTTTTACCAGAAGCTGATCGAGAAGAACGGCTTCCACCCC TGCCCGAGAACCAGCCTCTGGAAGGCACCTTCCCTGCGATTTTGCCTGGGGC GTGGTGGACAACCTACATCCAGGTGGACACCACCCTGTCCAGTTCACCGACCT GAACGTGTACCTGTGGGACGTGCACCACAGCAAGCGGCTGATTAAGGTGGAC GGGGTCGTGACCAAGAAGCGGAAGTCCTACTGCGTGGACTTTGCCGCCATCC AGCCCCAGATTGCCCTGCTGCAGGAAATGCACGTGACACACTTCCGTTCTCC CTGGACTGGGCCCTGATCCTGCCACTGGGCAATCAGAGCCAAGTGAACCACAC CATTCTGCAGTACTACAGATGCATGGCCTCCGAGCTGGTGC GCGTGAACATCA CACCTGTGGTGGCCCTGTGGCAGCCCATGGCCCTAATCAGGGACTGCCTAGA CTGCTGGCTAGACAGGGCGCCTGGGAGAACCCTTACACCGCCCTGGCCTTTCG CGAGTACGCCCCGCTGTGTTTCCAGGAAGTGGGGCACCGTGAAGCTGTGG ATCACAATGAACGAGCCCTACACCCGGAACATGACCTACAGCGCCGGACATAA CCTGCTGAAGGCCACGCCCTGGCTTGGCATGTGTACAACGAGAAGTTCGGGC ACGCCCAGAACGGCAAGATCAGTATCGCCCTGCAGGCCGACTGGATCGAGCC CGCCTGTCCCTCAGCCAGAAAGACAAAGAGGTGGCCGAGCGGGTGTGGAA TTCGACATTGGATGGCTGGCCGAGCCCATCTTCGGCAGCGGCGATTACCCCTG GGTCATGCGGGACTGGCTGAACCAGCGGAACAACTTCTGCTGCCTTACTTA CCGAGGATGAGAAGAACTGATCCAGGGGACCTTCGACTTCTGGCCCTGAG CCACTACACCACAATCCTGGTGGACAGCGAGAAAGAGGACCCCATCAAGTAC AACGACTACCTGGAAGTGCAGGAAATGACCGACATCACCTGGCTGAATAGCC CCTCCAGGTGGCCGTGGTGCCTTGGGGACTGAGAAAGGTGCTGAATTGGCT GAAGTTTAAGTACGGCGACCTGCCCATGTACATCATCAGCAACGGCATCGACG ATGGCCTGCACGCCGAGGACGATCAGCTGCGGGTGTACTACATGCAGAACTA CATCAACGAGGCCCTGAAAGCCACATCCTGGACGGCATCAACCTGTGCGGCT ACTTCGCTACAGCTTCAACGACCGGACCGCCCTAGATTGCGCCTGTACAGA TACGCCGCCGACCAGTTCGAGCCCAAGGCCAGCATGAAGCACTACCGGAAGA TCATCGACAGCAATGGCTTCCCTGGCCCCGAGACACTGGAACGGTTCTGCCCC GAGGAATTCACCGTGTGTACCGAGTGCAGCTTCTCCACACCAGAAAGTCCCT GCTGGCTTTTATCGCCTTCTGTTCTTCGCCAGCATCATCTCCCTGTCCCTGATC TTCTACTACAGCAAGAAGGGCAGACGGTCCTACAAGT<u>ACCCTACGACGTGCC</u> <u>CGACTACGCCTGATGATGA</u>
---------------------------	---

(continuación)

SEQ ID NO 3: Secuencia de ADNc de Klotho humana (secretada) (Pubmed: AB009667.2) Péptido señal (Pos. 1-52)	ATGCCCGCCAGCGCCCCGCCGCGCCCGCCGCGGCCCGCCGCGCAGTCGCTGT CGCTGCTGCTGGTGCTGCTGGGCCTGGGCGGCCCGCCGCTGCGTGCGGAGCC GGGCGACGGCGCGCAGACCTGGGCCCGTTTCTCGCGGCCCTCTGCCCCGAG GCCGCGGGCCTCTTCCAGGGCACCTTCCCCGACGGCTTCTCTGGGCGGTGGG CAGCGCCGCCTACCAGACCGAGGGCGGCTGGCAGCAGCACGGCAAGGGTGC GTCCATCTGGGACACGTTACCCACCACCCCTGGCACCCCGGGAGACTCCC GGAACGCCAGTCTGCCGTTGGGCGCCCCGTCGCCGCTGCAGCCCGCCACCGG GGACGTAGCCAGCGACAGCTACAACAACGTCTTCCGCGACACGGAGGCGCTG CGCGAGCTCGGGGTCACTCACTACCGCTTCTCCATCTCGTGGGCGCGAGTGCT CCCCAATGGCAGCGCGGGCGTCCCCAACCGCGAGGGGCTGCGCTACTACCGG CGCCTGCTGGAGCGGCTGCGGGAGCTGGGCGTGCAGCCCGTGGTCACCTGT ACCACTGGGACCTGCCCCAGCGCCTGCAGGACGCCTACGGCGGCTGGGCCAA CCGCGCCCTGGCCGACCACTTCAGGGATTACGCGGAGCTCTGCTTCCGCCACT TCGGCGGTCAAGTCAAGTACTGGATCACCATCGACAACCCCTACGTGGTGGCC TGGCACGGCTACGCCACCGGGCGCCTGGCCCCCGGCATCCGGGGCAGCCCGC GGCTCGGGTACCTGGTGGCGCACAACTCCTCCTGGCTCATGCCAAAGTCTGG CATCTCTACAATACTTCTTTCCGTCCCACTCAGGGAGGTCAAGTGTCATTGCC CTAAGCTCTCACTGGATCAATCCTCGAAGAATGACCGACCACAGCATCAAAGA ATGTCAAAAATCTCTGGACTTTGTACTAGGTTGGTTTGCCAAACCCGTATTTAT TGATGGTGACTATCCCGAGAGCATGAAGAATAACCTTTCATCTATTCTGCCTGA TTTTACTGAATCTGAGAAAAAGTTCATCAAAGGAAGTCTGACTTTTTTGTCT TTGCTTTGGACCCACCTTGAGTTTTCACTTTTGGACCCTCACATGAAGTCCG CCAATTGGAATCTCCCAACCTGAGGCAACTGCTTTCCTGGATTGACCTTGAATT TAACCATCCTCAAATATTTATTGTGGAAAATGGCTGGTTTGTCTCAGGGACCAC CAAGAGAGATGATGCCAAATATATGTATTACCTCAAAAAAGTTCATCATGGA CCTTAAAAGCCATCAAGCTGGATGGGGTGGATGTCATCGGGTATACCGCATG GTCCCTCATGGATGGTTTCGAGTGGCACAGAGGTTACAGCATCAGGCGTGGA CTCTTCTATGTTGACTTTCTAAGCCAGGACAAGATGTTGTTGCCAAAGTCTTCA GCCTTGTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAATGGCTTCCCTCCTTTACCTGAA AATCAGCCCCTAGAAGGGACATTTCCCTGTGACTTGTCTGGGGAGTTGTTGA CAACTACATTCAAGTAAGTCAGCTGACAAAACCAATCAGCAGTCTACCAAGC CCTATCACTAG
---	--

(continuación)

SEQ ID NO 4: Secuencia de ADNc de β-Klotho humana (Pubmed: NM_175737.3; pb 98-3232)	ATGAAGCCAGGCTGTGCGGCAGGATCTCCAGGGAATGAATGGATTTTCTTCA GCACTGATGAAATAACCACACGCTATAGGAATACAATGTCCAACGGGGGATT GCAAAGATCTGTCATCCTGTCAGCACTTATTCTGCTACGAGCTGTTACTGGATT CTCTGGAGATGGAAGAGCTATATGGTCTAAAAATCCTAATTTTACTCCGGTAA ATGAAAGTCAGCTGTTTCTCTATGACACTTTCCTAAAAACTTTTTCTGGGGTA TTGGGACTGGAGCATTGCAAGTGGAAGGGAGTTGGAAGAAGGATGGAAAAG GACCTTCTATATGGGATCATTTTCATCCACACACACCTTAAAAATGTCAGCAGCA CGAATGGTTCCAGTGACAGTTATATTTTCTGGAAAAAGACTTATCAGCCCTG GATTTTATAGGAGTTTCTTTTATCAATTTTCAATTTCTGGCCAAGGCTTTTCC CCGATGGAATAGTAACAGTTGCCAACGCAAAAGGTCTGCAGTACTACAGTACT CTTCTGGACGCTCTAGTGCTTAGAAACATTGAACCTATAGTTACTTTATACCAC TGGGATTTGCCTTTGGCACTACAAGAAAAATATGGGGGGTGGAAAAATGATA CCATAATAGATATCTTCAATGACTATGCCACATACTGTTTCCAGATGTTTGGGG ACCGTGTCAAATATTGGATTACAATTCACAACCCATATCTAGTGGCTTGGCATG GGTATGGGACAGGTATGCATGCCCCTGGAGAGAAGGGAAATTTAGCAGCTGT CTACACTGTGGGACACAACCTTGATCAAGGCTCACTCGAAAGTTTGGCATAACT ACAACACACATTTCCGCCCACATCAGAAGGGTTGGTTATCGATCACGTTGGGA TCTCATTGGATCGAGCCAAACCGGTCGGAAAACACGATGGATATATTCAAATG TCAACAATCCATGGTTTCTGTGCTTGATGGTTTGCCAACCTATCCATGGGGA TGGCGACTATCCAGAGGGGATGAGAAAGAAGTTGTTCTCCGTTCTACCCATTT TCTCTGAAGCAGAGAAGCATGAGATGAGAGGCACAGCTGATTTCTTTGCCTTT TCTTTTGGACCCAACAACCTCAAGCCCCTAAACACCATGGCTAAAATGGGACA AAATGTTTCACTTAATTTAAGAGAAGCGCTGAACTGGATTAACTGGAATACA ACAACCCTCGAATCTTGATTGCTGAGAATGGCTGGTTCACAGACAGTCGTGTG
---	--

(continuación)

	AAAAACAGAAGACACACGCGCCATCTACATGATGAAGAATTTCTCAGCCAGGT GCTTCAAGCAATAAGGTTAGATGAAATACGAGTGTTTGGTTATACTGCCTGGT CTCTCCTGGATGGCTTTGAATGGCAGGATGCTTACACCATCCGCCGAGGATTA TTTTATGTGGATTTTAACAGTAAACAGAAAGAGCGGAAACCTAAGTCTTCAGC ACACTACTACAAACAGATCATACGAGAAAAATGGTTTTCTTTAAAAGAGTCCAC GCCAGATGTGCAGGGCCAGTTTCCCTGTGACTTCTCCTGGGGTGTCACTGAAT CTGTTCTTAAGCCCGAGTCTGTGGCTTCGTCCCCACAGTTCAGCGATCCTCATC TGTACGTGTGGAACGCCACTGGCAACAGACTGTTGCACCGAGTGGAAGGGGT GAGGCTGAAAAACGACCCGCTCAATGCACAGATTTTGTAAACATCAAAAAAC AACTTGAGATGTTGGCAAGAATGAAAGTCACCCACTACCGGTTTGCTCTGGAT TGGGCCTCGGTCCTTCCCACTGGCAACCTGTCCGCGGTGAACCGACAGGCCCT GAGGTACTACAGGTGCGTGGTCAGTGAGGGGCTGAAGCTTGGCATCTCCGCG ATGGTCACCTGTATTATCCGACCCACGCCCACCTAGGCCTCCCCGAGCCTCTG TTGCATGCCGACGGGTGGCTGAACCCATCGACGGCCGAGGCCTTCAGGCCT ACGCTGGGCTGTGCTTCCAGGAGCTGGGGGACCTGGTGAAGCTCTGGATCAC CATCAACGAGCCTAACCGGCTAAGTGACATCTACAACCGCTCTGGCAACGACA CCTACGGGGCGGCGCACAACCTGCTGGTGGCCACGCCCTGGCCTGGCGCCT CTACGACCGGCAGTTCAGGCCCTCACAGCGCGGGGGCCGTGTGCTGTGCTG CACGCGGACTGGGCGGAACCCGCCAACCCCTATGCTGACTCGCACTGGAGGG CGGCCGAGCGCTTCTGCACTTCGAGATCGCCTGGTTCGCCGAGCCGCTCTTC AAGACCGGGGACTACCCCGCGGCCATGAGGGAATACATTGCCTCCAAGCACC GACGGGGGCTTTCCAGCTCGGCCCTGCCGCGCTCACCGAGGCCGAAAGGAG GCTGCTCAAGGGCACGGTCGACTTCTGCGCGCTCAACCACTTCAACCTAGGT TCGTGATGCACGAGCAGCTGGCCGGCAGCCGCTACGACTCGGACAGGGACAT CCAGTTTCTGCAGGACATACCCGCCTGAGCTCCCCACGCGCCTGGCTGTGA TTCCCTGGGGGGTGCGCAAGCTGCTGCGGTGGGTCCGGAGGAACTACGGCG ACATGGACATTTACATCACCGCCAGTGGCATCGACGACCAGGCTCTGGAGGAT GACCGGCTCCGGAAGTACTACCTAGGGAAGTACCTTCAGGAGGTGCTGAAAG CATACTGATTGATAAAGTCAGAATCAAAGGCTATTATGCATTCAAAGTGGCT GAAGAGAAAATCTAAACCCAGATTTGGATTCTTACATCTGATTTTAAAGCTAAA TCCTCAATACAATTTTACAACAAAGTGATCAGCAGCAGGGGCTTCCCTTTGAG AACAGTAGTTCTAGATGCAGTCAGACCCAAGAAAATACAGAGTGCATGTCTG CTTATTCCTTGTGCAGAAGAAACCACTGATATTCCTGGGTTGTTGCTTCTTCTCC ACCCTGGTTCTACTCTTATCAATTGCCATTTTCAAAGGCAGAAGAGAAGAAA GTTTTGGAAAGCAAAAACTTACAACACATACCATTAAAGAAAGGCAAGAGA GTTGTTAGCTAA
--	--

(continuación)

SEQ ID NO 5: Secuencia de ADNc de γ-Klotho humana similar a lactasa de Homo sapiens (LCTL), variante de transcripción 1, ADNc (Pubmed: NM_207338.3, pb: 133-1836)	ATGAAGCCAGTGTGGGTCGCCACCCTTCTGTGGATGCTACTGCTGGTGCCAG GCTGGGGGCCGCGCCGGAAGGGGTCCCCAGAAGAGGCCTCCTTCTACTATGGA ACCTTCCCTCTTGGCTTCTCTGGGGCGTGGGCAGTTCTGCCTACCAGACGGA GGGCGCCTGGGACCAGGACGGGAAAGGGCCTAGCATCTGGGACGTCTTCAC ACACAGTGGGAAGGGGAAAGTGCTTGGGAATGAGACGGCAGATGTAGCCTG TGACGGCTACTACAAGGTCCAGGAGGACATCATTCTGCTGAGGGAACTGCAC GTCAACCACTACCGATTCTCCCTGTCTTGGCCCCGGCTCCTGCCCACAGGCATC CGAGCCGAGCAGGTGAACAAGAAGGGAATCGAATTCTACAGTGATCTTATCG ATGCCCTTCTGAGCAGCAACATCACTCCCATCGTGACCTTGACCACTGGGATC TGCCACAGCTGCTCCAGGTCAAATACGGTGGGTGGCAGAATGTGAGCATGGC CACTACTTCAGAGACTACGCCAACCTGTGCTTTGAGGCCTTTGGGGACCGTG TGAAGCACTGGATCACGTTCAGTGATCCTCGGGCAATGGCAGAAAAAGGCTA TGAGACGGGGCCACCATGCGCCGGGCCTGAAGCTCCGCGGCACCGGCCTGTAC AAGGCAGCACACCACATCATTAAGGCCACGCCAAAGCCTGGCATTCTTATAA CACCACGTGGCGCAGCAAGCAGCAAGGTCTGGTGGGAATTTTATTGAAGTGT GACTGGGGGGAACCTGTGGACATTAGTAACCCCAAGGACCTAGAGGCTGCCG AGAGATACCTACAGTTCTGTCTGGGCTGGTTTGCCAACCCATTTATGCCGGT GACTACCCCAAGTCATGAAGGACTACATTGGAAGAAAGAGTGACAGAGCAAG GCCTGGAGATGTGAGGTTACCGGTGTTCTCACTCCAGGAGAAGAGCTACATT AAAGGCACATCCGATTTCTTGGGATTAGGTCATTTTACTACTCGGTACATCACG GAAAGGAACTACCCCTCCCGCCAGGGGCCAGCTACCAGAACGATCGTGAATT GATAGAGCTGGTTGACCCAACTGGCCAGATCTGGGGTCTAAATGGCTATATT CTGTGCCATGGGGATTTAGGAGGCTCCTTAACCTTGCTCAGACTCAATACGGT GATCCTCCATATATGTGATGGAAAATGGAGCATCTCAAAAATCCACTGTACT CAATTATGTGATGAGTGGAGAATTCAATACCTTAAAGGATACATAAATGAAAT GCTAAAAGCTATAAAAGATGGTGCTAATATAAAGGGGTATACTTCTGGTCTC TGTGGATAAGTTTGAATGGGAGAAAGGATACTCAGATAGATATGGATTCTAC TATGTTGAATTTAACGACAGAAAATAAGCCTCGCTATCCAAAGGCTTCAGTTCAA TATTACAAGAAGATTATCATTGCCAATGGGTTTCCCAATCCAAGAGAGGTGGA AAGTTGGTACCTCAAAGCTTTGGAACTTGCTCTATCAACAATCAGATGCTTGC TGCAGAGCCCTTGCTAAGTCACATGCAAATGGTTACGGAGATCGTGGTACCCA CTGTCTGCTCCCTCTGTGCTCCTCATCACTGCTGTTCTACTAATGCTCCTCTGAG GAGGCAGAGCTGA
---	---

Por tanto, la invención abarca una MSC modificada como se describe en el presente documento que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 5 a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína Klotho, preferentemente de acuerdo con una secuencia de proteína de la SEQ ID NO 6 a 10, por lo que la secuencia de nucleótidos es preferentemente una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO 1, 2, 3, 4 o 5;
- 10 b) una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de acuerdo con a);
- c) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene suficiente identidad de secuencia para que sea funcionalmente análoga/equivalente a una secuencia de nucleótidos de acuerdo con a) o b), que comprende preferentemente una identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con a) o b) de al menos un 70 %, un 80 %, preferentemente un 90 %, más preferentemente un 95 %;
- 15 d) una molécula de ácido nucleico que, como consecuencia del código, está degenerada en una secuencia de nucleótidos de acuerdo con a) a c); y/o

e) una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una secuencia de nucleótidos de a) a d) que está modificada por eliminaciones, adiciones, sustituciones, translocaciones, inversiones y/o inserciones y funcionalmente análoga/equivalente a una secuencia de nucleótidos de acuerdo con a) a d).

- 5 Las secuencias funcionalmente análogas se refieren a la capacidad de codificar un producto del gen de klotho funcional. Las secuencias funcionalmente análogas se refieren a la capacidad de codificar un producto del gen de Klotho funcional y permitir el efecto funcional igual o similar al de la Klotho humana. La función de Klotho puede determinarse por su actividad β -glucuronidasa o a través de los efectos funcionales que se describen en los ejemplos a continuación. Un experto en la materia conoce los ensayos adecuados para determinar la actividad de β -glucuronidasa o para someter a ensayo los efectos funcionales biológicos deseados que se describen en el presente documento y como se muestran en los ejemplos.

15 Para medir la β -glucuronidasa de Klotho, la proteína recombinante se somete a una reacción *in vitro*. En esta reacción, el sustrato marcado con fluorescencia glucurónido es hidrolizado por la proteína Klotho. El tampón de reacción contiene 4-metilumbeliferilo (4Mu)-D-glucurónido 0,5 mM (Sigma), tampón de citrato de sodio 0,1 M, pH 5,5, NaCl 0,05 M, Tween 20 al 0,01 % y 20 μ g de proteína Klotho secretada purificada. La reacción se realiza en un volumen final de 100 μ l. La función enzimática de Klotho se correlaciona con un aumento en la intensidad de fluorescencia que se mide en varios puntos temporales con un contador ARVOSx (PerkinElmer Life Sciences) de marcadores múltiples a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 470 nm. Los productos hidrolizados se cuantifican en base a la fluorescencia de 4-metilumbeliferona.

La secuencia de nucleótidos de acuerdo con las SEQ ID NO 1 a 5 codifica una proteína Klotho humana de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 6 a 10, que se prefieren en la presente invención:

25

Tabla 2: Secuencias de Klotho preferidas.

