



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 184 623**

⑫ Número de solicitud: 200101526

⑬ Int. Cl.⁷: A61K 48/00

C12N 15/16

C12N 5/06

A61F 2/10

A61P 5/00

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **29.06.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2003**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.04.2003

⑰ Solicitante/s: **CENTRO DE INVESTIGACIONES
ENERGÉTICAS, MEDIOAMBIENTALES Y
TECNOLÓGICAS (C.I.E.M.A.T.)**
Avda. Complutense 22
28040 Madrid, ES
**CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN
DE ASTURIAS - CRUZ ROJA y
FUNDACIÓN MARCELINO BOTÍN**

⑱ Inventor/es: **Jorcano Noval, José Luis;**
Larcher Laguzzi, Fernando;
Meana Infiesta, Alvaro y
Rio Nechaevsky, Marcela del

⑲ Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro**

⑳ Título: **Piel artificial autóloga secretora de leptina y método de obtención.**

㉑ Resumen:

Piel artificial autóloga secretora de leptina y método de obtención.

Incorpora queratinocitos modificados genéticamente mediante su infección con un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana sobre una dermis artificial autóloga obtenida, básicamente, por la gelificación con Ca⁺⁺ de plasma con plaquetas.

El método de obtención comprende las etapas de:

- Obtención del plasma con plaquetas mediante centrifugación ligera.
- Cultivo de células dérmicas a partir de una biopsia.
- Gelificación del plasma con plaquetas mediante sales de calcio, sembrando en el interior de la matriz de fibrina las células dérmicas cultivadas.
- Cultivo de queratinocitos a partir de una biopsia.
- Modificación genética de los queratinocitos mediante infección con un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana.
- Cultivo de los queratinocitos modificados genéticamente hasta confluencia.
- Selección de los queratinocitos modificados genéticamente mediante un gen marcador.
- Sembrado de los queratinocitos seleccionados sobre la dermis artificial obtenida tras las tres primeras etapas.

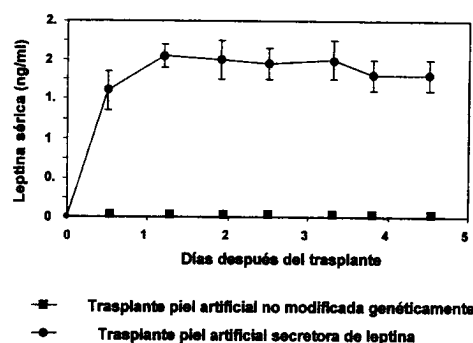


FIG. 4

DESCRIPCION

Piel artificial autóloga secretora de leptina y método de obtención.

La presente invención se refiere a una piel artificial utilizable para el tratamiento de las patologías causadas por una deficiencia permanente de la hormona proteica leptina.

Antecedentes de la invención

La Leptina es una hormona proteica esencial secretada mayoritariamente por los adipocitos encargada de regular tanto la ingesta como la función neuroendócrina a través de receptores hipotalámicos. Se han recogido hasta el momento, además, datos experimentales que evidencian un claro efecto de la leptina sobre la función celular actuando directamente sobre tejidos periféricos entre los que se incluyen el páncreas endócrino, la glándula pituitaria, el ovario, el músculo esquelético e hígado. La leptina podría jugar también un papel clave en procesos relacionados con la angiogénesis y en la remodelación ósea. La deficiencia congénita de leptina ha sido identificada como el agente etiológico de una patología, de baja incidencia en la población, que cursa con la aparición temprana de una obesidad severa (Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C., Earley, A., Barnett, A., Prins, J. And O'Rahilly S. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908). Niveles bajos de leptina circulante se han observado también en pacientes afectados por distintas formas de diabetes lipoatrófica generalizada. Los pacientes afectados por esta enfermedad presentan una importante involución del tejido adiposo (fuente de la hormona) así como hiperglucemia y una resistencia severa a la insulina. Otras manifestaciones clínicas de esta patología incluyen la aparición de un síndrome anabólico caracterizado por organomegalia y cardiomiopatía hipertrofica (Pardini, V.C., Victoria, I.M., Rocha, S.M., Andrade, D.G., Rocha, A.M., Pieroni F.B., Milagres G., Purisch, S. and Velho, G. (1998) Leptin levels, beta-cell function, and insulin sensitivity in families with congenital and acquired generalized lipoatrophic diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 503-508).

Esta última es la principal causa de muerte entre los pacientes afectados de diabetes lipoatrófica generalizada. La administración de leptina ha demostrado ser capaz de incrementar el metabolismo glucídico y restablecer la sensibilidad a la insulina en dos modelos animales de lipo-distrofia congénita generalizada con lo que queda establecido el papel crítico de la hormona en la fisiopatología de estos desordenes. Actualmente se están llevando a cabo distintos estudios clínicos en los que se trata a pacientes afectados tanto por deficiencia congénita de la hormona (Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A. and O'Rahilly S. (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341, 879-884) como a pacientes que sufren de diabetes li-

podistrófica con inyecciones diarias de leptina recombinante. Los resultados que se están obteniendo son muy alentadores y subrayan el potencial terapéutico de leptina para el tratamiento de dichas patologías.