SEQ ID NO 6: Secuencia de aminoácidos de Klotho humana de longitud completa (unida a la membrana) codificada por la SEQ ID 1	MPASAPRRRPPPPPSLSLLVLLGLGRRRLRAEPGDGAQTWARFSRPPAPEAAG LFQGTFPDGLWAVGSAAYQTEGGWQQHGKGASIWDTFTHHPLAPPGDSRNA SLPLGAPSPQLPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTYHRSISWARVLPNGSA GVPNREGLRYYRLLERLRELGVPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADH FRDYAELCFRHFEGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLGYLVAH NLLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVL GWFAKPVFIDGDYPESMKNNLSSILPDFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLD PHMKFRQLESPNLRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWVSGTTKRDDAKMYYLKK FIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGIFYVDLSQDKMLLPK SSALFYQKLIKENGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDLNVY LWDVHHSKRLIKVDGVVTKKRKSYCVDFAAIQPQIALQEMHVTHFRFSLDWALI LPLGNQSQVNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLLARQG AWENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHAL AWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFQKDKVAERVLFEFDIGWLAEP FGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLPYFTEDEKKLIQGTDFLALSHYTTILVDSEKE DPIKYNDYLEVQEMTDITWLNPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPYIISN GIDDGLHAEDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAYSFNDRTAPRFLYR YAADQFEPKASKMKHYRKIIDSNGFPGPETLERFCPEEFTVCTECSFFHTRKSLAFIA FLFFASIISLSLIFYYSKKGRRSYK
--	--

(continuación)

SEQ ID NO 7: Secuencia de aminoácidos de Klotho humana de longitud completa (unida a la membrana) con marcador HA adicional (texto subrayado en el secuencia) codificada por la SEQ ID NO 2.	MPASAPRRRPRPPPSLSLLLVLLGLGGRRRLRAEPGDGAQTWARFSRPPAPEAAG LFQGTFPDGLFWAVGSAAYQTEGGWQQHGKGASIWDFTTHHPLAPPGDSRNA SLPLGAPSPQLPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTYRFSISWARVLPNGSA GVPNREGLRYYRLLERLRELGVQPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADH FRDYAELCFRHFGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLGYLVAH NLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVL GWFAKPVFIDGDYPESMKNNLSSILPDFTSEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLD PHMKFRQLESPNLRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWVSGTTKRDDAKYMYLKK FIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGIFYVDLFSQDKMLLPK SSALFYQKLIKNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTSLSQFTDLNVY LWDVHHSKRLIKVDGVVTKRKSYCVDFAAIQPQIALLQEMHVTHFRFSLDWALI LPLGNQSQVNHILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLLARQG AWENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHAL AWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSSQKDEVAERVLEFDIGWLAEP FGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLPYFTEDEKKLIQGTDFDLALSHYTTILVDSEKE DPIKYNDYLEVQEMTDITWLNPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYGDLPMYIISN GIDDGLHAEDDQLRVYVMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAYSFNDRTAPRFGLYR YAADQFEPKASMKHYRKIIDSNGFPGPETLERFCPEEFTVCTECFFHTRKSLLAFIA FLFFASIISLSLIFYYSKKGRRSYKYPYDVPDYA
SEQ ID NO 8: Secuencia de aminoácidos de Klotho humana (secretada) codificada por la SEQ ID NO 3	MPASAPRRRPRPPPSLSLLLVLLGLGGRRRLRAEPGDGAQTWARFSRPPAPEAAG LFQGTFPDGLFWAVGSAAYQTEGGWQQHGKGASIWDFTTHHPLAPPGDSRNA SLPLGAPSPQLPATGDVASDSYNNVFRDTEALRELGVTYRFSISWARVLPNGSA GVPNREGLRYYRLLERLRELGVQPVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADH FRDYAELCFRHFGGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLGYLVAH NLLAHAKVWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVL GWFAKPVFIDGDYPESMKNNLSSILPDFTSEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLD PHMKFRQLESPNLRQLLSWIDLEFNHPQIFIVENGWVSGTTKRDDAKYMYLKK FIMETLKAIKLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGIFYVDLFSQDKMLLPK SSALFYQKLIKNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVSQLTKPISSLTKPY H

(continuación)

SEQ ID NO 9: Secuencia de aminoácidos de β -Klotho humana codificada por la SEQ ID NO 4,	MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVLSALILLRAVTFGSGD GRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFKNFFWIGTGALQVEGSWKKDGKGPSIW DHFHHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIPTVAN AKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYC FQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGEKGNLAAYTVGHNLKAHS KVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQSQSMVSVLWGF ANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEMRGTADFFAFSGPNNFKPLNTM AKMGQNVSLNLREALNWIKLEYNNPRILIAENGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNF LSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSS AHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGGQFPCDFSWGVTESVLKPEVASSPQFSDPHLY VWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWA SVLPTGNLSAVNRQALRYRCVSEGLKLGISAMVTLYPTHALGLPEPLLHADG WLNPTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSNDTYGAAHNL LVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEI AWFAEPLFKTGDYPAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNH FTTRFVMHEQLAGSRYDSRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRRKLLRWVRRNY GDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYLGKYLQEVLKAYLIDKVKRIKGYAFKLAEEKS KPRFGFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKP LIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS
SEQ ID NO 10: γ -Klotho humana similar a lactasa de Homo sapiens (LCTL), variante de transcripción 1, secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO 5.	MKPVVWVATLLWMLLLVPRLGAAARKGSPEEASFYYGTFLGFSWGVGSSAYQTEG AWDQDGKGPSIWVDFTHSGKGKVLGNETADVACDGYKQVEDIILLRELHVNHY RFSLSWPRLLPTGIRAEQVNKKGIEFYSDLIDALLSSNITPIVTLHHWDLPLLQVKY GGWQNVSMANYFRDYANLCEAFGDRVKHWTFSDPRAMAEKGYETGHHAPG LKLRTGLYKAAHHIIKAHAKAWHSYNTTWRKQKGLVGLSLNCDWGEVVDISN PKDLEAAERYLQFCLGWAFANPIYAGDYPQVMKDYIGRKSAEQGLEMSRLPVFSLQ EKSYIKGTSDFLGLGHFTTRYITERNYPSRQGPSYQNDRLIELVDPNWPDLGSKW LYSVPWGFRRLLNFAQTQYGDPPPIYVMENGASQKFHCTQLCDEWRIQYLGKGIN EMLKAIKDGANIKGYTSWLLDKFEWEKGYSDRYGFYFVFNDRNKPRYPKASVQ YYKKIIIANGFPNPREVESWYLKALETCSINNQMMLAAEPLLSHMQMVTIVVPTVC SLCVLITAVLLMLLLRRQS

- Modificaciones de proteína de la proteína klotho, que pueden producirse mediante sustituciones en la secuencia de aminoácidos, y secuencias de ácido nucleico que codifican dichas moléculas, dentro del alcance de la invención. Las sustituciones como se definen en el presente documento son modificaciones hechas a la secuencia de aminoácidos de la proteína, por las que uno o más aminoácidos se remplazan con el mismo número de aminoácidos (diferentes), produciendo una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos diferente a la proteína primaria. La sustitución puede no alterar significativamente la función de la proteína. Como las adiciones, las sustituciones pueden ser naturales o artificiales. Es bien sabido en la técnica que las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse sin alterar significativamente la función de la proteína. Esto es particularmente cierto cuando la modificación se refiere a una sustitución de aminoácido "conservativa", que es la sustitución de un aminoácido por otro de propiedades similares. Dichos aminoácidos "conservados" pueden ser aminoácidos naturales o sintéticos que, a causa del tamaño, carga, polaridad y conformación, pueden sustituirse sin afectar significativamente a la estructura y función de la proteína. Con frecuencia, muchos aminoácidos pueden sustituirse por aminoácidos conservativos sin afectar de forma perjudicial a la función de la proteína. En general, los aminoácidos no polares Gly, Ala, Val, Ile y Leu; los aminoácidos aromáticos no polares Phe, Trp y Tyr; los aminoácidos polares neutros Ser, Thr, Cys, Gln, Asn y Met; los aminoácidos con carga positiva Lys, Arg e His; los aminoácidos cargados negativamente Asp y Glu, representan grupos de aminoácidos conservativos. Esta lista no es exhaustiva. Por ejemplo, es bien sabido que Ala, Gly, Ser y a veces Cys pueden sustituirse entre sí aunque pertenecen a grupos diferentes.
- En una realización, la célula modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque dicha célula se obtiene de médula ósea, cordón umbilical, tejido adiposo o líquido amniótico.

En una realización, la célula modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque dicha célula es CD34-negativa.

En una realización, la célula modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque dicha célula es una célula humana.

- 5 Debido a su capacidad para migrar a áreas de enfermedad, en áreas de inflamación particulares, las MSC representan sorprendentemente una herramienta adecuada para la entrega de Klotho como agente terapéutico. Sin quedar ligados a teoría alguna, las MSC de la presente invención representan una herramienta o vehículo de entrega de fármacos para la entrega eficaz de un agente terapéutico al sitio de la enfermedad. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el agente terapéutico es la proteína Klotho expresada a partir de un ácido nucleico exógeno en
10 dichas MSC.

- Por tanto, las células de la presente invención permiten efectos terapéuticos beneficiosos y sorprendentes. Sorprendentemente, la administración de las MSC que se describen en el presente documento conduce a una migración eficaz al sitio de la enfermedad después de la infección sistémica, preferentemente intravenosa, de las
15 células. Las MSC son capaces de migrar e injertarse potencialmente en áreas de tejido enfermo, incluyendo tumores y otros tejidos inflamados. Las propias MSC proporcionan una señal antiinflamatoria beneficiosa para las patologías incluidas en la invención, además del efecto local potenciado de Klotho a partir de la expresión del transgén presente en las MSC modificadas con Klotho.

- 20 La combinación de MSC que presentan una expresión aumentada de Klotho (en comparación con las MSC no modificadas) con el tratamiento de un cáncer, fibrosis de órganos, insuficiencia renal, cambios de relacionados con la edad de los órganos o los sistemas de órganos, arterioesclerosis, demencia, diabetes mellitus, enfermedad neurodegenerativa y enfermedades autoinmunitarias y enfermedades relacionadas con la autoinmunidad muestra una sinergia inesperada. La migración dirigida MSC a áreas de tejido enfermo, además de las propiedades antiinflamatorias
25 de las propias MSC y el efecto terapéutico del transgén de Klotho proporciona un efecto terapéutico sinérgico superior a la suma de cada efecto individual cuando se considera de forma aislada.

- Por tanto, las MSC modificadas con Klotho evitan y/o minimizan los posibles efectos secundarios debido a la administración sistémica de la proteína Klotho o los vectores de ácido nucleico que codifican Klotho. El uso de MSC
30 como vehículos para la administración de Klotho proporciona la producción local de Klotho en regiones enfermas del cuerpo debido a las capacidades de migración dirigida de MSC hacia el tejido inflamado.

- Además, se sabe que las MSC presentan efectos inmunomoduladores beneficiosos en sujetos y en particular en sujetos que padecen enfermedades inflamatorias y/o una respuesta inmunitaria no deseada. Fue particularmente sorprendente que las MSC modificadas genéticamente mantuviesen las propiedades inmunomoduladoras
35 beneficiosas de las MSC. Un experto en la materia no podría haber sospechado esto, en cambio, se habría esperado que la expresión de Klotho, especialmente en cantidades terapéuticamente eficaces, interfiriese con las propiedades inmunomoduladoras de las MSC. Sin embargo, las Klotho-MSC mantienen una función moduladora beneficiosa, en particular en las células inmunitarias del sujeto. Por tanto, las Klotho-MSC son sorprendentemente eficaces para el
40 tratamiento de enfermedades asociadas a inflamación y/o respuesta inmunitaria no deseada. La expresión de la Klotho terapéuticamente eficaz junto con las propiedades inmunomoduladoras de las Klotho-MSC producen un efecto terapéutico sinérgico superior a la suma de los efectos individuales de ambos agentes terapéuticos cuando se consideran por separado.

- 45 Además, las MSC modificadas con Klotho producen efectos terapéuticos sorprendentes debido a una producción continua de Klotho. Después de la administración, las MSC modificadas con Klotho pueden actuar como una biobomba o una fábrica de fármacos que proporciona continuamente proteína Klotho al sujeto. De este modo, la cantidad de Klotho puede mantenerse a nivel terapéutico durante períodos de tiempo largos. Como se indica en el presente documento, las capacidades de localización de Klotho-MSC conducen ventajosamente a una expresión localizada de
50 Klotho en regiones enfermas. Sin embargo, la Klotho expresada también puede ser transportada por el sistema vascular por todo el cuerpo del sujeto. Las Klotho-MSC administradas, por tanto, también contribuyen de manera sistémica en gran medida, independientemente de la ubicación de las MSC dentro del cuerpo del sujeto. La producción continua de Klotho por las Klotho-MSC es particularmente ventajosa ya que la proteína Klotho puede sufrir degradación. Por tanto, una administración sistemática directa de la proteína Klotho a un sujeto tendría que realizarse
55 repetidamente a intervalos cortos para mantener niveles terapéuticos suficientes. Es sorprendente que las MSC modificadas genéticamente puedan superar este obstáculo mediante una expresión continua de Klotho durante períodos de más de 7 o más de 10 días, e incluso de más de 30 días. Al actuar como una biobomba, la MSC-Klotho llega a niveles estables de Klotho dentro de un sujeto durante más de 1 semana e incluso más de 1 mes.

- 60 Los niveles estables particulares de Klotho terapéuticamente eficaz son resultado de la expresión de Klotho bajo el control de un promotor constitutivamente activo. Para este fin, el promotor EFS, PGK y/o CMV ha demostrado ser particularmente adecuado y permite una expresión prolongada a niveles elevados.

- Además, las MSC que expresan Klotho demostraron ser muy eficientes en la entrega de la proteína terapéutica al sistema vascular de un paciente. Por medio del sistema vascular, las proteínas Klotho se transportan por todo el cuerpo del sujeto. Ventajosamente, por tanto, pueden establecerse niveles terapéuticos de Klotho en diferentes órganos, tales
65

como el hígado, los riñones y/o los pulmones, que pueden verse afectados por una enfermedad. La administración de Klotho-MSK también es eficaz para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que afectan al cerebro. Este es incluso el caso si las Klotho-MSK no se han introducido ni migrado hacia las regiones cerebrales afectadas. Por tanto, se sospecha que Klotho puede atravesar ventajosamente la barrera hematoencefálica. Los expertos en la materia conocen métodos para la modificación genética de MSC. Se divulgan ejemplos de métodos adecuados para modificación genética de MSC en el documento WO 2010/119039 y el documento WO 2008/150368.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza por que el ácido nucleico exógeno comprende un vector vírico, por ejemplo, en forma de una construcción de expresión vírica, más preferentemente un vector retrovírico.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificadas genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza por que el ácido nucleico exógeno es o comprende una construcción de expresión no vírica.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza por que el promotor o combinación de promotor/potenciador es un promotor constitutivo. En otra realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor o la combinación promotor/potenciador es el promotor CMV o EF2.

En una realización preferida, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor constitutivo es el promotor EFS.

En una realización preferida, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor constitutivo es el promotor PGK.

En una realización preferida, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor constitutivo es el promotor EF1alpha.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque dicho promotor o combinación de promotor/potenciador es un promotor inducible.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor es inducible tras la diferenciación de dicha célula después de la administración.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor es un promotor específico de inflamación, preferentemente en la que dicho promotor se induce por mediadores inflamatorios o citocinas y/o se induce cuando la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente entra en proximidad al tejido inflamado.

Las formas inducibles del promotor se diseñan para presentar expresión específica de inflamación y/o localizada de la proteína Klotho. En combinación con las propiedades de migración dirigida y/o de migración de las MSC, se consigue un efecto sinérgico, de modo que se expresa o produce muy poca proteína Klotho en zonas del organismo del sujeto distintas del tejido u órgano enfermo.

En otras realizaciones, la expresión de Klotho se produce en MSC administradas en una ubicación distinta del sitio de la enfermedad y la proteína se transporta a través del sistema vascular al área de la enfermedad dentro del paciente.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor es el promotor Tie2.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor es el promotor RANTES.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque el promotor es el promotor HSP70.

Fue sorprendente, a la luz de la técnica anterior, que la expresión de los promotores inducibles mencionados en el presente documento condujera a una expresión suficiente de la proteína terapéutica Klotho tras un estímulo apropiado en el sitio de inflamación. Los promotores proporcionados en el presente documento muestran propiedades inducibles adecuadas para una expresión rápida y fuerte de Klotho tras entrar en proximidad con tejido inflamado.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque dicha célula comprende adicionalmente (iii) un gen marcador de selección unido operativamente a (iv) un promotor constitutivo o una combinación de promotor/potenciador.

En una realización, la célula modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque la región codificante de Klotho codifica una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de acuerdo con una de las SEQ ID NO 6 a 10, en la que la región codificante de Klotho preferentemente comprende o consiste en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO 1 a 5.

En otras realizaciones, la región codificante de Klotho codifica una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de acuerdo con una de las SEQ ID NO 6 a 10, o una secuencia de al menos un 70 % de identidad de secuencia, o al menos un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % de identidad de secuencia, con una de las SEQ ID NO 6 a 10,

En una realización, la célula modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque la región codificante de Klotho codifica una forma secretada de la proteína Klotho. Ventajosamente, la forma secretada de Klotho es particularmente eficaz terapéuticamente cuando se expresa mediante células madre mesenquimatosas.

En una realización, la célula modificada genéticamente como se describe en el presente documento se caracteriza porque la forma secretada de la proteína Klotho comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70 %, preferentemente de al menos un 80 %, un 85 %, un 90 % o al menos un 95 % con la SEQ ID NO 8. Se prefiere en particular que la proteína Klotho secretada tenga una secuencia establecida por la SEQ ID No 8 o sea funcionalmente análoga a una proteína con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 8.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento para su uso como medicamento.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque dicha célula se administra introduciendo un número terapéuticamente eficaz de células en el torrente sanguíneo de un paciente.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza por introducir un número terapéuticamente eficaz de dichas células por vía subcutánea. Adicionalmente, puede preferirse para este fin que las MSC-Klotho estén encapsuladas por una matriz biocompatible y se trasplanten junto con la matriz, preferentemente por vía subcutánea. En una realización la invención se refiere a la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento para su uso en aplicaciones cosméticas o cirugía plástica, por ejemplo, mediante la introducción de un número eficaz de dichas células por vía subcutánea o por vía intradérmica para mejorar la tersura o la blancura de la piel (reducción de arrugas).

En una realización de la invención, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento tiene por objeto su uso en aplicaciones cosméticas o cirugía plástica, tal como mediante la introducción de un número eficaz de dichas células por vía subcutánea o por vía intradérmica para aumentar el volumen de la piel (reducción de arrugas).

En una realización de la invención, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento tiene por objeto su uso para tratar la pérdida de cabello mediante la introducción de un número eficaz de células MSC-Klotho por vía subcutánea o por vía intradérmica.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza por introducir un número terapéuticamente eficaz de dichas células a un sujeto dentro de una matriz biocompatible.

Son materiales preferidos para la matriz biocompatible agarosa, carragenano, alginato, quitosano, goma gellan, ácido hialurónico, colágeno, celulosa y sus derivados, gelatina, elastina, resina epoxi, resinas foto reticulables, poliacrilamida, poliéster, poliestireno y poliuretano o polietilenglicol (PEG). Se prefiere adicionalmente que la matriz biocompatible sea una matriz de hidrogel semipermeable y las Klotho-MSK estén atrapadas por dicha matriz. Ventajosamente, la matriz biocompatible permite una difusión eficiente de nutrientes, oxígenos y otras biomoléculas para garantizar una viabilidad duradera de las Klotho-MSK, inmovilizando al mismo tiempo las células. De este modo, las Klotho-MSK pueden concentrarse en ubicaciones preferidas dentro del sujeto. Por ejemplo, las Klotho-MSK pueden trasplantarse por vía subcutánea y/o en la proximidad de regiones enfermas del sujeto, es decir, el riñón para el tratamiento de enfermedades renales. Es sorprendente que mediante la introducción de Klotho-MSK encapsuladas, las células funcionan de manera particularmente eficiente como biobombas y proporcionan un alto nivel de Klotho terapéutica al sujeto. En primer lugar, la matriz biocompatible permite la liberación de Klotho. En segundo lugar, la concentración elevada de Klotho-MSK dentro de la microencapsulación promueve un mecanismo de retroalimentación que da como resultado la producción aumentada de Klotho en comparación con las Klotho-MSK que migran individualmente. Por tanto, la administración de Klotho-MSK microencapsuladas constituye un tratamiento beneficioso particular de enfermedades que se benefician de niveles elevados estables de Klotho.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la célula se administra por vía intratecal. Para este fin, se prefiere que se introduzca un número terapéuticamente eficaz de Klotho-MSK en el canal espinal, preferentemente en el espacio subaracnoideo del sujeto. De este modo, las Klotho-MSK son capaces de alcanzar el líquido cefalorraquídeo. Las Klotho-MSK administradas por vía intratecal presentan una viabilidad sorprendentemente alta y permiten una provisión continua particular de proteína Klotho terapéuticamente eficaz a la región cerebral de un sujeto. Por tanto, se prefiere que las Klotho-MSK se administren por vía intratecal para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Mucho más preferentemente, las Klotho-MSK se administran por vía intratecal para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson y/o esquizofrenia.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque se administra al menos una vez al mes, preferentemente al menos una vez a la semana. La administración de Klotho-MSK con la periodicidad preferida demostró ser adecuada para mantener niveles terapéuticamente eficaces de Klotho durante todo el tratamiento del sujeto.

La administración aislada o repetida puede conducir a efectos beneficiosos, por lo que se prefiere la administración prolongada o continua, por ejemplo, una administración a largo plazo. Un ejemplo de dicha aplicación a largo plazo es que las MSC se administran al paciente en múltiples eventos, por ejemplo, una vez a la semana o una vez al mes, durante al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses, al menos once meses, al menos un año, al menos dos años o al menos tres años, o de forma duradera. La administración puede, por ejemplo, realizarse una vez al día, una vez a la semana, una vez cada 7 a 14, o de 7 a 21 días, o una vez al mes o una vez cada dos meses, durante un período de tiempo como se ha mencionado anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento para su uso como medicamento en el tratamiento de una enfermedad.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza por que la enfermedad es cáncer.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad es fibrosis de órganos.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad es insuficiencia renal.

En un aspecto, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad se asocia a o es provocada por un cambio relacionado con la edad en la fisiología o función de un órgano o sistema de órganos.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad es o se asocia a arterioesclerosis.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad es demencia.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad es diabetes mellitus.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad es una enfermedad pulmonar.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como se describe en el presente documento para su uso como medicamento en el tratamiento de un trastorno inflamatorio.

En realizaciones adicionales, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad inflamatoria es vasculitis, nefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y/o enfermedad de injerto contra hospedador.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente como

se describe en el presente documento para su uso como medicamento en el tratamiento de fibrosis crónica. En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad fibrótica inflamatoria y/o crónica es del riñón, el hígado y/o el colon de un sujeto. Fue sorprendente que la expresión localizada de Klotho en regiones fibróticas pudiese conducir a un efecto terapéutico potenciado. Las MSC podrían mostrar propiedades migratorias inesperadas hacia el tejido fibrótico y, a través de la expresión de Klotho, conducir a una reducción en la formación de tejido fibrótico.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque dicha célula se administra introduciendo un número terapéuticamente eficaz de dichas células en el torrente sanguíneo de un paciente, consiguiendo de este modo la entrega de la proteína Klotho expresada a partir de dichas células por vía local en regiones de enfermedad y/o inflamación. La administración de las MSC de la presente invención también puede tener lugar a través de vías de entrega que incluyen la inhalación, la inyección endoscópica de tejido, la inyección de tejido mediada por catéter, la inyección de líquido cefalorraquídeo, la inyección intraperitoneal, la inyección subcutánea, la inyección intramuscular, opcionalmente en combinación con la introducción de dichas células en el torrente sanguíneo de un paciente.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque la enfermedad que se ha de tratar es una enfermedad neurodegenerativa.

En una realización de la invención, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer (EA).

En una realización de la invención, la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis múltiple (EM).

En una realización de la invención, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Huntington.

En una realización de la invención, la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En una realización de la invención, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Parkinson.

En una realización de la invención, la enfermedad neurodegenerativa es esquizofrenia.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa a través de la administración de las células modificadas genéticamente que se describen en el presente documento que comprenden un transgén de Klotho. La administración puede proporcionarse por vía sistémica, tal como por vía intravenosa, debido a la capacidad de las MSC para atravesar la barrera hematoencefálica. Los métodos alternativos de administración, tales como inyecciones epidurales u otros modos de administración que no requieren el paso de la barrera hematoencefálica, están incluidos en la invención.

En particular, el enfoque terapéutico está destinado a pacientes en etapa precoz con enfermedad neurodegenerativa que no ha progresado a etapas graves o tardías de la enfermedad.

Estudios anteriores han descrito un perfil de seguridad suficiente con respecto a la administración de las MSC a pacientes con EM o ELA. También se han descrito efectos inmunomoduladores de las MSC (Karussis et al., *Arch Neurol.* 2010 67 (19), 1187). Estos efectos beneficiosos podrían potenciarse mediante el uso de un transgén de Klotho en las MSC que se describen en el presente documento.

Existen indicaciones adicionales de que Klotho puede mostrar potencial terapéutico en el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa. Se ha sugerido que los potenciadores de molécula pequeña de la función de Klotho muestran una función terapéutica en el tratamiento de la EM u otras enfermedades neurodegenerativas (Abraham et al., *Future Med Chem*, 4 de septiembre de 2012: 13, 1671), klotho se ha vinculado anteriormente a la mielinización del sistema nervioso central (Chen et al., *J Neurosci.* enero de 2013 33 (5): 1927) y se encuentran niveles reducidos de klotho en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Semba et al., *Neurosci. Lett.* 13 de enero de 2014; 558: 37). A pesar de estas sugerencias, el uso de un transgén de Klotho en MSC para el tratamiento de estas afecciones médicas representa un resultado sorprendente teniendo en cuenta las dificultades y la baja expectativa de éxito en la administración de productos terapéuticos transgénicos a través de terapia celular. Sorprendentemente, la Klotho entregada por vía local a través de la expresión transgénica de un vehículo de MSC celular conduce a un posible efecto terapéutico contra la enfermedad neurodegenerativa, cuando dichas MSC se administran por vía sistémica (tal como a través de inyecciones iv) o por vía local (tal como a través de inyección epidural o craneal).

Hay diversos ensayos disponibles para el experto con el fin de evaluar la enfermedad neurodegenerativa y, por tanto, también son adecuados para evaluar el posible efecto terapéutico de las klotho-MSC que se describen en el presente documento. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de atención, que comprenden ensayos de atención previa, prepulso o inhibición de interrogación, ensayos de atención tales como orientación de interrogación, respuestas de opción múltiple, tareas de reacción en serie, ensayos de ir/no ir o ensayos cognitivos, incluyendo la discriminación de objetos de interrogación, transmisión social de preferencias alimentarias, ensayos de patrones transversales o

ensayos de aprendizaje y memoria, tales como ensayos asociativos, por ejemplo, evitación pasiva de interrogación, evitación activa de una o dos vías o ensayos espaciales/contextuales, que comprenden el laberinto de brazos radiales, o el laberinto de agua de morris, o respuestas emocionales condicionales, tales como ensayos de aversión al gusto condicionada, sobresalto potenciado, o condicionamiento por miedo.

5 En una realización preferida, la presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades del corazón y enfermedades renales a través de la administración de las células modificadas genéticamente que se describen en el presente documento que comprenden un transgén de Klotho. Estos dos grupos de numerosas indicaciones médicas están vinculados por la característica especial de los depósitos de sal o calcificación, en las arterias y venas de
10 pacientes particulares. Klotho está implicada en el metabolismo del fosfato y, por tanto, en el procesamiento de sales en el cuerpo de sujetos mamíferos. En determinados sujetos, las sales de fosfato o calcio no se procesan correctamente y esto conduce al depósito de sales en las arterias y enfermedades arteriales, oclusivas o cardiovasculares asociadas. Dichas enfermedades pueden caracterizarse por el "endurecimiento" de las arterias.

15 Por tanto, un objeto de la invención es el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, trastornos circulatorios, enfermedades arteriales y/o afecciones isquémicas obstructivas u oclusivas o ictus, preferentemente enfermedades cardíacas coronarias o enfermedades obstructivas arteriales periféricas, aterosclerosis y/o esclerosis inducida por trasplante; una enfermedad oclusiva cerebral o enfermedad oclusiva renal.

20 Sorprendentemente, los sujetos con disfunción renal, en particular aquellos en los que la detección de creatina no es capaz de indicar la presencia de dicha disfunción renal, tienen un mayor riesgo de sufrir las enfermedades cardíacas o isquémicas que se describen en el presente documento.

25 En una realización, la presente invención se refiere al tratamiento de la sepsis a través de la administración de las MSC modificadas con Klotho como se describen en el presente documento.

En una realización, la presente invención se refiere al tratamiento de la disfunción eréctil a través de la administración de las MSC modificadas con Klotho como se describen en el presente documento. Se sabe que Klotho desempeña una función en la regulación del monóxido de nitrógeno (NO), influyendo por tanto potencialmente en la función eréctil.

30 En una realización, las células madre mesenquimatosas modificadas genéticamente para su uso como medicamento se caracterizan porque la enfermedad es un cambio relacionado con la edad de los órganos o los sistemas de órganos. En el presente documento también se desvela el uso médico de las MSC que se describen en el presente documento que se refiere al tratamiento del envejecimiento como tal.

35 En el presente documento se desvela que la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente se usa como medicamento para tratar y/o prevenir el envejecimiento o la senescencia. Es sorprendente que mediante la administración de Klotho-MSC los procesos de envejecimiento biológico se puedan ralentizar, revertir y/o inhibir eficazmente.

40 Se sospecha que Klotho tiene propiedades antienvjecimiento positivas. Sin embargo, las MSC modificadas genéticamente que expresan Klotho presentan una función antienvjecimiento particularmente eficaz puesto que las Klotho-MSC se dirigen a células, tejidos y/u órganos de un sujeto afectado por el envejecimiento biológico. De este modo, las Klotho-MSC proporcionan dosis terapéuticamente eficaces por vía local de Klotho a las regiones afectadas por el envejecimiento. Además, las Klotho-MSC conducen al restablecimiento y/o al rejuvenecimiento de la población
45 celular del sujeto y, en particular, de la población de células madre del sujeto. El efecto terapéutico de Klotho hacia la senescencia aumenta en un grado sorprendente, cuando se expresa por MSC modificadas genéticamente.

50 En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza por que el sujeto es humano.

En una realización, las células madre mesenquimatosas modificadas genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracterizan porque dichas células modificadas genéticamente son
55 alógenas con respecto al sujeto.

En una realización, la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento como se describe en el presente documento se caracteriza porque dichas células modificadas genéticamente son autólogas con respecto al sujeto.

60 En un aspecto adicional de la invención, las MSC como se describen en el presente documento pueden comprender un ácido nucleico exógeno que codifica un ligando de quimiocina en combinación con secuencias de ácido nucleico adecuadas para la expresión de dicho ligando. Las secuencias codificantes de quimiocinas pueden estar presentes en la misma molécula de ácido nucleico exógeno que codifica Klotho o en un ácido nucleico exógeno separado. Puede haber múltiples construcciones de ácido nucleico o casetes integrados presentes en las MSC de la presente invención,
65 portando, cada uno, uno o más genes de interés, por ejemplo, genes terapéuticos, tales como Klotho u otros genes implicados en la movilización de las células, tales como una quimiocina. Por tanto, la invención se refiere a las células

mesenquimatosas que se describen en el presente documento, en las que el ácido nucleico exógeno codifica preferentemente una quimiocina inflamatoria. Dichas quimiocinas son conocidas por un experto. Los ejemplos de quimiocinas inflamatorias se refieren a CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 y CXCL10, CXCL1, CXCL2.

- 5 La invención se refiere adicionalmente a un vector de ácido nucleico que comprende una región que codifica una proteína Klotho, estando dicha región operativamente unida a un promotor o combinación de promotor/potenciador. En realizaciones preferidas, el promotor o la combinación de promotor/potenciador es uno de los mencionados anteriormente.
- 10 La invención también se refiere a un método de entrega de una proteína Klotho a una célula o a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, en el contexto de un uso médico de una proteína Klotho, que comprende administrar el vector de ácido nucleico como se describe en el presente documento a una célula o sujeto, y/o administrar una MSC genéticamente modificada que comprende el vector de ácido nucleico a un sujeto con una o más de las afecciones médicas que se desvelan en el presente documento. La invención también se refiere a un método para la
- 15 transformación genética de una MSC, que comprende el tratamiento de una MSC con un vector de ácido nucleico como se desvela en el presente documento que codifica una proteína Klotho.

Descripción detallada de la invención

- 20 Las "células mesenquimatosas" que se desvelan en el presente documento (también denominadas en algunas realizaciones "células madre mesenquimatosas" o "MSC") pueden dar lugar a tejido conjuntivo, hueso, cartílago y células de los sistemas circulatorio y linfático. Las células madre mesenquimatosas se encuentran en el mesénquima, la parte del mesodermo embrionario que consiste en células no especializadas sueltas, fusiformes o estrelladas. Como se usa en el presente documento, las células madre mesenquimatosas incluyen, sin limitación, células madre CD34-
- 25 negativas.

En una realización de la invención, las células mesenquimatosas son células adherentes al plástico, de tipo fibroblasto, definidas en algunas realizaciones como células estromales mesenquimatosas multipotentes y también incluyen células CD34-

- 30 Para evitar cualquier duda, la expresión célula mesenquimatosas abarca células estromales mesenquimatosas multipotentes que también incluyen una subpoblación de células mesenquimatosas, MSC y sus precursores, cuya subpoblación está compuesta de células de autorrenovación multipotentes o pluripotentes con capacidad de diferenciación en múltiples tipos celulares *in vivo*.

- 35 Como se usa en el presente documento, célula CD34-negativa indicará una célula que carece de CD34, o que expresa únicamente niveles insignificantes de CD34, en su superficie. Se describen células CD34-negativas y métodos para aislar dichas células, 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.

- 40 Las células mesenquimatosas pueden diferenciarse a partir de células madre hematopoyéticas (HSC) mediante varios indicadores. Por ejemplo, se sabe que las HSC flotan en cultivo y no se adhieren a superficies plásticas. Por el contrario, las células mesenquimatosas se adhieren a superficies plásticas. Las células mesenquimatosas CD34-negativas de la presente invención son adherentes en cultivo.

- 45 Las célula o células modificadas genéticamente que se describen en el presente documento pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si tienen que administrarse en forma sólida, líquida o de aerosol, y si tienen que ser estériles para dichas vías de administración como inyección. La presente invención puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleuraleal, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intramuscular,
- 50 intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, por vía oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que riega células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas) o por otro método o cualquier combinación de los anteriores, como sabría un experto en la materia (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990).
- 55

- La presente invención abarca el tratamiento de un paciente introduciendo un número terapéuticamente eficaz de células en el torrente sanguíneo de un sujeto. Como se usa en el presente documento, "introducir" células "en el
- 60 torrente sanguíneo de un sujeto" incluirá, sin limitación, introducir dichas células en una de las venas o arterias del sujeto por inyección. Dicha administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados. Se prefiere una única inyección, pero pueden ser necesarias inyecciones repetidas a lo largo del tiempo (por ejemplo, trimestralmente, semestralmente o anualmente) en algunos casos. Dicha administración también se realiza preferentemente usando una mezcla de células CD34-negativas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, 0,01-0,1 M y preferentemente tampón fosfato 0,05 M o solución salina al
- 65

0,8 %, así como medios de crioconservación patentados usados habitualmente.

La administración también puede producirse de forma local, por ejemplo, por inyección en un área del cuerpo del sujeto en la proximidad a una enfermedad tumoral. Se ha demostrado que las MSC migran hacia tejido canceroso. De todas formas, la administración local de las células como se describe en el presente documento puede dar lugar a niveles elevados de las células en su sitio de acción.

Adicionalmente, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones, mucho más preferentemente soluciones acuosas. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones y suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, solución de Ringer con dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de líquidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos tales como solución de Ringer con dextrosa, los basados en solución de Ringer con dextrosa y similares. Los líquidos usados habitualmente para administración i.v. se encuentran, por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Ed., pág. 808, Lippincott Williams S- Wilkins (2000). También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Como se usa en el presente documento, un "número terapéuticamente eficaz de células" incluye, sin limitación, las siguientes e intervalos de cantidades: (i) de aproximadamente 1×10^2 a aproximadamente 1×10^8 células/kg de peso corporal; (ii) de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^7 células/kg de peso corporal; (iii) de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^6 células/kg de peso corporal; (iv) de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^5 células/kg de peso corporal; (v) de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^6 células/kg de peso corporal; (vi) de aproximadamente 5×10^4 a aproximadamente $0,5 \times 10^5$ células/kg de peso corporal; (vii) aproximadamente 1×10^3 células/kg de peso corporal; (viii) aproximadamente 1×10^4 células/kg de peso corporal; (ix) aproximadamente 5×10^4 células/kg de peso corporal; (x) aproximadamente 1×10^5 células/kg de peso corporal; (xi) aproximadamente 5×10^5 células/kg de peso corporal; (xii) aproximadamente 1×10^6 células/kg de peso corporal; y (xiii) aproximadamente 1×10^7 células/kg de peso corporal. Los pesos corporales humanos previstos incluyen, sin limitación, aproximadamente 5 kg, 10 kg, 15 kg, 30 kg, 50 kg, aproximadamente 60 kg; aproximadamente 70 kg; aproximadamente 80 kg, aproximadamente 90 kg; aproximadamente 100 kg, aproximadamente 120 kg y aproximadamente 150 kg. Estos números se basan en experimentos preclínicos en animales y en ensayos en seres humanos y protocolos convencionales del trasplante de células madre hematopoyéticas CD34+. Las células mononucleares (incluyendo células CD34+) habitualmente contienen entre 1:23000 a 1:300000 células CD34-negativas.

Como se usa en el presente documento, "tratar" un sujeto afectado con un trastorno significa ralentizar, detener o revertir la progresión del trastorno. En la realización preferida, tratar a un sujeto afectado con un trastorno significa revertir la progresión del trastorno, idealmente hasta el punto de eliminar el propio trastorno. Como se usa en el presente documento, mejorar un trastorno y mediar un trastorno son equivalentes. El tratamiento de la presente invención puede referirse también, o como alternativa, a administración profiláctica de dichas células. Una administración profiláctica de este tipo podría relacionarse con la prevención de cualquier trastorno médico dado, o la prevención del desarrollo de dicho trastorno, por lo que prevención o profilaxis no debe interpretarse en sentido estricto en todas las situaciones como prevención absoluta. La prevención o profilaxis también puede referirse a una reducción del riesgo de que un sujeto desarrolle cualquier afección médica dada, preferentemente en un sujeto en riesgo de dicha afección.

Normalmente, el término "inflamación", como se usa en su sentido reconocido en la técnica se refiere a una respuesta protectora localizada o sistémica provocada por lesión, infección o destrucción de tejidos que sirve para proteger al sujeto de un agente perjudicial y al tejido lesionado. La inflamación se caracteriza preferentemente por fenestración de la microvasculatura, filtración de los elementos de la sangre a los espacios intersticiales y migración de leucocitos al tejido inflamado, que puede dar lugar a una secuencia incontrolada de dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón y pérdida de función.

La inflamación puede clasificarse como aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del organismo a un estímulo dañino y se consigue mediante el movimiento aumentado de plasma y leucocitos (especialmente granulocitos) desde la sangre a los tejidos lesionados. Una cascada de eventos bioquímicos se propaga y madura la respuesta inflamatoria, implicando el sistema vascular local, el sistema inmunitario y diversas células dentro del tejido lesionado. La inflamación prolongada, conocida como inflamación crónica, da lugar a un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el sitio de inflamación y se caracteriza por destrucción y curación simultánea del tejido desde el proceso inflamatorio.

En algunas realizaciones de la invención, las MSC como se describen en el presente documento migran hacia nichos fisiológicos afectados por una patología, tales como zonas de inflamación, para conferir su efecto terapéutico, por ejemplo, de una manera local.

Como se usa en el presente documento, "migración celular" pretende indicar el movimiento de una célula hacia una

señal química o física particular. Las células con frecuencia migran en respuesta a señales externas específicas, incluyendo señales químicas y señales mecánicas. La quimiotaxis es un ejemplo de migración celular respecto a la respuesta a un estímulo químico. Los ensayos de quimiotaxis *in vitro* tal como los ensayos en cámara de Boyden pueden usarse para determinar si se produce migración celular en cualquier célula dada. Por ejemplo, las células de interés pueden purificarse y analizarse. Los ensayos de quimiotaxis (por ejemplo, de acuerdo con Falk et al., 1980 *J. Immuno. Methods* 33:239-247) pueden realizarse usando placas donde se ubica una señal química particular con respecto a las células de interés y después se recogen y analizan las células que han migrado. Por ejemplo, los ensayos de cámara de Boyden implican el uso de cámaras aisladas por filtros, usadas como herramientas para la determinación precisa del comportamiento quimiotáctico. El tipo pionero de estas cámaras se construyó por (Boyden (1962) "*The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes*". *J Exp Med* 115 (3): 453). Las células móviles se ubican en la cámara superior, mientras que se rellena un líquido que contiene la sustancia de ensayo en la inferior. El tamaño de las células móviles a investigar determina el tamaño de poro del filtro; es esencial elegir un diámetro que permita la migración activa. Para modelar las condiciones *in vivo*, varios protocolos prefieren la cobertura del filtro con moléculas de matriz extracelular (colágeno, elastina, etc.) La eficiencia de las mediciones puede aumentarse mediante el desarrollo de cámaras de múltiples pocillos (por ejemplo, NeuroProbe), donde se evalúan 24, 96, 384 muestras en paralelo. La ventaja de esta variante es que se ensayan varios análogos en condiciones idénticas.

Como alternativa, pueden obtenerse muestras tisulares de sujetos (por ejemplo, modelos de roedor) después del trasplante de las células y ensayarse para la presencia de las células de interés en tipos tisulares particulares. Dichos ensayos pueden ser de naturaleza molecular, que identifica células basadas en la secuencia de ácido nucleico, o de naturaleza histológica, que evalúa células basándose en marcas fluorescentes después del marcaje del anticuerpo. Dichos ensayos son particularmente útiles para evaluar el injerto de células trasplantadas. Los ensayos para injerto también pueden proporcionar información sobre la migración celular, ya que en algún grado el injerto depende de la localización celular antes del injerto.

En algunas realizaciones de la invención, las MSC como se describen en el presente documento se injertan en nichos fisiológicos afectados por una patología, tales como zonas de inflamación, para conferir su efecto terapéutico, por ejemplo, de una manera local.

Como se usa en el presente documento, "injerto" se refiere al proceso de incorporación de tejido o células injertadas o trasplantadas en el organismo del hospedador. Injerto también puede referirse a la integración de células trasplantadas en tejido hospedador y su supervivencia y en algunas condiciones diferenciación en estados de células que no son madre.

Las técnicas para evaluar el injerto y, de este modo, en algún grado tanto la migración como la biodistribución de las MSC, pueden abarcar métodos *in vivo* o *ex vivo*. Los ejemplos de métodos *in vivo* incluyen bioluminiscencia, por la que las células se transducen para que expresen luciferasa y después pueden tomarse imágenes a través de su metabolismo de luciferina que produce emisión de luz; fluorescencia, por la que las células se ubican con un tinte fluorescente o se transducen para que expresen un indicador fluorescente del que después pueden tomarse imágenes; marcaje de radionúclidos, donde las células se cargan con radionúclidos y se localizan con centelleografía, tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía de emisión monofotónica (SPECT); e imágenes de resonancia magnética (MRI), en la que las células cargadas con compuestos paramagnéticos (por ejemplo, nanopartículas de óxidos de hierro) se rastrean con un analizador de MRI. Los métodos *ex vivo* para evaluar la biodistribución incluyen PCR cuantitativa, citometría de flujo y métodos histológicos. Los métodos incluyen seguimiento de células marcadas de forma fluorescente; hibridación *in situ*, por ejemplo, para cromosomas Y y para secuencias ALU específicas humanas; y tinción histoquímica para proteínas específicas de especie o introducidas genéticamente tales como β -gactosidasa bacteriana. Estos métodos inmunohistoquímicos son útiles para discernir la ubicación del injerto, pero necesitan la escisión de tejido. Para una revisión adicional de estos métodos y su aplicación, véase Kean et al., *MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation, Stem Cells International*, volumen 2013 (2013).

Las células progenitoras o multipotentes, tales como las células mesenquimatosas de la presente invención, por lo tanto, pueden describirse como vehículos de suministro de proteínas, que posibilitan esencialmente la ubicación y la expresión de productos génicos terapéuticos en particular tejidos o regiones del organismo del sujeto. Dichas células terapéuticas ofrecen el potencial de proporcionar tratamientos celulares para enfermedades que son resistentes a otros tratamientos. Para cada tipo de célula terapéutica, el objetivo final es el mismo: la célula debe expresar un repertorio específico de genes, preferentemente ácidos nucleicos exógenos que codifican productos génicos terapéuticos, modificando de este modo la identidad celular para expresar dicho producto génico y proporcionar un efecto terapéutico, tal como un efecto antiinflamatorio. Las células de la invención, cuando se expanden *in vitro*, representan poblaciones heterogéneas que incluyen múltiples generaciones de descendencia celular mesenquimatosas (estromal), que carecen de la expresión de la mayoría de marcadores de diferenciación como CD34. Estas poblaciones pueden haber retenido un potencial de proliferación limitado y sensibilidad para diferenciación terminal y maduración a lo largo de los linajes mesenquimatosos y no mesenquimatosos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "biobomba" o "fábrica de fármacos" describe preferentemente

la función de las Klotho-MSK como una fuente de producción continua de Klotho. Mediante la administración de Klotho-MSK a un sujeto pueden proporcionarse niveles particularmente estables de Klotho. En este sentido la biobomba, es decir, las Klotho-MSK, permite un suministro continuo que mantiene los niveles de Klotho en un estado particular, por ejemplo, puede compensar por las pérdidas de Klotho por ejemplo debido a la degeneración de la proteína.

Como se usa en el presente documento, "expresión inducible" o "expresión condicionada" se refiere a un estado, múltiples estados o sistema de expresión génica, en el que el gen de interés, tal como el transgén terapéutico, preferentemente no se expresa, o en algunas realizaciones se expresa a niveles insignificantes o relativamente bajos, salvo que haya presencia de una o más moléculas (un inductor) u otro conjunto de condiciones en la célula que permita la expresión génica. Los promotores inducibles pueden referirse a promotores de origen natural que se expresan a un nivel relativamente mayor en condiciones biológicas particulares, o a otros promotores sintéticos que comprenden cualquier elemento inducible dado. Los promotores inducibles pueden referirse a los inducidos por entornos tisulares o microentornos particulares o combinaciones de señales biológicas presentes en entornos tisulares o microentornos particulares o a promotores inducidos por factores externos, por ejemplo, mediante la administración de una molécula farmacéutica pequeña u otra señal aplicada de forma externa.

Como se usa en el presente documento, en "proximidad con" un tejido incluye, por ejemplo, en 5 mm, en 1 mm del tejido, en 0,5 mm del tejido y en 0,25 mm del tejido.

Dado que las células madre pueden mostrar una migración selectiva a diferentes microentornos tisulares en escenarios normales así como de enfermedad, el uso de promotores específicos de tejido ligados a la ruta de diferenciación iniciada en la célula madre reclutada está abarcado en la presente invención y en teoría podría usarse para dirigir la expresión selectiva de genes terapéuticos únicamente en un contexto biológico definido. Las células madre que se reclutan a otros nichos tisulares, pero no experimentan el mismo programa de diferenciación, no deben expresar el gen terapéutico. Esta estrategia permite un grado significativo de control potencial de la expresión selectiva del gen terapéutico dentro de un microentorno definido y se ha aplicado satisfactoriamente para regular la expresión génica terapéutica durante neovascularización. Se divulgan estrategias potenciales para dichas modificaciones génicas en el documento WO 2008/150368 y el documento WO 2010/119039.

Como se usa en el presente documento, una proteína "secretada" se refiere preferentemente a aquellas proteínas capaces de dirigirse al retículo endoplásmico, las vesículas secretoras o el espacio extracelular como resultado de una secuencia señal, así como aquellas proteínas liberadas en el espacio extracelular sin contener necesariamente una secuencia señal. Si la proteína secretada se libera en el espacio extracelular, la proteína secretada puede experimentar un procesamiento extracelular. La liberación en el espacio extracelular puede producirse preferentemente mediante muchos mecanismos, incluyendo la exocitosis y la escisión proteolítica.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" significa cualquier molécula de ácido nucleico, incluyendo, sin limitación, ADN, ARN e híbridos o variantes modificadas de los mismos. Un "ácido nucleico exógeno" o "elemento genético exógeno" se refiere a cualquier ácido nucleico introducido en la célula, que no es un componente del genoma "original" o "natural" de las células. Los ácidos nucleicos exógenos pueden integrarse o no integrarse, o se refieren a ácidos nucleicos transfectados de forma estable.

En el presente documento se desvela cualquier método de entrega de genes dado y preferentemente se refiere a vectores víricos o no víricos, así como métodos bioquímicos o químicos de transfección. Los métodos pueden producir expresión génica estable o transitoria en el sistema usado.