La terapia génica sistémica consiste en una intervención médica en la que células del propio paciente, o de otra fuente apropiada, son modificadas genéticamente para tratar o curar cualquier patología, independientemente de su etiología, derivada de una deficiencia en los niveles circulantes de una proteína determinada. Por tanto se puede considerar a la terapia génica sistémica como un método de producción y suministro *in situ* de proteínas. En el caso de enfermedades en las que la proteína debe ser administrada durante toda la vida del paciente, es necesario asegurar el mantenimiento tanto de la funcionalidad del gen incorporado como la supervivencia de la célula diana de la modificación genética. Los enfoques actualmente disponibles para una terapia génica sistémica y permanente hacen uso de vectores virales del tipo de adenovirus y AAV en células normalmente quiescentes tales como hepatocitos y músculo esquelético. La administración en estos casos es *in vivo*, es decir, el vector viral se inyecta directamente en el tejido o en el torrente sanguíneo. Dichas aproximaciones tienen serias limitaciones que restringen su aplicabilidad terapéutica, tales como la posibilidad de generar respuestas inmunes no deseadas (adenovirus), una capacidad muy limitada de clonación en el vector viral (virus asociados a adenovirus: AAV) o la dificultad para acceder al tejido modificado genéticamente en caso de una reacción adversa al gen introducido.

El documento de patente ES 2 106 891 describe una técnica que utiliza células transfectadas con un ADN exógeno que codifica una proteína terapéutica. La información genética se transfiere por métodos no virales del tipo: electroporación, microinyección o recombinación homóloga, pero estos métodos son mucho menos eficientes que la utilización de vectores retrovirales. Esto es particularmente cierto al trabajar con la piel, en donde es necesario alcanzar porcentajes altos de células modificadas genéticamente para asegurar la transferencia también a las células madre epidérmicas. La obtención de células madre epidérmicas modificadas es el paso obligado cuando se trata de generar en el paciente una producción permanente, a partir de la piel, de la proteína terapéutica. Hasta el momento, la modificación genética de células madre epidérmicas ha sido conseguida únicamente con el empleo de vectores retrovirales.

La piel representa un sistema exportador de proteínas exógenas muy atractivo (Fenjves, E.S., Smith, J., Zaradic, S. and Taichman LB. (1994) Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: prospects for keratinocyte gene therapy. *Hum Gene Ther.* 5, 1241-1248). Además, en la piel del propio paciente existen células madre (*stem*) epiteliales cuya manipulación genética *ex vivo* (expresión de la proteína deficiente) y posterior reimplantación asegurarían la regeneración en el paciente de su propia piel modificada, ahora secretora de

la proteína terapéutica, cuya producción se mantendría durante toda la vida (De Luca, M. and Pellegrini, G. (1997) The importance of epidermal stem cells in keratinocyte-mediated gene therapy. *Gene Therapy* 4, 381-383). Las células epiteliales de la piel, incluidas las células madre o *stem*, se pueden aislar, cultivar, y modificar genéticamente empleando vectores retrovirales así como trasplantar nuevamente al paciente. El epitelio regenerado a partir de una célula madre modificada genéticamente daría como resultado una piel que expresa el factor de forma consistente en todos sus estratos y por tiempo ilimitado. Por último la piel es nuestra cobertura más externa por tanto representa un órgano que puede monitorizarse clínicamente así como retirarse de forma poco traumática en caso de efectos adversos. Resultaría por tanto muy valioso disponer de un método en el que la producción y suministro *in vivo* de leptina se lleve a cabo a partir de un trasplante autólogo de queratinocitos que incluyese células madre epiteliales modificadas genéticamente, secretoras de la proteína, para el tratamiento/curación de enfermedades de cursen con niveles deficientes de leptina.

En los documentos de patente P9701533 y P200100494 se describen dos métodos para la preparación de pieles artificiales, en las que los queratinocitos se cultivan sobre una matriz dérmica de fibrina, obtenida por bioprecipitado o directamente del plasma, resultando ser la matriz de fibrina un sustrato óptimo para la proliferación de los queratinocitos. La proliferación (amplificación de los queratinocitos) es un paso crítico cuando se pretende emplear esta piel para el tratamiento de grandes quemados, pero no lo es en el caso de terapia génica. Aquí lo importante es que la fibrina mantiene todas las propiedades de la célula madre modificadas genéticamente, asegurando la reimplantación de las células madre funcionales que perpetuarán la producción de la proteína terapéutica. La utilización de un tipo de piel artificial en el caso que nos ocupa aprovecha fundamentalmente la capacidad de la fibrina de mantener en estado funcional las células madres epidérmicas alteradas genéticamente, en lugar de buscar grandes expansiones de biopsia autóloga.

El objetivo de la invención es, en consecuencia, el disponer de una piel artificial autóloga con capacidad de secretar y mantener *in vivo*, tras un trasplante, niveles terapéuticos de leptina que actúen, en el individuo receptor de dicho trasplante, como fuente alternativa de la hormona perdida, perpetuándose el efecto por el resto de la vida del paciente.