Los virus modificados genéticamente se han aplicado ampliamente para el suministro de genes en células madre. Los vectores víricos preferidos para la modificación genética de las MSC que se describen en el presente documento se refieren a vectores retrovíricos, en particular a vectores retrovíricos gamma. Los retrovirus gamma (a veces mencionados como retrovirus de tipo C de mamífero) es un género hermano al clado de lentivirus, y es un miembro de la subfamilia *Orthoretrovirinae* de la familia de retrovirus. El virus de la leucemia murina (MLV o MuLV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus relacionado con el virus de la leucemia murina xenotrópica (XMRV) y el virus de la leucemia del simio gibbon (GALV) son miembros del género de retrovirus gamma. Un experto en la materia es consciente de las técnicas requeridas para la utilización de retrovirus gamma en modificación genética de MSC. Por ejemplo, pueden emplearse los vectores descritos por Maetzig et al (*Gammaretroviral vectors: biology, technology and application*, 2001, *Viruses* Junio; 3 (6): 677-713) o vectores similares. Por ejemplo, el virus de la leucemia murina (MLV), un retrovirus gamma simple, puede convertirse en un vehículo eficaz de agentes terapéuticos genéticos en el contexto de la creación de MSC modificadas por retrovirus gamma y la expresión de un transgén terapéutico a partir de dichas MSC después del suministro a un sujeto.

Los virus modificados genéticamente se han aplicado ampliamente para el suministro de genes en células madre. Pueden aplicarse adenovirus, o virus de ARN tales como lentivirus, u otros retrovirus. Los adenovirus se han usado para generar una serie de vectores para ingeniería celular por transferencia génica. La generación inicial de vectores de adenovirus se produjo suprimiendo el gen EI (requerido para la replicación vírica) generando un vector con una capacidad de clonación de 4 kb. Una supresión adicional de E3 (responsable de la respuesta inmunitaria del hospedador) permitió una capacidad de clonación de 8 kb. Se han producido generaciones adicionales que abarcan

eliminaciones de E2 y/o E4. 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). Los vectores lentivíricos se generan por eliminación de la secuencia vírica completa con la excepción de las LTR y las señales de empaquetado de acción en cis. Los vectores resultantes tienen una capacidad de clonación de aproximadamente 8 kb. Una característica distintiva de estos vectores respecto a los vectores retrovíricos es su capacidad de transducir células en división y células que no están en división, así como células diferenciadas de forma terminal.

También pueden emplearse métodos no víricos, tales como estrategias alternativas que incluyen transferencia convencional de plásmidos y la aplicación de integración génica dirigida mediante el uso de tecnologías de integrasa o transposasa. Estas representan estrategias para la transformación con vectores que tienen la ventaja de ser eficaces, y con frecuencia específicas de sitio en su integración. Los métodos físicos para introducir vectores en células son conocidos para los expertos en la materia. Un ejemplo se refiere a electroporación, que se basa en el uso de pulsos eléctricos breves, de alto voltaje 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 tipos celulares. Métodos alternativos se refieren al uso de liposomas o dominios de transducción de proteínas. Los métodos apropiados son conocidos para los expertos en la materia y no se entienden como realizaciones limitantes de la presente invención.

El cáncer comprende un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo y es provocado por un crecimiento y una proliferación celulares anormales. Estas células en proliferación tienen el potencial de invadir el tejido circundante y/o extenderse a otras partes del cuerpo donde forman metástasis. A nivel mundial, hubo 14 millones de casos nuevos de cáncer y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en 2012 (*World Cancer Report 2014*). La mayoría de los cánceres son provocados por señales ambientales relacionadas con el consumo de tabaco, la obesidad y las infecciones, entre otros, mientras que aproximadamente el 5-10 % son casos genéticos. Los cánceres pueden clasificarse en subcategorías de acuerdo con la célula de origen. Las subcategorías más comunes son carcinomas de células epiteliales, sarcomas de tejido conectivo y linfomas y leucemias de células hematopoyéticas. El cáncer se asocia a una gran diversidad de síntomas locales y sistémicos y en muchos casos no puede curarse. En vista del alto número de nuevos pacientes con cáncer y de muertes relacionadas con el cáncer, se requieren nuevas estrategias de tratamiento.

El cáncer de acuerdo con la presente invención se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasias o tumores malignos que se encuentran en mamíferos, incluyendo leucemias, sarcomas, melanomas y carcinomas. Son ejemplos de cánceres el cáncer de mama, páncreas, colon, pulmón, no microcítico de pulmón, ovario y próstata.

Las leucemias incluyen, pero no se limitan a, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, leucemia aleucémica, leucemia leucocitémica, leucemia basófila, leucemia de citoblastos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia blastocítica, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia mieloide granulocítica, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia blastocítica, leucemia subleucémica y leucemia celular indiferenciada.

Los sarcomas incluyen, pero no se limitan a un condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abernethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de las partes blandas, sarcoma ameloblástico, sarcoma botriode, sarcoma cloroma, carcinoma coriónico, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estromal, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiple idiopático, sarcoma inmunoblástico de linfocitos B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de linfocitos T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma cerocístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectásico.

Los melanomas incluyen, pero no se limitan a incluir, por ejemplo, melanoma acral-lentiginoso, melanoma amelanocítico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, léntigo, melanoma maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal y melanoma de propagación superficial.

Los carcinomas incluyen, pero no se limitan a carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenocístico, carcinoma adenoideo quístico, carcinoma adenomatoso, carcinoma de corteza adrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescomasas, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma

cerebriforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloidal, comedocarcinoma, carcinoma endométrico, carcinoma cribiforme, carcinoma en coraza, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma ductal, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epidermoide, carcinoma epitelial adenoide, carcinoma exofítico, carcinoma ulcerado, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma de células gigantes, carcinoma glandular, carcinoma de células granulosa, carcinoma de matriz pilosa, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipernefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma in situ, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lenticular, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfopitelial, carcinoma medular, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma molle, carcinoma mucinoso, carcinoma mucoso, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucoso, carcinoma mucoso, carcinoma mixomatodes, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células en avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de células renales del riñón, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoides, carcinoma schneideriano, carcinoma escirroso, carcinoma de escroto, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma microcítico, carcinoma solanoide, carcinoma de células esferoideas, carcinoma de células en husillo, carcinoma de células fusiformes, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma ganglionar, carcinoma telangiectásico, carcinoma telangiectodes, carcinoma de células transicionales, carcinoma tuberoso, carcinoma tuberoso, carcinoma verrugoso y carcinoma vellosos.

Los cánceres adicionales incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón microcíticos, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulinooma pancreático maligno, carcinoma maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas precancerosas, cáncer de testículo, linfomas, cáncer de tiroides, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer cortical suprarrenal y cáncer de próstata.

La fibrosis es el punto final de muchas enfermedades inflamatorias crónicas y se define por una acumulación anormal de componentes de la matriz extracelular. El término fibrosis designa el aumento de tejido conectivo fibroso y material que incluye colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular en el parénquima de los órganos. Esto puede ocurrir en múltiples órganos en respuesta a la estimulación externa como lesión, infección, inflamación. La fibrosis puede cambiar la arquitectura y la función del tejido afectado, lo que puede interferir con la función del órgano y, por tanto, provocar patología e incluso insuficiencia orgánica. Los ejemplos de fibrosis incluyen fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, fibrosis miocárdica y renal, entre otros. Se necesitan nuevas opciones de tratamiento para este grupo de enfermedades para mejorar la condición de los pacientes afectados. La fibrosis de órganos de acuerdo con la presente invención se refiere, pero no se limita a, a una o más de entre fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis endomiocárdica, infarto de miocardio antiguo, fibrosis auricular, fibrosis mediastinal, mielofibrosis de la médula ósea, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva del pulmón, fibrosis sistémica nefrogénica de la piel, enfermedad de Crohn, queloide, esclerodermia/esclerosis sistémica, artrofibrosis, enfermedad de Peyronie, contractura de Dupuytren o capsulitis adhesiva.

A pesar de su lenta progresión, conduce a un mal funcionamiento de los órganos. La fibrosis puede afectar a casi cualquier tejido. Uno de los principales agentes moleculares que inducen la fibrosis es el TGF- β 1, principalmente sintetizado por los linfocitos T durante el proceso de curación. El TGF- β 1 se secreta en una forma latente asociado a LAP (péptido asociado a latencia). LAP se escinde para permitir la activación de TGF- β 1 que puede unirse a sus receptores TGF- β R1 (receptor del factor de crecimiento transformante β 1) y TGF- β R2. Por tanto, existe un gran grupo de TGF- β 1 inactivos en el entorno extracelular. Diversos agentes pueden inducir la activación de TGF- β 1: Las MMP, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS), las citocinas u otros estímulos tales como la radiación ionizante. La unión de TGF- β 1 a sus receptores activa la vía de señalización de Smad (homólogo de "madre contra deca-pentapléjico" pequeña) que induce la transcripción de diversos genes, incluyendo los genes que codifican miembros de la matriz extracelular (colágenos en su mayoría). También activa la diferenciación de fibrocitos hacia fibroblastos funcionales (Benoît et al., *Break-through Stem Cells International* 2014, ID de artículo 340257, 26 páginas).

La expresión insuficiencia renal describe una afección médica en la que el riñón no funciona adecuadamente para cumplir con sus funciones fisiológicas. Las dos formas principales son la enfermedad renal crónica y la lesión renal aguda. La lesión renal aguda se define por una pérdida rápida de la función renal en menos de 3 meses. La enfermedad renal crónica es una enfermedad progresiva asociada a la pérdida gradual de la función renal durante un período de varios meses a años que conduce a la insuficiencia orgánica. Se estima que en los EE.UU., el 16,8 % de los adultos mayores de 20 años se vieron afectados entre 1999 y 2004. Las 3 causas principales de enfermedad renal crónica son la diabetes, la hipertensión y la glomerulonefritis. No se ha demostrado que ningún tratamiento específico reduzca la velocidad de la enfermedad renal crónica y los pacientes en etapa tardía son tratados con una terapia de reemplazo renal costosa que implica diálisis y trasplante. De forma similar, la lesión renal aguda con frecuencia requiere terapia de reemplazo renal. Por tanto, se necesitan estrategias de tratamiento alternativas para curar o retrasar la progresión de la lesión renal aguda y la enfermedad renal crónica.

La insuficiencia renal de acuerdo con la presente invención se refiere, pero no se limita a, a una o más de, lesión renal aguda, enfermedad renal crónica o insuficiencia renal aguda sobre crónica.

5 En individuos de edad avanzada, la función de casi todos los órganos del cuerpo está en disminución debido a cambios relacionados con la edad también en ausencia de patología. Estos cambios pueden deberse a una diversidad de razones incluyendo la pérdida de la función celular específica del órgano o las células específicas del órgano. Por otro lado, la disminución de la función de un órgano puede afectar a la función de otros órganos del cuerpo. Los cambios relacionados con la edad en los órganos hacen que las personas mayores sean menos capaces de soportar el estrés y los estímulos externos, tales como la actividad física, el tratamiento farmacológico, las infecciones y los cambios de temperatura, entre muchos otros. Si el proceso de envejecimiento de los diversos sistemas de órganos del cuerpo pudiera ralentizarse, esto aumentaría la calidad de vida de las personas mayores y beneficiaría a la sociedad en su conjunto.

15 Los cambios relacionados con la edad de los órganos y los sistemas de órganos de acuerdo con la presente divulgación se refieren, pero no se limita a, a uno o más de los cambios relacionados con la edad de los huesos, articulaciones, oídos, músculos, grasa corporal, los ojos, boca, nariz, piel, cerebro, sistema nervioso, médula espinal, corazón, vasos sanguíneos, pulmón, intestino, estómago, colon, esófago, riñón, tracto urinario, órganos reproductivos, mamas, sistema endocrino, médula ósea y sistema inmunitario.

20 Por tanto, las MSC de la presente invención pueden usarse como un agente antienvjecimiento, por ejemplo, en el tratamiento del envejecimiento, por ejemplo, el envejecimiento relacionado con la senescencia. "Envejecimiento relacionado con la senescencia" se refiere a la senescencia, que generalmente significa "envejecer" o "envejecimiento". El envejecimiento biológico es el proceso de cambios acumulativos en la estructura molecular y celular que interrumpe el metabolismo con el paso del tiempo, lo que da como resultado deterioro y muerte. La senescencia ocurre tanto a nivel de todo el organismo (senescencia orgánica) como a nivel de sus células individuales (senescencia celular). El tratamiento de la senescencia (antienvjecimiento) es un aspecto de la presente divulgación. El tratamiento del envejecimiento, o el tratamiento de la senescencia, se relaciona en algunos aspectos con el enlentecimiento, la reversión y/o la inhibición del proceso de envejecimiento.

30 Durante el envejecimiento, la incidencia de afecciones agudas y crónicas, tales como trastornos neurológicos, diabetes, artritis degenerativa e incluso cáncer, aumenta en los individuos, por lo que el envejecimiento se ha denominado el sustrato en el que crecen las enfermedades asociadas a la edad. Por tanto, la divulgación se refiere a métodos profilácticos para prevenir enfermedades asociadas al envejecimiento.

35 Las vías moleculares subyacentes al envejecimiento no se comprenden bien, ya que se observa una gran heterogeneidad individual del proceso de envejecimiento biológico. Se propone que estas diferencias interindividuales derivan de la acumulación de daño estocástico que se contrarresta mediante sistemas de reparación genéticamente codificados y regulados ambientalmente. A nivel de moléculas, la reparación trabaja mediante sistemas enzimáticos, mientras que a nivel celular trabaja mediante replicación y diferenciación para mantener la homeostasis tisular. Sin embargo, el potencial replicativo de las células madre somáticas y adultas se ve limitado por la senescencia celular y las pruebas recientes muestran que contrarrestar la senescencia o retirar las células senescentes retrasa la aparición de patologías asociadas a la edad. Por tanto, la presente divulgación proporciona medios para el tratamiento y/o la prevención y/o la reducción del riesgo de envejecimiento como tal, además de afecciones médicas relacionadas con la edad.

45 El término arterioesclerosis describe el engrosamiento patológico, el endurecimiento y la pérdida de elasticidad de las paredes arteriales que pueden conducir a la estenosis y al posterior suministro insuficiente de sangre de los tejidos corriente abajo dando como resultado isquemia. Este proceso con frecuencia se asocia a calcificación de la pared arterial. Existen diferentes tipos de arterioesclerosis que afectan a diferentes ubicaciones anatómicas y tienen diferentes etiologías. La aterosclerosis es un tipo específico de arterioesclerosis, que se define por la acumulación de glóbulos blancos en la pared arterial y la formación de placas ateromatosas. La aterosclerosis es una enfermedad crónica que puede permanecer asintomática durante períodos de tiempo prolongados hasta que se produce una estenosis de la luz de la arteria afectada. Adicionalmente, las rupturas de las lesiones ateroscleróticas pueden conducir a la formación de trombos y al consiguiente tromboembolismo, lo que puede conducir a infarto/necrosis de tejidos en todas las partes del cuerpo. Son ejemplos drásticos de dichos eventos el infarto de miocardio y el ictus, estos efectos posteriores de la aterosclerosis representan la causa más común de muerte en los países industrializados y, por tanto, se necesitan urgentemente mejores estrategias de tratamiento. La arterioesclerosis de acuerdo con la presente invención se refiere, pero no se limita a, a una o más de, aterosclerosis, arterioesclerosis obliterante y arterioesclerosis de Monckeberg.

60 Las expresiones trastornos circulatorios, enfermedad cardiovascular, afecciones de las arterias o vasos sanguíneos y/o enfermedades o afecciones obstructivas u oclusivas isquémicas se refieren a estados del tejido vascular donde el flujo sanguíneo está, o puede llegar a estar, afectado o alterado con respecto a los niveles normales. Muchas afecciones patológicas pueden conducir a enfermedades vasculares que se asocian a alteraciones en la condición vascular normal de los tejidos y/o sistemas afectados. Los ejemplos de afecciones vasculares o enfermedades vasculares a las que se aplican los métodos de la invención son aquellas en las que la vasculatura del tejido o sistema

afectado es senescente o está alterada de alguna otra forma de manera que el flujo sanguíneo al tejido o sistema se reduce o está en peligro de verse reducido o aumentado por encima de los niveles normales. Se refiere a cualquier trastorno en cualquiera de las diversas partes del sistema cardiovascular, que consiste en el corazón y todos los vasos sanguíneos que se encuentran en todo el cuerpo. Las enfermedades del corazón pueden incluir la arteriopatía coronaria, CC, cardiomiopatía, cardiopatía valvular, enfermedad pericárdica, cardiopatía congénita (por ejemplo, estrechamiento aórtico, defectos septales auriculares o ventriculares) e insuficiencia cardíaca. Las enfermedades de los vasos sanguíneos pueden incluir arterioesclerosis, aterosclerosis, hipertensión, ictus, demencia vascular, aneurisma, enfermedad de las arterias periféricas, claudicación intermitente, vasculitis, incompetencia venosa, trombosis venosa, venas varicosas y linfedema.

Fue un aspecto sorprendente de la presente invención que las MSC que se describen en el presente documento se localizasen *in vivo* en áreas de aterosclerosis después de la administración sistémica. Las MSC se produjeron en un transgén localizado de manera suficiente para proporcionar un efecto terapéutico sin expresión sistémica y no controlada no deseada de dicho transgén.

Enfermedad neurodegenerativa o neurodegeneración es una expresión para afecciones médicas en las que se produce la pérdida progresiva de estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las neuronas. Muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la ELA, el Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington, se producen como resultado de procesos neurodegenerativos. Dichas enfermedades habitualmente se consideran incurables, dando como resultado una degeneración progresiva y/o la muerte de las células neuronales. Hay presente una serie de similitudes en las características de estas enfermedades, vinculando estas enfermedades a nivel subcelular. Algunos de los paralelismos entre los diferentes trastornos neurodegenerativos incluyen el ensamblaje de proteínas atípicas, así como la muerte celular inducida.

La demencia es un grupo de enfermedades cerebrales que provocan una disminución gradual de las funciones cognitivas. La mayoría de estas enfermedades son enfermedades neurodegenerativas crónicas y se asocian a síntomas neuroconductuales y/o neuropsiquiátricos que incapacitan a los pacientes para realizar independientemente actividades de la vida diaria. La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia con 25 millones de personas afectadas en todo el mundo en el año 2000. Se espera que este número aumente a 114 millones de casos en 2050, a menos que surjan enfoques terapéuticos preventivos o neuroprotectores.

La demencia de acuerdo con la presente invención se refiere, pero no se limita a, a una o más de, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia post ictus, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, enfermedad de Huntington y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

La disfunción eréctil es un trastorno multifactorial asociado al envejecimiento y a una diversidad de afecciones orgánicas y psicógenas, incluyendo hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular y depresión. Se cree que el óxido nítrico (NO) es un importante neurotransmisor vasoactivo y mediador químico de la erección del pene. La bioactividad de NO deteriorada es un mecanismo patógeno de la disfunción eréctil. La eficacia de los inhibidores de PDE-5 en el tratamiento de la disfunción eréctil sirve para ilustrar la importancia de la regulación de NO en la función eréctil, puesto que estos agentes contrarrestan la degradación de la GMPc generada por NO. Sin embargo, no todos los pacientes responden a los inhibidores de la PDE-5, de manera que se requieren terapias adicionales (Burnett AL, *J Clin Hypertens*, diciembre de 2006; 8 (12 Supl. 4): 53-62).

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas crónicas que se asocian a altos niveles de azúcar en sangre durante períodos de tiempo prolongados, lo que puede conducir a complicaciones graves que incluyen enfermedades cardiovasculares, ictus, insuficiencia renal, úlceras en los pies y ojos dañados. Los dos subtipos principales son diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2. La diabetes mellitus de tipo 1 se caracteriza por la pérdida de células productoras de insulina en el páncreas. Representa aproximadamente el 10 % de los casos de diabetes en los EE.UU. y Europa, afecta principalmente a niños y con frecuencia se asocia a patologías autoinmunitarias. La diabetes mellitus de tipo 2 se caracteriza por resistencia a la insulina. La diabetes mellitus representa un problema de salud masivo con más de 350 millones de personas afectadas en 2013 en todo el mundo.

La diabetes mellitus de acuerdo con la presente invención se refiere, pero no se limita a, a una o más de, diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2, diabetes gestacional y diabetes autoinmunitaria latente de adultos.

Las enfermedades autoinmunitarias son un grupo de enfermedades provocadas por una respuesta inmunitaria anormal del cuerpo contra moléculas o células específicas que normalmente están presentes en el cuerpo y, por tanto, deberían ser toleradas por el sistema inmunitario en condiciones fisiológicas. La reacción patológica del sistema inmunitario del cuerpo contra sus propios componentes puede conducir a afecciones físicas graves. Una gran cantidad de enfermedades se han identificado como provocadas por reacciones autoinmunitarias y se sospecha que muchas patologías de etiología poco clara tienen componentes autoinmunitarios y, por tanto, se denominan enfermedades relacionadas con la autoinmunidad. Por tanto, se necesita con urgencia el desarrollo de estrategias de tratamiento eficaces y específicas para este grupo de enfermedades.

Las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades relacionadas con la autoinmunidad de acuerdo con la

presente invención se refieren, pero no se limita a, a una o más de, encefalomiелitis diseminada aguda, leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, nefritis anti-GBM/anti-TBM, síndrome antifosfolípido (APS), angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, disautonomía autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, miocarditis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, neuropatías axónicas y neuronales, enfermedad de Baló, enfermedad de Behçet, pénfigo ampolloso, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, osteomielitis crónica recurrente multifocal, síndrome de Churg-Strauss, pénfigoide cicatricial/pénfigoide benigno de las mucosas, enfermedad de Crohn, síndrome de Cogan, enfermedad de las aglutininas frías, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis coxsackie, enfermedad de CREST, crioglobulinemia mixta esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, esofagitis eosinófila, fascitis eosinofílica, eritema nudoso, encefalomiелitis alérgica experimental, síndrome de Evans, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes, miocarditis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, miositis de cuerpos de inclusión, cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil (diabetes de tipo 1), miositis juvenil, síndrome de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis lefosa, enfermedad de IgA lineal (EAL), lupus (LES), enfermedad de Lyme (crónica), enfermedad de Meniere, poliangiitis microscópica, enfermedad mixta del tejido conectivo, úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, esclerosis múltiple, miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica, neutropenia, pénfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, reumatismo palindrómico, trastornos neuropsiquiátricos autoinmunitarios pediátricos asociados a estreptococo, degeneración cerebelosa paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, pars planitis (uveítis periférica), pénfigo, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome POEMS, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunitarios de tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome postinfarto de miocardio, síndrome postpericardiotomía, dermatitis por progesterona, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis pulmonar idiopática, pioderma gangrenoso, Aplasia pura de células rojas, fenómeno de Raynaud, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, síndrome de Reiter, policondritis recidivante, síndrome de las piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, Síndrome de Schmidt, escleritis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, autoinmunidad del esperma y testicular, síndrome de persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda (EBS), síndrome de Susac, oftalmia del simpático, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica, síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, diabetes de tipo 1, colitis ulcerosa, enfermedad diferenciada del tejido conectivo, uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculobulosa, vitíligo o granulomatosis de Wegener.

En realizaciones preferidas, la enfermedad pulmonar se selecciona entre una enfermedad pulmonar inflamatoria o restrictiva, una infección del tracto respiratorio, un tumor maligno o benigno del pulmón y/o una enfermedad o afección vascular pulmonar.

Ejemplos

La invención se describe además por los siguientes ejemplos. Estos no pretenden limitar el alcance de la invención. Los ejemplos experimentales se relacionan con el desarrollo de tecnología que permite la expresión de Klotho a partir de MSC modificadas genéticamente. Los ejemplos se relacionan adicionalmente con ensayos en modelos adecuados para someter a ensayo el tratamiento de diversas afecciones médicas.

En realizaciones preferidas, los ejemplos se refieren al desarrollo preclínico de un nuevo producto de terapia génica que combina los múltiples efectos beneficiosos de Klotho en el contexto de la patología con las propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimatosas (MSC) humanas primarias para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Preparación de células madre mesenquimatosas humanas:

Se aíslan células humanas de médula ósea por adherencia a plástico y se cultivan en medio de crecimiento, por ejemplo, FBS que contiene DMEM como se describe por Pittenger, M.F. (2008) *Mesenchymal stem cells from adult bone marrow*, En D.J. Prockop, D. G. Phinney, B.A. Bunnell, *Methods in Molecular Biology* 449, Mesenchymal stem cells, Totowa: Humana Press). Se aíslan células de ratón de acuerdo con los métodos establecidos. Se conocen en la técnica métodos para el aislamiento de MSC de ratones, por ejemplo, como se describe en Soleimani (*Nat Protocol*. 2009; 4 (1): 102-6) o Zhu (*Nat Protoc*. 2010; 5, 550-560).

Generación de vectores para la expresión de Klotho:

Los casetes de expresión transgénica que comprenden un promotor y una región codificante (por ejemplo, ADNc) para

la expresión del gen de Klotho humana (longitud completa o forma soluble) se construyen usando técnicas de clonación convencionales como se describen en Julia Lodge, Peter Lund, Steve Minchin (2007) *Gene Cloning*, Nueva York: Tylor and Francis Group.

- 5 Los promotores evaluados durante la evaluación se refieren a los promotores inducibles Tie2, RANTES o el promotor HSP70, o los promotores constitutivos CMV o PGK.

En algunas realizaciones, el gen se fusiona con secuencias de marcadores (por ejemplo, proteínas/péptidos marcadores como el marcador hemaglutinina o el marcador HIS) para permitir la detección fácil de la expresión del transgén de Klotho (Hinrik Garoff, 1985, *Annual Review of Cell Biology*, Vol. 1: 403-445). En particular, a continuación se describen ejemplos que han implementado la versión de Klotho marcada con hemaglutinina para la detección de la expresión de Klotho.

15 En algunos ejemplos, el péptido señal del gen Klotho se reemplaza por otras secuencias señal. Además, en algunos ejemplos, pueden emplearse secuencias de genes que estén codificadas para permitir una traducción potenciada. Los ejemplos que incorporan secuencias empleadas de Klotho humana de acuerdo con la SEQ ID NO 2 o 3.

El transgén se inserta después en un sistema de vector adecuado (por ejemplo, vector lentivírico o gamma-retrovírico) mediante técnicas de clonación convencionales. Baum, por ejemplo, describe un vector adecuado (solicitud de Patente EP 1757703 A2). El vector comprende preferentemente un segundo casete transgénico que consiste en un promotor, una secuencia IRES y un gen marcador seleccionable (marcador de superficie celular o gen de resistencia, por ejemplo, el gen *pac* para conferir resistencia a la puromicina) para permitir el enriquecimiento de células modificadas genéticamente más adelante en el proceso (David P. Clark, Nanette J. Pazdernik, 2009, *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution*, Londres: Elsevier).

25

Modificación genética de las células madre mesenquimatosas:

La transducción se realiza con modificaciones como se describen por Murray et al., 1999 *Human Gene Therapy*. 10(11): 1743-1752 y Davis et al., 2004 *Biophysical Journal* Volumen 86 1234-1242. En detalle:
30 se recubren placas de cultivo celular de 6 pocillos (por ejemplo, Corning) con poli-L-lisina (PLL) (por ejemplo, Sigma-Aldrich, P4707-50ML): La solución de PLL (0,01 %) se diluye a una concentración final de entre el 0,0001 % y el 0,001 % con PBS. Se usan 2 ml de PLL diluida para cada pocillo. La placa se incuba al menos durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavan cuidadosamente con PBS.

35 Se añade sobrenadante de vector vírico en un volumen final de 2 ml a cada pocillo recubierto con PLL. El número de partículas debe estar entre 2×10^3 y 1×10^6 por pocillo, lo que dará como resultado una multiplicidad de infección de 0,25 y 10. La placa cargada se centrifuga durante $2000 \times g$, 30 min, 4 °C. Después el sobrenadante se desecha y se siembran 1×10^5 células madre mesenquimatosas por pocillo. Las placas se incuban a 37 ° con CO₂ al 5 % para su uso posterior.

40

Análisis de la expresión transgénica en MSC:

Citometría de flujo:

45 Para demostrar que se expresa la Klotho, se realizan ensayos de citometría de flujo intracelular de MSC. 3 días después de la transducción, el medio de MSC se intercambia con medio que contiene 1 µl de BD Golgi Plug (N.º de cat. 555029) por 1 ml de Medio para enriquecer la Klotho expresada en el aparato de Golgi de las células transducidas.

Las células se incuban durante 16 h a 37 °C y después se inmunotiñen para la expresión del transgén de Klotho. Las MSC se recogen. Las células se permeabilizan usando la solución de permeabilización celular/fijación BD Cytotfix/Cytoperm (Becton Dickinson, 554722) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para permitir la tinción intracelular de la proteína Klotho diana.

50 Se usa un anticuerpo específico de marcador de hemaglutinina marcado con Ficoeritrina (PE) (Milteny, 120-002-687) para la detección de la Klotho expresada. Se tiñen 2×10^5 MSC con 100 µl de anticuerpo (1:75 diluido con solución Perm/lavado, Becton Dickinson, 554723).

60 Como alternativa, se usan anticuerpos directamente dirigidos contra Klotho de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, ProSci 45-810). Las células teñidas se lavan y se resuspenden en PBS. Las células se analizan después en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter).

ELISA para determinar niveles de Klotho en el sobrenadante:

65 Las MSC transducidas se siembran en placas de 6 pocillos (1×10^5 MSC por pocillo). Las MSC transducidas, que llevan el gen de resistencia a la puromicina *pac*, se enriquecen mediante la selección de puromicina. Se añade puromicina (3 µg/ml de medio) al medio y las células se cultivan durante un período de 5 días a 37 °C y CO₂ al 5 %

con intercambios de medio cada 2 días para agotar las células no transducidas del cultivo. A continuación, se usa medio sin puromicina para el cultivo. Las MSC se vuelven a sembrar a un número de células definido de 1×10^5 células por pocillo en una placa de 6 pocillos y se incuban durante 72 h. Se recoge el medio y se usa para el ELISA específico de Klotho para la cuantificación de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, R&D Systems DY5334-05).

La Klotho expresada en MSC protege a las células de la apoptosis inducida por H_2O_2 :

Los mecanismos de defensa desequilibrados contra los antioxidantes o la sobreproducción o incorporación de radicales libres, conducen a la neurodegeneración, por la que las células neuronales sufren pérdida funcional o sensorial en enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo (EO) conduce a un ataque de radicales libres en las células neurales y contribuye a la neurodegeneración; El metabolismo desequilibrado y el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) generan una diversidad de trastornos tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, envejecimiento y muchos otros trastornos neurodegenerativos (Uttara et al., *Curr Neuroparmacol.* Marzo de 2009; 7 (1): 65-7). La capacidad de Klotho para proteger las células del daño provocado por especies reactivas de oxígeno representa un modelo terapéutico útil para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

Hay disponibles marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y han confirmado la creencia de que la ERC es un estado prooxidante. Estudios recientes sugieren que el vínculo entre el estrés oxidativo y la inflamación en la ERC emerge como un proceso clave que contribuye a la patogenia del estrés oxidativo en estos pacientes (Massy et al., *Semin Dial.* julio-agosto de 2009; 22 (4): 405-8). La capacidad de Klotho para proteger las células del daño provocado por especies reactivas de oxígeno representa un modelo terapéutico útil para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

Klotho es capaz de proteger las células de los efectos de las especies reactivas de oxígeno:

Se siembran MSC transducidas y seleccionadas (como se ha descrito anteriormente) y MSC de control no transducidas en placas de 6 pocillos (5000-50000 células por cm^2). Las células se incuban 16 h a $37^\circ C$, $5^\circ C$. Las células transducidas y no transducidas se tratan posteriormente con peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , Roth, N.º de cat. 8070.2) durante un período de 2-8 h. La concentración final de H_2O_2 en el cultivo está entre 10 y 100 μM . Además, muestras seleccionadas de MSC no se tratan con H_2O_2 y sirven como control. Todas las muestras se tripsinizan para separar la MSC de las placas.

La supervivencia de MSC se determina mediante citometría de flujo. Las muestras se someten al kit Dead Cell Apoptosis (ThermoFisher Scientific, V13241) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El kit permite la detección de células muertas y apoptóticas en las muestras mediante tinción con anexina V Alexa Fluor 488 y yoduro de propidio (PI) (Vermes et al. (1995) *Journal of Immunological Methods*, Volumen 184, Número 1, Páginas 39-51). Las muestras se analizan por citometría de flujo. Las MSC que expresan Klotho tratadas con H_2O_2 muestra una mayor supervivencia y una apoptosis reducida en comparación con las MSC nativas tratadas con H_2O_2 .

La Klotho secretada de MSC transducidas protege las células HUVEC de la apoptosis inducida por H_2O_2 :

Klotho es capaz de proteger las células de los efectos de las especies reactivas de oxígeno:

Las MSC transducidas y seleccionadas (como se ha descrito anteriormente) y las MSC de control no transducidas se siembran en placas de 6 pocillos (50000-200000 células por cm^2). Además, muestras seleccionadas de MSC no se tratan con H_2O_2 y sirven como control. Las células se incuban 16-48 h a $37^\circ C$, $5^\circ C$. El sobrenadante se recoge, se filtra (0,25 μm) de las células y se almacena.

Se siembran células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en placas de 6 pocillos (5000-50000 células por cm^2). Las células se incuban durante 16 h a $37^\circ C$ para permitir que las células se fijen a las placas. Las células se tratan con peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , Roth, N.º de cat. 8070.2). La concentración final de H_2O_2 en el cultivo está entre 10 y 100 μM . Se añaden diferentes diluciones del sobrenadante que contiene Klotho y el sobrenadante de control a las células HUVEC (volumen de 2-4 ml). Las muestras se incuban durante 2-8 h. Todas las muestras se tripsinizan para separar las células HUVEC de las placas.

La supervivencia de las células HUVEC se determina mediante citometría de flujo. Las muestras se someten al kit Dead Cell Apoptosis (ThermoFisher Scientific, V13241) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El kit permite la detección de células muertas y apoptóticas en las muestras mediante tinción con anexina V Alexa Fluor 488 y yoduro de propidio (PI) (Vermes et al. (1995) *Journal of Immunological Methods*, Volumen 184, Número 1, Páginas 39-51). Las muestras se analizan por citometría de flujo. Las células HUVEC tratadas con sobrenadante de MSC que expresan Klotho muestran una mayor supervivencia y una apoptosis reducida en comparación con las HUVEC no tratadas, cuando se cultivan en presencia de H_2O_2 .

La Klotho expresada en MSC aumenta la producción de óxido nítrico (NO) en las MSC:

La producción global de óxido nítrico (NO) disminuye en la enfermedad renal crónica (ERC), lo que contribuye a eventos cardiovasculares y una progresión adicional del daño renal. Es probable que las intervenciones que pueden

restaurar la producción de NO reduzcan las complicaciones cardiovasculares de la ERC, así como también disminuyan la tasa de progresión (Baylis, *Am J Physiol Renal Physiol.* enero de 2008; 294 (1): F1-9). La capacidad de Klotho para restaurar los niveles de NO representa un modelo terapéutico útil para el tratamiento de la enfermedad renal.

- 5 Como se analiza en el presente documento, se cree que el óxido nítrico (NO) es un importante neurotransmisor vasoactivo y mediador químico de la erección del pene, por lo que la bioactividad de NO deteriorada es un mecanismo patógeno de la disfunción eréctil. La capacidad de Klotho para restaurar los niveles de NO representa un modelo terapéutico útil para el tratamiento de la disfunción eréctil.
- 10 El óxido nítrico (NO) es un mensajero intercelular que realiza una serie de funciones, incluyendo la neurotransmisión, vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria y modulación de la adhesión de leucocitos. Recientemente se ha demostrado que el NO actúa como una molécula efectora citotóxica potente y desempeña una función importante en la patogenia de la autoinmunidad específica de órganos. El NO también puede modular la respuesta inmunitaria interfiriendo con el equilibrio Th1/Th2 en enfermedades autoinmunitarias (Singh et al., *Immunol Res.* 2000; 22 (1): 1-19).
- 15 La capacidad de Klotho para restablecer los niveles de NO representa un modelo terapéutico útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

Klotho aumenta la producción de NO, un importante mensajero intercelular, en MSC:

- 20 Se siembran MSC transducidas y seleccionadas (como se han descrito anteriormente) y MSC de control no transducidas en placas de 6 pocillos (5000-50000 células por cm²). Las células se incuban durante 48 h a 37 °C/CO₂ al 5 %.

- 25 Para evaluar la producción de NO, se transfieren 100 µl de sobrenadante de cada pocillo de la placa de cultivo a una nueva placa de 96 pocillos. Se añade al sobrenadante la misma cantidad de reactivo de Griess (sulfanilamida al 1 %, diclorhidrato de naftilendiamina al 0,1 % y ácido fosfórico al 2,5 %). Las concentraciones de nitrito en los sobrenadantes se obtienen mediante análisis de regresión lineal de la curva patrón usando diluciones dobles en serie de nitrito de sodio desde 200 mmol/l hasta la 11a dilución. La absorbancia se determina a 540 nm usando un lector de microplacas (Spectramax 190-Molecular Device, Sunnyvale, California). La concentración de NO es mayor en las muestras recogidas de MSC transducidas.

30 **La Klotho secretada de MSC transducidas induce una mayor producción de óxido nítrico en células HUVEC:**

- 35 Se siembran MSC transducidas y seleccionadas (como se han descrito anteriormente) y MSC de control no transducidas en placas de 6 pocillos (5000-50000 células por cm²). Las células se incuban durante 48 h a 37 °C/CO₂ al 5 %. El sobrenadante se recoge, se filtra (0,25 µm) de las células y se almacena.

- 40 Se siembran células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en placas de 6 pocillos (5000-50000 células por cm²). Las células se incuban durante 16 h a 37 °C para permitir que las células se fijen a las placas. Se añaden diferentes diluciones del sobrenadante que contiene Klotho y el sobrenadante de control a las células HUVEC (volumen de 2-4 ml). Las muestras se incuban durante 6-48 h. Para evaluar la producción de NO, se transfieren 100 µl de sobrenadante de cada pocillo de HUVEC de la placa de cultivo a una nueva placa de 96 pocillos. Se añade al sobrenadante la misma cantidad de reactivo de Griess (sulfanilamida al 1 %, diclorhidrato de naftilendiamina al 0,1 % y ácido fosfórico al 2,5 %). Las concentraciones de nitrito en los sobrenadantes se obtienen mediante análisis de regresión lineal de la curva patrón usando diluciones dobles en serie de nitrito de sodio desde 200 mmol/l hasta la 11a dilución. La absorbancia se determina a 540 nm usando un lector de microplacas (Spectramax 190-Molecular Device, Sunnyvale, California). La concentración de NO es mayor en las células HUVEC tratadas con sobrenadante de MSC que expresan Klotho.

50 **La Klotho secretada de MSC transducidas suprime la señalización de TGF-beta en células diana**

- 55 Se siembran MSC transducidas y seleccionadas (como se han descrito anteriormente) y MSC de control no transducidas en placas de 6 pocillos (5000-50000 células por cm²). Las células se incuban durante 48 h a 37 °C/CO₂ al 5 %. El sobrenadante se recoge, se filtra (0,25 µm) de las células y se almacena.

- 60 Las células epiteliales renales NRK52E se tratan con los sobrenadantes recogidos durante 30 min y después se estimulan con TGF-beta (10 ng/ml) durante 30 minutos. Las células se lisan y se usan para el análisis por inmunotransferencia. Para detectar la activación de la cascada de señalización de TGF-beta en las células renales, se usa un anticuerpo contra Smad2 fosforilada (pSmad2) o un anticuerpo que reconoció Smad2 independientemente de su estado de fosforilación (Smad2). Un aumento en la fracción de Smad2 fosforilada en comparación con Smad2 total indica la activación de la señalización de TGF-beta. El sobrenadante que contiene Klotho suprime la activación de la señalización de TGF-beta en comparación con las células tratadas con sobrenadantes desprovistos de Klotho o controles no tratados.

65 **La Klotho secretada de MSC transducidas aumenta la señalización de FGF-23 en células diana**

Se siembran MSC transducidas y seleccionadas (como se han descrito anteriormente) y MSC de control no

transducidas en placas de 6 pocillos (5000-50000 células por cm²). Las células se incuban durante 48 h a 37 °C/CO₂ al 5 %. El sobrenadante se recoge, se filtra (0,25 µm) de las células y se almacena.

Se siembran células 293, que expresan el receptor de FGF, en placas de 6 pocillos (5000 células por cm²) y se incuban durante la noche. El medio se intercambia por sobrenadante que contiene Klotho o sin Klotho y las células se incuban durante 30 min. Después se añade FGF23 de ratón (R179Q) (10 ng/ml) y las células se incuban durante 15 min adicionales. Las células se recogen y se lisan usando tampón de lisis (reactivo de extracción de proteína de mamífero M PER) que contiene inhibidores de fosfatasa y proteinasa (cóctel inhibidor de proteasa de detención, sin EDTA (100X)). La señalización de FGF se determina mediante análisis por inmunotransferencia usando anticuerpo anti-fosfo-FRS2a (p-FRS2a), anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2 (p-ERK1/2) o anticuerpo anti-ERK1/2 (ERK1). El sobrenadante que contiene Klotho activa la señalización de FGF23 en comparación con las células que se tratan con sobrenadantes desprovistos de Klotho o controles no tratados.

Estudios en modelos animales para determinar la función de Klotho cuando se expresa en MSC transgénicas:

Los experimentos que se describen en el presente documento se basan en el hecho de que los ratones viejos carecen de klotho en el riñón y que la deficiencia de Klotho en ratones viejos puede restablecerse mediante la aplicación i.v. de MSC modificadas con Klotho. En modelos murinos, se emplearon MSC de ratón, obtenidas mediante los métodos descritos anteriormente y se usó la secuencia de Klotho de ratón. Las MSC modificadas con Klotho mejoran la función renal, mejoran la variabilidad de la frecuencia cardíaca y prolongan la esperanza de vida en ratones viejos.

Enfoque experimental:

Se obtienen ratones a la edad de 12-15 meses de Jackson Laboratories. Todos los animales se colocan en jaulas metabólicas una vez a la semana para medir la función renal. Después del sacrificio, se determinará la expresión de klotho en el riñón por inmunohistología.

Se realizan dos Experimentos diferentes en 6 grupos.

Experimento A:

Grupo 1: Se colocan ratones de 12-15 meses de edad en jaulas metabólicas una vez a la semana. No se realizará ningún tratamiento adicional hasta que mueran.

Grupo 2: Se tratan ratones de 12-15 meses de edad con MSC no transducidas (células madre mesenquimatosas que se han obtenido de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad). Reciben 1x10⁶ MSC una vez al mes hasta la muerte. Todos los animales se colocan en jaulas metabólicas una vez a la semana.

Grupo 3: Se tratan ratones de 12-15 meses de edad con MSC modificadas con Klotho (células madre mesenquimatosas que se han obtenido de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, se modifican genéticamente de acuerdo con los protocolos que se describen en el presente documento para expresar klotho transgénica). Reciben 1x10⁶ MSC modificadas con Klotho una vez al mes hasta la muerte. Todos los animales se colocan en jaulas metabólicas una vez a la semana.

Resultados: Los animales del grupo 3 muestran una función renal significativamente mejorada y viven significativamente más tiempo en comparación con los animales de los grupos 1 y 2. La expresión de Klotho en el riñón es significativamente mayor en los animales del grupo 3 que en los otros dos grupos.

Experimento B:

Grupo 1: Se implantan ratones de 12-15 meses de edad con un transmisor ETA-F10 (DSI, St. Paul, MN, EE.UU.). Una vez a la semana se mide el ECG y la variabilidad de la frecuencia cardíaca.

Grupo 2: Se implantan ratones de 12-15 meses de edad con un transmisor ETA-F10 (DSI, St. Paul, MN, EE.UU.). Todos los animales se tratan con MSC no transducidas (células madre mesenquimatosas que se han obtenido de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad). Los ratones tratados reciben 1x10⁶ MSC una vez al mes hasta la muerte. Una vez a la semana se mide el ECG y la variabilidad de la frecuencia cardíaca.

Grupo 3: Se implantan ratones de 12-15 meses de edad con un transmisor ETA-F10 (DSI, St. Paul, MN, EE.UU.). Todos los animales se tratan con MSC modificadas con Klotho (células madre mesenquimatosas que se han obtenido de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, se modifican genéticamente para expresar klotho como se describe en el presente documento). Los ratones tratados reciben 1x10⁶ MSC modificadas con Klotho una vez al mes. Una vez a la semana se mide el ECG y la variabilidad de la frecuencia cardíaca.

Resultados: Los animales del grupo 3 muestran una variabilidad significativa de la frecuencia cardíaca en comparación con los animales de los grupos 1 y 2.

Las MSC que expresan Klotho mejoran la fibrosis renal en un modelo murino

Para inducir la fibrosis renal, se usan ratones 129S1/SvlmJ (de 7-10 semanas de edad). El uréter derecho se expone quirúrgicamente y se liga (obstrucción ureteral unilateral, UUU). Tras la cirugía, los ratones se inyectan por vía intravenosa o intraperitoneal con MSC que expresan Klotho (5×10^5 - 2×10^6 células por ratón) o con PBS. El tratamiento se repite cada 3 días.

Después de 14 días postcirugía, los ratones se sacrifican y el riñón se prepara para la histología. Los marcadores de fibrosis renal, tales como el número de fibroblastos intersticiales, el volumen intersticial, la expresión de colágeno I, aumentan en los animales UUU tratados solo con PBS. Por el contrario, los animales UUU que reciben MSC que expresan Klotho muestran niveles marcadamente disminuidos de fibrosis renal.

Estudios en modelos animales para determinar la función de Klotho cuando se expresa en MSC transgénicas en la enfermedad de Alzheimer (EA):

Los siguientes ejemplos describen enfoques que demuestran que las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal inducen la maduración de células progenitoras oligodendrocíticas (OPC), las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal aumentan el número de oligodendrocitos totales, las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal mejoran la mielinización de los oligodendrocitos, las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal reducen las placas en un modelo de ratón de ratones transgénicos dobles APPswe/PS1(M146V), las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal restablecen la cognición en un modelo de ratón de ratones transgénicos dobles APPswe/PS1(M146V), las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal inducen la recuperación del comportamiento elevando los niveles de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los cerebros de ratones transgénicos dobles APPswe/PS1(M146V), y que las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal promueven la activación de microglía que secreta agentes neurotróficos y da como resultado mejoras cognitivas y una reducción en la patología A β en ratones transgénicos dobles APPswe/PS1(M146V).

Configuración experimental

Se emplean tres cepas de ratón diferentes (C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax, C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax, B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPswe,tauP301L)1Lfa/Mmjax) que se asemejan a la enfermedad de Alzheimer.

Se realizarán tres experimentos diferentes en 18 grupos.

Experimento A:

Se modifican genéticamente células madre mesenquimatosas de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, para expresar klotho. Se inyectan 1×10^6 MSC-Klotho por vía intravenosa una vez al mes.

Ratones Grupo 1C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 2C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 3B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPswe,tauP301L)1Lfa/Mmjax
Los ratones se inyectan con solución salina por vía intravenosa una vez al mes.

Ratones Grupo 4C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 5C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 6B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPswe,tauP301L)1Lfa/Mmjax

Se inyectan 1×10^6 de células madre mesenquimatosas no transducidas de animales jóvenes (de 6 semanas de edad) por vía intravenosa en los ratones una vez al mes.

Ratones Grupo 7C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 8C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 9B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPswe,tauP301L)1Lfa/Mmjax

Los ensayos cognitivos se realizan una vez a la semana durante un período de 3 meses.

Resultados: Los animales de los grupos 1-3 muestran una mejora significativa de la atención, el aprendizaje y la memoria en comparación con los animales de los grupos 4-6 y los grupos 7-9.

Experimento B:

Se modifican genéticamente células madre mesenquimatosas de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, para expresar klotho. Se inyectan 1×10^6 MSC-Klotho por vía intratecal una vez al mes.

Ratones Grupo 1C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 2C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 3B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa/Mmjax
Los ratones se inyectan con solución salina por vía intratecal una vez al mes

Ratones Grupo 4C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 5C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 6B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa/Mmjax
Se inyectan 1×10^6 de células madre mesenquimatosas no transducidas de animales jóvenes (de 6 semanas de edad) por vía intravenosa en los ratones una vez al mes.

Ratones Grupo 7C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 8C3B6-Tg(APP695)3Dbo/Mmjax

Ratones Grupo 9B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa/Mmjax

Se sacrificarán tres animales de cada grupo cada semana durante 3 meses. Se realizará inmunohistoquímica, microscopía electrónica, HPLC, PCR-Tlc y transferencia Western de tejido cerebral.

Resultados: Los animales de los grupos 1-3 muestran una mejora significativa en la maduración de células progenitoras oligodendrocíticas (OPC), un mayor número de oligodendrocitos totales, una mielinización mejorada de los oligodendrocitos, placas de A β reducidas, una elevación de los niveles de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en comparación con los animales de los grupos 4-6 y los grupos 7-9.

Estudios en modelos animales para determinar la función de Klotho cuando se expresa en MSC transgénicas en la esclerosis múltiple (EM):

Los siguientes ejemplos describen enfoques que demuestran que las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal inducen la maduración de células progenitoras oligodendrocíticas (OPC), las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal aumentan el número de oligodendrocitos totales, las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal mejoran la mielinización de los oligodendrocitos, Las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal reducen la inflamación y esas MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal reducen el número de linfocitos T y B activados en el cerebro de pacientes con EM.

Configuración experimental:

Se usa un modelo en ratón de encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE). Se inmunizan ratones C57BL/6 (H-2b) con proteína de oligodendrocitos de mielina (MOG₃₅₋₅₅).

Se realizan dos Experimentos diferentes en 6 grupos.

Experimento A:

Se modifican genéticamente células madre mesenquimatosas de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, para expresar klotho. Se inyectan 1×10^6 MSC-Klotho por vía intravenosa una vez a la semana.

Grupo 1C57BL/6 (H-2b) inmunizado con (MOG₃₅₋₅₅)

A los ratones se les inyecta solución salina por vía intravenosa una vez a la semana

Grupo 2C57BL/6 (H-2b) inmunizado con (MOG₃₅₋₅₅)

Se inyectan 1×10^6 de células madre mesenquimatosas no transducidas de animales jóvenes (de 6 semanas de edad) por vía intravenosa en los ratones una vez al mes.

Grupo 3C57BL/6 (H-2b) inmunizado con (MOG₃₅₋₅₅)

Experimento B:

5 Se modifican genéticamente células madre mesenquimatosas de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, para expresar klotho. Se inyectan 1×10^6 MSC-Klotho por vía intratecal una vez a la semana.

Grupo 4C57BL/6 (H-2b) inmunizado con (MOG₃₅₋₅₅)

A los ratones se les inyecta solución salina por vía intratecal una vez a la semana.

Grupo 5C57BL/6 (H-2b) inmunizado con (MOG₃₅₋₅₅)

10 Se inyectan 1×10^6 de células madre mesenquimatosas no transducidas de animales donantes jóvenes (de 6 semanas de edad) por vía intratecal en los ratones una vez al mes.

Grupo 6C57BL/6 (H-2b) inmunizado con (MOG₃₅₋₅₅)

15 Todos los animales de los grupos 1-6 se siguen diariamente para determinar la parálisis que comienza en la cola y las extremidades posteriores y progresa a las extremidades anteriores con pérdida de peso simultánea. Una vez a la semana se sacrifican 3 animales de cada grupo y se realiza inmunohistoquímica, microscopía electrónica, HPLC, PCR-TIc y transferencia Western de tejido cerebral.

20 **Estudios en modelos animales para determinar la función de Klotho cuando se expresa en MSC transgénicas en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA):**

25 Los siguientes ejemplos describen enfoques que demuestran que las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal inducen la maduración de células progenitoras oligodendrocíticas (OPC), las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal aumentan el número de oligodendrocitos totales, las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal mejoran la mielinización de los oligodendrocitos, las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal reducen la degeneración axónica, las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal inhibirán la señalización de Wnt.

30 Configuración experimental:

Se utilizan ratones SOD1 (G93A). Se realizarán dos experimentos diferentes en 6 grupos.

Experimento A:

35 Se modifican genéticamente células madre mesenquimatosas de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, para expresar klotho. Se inyectan 1×10^6 MSC-Klotho por vía intravenosa una vez a la semana.

Grupo 1SOD1 (G93A)

A los ratones se les inyecta solución salina por vía intravenosa una vez a la semana

40

Grupo 2SOD1 (G93A)

Se inyectan 1×10^6 de células madre mesenquimatosas no transducidas de animales jóvenes (de 6 semanas de edad) por vía intravenosa en los ratones una vez al mes.

45 Grupo 3SOD1 (G93A)

Experimento B:

50 Se modifican genéticamente células madre mesenquimatosas de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, para expresar klotho. Se inyectan 1×10^6 MSC-Klotho por vía intratecal una vez a la semana.

Grupo 4SOD1 (G93A)

A los ratones se les inyecta solución salina por vía intratecal una vez a la semana. Grupo 5 SOD1 (G93A)

55 Se inyectan 1×10^6 de células madre mesenquimatosas no transducidas de animales donantes jóvenes (de 6 semanas de edad) por vía intratecal en los ratones una vez al mes.

Grupo 6SOD1 (G93A)

60 Una vez a la semana se sacrifican 3 animales de cada grupo y se recogerá el cerebro y la médula espinal. Se realizará inmunohistoquímica, microscopía electrónica, HPLC, PCR-TIc y transferencia Western de cerebro y médula espinal.

65 **Estudios en modelos animales para determinar la función de Klotho cuando se expresa en MSC transgénicas en la diabetes de tipo 1**

Los siguientes ejemplos describen enfoques que demuestran que las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa

retrasan la aparición de diabetes de tipo 1 en ratones.

Configuración experimental:

- 5 Para evaluar el efecto de Klotho-MSK en el desarrollo de diabetes *in vivo*, se realiza un modelo de ratón diabetes de tipo 1 acelerada por ciclofosfamida (adaptado de Brode et al., *The Journal of Immunology* 2006). Se obtienen ratones NOD, donde la incidencia de la diabetes en ratones hembra es de un 75 % a las 40 semanas de edad. Para acelerar y sincronizar la diabetes, se tratan ratones NOD hembra de 8 semanas de edad con una única inyección i.p. de ciclofosfamida (CY) (200 mg/kg de peso corporal en solución salina normal al 0,9 %). Los ratones después se
- 10 dividieron aleatoriamente en grupos de tratamiento y de control.

De uno a cinco días después del tratamiento con ciclofosfamida, cada animal recibe 200 µl de PBS por inyección intravenosa o intraperitoneal. Los ratones se controlan semanalmente para determinar la hiperglucemia hasta que llegan a ser diabéticos, definida por dos niveles consecutivos (con >24 h de diferencia) de glucosa en sangre no en ayunas >240 mg/dl.

15

Grupo 1NOD después del tratamiento con ciclofosfamida

De uno a cinco días después del tratamiento con ciclofosfamida, el animal recibe 200 µl de 1×10^6 MSC (de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad) en 200 µl de PBS por inyección intravenosa o intraperitoneal. Los ratones se controlan semanalmente para determinar la hiperglucemia hasta que llegan a ser diabéticos, definida por dos niveles consecutivos (con >24 h de diferencia) de glucosa en sangre no en ayunas >240 mg/dl.

20

Grupo 2 NOD después del tratamiento con ciclofosfamida

Se modifican genéticamente células madre mesenquimatosas de animales donantes jóvenes, de 6 semanas de edad, para expresar Klotho. De uno a cinco días después del tratamiento con ciclofosfamida, el animal recibe 1×10^6 Klotho-MSK en 200 µl de PBS por inyección intravenosa o intraperitoneal. Los ratones se controlan semanalmente para determinar la hiperglucemia hasta que llegan a ser diabéticos, definida por dos niveles consecutivos (con >24 h de diferencia) de glucosa en sangre no en ayunas >240 mg/dl.

25

30

Grupo 3 NOD después del tratamiento con ciclofosfamida

Los ratones del grupo 1 desarrollan diabetes a los 30 días, mientras que la aparición de diabetes en ratones tratados con MSC (grupo 2) o Klotho-MSK (grupo 3) se retrasa. Curiosamente, para los ratones del grupo 3, el retraso en el desarrollo de la diabetes aumenta en 2 semanas en comparación con el grupo 2.

35

Estudios en modelos animales para determinar la función de Klotho cuando se expresa en MSC transgénicas en la diabetes de tipo 2

Los siguientes ejemplos describen enfoques que demuestran que las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa mejorarán el metabolismo de glucosa en diabetes de tipo 2 en ratones. Un modelo similar se describe en Chen et al. (*J Diabetes Research*, 2015, Art ID 796912).

40

Configuración experimental:

45

Se alimentan ratones C57BL/6 con una dieta convencional (DC) o alta en grasas (DAG). Después de 4 semanas, los ratones se dividen en 6 grupos

- Grupo 1: Ratones alimentados con DC reciben solución salina por vía intravenosa una vez a la semana durante 8 semanas
 - Grupo 2: Ratones alimentados con DAG reciben solución salina por vía intravenosa una vez a la semana durante 8 semanas
 - Grupo 3: Ratones alimentados con DC reciben 1×10^6 MSC una vez a la semana durante 8 semanas
 - Grupo 4: Ratones alimentados con DAG reciben 1×10^6 MSC una vez a la semana durante 8 semanas
 - Grupo 5: Ratones alimentados con DC reciben 1×10^6 MSC-Klotho una vez a la semana durante 8 semanas
 - Grupo 6: Ratones alimentados con DAG reciben 1×10^6 MSC-Klotho una vez a la semana durante 8 semanas
- 50

Los ratones de los grupos 4 y 6 muestran un metabolismo de glucosa mejorado (hiperglucemia, hiperinsulinemia, peso corporal y/o masa de células beta) en comparación con los ratones del grupo 2.

Las Klotho-MSK (grupo 6) muestran un metabolismo de glucosa mejorado adicionalmente en comparación con ratones

tratados con MSC no transducidas (grupo 4).

Estudios en modelos animales para determinar la función de Klotho cuando se expresa en MSC transgénicas en la insuficiencia renal crónica

Se realiza una nefrectomía unilateral a ratones C57/BL6 de 10 semanas de edad y reciben una implantación subcutánea de un gránulo de acetato de doxicorcorticoesterona (DOCA) de 50 mg. 7 días después, a los ratones se les implanta por vía subcutánea una mini bomba osmótica que entrega 1,5 ng de angiotensina II por minuto y por gramo de peso corporal durante 2 semanas. Un modelo similar se describe en Kirchhoff et al (*Kidney International*, 2008, 73, 643).

Durante las 4 semanas siguientes, los ratones reciben solución salina por vía intravenosa o MSC por vía intravenosa o MSC-Klotho por vía intravenosa una vez a la semana durante 4 semanas. Se controlan la presión arterial, la albuminuria y la creatinina sérica una vez a la semana.

Grupo 1:

C57/BL6 con DOCA y angiotensina II reciben solución salina intravenosa durante 4 semanas.

Grupo 2:

C57/BL6 con DOCA y angiotensina II reciben 1×10^6 MSC intravenosas una vez a la semana durante 4 semanas.

Grupo 3:

C57/BL6 con DOCA y angiotensina II recibirán 1×10^6 MSC-Klotho intravenosas una vez a la semana durante 4 semanas.

Los ratones de los grupos 2 y 3 muestran una función renal y cardíaca mejorada medida mediante creatinina sérica, albuminuria, presión arterial y variabilidad de la frecuencia cardíaca en comparación con los ratones del grupo 1.

Los ratones del grupo 3 muestran una función renal y cardíaca mejorada medida mediante creatinina sérica, albuminuria, presión arterial y variabilidad de la frecuencia cardíaca en comparación con los ratones del grupo 2.

Los cambios histológicos y los observados por microscopía electrónica de la arquitectura renal mejoran en los ratones de los grupos 2 y 3 en comparación con los ratones del grupo 1.

Estudios en modelos animales para determinar la función de Klotho cuando se expresa en MSC transgénicas en la Enfermedad de Parkinson (EP):

Aunque todavía no se han establecido modelos preclínicos, los inventores afirman que las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal reducirán el estrés oxidativo, las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal reducirán el plegamiento erróneo de proteínas, la degradación de proteínas y la agregación de proteínas, las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal reducirán la inflamación, y que las MSC-Klotho administradas por vía intravenosa o intratecal aumentarán las células dopaminérgicas en la parte compacta de la sustancia negra.

Se está realizando experimentación adicional sobre la base de los enfoques descritos anteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> apceth GmbH & Co. KG

<120> CÉLULA MADRE MESENQUIMATOSA MODIFICADA GENÉTICAMENTE QUE EXPRESA KLOTHO

<130> XII 2004/15WO

<150> EP 15156974.6

<151> 27-02-2015

<150> EP 15185805.7

<151> 18-09-2015

<150> EP 15191062.7

<151> 22-10-2015

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 750 008 T3

<210> 1
 <211> 3039
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 1

atgcccgccca gcgccccgcc gcgcccgcgc cggccgcgcgc cgcgcgtcgct gtcgctgctg	60
ctggtgctgc tgggcctggg cggccgcgcgc ctgctgctgc agccggggcga cggcgcgcag	120
acctggggccc gtttctcgcg gcctcctgcc cccgaggccg cgggcctctt ccagggcacc	180
ttccccgacg gcttcctctg ggccgtgggc agcgcgcgcct accagaccga gggcgcgtgg	240
cagcagcacg gcaagggtgc gtccatctgg gatacgttca cccaccaccc cctggcacc	300
ccgggagact cccggaacgc cagtctgcgc ttgggcgcgc cgtcgcgcgt gcagccgcgc	360
accggggacg tagccagcga cagctacaac aacgtcttcc gcgacacgga ggcgctgcgc	420
gagctcgggg tcaactacta ccgcttctcc atctcgtggg cgcgagtgct ccccaatggc	480
agcgcggggc tccccaacgc cgaggggctg cgtactacc ggcgcctgct ggagcggctg	540
cgggagctgg gcgtgcagcc cgtggtcacc ctgtaccact gggacctgcc ccagcgcctg	600
caggacgcct acggcggctg ggccaaccgc gccctggccg accacttcag ggattacgcg	660
gagctctgct tccgccactt cggcggctcag gtcaagtact ggatcaccat cgacaacccc	720
tacgtggtgg cctggcacgg ctacgccacc gggcgcctgg cccccggcat ccggggcagc	780
ccgcggctcg ggtacctggt ggcgcacaac ctctcctgg ctcatgccaa agtctggcat	840
ctctacaata cttctttccg tcccactcag ggaggtcagg tgtccattgc cctaagctct	900
cactggatca atcctcgaag aatgaccgac cacagcatca aagaatgtca aaaatctctg	960
gactttgtac taggttggtt tgccaaaccc gtatttattg atggtgacta tcccagagac	1020
atgaagaata acctttcatc tattctgcct gattttactg aatctgagaa aaagttcatc	1080

10

ES 2 750 008 T3

aaaggaactg	ctgacttttt	tgctctttgc	tttggaacca	ccttgagttt	tcaacttttg	1140
gaccctcaca	tgaagttccg	ccaattggaa	tctcccaacc	tgaggcaact	gctttcctgg	1200
attgaccttg	aatttaacca	tcctcaaata	tttattgtgg	aaaatggctg	gtttgtctca	1260
gggaccacca	agagagatga	tgccaaatat	atgtattacc	tcaaaaagtt	catcatggaa	1320
accttaaaag	ccatcaagct	ggatggggtg	gatgtcatcg	ggtataccgc	atgggtccctc	1380
atggatggtt	tcgagtggca	cagaggttac	agcatcaggc	gtggactctt	ctatgttgac	1440
tttctaagcc	aggacaagat	gttgttgcca	aagtcttcag	ccttgttcta	ccaaaagctg	1500
atagagaaaa	atggcttccc	tcctttacct	gaaaatcagc	ccctagaagg	gacatttccc	1560
tgtgactttg	cttggggagt	tgttgacaac	tacattcaag	tagataccac	tctgtctcag	1620
tttaccgacc	tgaatgttta	cctgtgggat	gtccaccaca	gtaaaaggct	tattaaagtg	1680
gatggggttg	tgaccaagaa	gaggaaatcc	tactgtgttg	actttgctgc	catccagccc	1740
cagatcgctt	tactccagga	aatgcacgtt	acacattttc	gcttctccct	ggactgggcc	1800
ctgattctcc	ctctgggtaa	ccagtcccag	gtgaaccaca	ccatcctgca	gtactatcgc	1860
tgcatggcca	gcgagcttgt	ccgtgtcaac	atcaccaccag	tggtggccct	gtggcagcct	1920
atggccccga	accaaggact	gccgcgcctc	ctggccaggc	agggcgcctg	ggagaacccc	1980
tacactgccc	tggcctttgc	agagtatgcc	cgactgtgct	ttcaagagct	cggccatcac	2040
gtcaagcttt	ggataacgat	gaatgagccg	tatacaagga	atatgacata	cagtgtctggc	2100
cacaaccttc	tgaaggccca	tgccctggct	tggcatgtgt	acaatgaaaa	gtttaggcat	2160
gctcagaatg	ggaaaatata	catagccttg	caggctgatt	ggatagaacc	tgcttgcctt	2220
ttctcccaaa	aggacaaaga	ggtggctgag	agagtttttg	aatttgacat	tggctggctg	2280
gctgagccca	ttttcggttc	tggagattat	ccatgggtga	tgagggactg	gctgaaccaa	2340
agaaacaatt	ttcttcttcc	ttatttcact	gaagatgaaa	aaaagctaata	ccagggtacc	2400
tttgactttt	tggctttaag	ccattatacc	accatccttg	tagactcaga	aaaagaagat	2460
ccaataaaat	acaatgatta	cctagaagtg	caagaaatga	ccgacatcac	gtggctcaac	2520
tccccagtc	aggtggcggt	agtgccctgg	gggttgcgca	aagtgtgtaa	ctggctgaag	2580
ttcaagtacg	gagacctccc	catgtacata	atatccaatg	gaatogatga	cgggctgcat	2640
gctgaggacg	accagctgag	ggtgtattat	atgcagaatt	acataaacga	agctctcaaa	2700
gccacatac	tggatggtat	caatctttgc	ggatactttg	cttattcgtt	taacgaccgc	2760
acagctccga	ggtttggcct	ctatcgttat	gctgcagatc	agtttgagcc	caaggcatcc	2820
atgaaacatt	acaggaaaat	tattgacagc	aatggtttcc	cgggcccgaga	aactctggaa	2880
agattttgtc	cagaagaatt	caccgtgtgt	actgagtgca	gtttttttca	cacccgaaaag	2940
tctttactgg	ctttcatagc	ttttctattt	tttgcttcta	ttatttctct	ctcccttata	3000
ttttactact	cgaagaaagg	cagaagaagt	tacaaatag			3039

ES 2 750 008 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

5

atgcccgcca ggcggccctcc aagaaggcct agacctcctc cacctagcct gagcctgctg	60
ctggtgctgc tgggactggg aggaagaagg ctgagagccg aacctgggga tggcgcccag	120
acatgggcca gattctctag accacccgcc cctgaagccg ccggactgtt tcagggaacc	180
ttccccgatg gcttcctgtg ggccgtggga tctgccgcct atcagactga agggggctgg	240
cagcagcacg gcaagggcgc ctctatctgg gacaccttca cccaccatcc tctggcccca	300
cccggcgaca gcagaaatgc ttctctgcct ctgggagccc ccagccctct gcagcctgct	360
acaggggatg tggccagcga cagctacaac aacgtgttcc gggacacaga ggccctgcgg	420
gaactgggcg tgaccacta cagattcagc atcagctggg ccagagtgtt gcccaatggc	480
tctgccggcg tgcccaatag agagggcctg cgggtactacc ggcggctgtt ggaaagactg	540
agagaactgg gagtgagcc cgtcgtgacc ctgtaccatt gggacctgcc ccagagactg	600
caggatgcct atggcggctg ggccaataga gccctggccg accacttcag agactacgcc	660
gagctgtgct tccggcactt tggcggccaa gtgaagtact ggatcaccat cgacaacccc	720
tacgtggtgg cctggcacgg ctatgccaca ggcagactgg cccctggcat cagaggaagc	780
cctagactgg gctacctggt ggcccacaat ctgctgctgg cccacgctaa agtgtggcac	840
ctgtacaaca ccagcttccg gcctacacag ggcggccagg tgtccattgc cctgagcagc	900
cactggatca accccagacg gatgaccgac cacagcatca aagagtgcc gaaaagcctg	960
gacttcgtgc tgggatggtt cgccaagccc gtgttcacat acggcgacta ccccgagagc	1020
atgaagaaca acctgtccag catcctgccc gacttcaccg agagcgagaa gaagttcatc	1080
aagggcaccc ccgatttctt cgccctgtgc ttcggcccta ccctgagctt ccagctgctg	1140
gacccccaca tgaagttcag acagctggaa agccccaacc tgccgcagct gctgagctgg	1200
atcgacctgg aattcaacca ccccagatt ttcacgtggg aaaacggctg gttcgtgtcc	1260
ggcaccacca agagggacga cgccaagtac atgtattacc tgaaaaagtt tatcatggaa	1320
accctgaagg ccatcaagct ggacggcgtg gacgtgatcg gctacacagc ctggtccctg	1380
atggacggct tcgagtggca ccggggctac tctatcagac ggggcctgtt ctacgtggac	1440
ttcctgagcc aggacaagat gctgctgcct aagagcagcg ccctgtttta ccagaagctg	1500
atcgagaaga acggcttccc acccctgccc gagaaccagc ctctggaagg caccttcccc	1560
tgcgattttg cctggggcgt ggtggacaac tacatccagg tggacaccac cctgtcccag	1620

ES 2 750 008 T3

ttcaccgacc tgaacgtgta cctgtgggac gtgcaccaca gcaagcggct gattaaggtg	1680
gacgggggtcg tgaccaagaa gcggaagtcc tactgcgtgg actttgccgc catccagccc	1740
cagattgccc tgctgcagga aatgcacgtg acacacttcc ggttctccct ggactgggcc	1800
ctgatcctgc cactgggcaa tcagagccaa gtgaaccaca ccattctgca gtactacaga	1860
tgcattggcct ccgagctggt gcgcgtgaac atcacacctg tggtagccct gtggcagccc	1920
atggccccta atcagggact gcctagactg ctggctagac agggcgccct ggagaaccct	1980
tacaccgccc tggcctttgc cgagtacgcc cggctgtgtt tccaggaaact ggggcaccac	2040
gtgaagctgt ggatcacaat gaacgagccc tacaccgga acatgaccta cagcgccgga	2100
cataacctgc tgaaggccca cgccttggt tggcatgtgt acaacgagaa gttccggcac	2160
gcccagaacg gcaagatcag tatcgccctg caggccgact ggatcgagcc cgcctgtccc	2220
ttcagccaga aagacaaaga ggtggccgag cgggtgctgg aattcgacat tggatggctg	2280
gccgagccca tcttcggcag cggcgattac ccctgggtca tgcgggactg gctgaaccag	2340
cggaacaact tcttgctgcc ttactttacc gaggatgaga agaaactgat ccaggggacc	2400
ttcgacttcc tggccctgag ccactacacc acaatcctgg tggacagcga gaaagaggac	2460
cccatcaagt acaacgacta cctggaagtg caggaaatga ccgacatcac ctggctgaat	2520
agcccctccc aggtggccgt ggtgccttgg ggactgagaa aggtgctgaa ttggctgaag	2580
tttaagtacg gcgacctgcc catgtacatc atcagcaacg gcatcgacga tggcctgcac	2640
gccgaggacg atcagctgcg ggtgtactac atgcagaact acatcaacga ggccctgaaa	2700
gccacatcc tggacggcat caacctgtgc ggctacttgc cctacagctt caacgaccgg	2760
accgccccta gattcggcct gtacagatac gccgccgacc agttcgagcc caaggccagc	2820
atgaagcact accggaagat catcgacagc aatggcttcc ctggccccga gacactggaa	2880
cggttctgcc ccgaggaatt caccgtgtgt accgagtga gcttcttcca caccagaaag	2940
tccttctgtg cttttatcgc cttcctgttc ttcccgagca tcattctccct gtccctgatc	3000
ttctactaca gcaagaaggc cagacggtcc tacaagtacc cctacgacgt gcccgactac	3060
gcctgatgat ga	3072

<210> 3
 <211> 1650
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 750 008 T3

atgcccgcca ggcggccgcc gcgcccgcgc cggccgcgcgc cgcagtcgct gtcgctgctg 60
ctggtgctgc tgggcctggg cggccgcgcgc ctgctgctgc agccggggcga cggcgcgagc 120
acctggggccc gtttctcgcg gcctcctgcc cccgagggcg cgggcctctt ccagggcacc 180
ttccccgacg gcttcctctg ggccgtgggc agcgcgcgcct accagaccga gggcggtggtg 240
cagcagcacg gcaaggggtg gtccatctgg gacacgttca cccaccaccc cctggcaccc 300
ccgggagact cccggaacgc cagtctgccg ttgggcgccc cgtcgccgct gcagcccgcc 360
accggggacg tagccagcga cagctacaac aacgtcttcc gcgacacgga ggcgctgctg 420
gagctcgggg tcaactacta ccgcttctcc atctcgtggg cgcgagtgct cccaatggc 480
agcgcggggc tcccccaacc cgaggggctg cgctactacc ggcgcctgct ggagcggtg 540
cgggagctgg gcgtgcagcc cgtggtcacc ctgtaccact gggacctgcc ccagcgctg 600
caggacgcct acggcggtg ggccaaccgc gccctggcgc accacttcag ggattacgcg 660
gagctctgct tccgccactt cggcggtcag gtcaagtact ggatcaccat cgacaacccc 720
tacgtggtgg cctggcacgg ctacgccacc gggcgccctg ccccgccat ccggggcagc 780
ccgcggctcg ggtacctggt ggccgacaac ctctcctggt ctcatgccaa agtctggcat 840
ctctacaata cttctttccg tcccactcag ggaggtcagg tgtccattgc cctaagctct 900
cactggatca atcctcgaag aatgaccgac cacagcatca aagaatgtca aaaatctctg 960
gactttgtac taggttggtt tgccaaaccc gtatttattg atggtgacta tcccagagac 1020
atgaagaata acctttcatc tattctgcct gattttactg aatctgagaa aaagttcatc 1080
aaaggaactg ctgacttttt tgctctttgc tttggacca ccttgagttt tcaacttttg 1140
gaccctcaca tgaagttccg ccaattggaa tctcccaacc tgaggcaact gctttcctgg 1200
attgaccttg aatttaacca tcctcaaata tttattgtgg aaaatggctg gtttgtctca 1260
gggaccacca agagagatga tgccaaatat atgtattacc tcaaaaagtt catcatggaa 1320
accttaaaag ccatcaagct ggatgggggt gatgtcatcg ggtataccgc atggtccctc 1380
atggatggtt tcgagtgcca cagaggttac agcatcaggc gtggactctt ctatgttgac 1440
tttctaagcc aggacaagat gttgttgcca aagtcttcag ccttgttcta ccaaagctg 1500
atagagaaaa atggcttccc tcctttacct gaaaatcagc ccctagaagg gacatttccc 1560
tgtgactttg cttggggagt tgttgacaac tacattcaag taagtcagct gacaaaacca 1620
atcagcagtc tcaccaagcc ctatcactag 1650

<210> 4
<211> 3135
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4

atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt cagcactgat 60
gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg gattgcaaag atctgtcatc 120
ctgtcagcac ttattctgct acgagctggt actggattct ctggagatgg aagagctata 180

ES 2 750 008 T3

tggtctaaaa atcctaattt tactccggtg aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact	240
tccctaataa actttttctg gggatttggg actggagcat tgcaagtga agggagttgg	300
aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca ccttaaaaat	360
gtcagcagca cgaatggttc cagtgcagct tatatttttc tggaaaaaga cttatcagcc	420
ctggatttta taggagtttc tttttatcaa ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc	480
gatggaatag taacagttgc caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac	540
gctctagtgc ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga tttgcctttg	600
gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat cttcaatgac	660
tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca aatattggat tacaattcac	720
aacccatata tagtggcttg gcatgggtat gggacaggta tgcatgcccc tggagagaag	780
ggaaatttag cagctgtcta cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagtt	840
tggcataact acaacacaca tttccgcca catcagaagg gttggttatc gatcacgttg	900
ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggtcg gaaaacacga tggatatatt caaatgtcaa	960
caatccatgg tttctgtgct tggatgggtt gccaacctta tccatgggga tggcgactat	1020
ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc gttctaccca ttttctctga agcagagaag	1080
catgagatga gaggcacagc tgattttctt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag	1140
cccctaataa ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgctg	1200
aactggatta aactggaata caacaaccct cgaatcttga ttgctgagaa tggctgggtc	1260
acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct acatgatgaa gaatttcctc	1320
agccagggtgc ttcaagcaat aaggtagat gaaatacagag tgtttgggta tactgcctgg	1380
tctctcctgg atggctttga atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat	1440
gtggatttta acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaagt cttcagcaca ctactacaaa	1500
cagatcatat gagaaaatgg tttttcttta aaagagtcca cgccagatgt gcagggccag	1560
tttccctgtg acttctcctg ggggtgtcact gaatctgttc ttaagcccga gtctgtggct	1620
tcgtccccac agttcagcga tcctcatctg tacgtgtgga acgccactgg caacagactg	1680
ttgcaccgag tggaaggggt gaggtgaaa acacgaccgg ctcaatgcac agattttgta	1740
aacatcaaaa aacaacttga gatgttggca agaataaaag tcaccacta ccggtttgct	1800
ctggattggg cctcggtcct tcccactggc aacctgtccg cggatgaaccg acaggccctg	1860
aggtactaca ggtgcgtggt cagtgcaggg ctgaagcttg gcatctccgc gatggtcacc	1920
ctgtattatc cgaccacgc ccacctaggc ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg	1980
tggctgaacc catcgacggc cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag	2040

ES 2 750 008 T3

ctgggggacc tggatgaagct ctggatcacc atcaacgagc ctaaccggct aagtgacatc	2100
tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacaca acctgctggt ggcccacgcc	2160
ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggccctcac agcgcggggc cgtgtcgctg	2220
tcgctgcacg cggactgggc ggaaccggcc aaccctatg ctgactcgca ctggagggcg	2280
gccgagcgct tcctgcagtt cgagatcgcc tggttcgccg agccgctctt caagaccggg	2340
gactaccccg cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc	2400
tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggtgc tcaagggcac ggtcgacttc	2460
tgcgcgctca accacttcac cactaggttc gtgatgcacg agcagctggc cggcagccgc	2520
tacgactcgg acagggacat ccagtttctg caggacatca cccgcctgag ctccccacg	2580
cgcctggctg tgattccctg gggggtgcgc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac	2640
ggcgacatgg acatttacat caccgccagt ggcacgcagc accaggctct ggaggatgac	2700
cggctccgga agtactacct aggggaagtac cttcaggagg tgctgaaagc atacctgatt	2760
gataaagtca gaatcaaagg ctattatgca ttcaaactgg ctgaagagaa atctaaaccc	2820
agatttggat tcttcacatc tgattttaaa gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa	2880
gtgatcagca gcaggggctt cccttttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa	2940
gaaaatacag agtgcactgt ctgcttattc cttgtgcaga agaaaccact gatattcctg	3000
ggttggtgct tcttctccac cctggttcta ctcttatcaa ttgccatttt tcaaaggcag	3060
aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca taccattaaa gaaaggcaag	3120
agagttgtta gctaa	3135

<210> 5
 <211> 1704
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 5

ES 2 750 008 T3

atgaagccag tgtgggtcgc cacccttctg tggatgctac tgctgggtgcc caggctgggg	60
gccgcccggg aggggtcccc agaagaggcc tccttctact atggaacctt ccctcttggc	120
ttctcctggg gcgtgggcag ttctgcctac cagacggagg gcgcctggga ccaggacggg	180
aaagggccta gcatctggga cgtcttcaca cacagtggga aggggaaagt gcttgggaat	240
gagacggcag atgtagcctg tgacggctac tacaaggctc aggaggacat cattctgctg	300
agggaaactgc acgtcaacca ctaccgattc tcctgtctt ggccccggct cctgccaca	360
ggcatccgag ccgagcaggt gaacaagaag ggaatcgaat tctacagtga tcttatcgat	420
gcccttctga gcagcaacat cactcccatc gtgaccttgc accactggga tctgccacag	480
ctgctccagg tcaaatacgg tgggtggcag aatgtgagca tggccaacta cttcagagac	540
tacgccaaacc tgtgctttga ggcctttggg gaccgtgtga agcactggat cacgttcagt	600
gatcctcggg caatggcaga aaaaggctat gagacgggcc accatgcgcc gggcctgaag	660
ctccgcggca ccggcctgta caaggcagca caccacatca ttaaggcca cgccaaagcc	720
tggcattctt ataacaccac gtggcgcagc aagcagcaag gtctgggtggg aatttcattg	780
aactgtgact ggggggaacc tgtggacatt agtaacccca aggacctaga ggctgccgag	840
agatacctac agttctgtct gggctggttt gccaacccca tttatgccgg tgactacccc	900
caagtcatga aggactacat tggaagaaag agtgcagagc aaggcctgga gatgtcgagg	960
ttaccggtgt tctcactcca ggagaagagc tacattaaag gcacatccga tttcttggga	1020
ttaggtcatt ttactactcg gtacatcacg gaaaggaaact acccctcccg ccagggggccc	1080
agctaccaga acgatcgtga cttgatagag ctggttgacc caaactggcc agatctgggg	1140
tctaaatggc tatattctgt gccatgggga tttaggaggc tccttaactt tgctcagact	1200
caatacggtg atcctcccat atatgtgatg gaaaatggag catctcaaaa attccactgt	1260
actcaattat gtgatgagtg gagaattcaa taccttaaag gatacataaa tgaaatgcta	1320
aaagctataa aagatgggtgc taatataaag gggatatactt cctgggtctct gttggataag	1380
tttgaatggg agaaaggata ctcatagata tatggattct actatgttga atttaacgac	1440
agaaataagc ctcgctatcc aaaggcttca gttcaatatt acaagaagat tatcattgcc	1500
aatgggtttc ccaatccaag agaggtggaa agttgggtacc tcaaagcttt ggaaacttgc	1560
tctatcaaca atcagatgct tgctgcagag cccttgctaa gtcacatgca aatgggttacg	1620
gagatcgtgg taccactgt ctgctccctc tgtgtcctca tctactgctgt tctactaatg	1680
ctcctcctga ggaggcagag ctga	1704

<210> 6
 <211> 1012
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 750 008 T3

Met Pro Ala Ser Ala Pro Pro Arg Arg Pro Arg Pro Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Leu Gly Gly Arg Arg Leu Arg
20 25 30

Ala Glu Pro Gly Asp Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Phe Ser Arg Pro
35 40 45

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Phe Gln Gly Thr Phe Pro Asp Gly
50 55 60

ES 2 750 008 T3

Phe	Leu	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	Ala	Ala	Tyr	Gln	Thr	Glu	Gly	Gly	Trp
65					70					75					80
Gln	Gln	His	Gly	Lys	Gly	Ala	Ser	Ile	Trp	Asp	Thr	Phe	Thr	His	His
			85						90					95	
Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Arg	Asn	Ala	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly
			100					105					110		
Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Pro	Ala	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Asp	Ser
		115					120					125			
Tyr	Asn	Asn	Val	Phe	Arg	Asp	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Val
	130					135					140				
Thr	His	Tyr	Arg	Phe	Ser	Ile	Ser	Trp	Ala	Arg	Val	Leu	Pro	Asn	Gly
145					150					155					160
Ser	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Leu
				165					170					175	
Leu	Glu	Arg	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Val	Gln	Pro	Val	Val	Thr	Leu	Tyr
			180					185					190		
His	Trp	Asp	Leu	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Asp	Ala	Tyr	Gly	Gly	Trp	Ala
		195					200					205			
Asn	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	His	Phe	Arg	Asp	Tyr	Ala	Glu	Leu	Cys	Phe
	210					215					220				
Arg	His	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Lys	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ile	Asp	Asn	Pro
225					230					235					240
Tyr	Val	Val	Ala	Trp	His	Gly	Tyr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ala	Pro	Gly
				245					250					255	
Ile	Arg	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Ala	His	Asn	Leu	Leu
			260					265					270		
Leu	Ala	His	Ala	Lys	Val	Trp	His	Leu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Phe	Arg	Pro
		275					280					285			
Thr	Gln	Gly	Gly	Gln	Val	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser	Ser	His	Trp	Ile	Asn
	290					295					300				
Pro	Arg	Arg	Met	Thr	Asp	His	Ser	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Lys	Ser	Leu
305					310					315					320

ES 2 750 008 T3

Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Val Phe Ile Asp Gly Asp
325 330 335

Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Ile Leu Pro Asp Phe
340 345 350

Thr Glu Ser Glu Lys Lys Phe Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala
355 360 365

Leu Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro His Met
370 375 380

Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu Ser Trp
385 390 395 400

Ile Asp Leu Glu Phe Asn His Pro Gln Ile Phe Ile Val Glu Asn Gly
405 410 415

Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr Met Tyr
420 425 430

Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Lys Leu Asp
435 440 445

Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp Gly Phe
450 455 460

Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp
465 470 475 480

Phe Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe
485 490 495

Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn
500 505 510

Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly Val Val
515 520 525

Asp Asn Tyr Ile Gln Val Asp Thr Thr Leu Ser Gln Phe Thr Asp Leu
530 535 540

Asn Val Tyr Leu Trp Asp Val His His Ser Lys Arg Leu Ile Lys Val
545 550 555 560

Asp Gly Val Val Thr Lys Lys Arg Lys Ser Tyr Cys Val Asp Phe Ala

ES 2 750 008 T3

										565										570										575				
Ala	Ile	Gln	Pro	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	Glu	Met	His	Val	Thr	His																			
										580					585					590														
Phe	Arg	Phe	Ser	Leu	Asp	Trp	Ala	Leu	Ile	Leu	Pro	Leu	Gly	Asn	Gln																			
										595					600					605														
Ser	Gln	Val	Asn	His	Thr	Ile	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Arg	Cys	Met	Ala	Ser																			
										610					615					620														
Glu	Leu	Val	Arg	Val	Asn	Ile	Thr	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Trp	Gln	Pro																			
										625					630					635					640									
Met	Ala	Pro	Asn	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Leu	Leu	Ala	Arg	Gln	Gly	Ala																			
										645					650					655														
Trp	Glu	Asn	Pro	Tyr	Thr	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Glu	Tyr	Ala	Arg	Leu																			
										660					665					670														
Cys	Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	His	His	Val	Lys	Leu	Trp	Ile	Thr	Met	Asn																			
										675					680					685														
Glu	Pro	Tyr	Thr	Arg	Asn	Met	Thr	Tyr	Ser	Ala	Gly	His	Asn	Leu	Leu																			
										690					695					700														
Lys	Ala	His	Ala	Leu	Ala	Trp	His	Val	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Arg	His																			
										705					710					715					720									
Ala	Gln	Asn	Gly	Lys	Ile	Ser	Ile	Ala	Leu	Gln	Ala	Asp	Trp	Ile	Glu																			
										725					730					735														
Pro	Ala	Cys	Pro	Phe	Ser	Gln	Lys	Asp	Lys	Glu	Val	Ala	Glu	Arg	Val																			
										740					745					750														
Leu	Glu	Phe	Asp	Ile	Gly	Trp	Leu	Ala	Glu	Pro	Ile	Phe	Gly	Ser	Gly																			
										755					760					765														
Asp	Tyr	Pro	Trp	Val	Met	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gln	Arg	Asn	Asn	Phe																			
										770					775					780														
Leu	Leu	Pro	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asp	Glu	Lys	Lys	Leu	Ile	Gln	Gly	Thr																			
										785					790					795					800									
Phe	Asp	Phe	Leu	Ala	Leu	Ser	His	Tyr	Thr	Thr	Ile	Leu	Val	Asp	Ser																			
										805					810					815														

ES 2 750 008 T3

Glu Lys Glu Asp Pro Ile Lys Tyr Asn Asp Tyr Leu Glu Val Gln Glu
 820 825 830
 Met Thr Asp Ile Thr Trp Leu Asn Ser Pro Ser Gln Val Ala Val Val
 835 840 845
 Pro Trp Gly Leu Arg Lys Val Leu Asn Trp Leu Lys Phe Lys Tyr Gly
 850 855 860
 Asp Leu Pro Met Tyr Ile Ile Ser Asn Gly Ile Asp Asp Gly Leu His
 865 870 875 880
 Ala Glu Asp Asp Gln Leu Arg Val Tyr Tyr Met Gln Asn Tyr Ile Asn
 885 890 895
 Glu Ala Leu Lys Ala His Ile Leu Asp Gly Ile Asn Leu Cys Gly Tyr
 900 905 910
 Phe Ala Tyr Ser Phe Asn Asp Arg Thr Ala Pro Arg Phe Gly Leu Tyr
 915 920 925
 Arg Tyr Ala Ala Asp Gln Phe Glu Pro Lys Ala Ser Met Lys His Tyr
 930 935 940
 Arg Lys Ile Ile Asp Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Glu Thr Leu Glu
 945 950 955 960
 Arg Phe Cys Pro Glu Glu Phe Thr Val Cys Thr Glu Cys Ser Phe Phe
 965 970 975
 His Thr Arg Lys Ser Leu Leu Ala Phe Ile Ala Phe Leu Phe Phe Ala
 980 985 990
 Ser Ile Ile Ser Leu Ser Leu Ile Phe Tyr Tyr Ser Lys Lys Gly Arg
 995 1000 1005
 Arg Ser Tyr Lys
 1010

<210> 7
 <211> 1021
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

5

10

Met Pro Ala Ser Ala Pro Pro Arg Arg Pro Arg Pro Pro Pro Ser
 1 5 10 15

ES 2 750 008 T3

Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Leu Gly Gly Arg Arg Leu Arg
 20 25 30
 Ala Glu Pro Gly Asp Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Phe Ser Arg Pro
 35 40 45
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Phe Gln Gly Thr Phe Pro Asp Gly
 50 55 60
 Phe Leu Trp Ala Val Gly Ser Ala Ala Tyr Gln Thr Glu Gly Gly Trp
 65 70 75 80
 Gln Gln His Gly Lys Gly Ala Ser Ile Trp Asp Thr Phe Thr His His
 85 90 95
 Pro Leu Ala Pro Pro Gly Asp Ser Arg Asn Ala Ser Leu Pro Leu Gly
 100 105 110
 Ala Pro Ser Pro Leu Gln Pro Ala Thr Gly Asp Val Ala Ser Asp Ser
 115 120 125
 Tyr Asn Asn Val Phe Arg Asp Thr Glu Ala Leu Arg Glu Leu Gly Val
 130 135 140
 Thr His Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly
 145 150 155 160
 Ser Ala Gly Val Pro Asn Arg Glu Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg Arg Leu
 165 170 175
 Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gly Val Gln Pro Val Val Thr Leu Tyr
 180 185 190
 His Trp Asp Leu Pro Gln Arg Leu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Trp Ala
 195 200 205
 Asn Arg Ala Leu Ala Asp His Phe Arg Asp Tyr Ala Glu Leu Cys Phe
 210 215 220
 Arg His Phe Gly Gly Gln Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Asp Asn Pro
 225 230 235 240
 Tyr Val Val Ala Trp His Gly Tyr Ala Thr Gly Arg Leu Ala Pro Gly
 245 250 255
 Ile Arg Gly Ser Pro Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn Leu Leu
 260 265 270

ES 2 750 008 T3

Leu Ala His Ala Lys Val Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe Arg Pro
 275 280 285
 Thr Gln Gly Gly Gln Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp Ile Asn
 290 295 300
 Pro Arg Arg Met Thr Asp His Ser Ile Lys Glu Cys Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Val Phe Ile Asp Gly Asp
 325 330 335
 Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Ile Leu Pro Asp Phe
 340 345 350
 Thr Glu Ser Glu Lys Lys Phe Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala
 355 360 365
 Leu Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro His Met
 370 375 380
 Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu Ser Trp
 385 390 395 400
 Ile Asp Leu Glu Phe Asn His Pro Gln Ile Phe Ile Val Glu Asn Gly
 405 410 415
 Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr Met Tyr
 420 425 430
 Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Lys Leu Asp
 435 440 445
 Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp Gly Phe
 450 455 460
 Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp
 465 470 475 480
 Phe Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe
 485 490 495
 Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn
 500 505 510
 Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly Val Val
 515 520 525

ES 2 750 008 T3

Asp Asn Tyr Ile Gln Val Asp Thr Thr Leu Ser Gln Phe Thr Asp Leu
 530 535 540

Asn Val Tyr Leu Trp Asp Val His His Ser Lys Arg Leu Ile Lys Val
 545 550 555 560

Asp Gly Val Val Thr Lys Lys Arg Lys Ser Tyr Cys Val Asp Phe Ala
 565 570 575

Ala Ile Gln Pro Gln Ile Ala Leu Leu Gln Glu Met His Val Thr His
 580 585 590

Phe Arg Phe Ser Leu Asp Trp Ala Leu Ile Leu Pro Leu Gly Asn Gln
 595 600 605

Ser Gln Val Asn His Thr Ile Leu Gln Tyr Tyr Arg Cys Met Ala Ser
 610 615 620

Glu Leu Val Arg Val Asn Ile Thr Pro Val Val Ala Leu Trp Gln Pro
 625 630 635 640

Met Ala Pro Asn Gln Gly Leu Pro Arg Leu Leu Ala Arg Gln Gly Ala
 645 650 655

Trp Glu Asn Pro Tyr Thr Ala Leu Ala Phe Ala Glu Tyr Ala Arg Leu
 660 665 670

Cys Phe Gln Glu Leu Gly His His Val Lys Leu Trp Ile Thr Met Asn
 675 680 685

Glu Pro Tyr Thr Arg Asn Met Thr Tyr Ser Ala Gly His Asn Leu Leu
 690 695 700

Lys Ala His Ala Leu Ala Trp His Val Tyr Asn Glu Lys Phe Arg His
 705 710 715 720

Ala Gln Asn Gly Lys Ile Ser Ile Ala Leu Gln Ala Asp Trp Ile Glu
 725 730 735

Pro Ala Cys Pro Phe Ser Gln Lys Asp Lys Glu Val Ala Glu Arg Val
 740 745 750

Leu Glu Phe Asp Ile Gly Trp Leu Ala Glu Pro Ile Phe Gly Ser Gly
 755 760 765

Asp Tyr Pro Trp Val Met Arg Asp Trp Leu Asn Gln Arg Asn Asn Phe

ES 2 750 008 T3

770		775		780
Leu 785	Leu 785	Pro 785	Tyr 785	Phe 785
			Thr 790	Glu 790
			Asp 790	Glu 790
			Lys 795	Lys 795
			Leu 795	Ile 795
			Gln 795	Gly 795
			Thr 800	
Phe 805	Asp 805	Phe 805	Leu 805	Ala 805
			Leu 810	Ser 810
			His 810	Tyr 810
			Thr 810	Thr 810
			Ile 810	Leu 810
			Val 815	Asp 815
			Ser 815	
Glu 820	Lys 820	Glu 820	Asp 820	Pro 820
			Ile 825	Lys 825
			Tyr 825	Asn 825
			Asp 825	Tyr 825
			Leu 830	Glu 830
			Val 830	Gln 830
			Glu 830	
Met 835	Thr 835	Asp 835	Ile 835	Thr 835
			Trp 840	Leu 840
			Asn 840	Ser 840
			Pro 840	Ser 840
			Gln 845	Val 845
			Ala 845	Val 845
			Val 845	
Pro 850	Trp 850	Gly 850	Leu 850	Arg 850
			Lys 855	Val 855
			Leu 855	Asn 855
			Trp 860	Leu 860
			Lys 860	Phe 860
			Lys 860	Tyr 860
			Gly 860	
Asp 865	Leu 865	Pro 865	Met 865	Tyr 865
			Ile 870	Ile 870
			Ser 870	Asn 870
			Gly 875	Ile 875
			Asp 875	Asp 875
			Gly 880	Leu 880
			His 880	
Ala 885	Glu 885	Asp 885	Asp 885	Gln 885
			Leu 890	Arg 890
			Val 890	Tyr 890
			Tyr 890	Met 890
			Gln 895	Asn 895
			Tyr 895	Ile 895
			Asn 895	
Glu 900	Ala 900	Leu 900	Lys 900	Ala 900
			His 905	Ile 905
			Leu 905	Asp 905
			Gly 910	Ile 910
			Asn 910	Leu 910
			Cys 915	Gly 915
			Tyr 915	
Phe 915	Ala 915	Tyr 915	Ser 915	Phe 915
			Asn 920	Asp 920
			Arg 920	Thr 920
			Ala 925	Pro 925
			Arg 925	Phe 925
			Gly 925	Leu 925
			Tyr 925	
Arg 930	Tyr 930	Ala 930	Ala 930	Asp 930
			Gln 935	Phe 935
			Glu 935	Pro 935
			Lys 940	Ala 940
			Ser 940	Met 940
			Lys 940	His 940
			Tyr 940	
Arg 945	Lys 945	Ile 945	Ile 945	Asp 945
			Ser 950	Asn 950
			Gly 955	Phe 955
			Pro 955	Gly 955
			Pro 955	Glu 955
			Thr 960	Leu 960
			Glu 960	
Arg 965	Phe 965	Cys 965	Pro 965	Glu 965
			Glu 970	Phe 970
			Thr 970	Val 970
			Cys 975	Thr 975
			Glu 975	Cys 975
			Ser 975	Phe 975
			Phe 975	
His 980	Thr 980	Arg 980	Lys 980	Ser 980
			Leu 985	Leu 985
			Ala 985	Phe 985
			Ile 990	Ala 990
			Phe 990	Leu 990
			Phe 990	Phe 990
			Ala 990	
Ser 995	Ile 995	Ile 995	Ser 995	Leu 995
			Ser 1000	Leu 1000
			Ile 1000	Phe 1000
			Tyr 1005	Tyr 1005
			Ser 1005	Lys 1005
			Lys 1005	Gly 1005
			Arg 1005	
Arg 1010	Ser 1010	Tyr 1010	Lys 1010	Tyr 1010
			Pro 1015	Tyr 1015
			Asp 1015	Val 1015
			Pro 1020	Asp 1020
			Tyr 1020	Ala 1020

<210> 8
 <211> 549
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

ES 2 750 008 T3

Met	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Gln	Ser	1	5	10	15
Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Arg	Arg	Leu	Arg	20	25	30	
Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Gly	Ala	Gln	Thr	Trp	Ala	Arg	Phe	Ser	Arg	Pro	35	40	45	
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Leu	Phe	Gln	Gly	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly	50	55	60	
Phe	Leu	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	Ala	Ala	Tyr	Gln	Thr	Glu	Gly	Gly	Trp	65	70	75	80
Gln	Gln	His	Gly	Lys	Gly	Ala	Ser	Ile	Trp	Asp	Thr	Phe	Thr	His	His	85	90	95	
Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Arg	Asn	Ala	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	100	105	110	
Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Pro	Ala	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Asp	Ser	115	120	125	
Tyr	Asn	Asn	Val	Phe	Arg	Asp	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Val	130	135	140	
Thr	His	Tyr	Arg	Phe	Ser	Ile	Ser	Trp	Ala	Arg	Val	Leu	Pro	Asn	Gly	145	150	155	160
Ser	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Leu	165	170	175	
Leu	Glu	Arg	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Val	Gln	Pro	Val	Val	Thr	Leu	Tyr	180	185	190	
His	Trp	Asp	Leu	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Asp	Ala	Tyr	Gly	Gly	Trp	Ala	195	200	205	
Asn	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	His	Phe	Arg	Asp	Tyr	Ala	Glu	Leu	Cys	Phe	210	215	220	

ES 2 750 008 T3

Arg	His	Phe	Gly	Gly	Gln	Val	Lys	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ile	Asp	Asn	Pro	
225					230					235					240	
Tyr	Val	Val	Ala	Trp	His	Gly	Tyr	Ala	Thr	Gly	Arg	Leu	Ala	Pro	Gly	
				245					250					255		
Ile	Arg	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Ala	His	Asn	Leu	Leu	
			260					265					270			
Leu	Ala	His	Ala	Lys	Val	Trp	His	Leu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Phe	Arg	Pro	
		275					280					285				
Thr	Gln	Gly	Gly	Gln	Val	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser	Ser	His	Trp	Ile	Asn	
	290					295					300					
Pro	Arg	Arg	Met	Thr	Asp	His	Ser	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Lys	Ser	Leu	
305					310					315					320	
Asp	Phe	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Ala	Lys	Pro	Val	Phe	Ile	Asp	Gly	Asp	
				325					330					335		
Tyr	Pro	Glu	Ser	Met	Lys	Asn	Asn	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Pro	Asp	Phe	
			340					345					350			
Thr	Glu	Ser	Glu	Lys	Lys	Phe	Ile	Lys	Gly	Thr	Ala	Asp	Phe	Phe	Ala	
		355					360					365				
Leu	Cys	Phe	Gly	Pro	Thr	Leu	Ser	Phe	Gln	Leu	Leu	Asp	Pro	His	Met	
	370					375					380					
Lys	Phe	Arg	Gln	Leu	Glu	Ser	Pro	Asn	Leu	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Trp	
385					390					395					400	
Ile	Asp	Leu	Glu	Phe	Asn	His	Pro	Gln	Ile	Phe	Ile	Val	Glu	Asn	Gly	
				405					410					415		
Trp	Phe	Val	Ser	Gly	Thr	Thr	Lys	Arg	Asp	Asp	Ala	Lys	Tyr	Met	Tyr	
			420					425					430			
Tyr	Leu	Lys	Lys	Phe	Ile	Met	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Ile	Lys	Leu	Asp	
		435					440					445				
Gly	Val	Asp	Val	Ile	Gly	Tyr	Thr	Ala	Trp	Ser	Leu	Met	Asp	Gly	Phe	
	450					455					460					
Glu	Trp	His	Arg	Gly	Tyr	Ser	Ile	Arg	Arg	Gly	Leu	Phe	Tyr	Val	Asp	
465					470					475					480	

ES 2 750 008 T3

Phe Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe
485 490 495

Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn
500 505 510

Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly Val Val
515 520 525

Asp Asn Tyr Ile Gln Val Ser Gln Leu Thr Lys Pro Ile Ser Ser Leu
530 535 540

Thr Lys Pro Tyr His
545

<210> 9
<211> 1044
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe
1 5 10 15

Phe Ser Thr Asp Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Arg Asn Thr Met Ser Asn
20 25 30

Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile Leu Leu Arg
35 40 45

Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn
50 55 60

Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr
65 70 75 80

Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val
85 90 95

Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp His
100 105 110

Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser
115 120 125

Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile
130 135 140

ES 2 750 008 T3

Gly	Val	Ser	Phe	Tyr	Gln	Phe	Ser	Ile	Ser	Trp	Pro	Arg	Leu	Phe	Pro	145	150	155	160
Asp	Gly	Ile	Val	Thr	Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Ser	165	170	175	
Thr	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Leu	Arg	Asn	Ile	Glu	Pro	Ile	Val	Thr	180	185	190	
Leu	Tyr	His	Trp	Asp	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly	195	200	205	
Trp	Lys	Asn	Asp	Thr	Ile	Ile	Asp	Ile	Phe	Asn	Asp	Tyr	Ala	Thr	Tyr	210	215	220	
Cys	Phe	Gln	Met	Phe	Gly	Asp	Arg	Val	Lys	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ile	His	225	230	235	240
Asn	Pro	Tyr	Leu	Val	Ala	Trp	His	Gly	Tyr	Gly	Thr	Gly	Met	His	Ala	245	250	255	
Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Ala	Ala	Val	Tyr	Thr	Val	Gly	His	Asn	260	265	270	
Leu	Ile	Lys	Ala	His	Ser	Lys	Val	Trp	His	Asn	Tyr	Asn	Thr	His	Phe	275	280	285	
Arg	Pro	His	Gln	Lys	Gly	Trp	Leu	Ser	Ile	Thr	Leu	Gly	Ser	His	Trp	290	295	300	
Ile	Glu	Pro	Asn	Arg	Ser	Glu	Asn	Thr	Met	Asp	Ile	Phe	Lys	Cys	Gln	305	310	315	320
Gln	Ser	Met	Val	Ser	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Ala	Asn	Pro	Ile	His	Gly	325	330	335	
Asp	Gly	Asp	Tyr	Pro	Glu	Gly	Met	Arg	Lys	Lys	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	340	345	350	
Pro	Ile	Phe	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	His	Glu	Met	Arg	Gly	Thr	Ala	Asp	355	360	365	
Phe	Phe	Ala	Phe	Ser	Phe	Gly	Pro	Asn	Asn	Phe	Lys	Pro	Leu	Asn	Thr	370	375	380	
Met	Ala	Lys	Met	Gly	Gln	Asn	Val	Ser	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ala	Leu	385	390	395	400

ES 2 750 008 T3

Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile Ala Glu
 405 410 415
 Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala
 420 425 430
 Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala Ile Arg
 435 440 445
 Leu Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Leu Asp
 450 455 460
 Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr
 465 470 475 480
 Val Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala
 485 490 495
 His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu Lys Glu
 500 505 510
 Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly
 515 520 525
 Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln
 530 535 540
 Phe Ser Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly Asn Arg Leu
 545 550 555 560
 Leu His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ala Gln Cys
 565 570 575
 Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met Leu Ala Arg Met
 580 585 590
 Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu Pro
 595 600 605
 Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg
 610 615 620
 Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met Val Thr
 625 630 635 640
 Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu

ES 2 750 008 T3

	645				650				655						
His	Ala	Asp	Gly 660	Trp	Leu	Asn	Pro	Ser 665	Thr	Ala	Glu	Ala	Phe 670	Gln	Ala
Tyr	Ala	Gly 675	Leu	Cys	Phe	Gln	Glu 680	Leu	Gly	Asp	Leu	Val 685	Lys	Leu	Trp
Ile	Thr 690	Ile	Asn	Glu	Pro	Asn 695	Arg	Leu	Ser	Asp	Ile 700	Tyr	Asn	Arg	Ser
Gly 705	Asn	Asp	Thr	Tyr	Gly 710	Ala	Ala	His	Asn	Leu 715	Leu	Val	Ala	His	Ala 720
Leu	Ala	Trp	Arg	Leu 725	Tyr	Asp	Arg	Gln	Phe 730	Arg	Pro	Ser	Gln	Arg 735	Gly
Ala	Val	Ser	Leu 740	Ser	Leu	His	Ala	Asp 745	Trp	Ala	Glu	Pro	Ala 750	Asn	Pro
Tyr	Ala	Asp 755	Ser	His	Trp	Arg	Ala 760	Ala	Glu	Arg	Phe	Leu 765	Gln	Phe	Glu
Ile	Ala 770	Trp	Phe	Ala	Glu	Pro 775	Leu	Phe	Lys	Thr	Gly 780	Asp	Tyr	Pro	Ala
Ala 785	Met	Arg	Glu	Tyr	Ile 790	Ala	Ser	Lys	His	Arg 795	Arg	Gly	Leu	Ser	Ser 800
Ser	Ala	Leu	Pro	Arg 805	Leu	Thr	Glu	Ala	Glu 810	Arg	Arg	Leu	Leu	Lys 815	Gly
Thr	Val	Asp	Phe 820	Cys	Ala	Leu	Asn	His 825	Phe	Thr	Thr	Arg	Phe 830	Val	Met
His	Glu	Gln 835	Leu	Ala	Gly	Ser	Arg 840	Tyr	Asp	Ser	Asp	Arg 845	Asp	Ile	Gln
Phe	Leu 850	Gln	Asp	Ile	Thr	Arg 855	Leu	Ser	Ser	Pro	Thr 860	Arg	Leu	Ala	Val
Ile 865	Pro	Trp	Gly	Val	Arg 870	Lys	Leu	Leu	Arg	Trp 875	Val	Arg	Arg	Asn	Tyr 880
Gly	Asp	Met	Asp	Ile 885	Tyr	Ile	Thr	Ala	Ser 890	Gly	Ile	Asp	Asp	Gln 895	Ala

ES 2 750 008 T3

Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln
 900 905 910
 Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr
 915 920 925
 Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe
 930 935 940
 Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys
 945 950 955 960
 Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys
 965 970 975
 Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val
 980 985 990
 Gln Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu
 995 1000 1005
 Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg
 1010 1015 1020
 Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys
 1025 1030 1035
 Gly Lys Arg Val Val Ser
 1040

<210> 10
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Lys Pro Val Trp Val Ala Thr Leu Leu Trp Met Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Pro Arg Leu Gly Ala Ala Arg Lys Gly Ser Pro Glu Glu Ala Ser Phe
 20 25 30
 Tyr Tyr Gly Thr Phe Pro Leu Gly Phe Ser Trp Gly Val Gly Ser Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Gln Thr Glu Gly Ala Trp Asp Gln Asp Gly Lys Gly Pro Ser
 50 55 60

ES 2 750 008 T3

Ile	Trp	Asp	Val	Phe	Thr	His	Ser	Gly	Lys	Gly	Lys	Val	Leu	Gly	Asn	65	70	75	80
Glu	Thr	Ala	Asp	Val	Ala	Cys	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Val	Gln	Glu	Asp	85	90	95	
Ile	Ile	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	His	Val	Asn	His	Tyr	Arg	Phe	Ser	Leu	100	105	110	
Ser	Trp	Pro	Arg	Leu	Leu	Pro	Thr	Gly	Ile	Arg	Ala	Glu	Gln	Val	Asn	115	120	125	
Lys	Lys	Gly	Ile	Glu	Phe	Tyr	Ser	Asp	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Leu	Ser	130	135	140	
Ser	Asn	Ile	Thr	Pro	Ile	Val	Thr	Leu	His	His	Trp	Asp	Leu	Pro	Gln	145	150	155	160
Leu	Leu	Gln	Val	Lys	Tyr	Gly	Gly	Trp	Gln	Asn	Val	Ser	Met	Ala	Asn	165	170	175	
Tyr	Phe	Arg	Asp	Tyr	Ala	Asn	Leu	Cys	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Asp	Arg	180	185	190	
Val	Lys	His	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Asp	Pro	Arg	Ala	Met	Ala	Glu	Lys	195	200	205	
Gly	Tyr	Glu	Thr	Gly	His	His	Ala	Pro	Gly	Leu	Lys	Leu	Arg	Gly	Thr	210	215	220	
Gly	Leu	Tyr	Lys	Ala	Ala	His	His	Ile	Ile	Lys	Ala	His	Ala	Lys	Ala	225	230	235	240
Trp	His	Ser	Tyr	Asn	Thr	Thr	Trp	Arg	Ser	Lys	Gln	Gln	Gly	Leu	Val	245	250	255	
Gly	Ile	Ser	Leu	Asn	Cys	Asp	Trp	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Ile	Ser	Asn	260	265	270	
Pro	Lys	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Arg	Tyr	Leu	Gln	Phe	Cys	Leu	Gly	275	280	285	
Trp	Phe	Ala	Asn	Pro	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Tyr	Pro	Gln	Val	Met	Lys	290	295	300	
Asp	Tyr	Ile	Gly	Arg	Lys	Ser	Ala	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Met	Ser	Arg	305	310	315	320

ES 2 750 008 T3

Leu Pro Val Phe Ser Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Ile Lys Gly Thr Ser
 325 330 335

Asp Phe Leu Gly Leu Gly His Phe Thr Thr Arg Tyr Ile Thr Glu Arg
 340 345 350

Asn Tyr Pro Ser Arg Gln Gly Pro Ser Tyr Gln Asn Asp Arg Asp Leu
 355 360 365

Ile Glu Leu Val Asp Pro Asn Trp Pro Asp Leu Gly Ser Lys Trp Leu
 370 375 380

Tyr Ser Val Pro Trp Gly Phe Arg Arg Leu Leu Asn Phe Ala Gln Thr
 385 390 395 400

Gln Tyr Gly Asp Pro Pro Ile Tyr Val Met Glu Asn Gly Ala Ser Gln
 405 410 415

Lys Phe His Cys Thr Gln Leu Cys Asp Glu Trp Arg Ile Gln Tyr Leu
 420 425 430

Lys Gly Tyr Ile Asn Glu Met Leu Lys Ala Ile Lys Asp Gly Ala Asn
 435 440 445

Ile Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ser Leu Leu Asp Lys Phe Glu Trp Glu
 450 455 460

Lys Gly Tyr Ser Asp Arg Tyr Gly Phe Tyr Tyr Val Glu Phe Asn Asp
 465 470 475 480

Arg Asn Lys Pro Arg Tyr Pro Lys Ala Ser Val Gln Tyr Tyr Lys Lys
 485 490 495

Ile Ile Ile Ala Asn Gly Phe Pro Asn Pro Arg Glu Val Glu Ser Trp
 500 505 510

Tyr Leu Lys Ala Leu Glu Thr Cys Ser Ile Asn Asn Gln Met Leu Ala
 515 520 525

Ala Glu Pro Leu Leu Ser His Met Gln Met Val Thr Glu Ile Val Val
 530 535 540

Pro Thr Val Cys Ser Leu Cys Val Leu Ile Thr Ala Val Leu Leu Met
 545 550 555 560

Leu Leu Leu Arg Arg Gln Ser
 565

REIVINDICACIONES

1. Célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente, en la que dicha célula madre comprende un ácido nucleico exógeno que comprende una región codificante de Klotho unida operativamente a un promotor o una combinación de promotor/potenciador, en la que la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente presenta una expresión aumentada de Klotho en comparación con una célula madre mesenquimatosa no modificada.
2. La célula modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ácido nucleico exógeno comprende un vector vírico, más preferentemente un vector retrovítico.
3. La célula modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el promotor es un promotor constitutivo, en la que el promotor constitutivo es preferentemente el promotor EFS, PGK o EF1 alfa.
4. La célula modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha célula comprende adicionalmente (iii) un gen marcador de selección unido operativamente a (iv) un promotor constitutivo o una combinación de promotor/potenciador.
5. La célula modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la región codificante de Klotho codifica una proteína de acuerdo con una de las SEQ ID NO 6 a 10, en la que la región codificante de Klotho preferentemente comprende o consiste en una secuencia de acuerdo con las SEQ ID NO 1 a 5.
6. La célula modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la región codificante de Klotho codifica una forma secretada de la proteína Klotho.
7. La célula modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente presenta una expresión aumentada de una forma secretada de proteína Klotho en comparación con una célula madre mesenquimatosa no modificada, en la que la forma secretada de la proteína Klotho comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 80 %, preferentemente de al menos un 90 %, con respecto a la SEQ ID NO 8, o una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO 8.
8. La célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como medicamento.
9. La célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento de acuerdo con la reivindicación anterior, en la que dicha célula se administra mediante la introducción de un número terapéuticamente eficaz de dichas células en el torrente sanguíneo de un paciente, mediante la introducción de un número terapéuticamente eficaz de dichas células por vía subcutánea, o en la que dicha célula se administra por vía intratecal.
10. La célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en la que dicha célula se administra en múltiples eventos de administración, por ejemplo, al menos una vez al mes, preferentemente durante un período de tiempo de 3 meses, preferentemente al menos una vez a la semana.
11. La célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
12. La célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento en el tratamiento de cáncer, enfermedad renal, arterioesclerosis, diabetes mellitus, disfunción eréctil, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades autoinmunitarias, una enfermedad inflamatoria del pulmón, sepsis y/o demencia.
13. La célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento en el tratamiento de fibrosis de órganos.
14. La célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento en el tratamiento de cáncer, fibrosis de órganos, insuficiencia renal, arterioesclerosis, demencia, diabetes mellitus y enfermedades autoinmunitarias, enfermedades relacionadas con la autoinmunidad o enfermedades pulmonares de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dichas células se administran mediante la introducción de un número terapéuticamente eficaz de células mediante inhalación, inyección endoscópica de tejido, inyección de tejido mediada por catéter, inyección de líquido cefalorraquídeo, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intramuscular, opcionalmente en combinación con la introducción de dicha célula en el torrente sanguíneo de un paciente.
15. La célula madre mesenquimatosa modificada genéticamente para su uso como medicamento de acuerdo con una

cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14,

- a) en la que el sujeto es humano; y/o
- b) en la que dicha célula modificada genéticamente es alógena con respecto al sujeto; y/o
- 5 c) en la que dicha célula modificada genéticamente es autóloga con respecto al sujeto.