Descripción de la invención

La piel artificial autóloga utilizada en la presente invención está constituida por un componente dérmico y un componente epidérmico al que se le ha transferido el gen codificante para leptina. Un aspecto básico de esta invención consiste en el desarrollo de un procedimiento eficaz para la obtención y mantenimiento *in vivo* de células madre epidérmicas modificadas genéticamente. Este procedimiento consiste en la transferencia eficiente (>50 % células transfectadas) del gen codificante para la leptina mediante el empleo de un vector retroviral seguido de un enriquecimiento

del cultivo en células que producen la proteína terapéutica y de una recuperación del cultivo enriquecido en una matriz de fibrina y fibroblastos que protege a las células madre epidérmicas de una posible diferenciación y pérdida de sus propiedades. La incorporación, en la piel artificial a trasplantar, de células madre epidérmicas secretoras de leptina asegura una corrección permanente del defecto con una única intervención.

Breve descripción de las figuras

Para complementar la descripción que antecede y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se va a realizar una descripción detallada de una realización preferida, en base a un juego de dibujos que se acompañan a esta memoria descriptiva y en donde, con carácter meramente orientativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1 muestra el efecto del trasplante de piel humana secretora de leptina sobre los niveles de glucemia en ratones ob/ob.

La figura 2 muestra el efecto del trasplante de piel humana secretora de leptina sobre la ingesta diaria en ratones ob/ob.

La figura 3 muestra el efecto del trasplante de piel humana secretora de leptina sobre el peso corporal en ratones ob/ob.

La figura 4 muestra el efecto del trasplante de piel humana secretora de leptina sobre los niveles de leptina en ratones ob/ob.

Descripción detallada de una realización preferida

La realización que se describe se refiere al desarrollo de un método para el tratamiento de patologías caracterizadas por una deficiencia permanente de la hormona proteica leptina. El método consiste en el trasplante de una piel artificial autóloga que actúe, en el individuo receptor de dicho trasplante, como fuente alternativa de la hormona perdida y que ese efecto se perpetúe por el resto de la vida del paciente.

La obtención del principal componente de la piel artificial, queratinocitos modificados genéticamente para producir y secretar leptina, se describe a continuación.

Los queratinocitos se obtienen a partir de una biopsia de piel por incubación con la enzima tripsina. Una vez aislados se siembran sobre células 3T3-J2 o Swiss 3T3 letalmente irradiadas. La transducción viral se lleva a cabo sobre colonias de queratinocitos de 8 a 16 células del primer pase de un cultivo primario. Los queratinocitos se incuban entonces bien con sobrenadantes retrovirales generados por transfección transitoria en la línea 293T o a partir de una productora estable como por ejemplo la línea PA317 o la línea PG13. La infección con sobrenadantes retrovirales generados a partir de las líneas 293T, PG13 o PA317 se lleva a cabo en dos días consecutivos en cada uno de los cuales las células son expuestas a dos ciclos de infecciones. La modificación genética se puede realizar también por co-cultivo con las líneas PG13 o PA317 previa irradiación letal de las mismas.

La modificación genética de los queratinocitos, comprende las siguientes etapas:

1. Primer ciclo de modificación genética que,

partiendo de colonias con un número de células entre 8 y 16 del cultivo de queratinocitos obtenido a partir de la biopsia de piel, y sembrados sobre la línea celular 3T3-J2 o Swiss 3T3 letalmente irradiadas, comprende una centrifugación a 3.500 r.p.m. y 30°C durante una hora en presencia de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 60 µg/ml. A este primer contacto de los queratinocitos con el retrovirus le sigue una incubación durante un tiempo de 4 horas en un medio fresco exento de retrovirus. Sorprendentemente ni la centrifugación a velocidades mayores de las habituales ni las altas concentraciones de polibreno empleadas en el primer ciclo alteraron la viabilidad o la funcionalidad de las células madre epidérmicas.

2. Segundo ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 2 horas de los queratinocitos en presencia de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus e incubación durante un tiempo de 16 horas.
3. Tercer ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 4 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus e incubación durante un tiempo de 4 horas.
4. Cuarto ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 4 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, y cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus.

Entre los vectores virales se pueden emplear vectores que además de portar una secuencia de ADN que codifique y exprese leptina por-

ten también una secuencia que codifique para un gen marcador (por ejemplo: pLZRS leptin-IRES-EGFP) en donde el marcador es el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) o pLZRS-leptin-IRES-GHR en donde el marcador es el receptor de la hormona de crecimiento (GHR).

Cuando los queratinocitos alcanzan el 60-80% de confluencia, se despegan de los frascos de cultivos por tripsinización, se resuspenden en PBS/2% suero fetal bovino, se analizan por citometría de flujo y se seleccionan en base a por ejemplo la fluorescencia de la proteína verde. Esta manipulación no altera la funcionalidad de las células madre epidérmicas comprendida entre la población transducida por el virus. La población así purificada formada únicamente por células que recibieron el gen marcador y el gen codificante para la leptina son sembradas ahora sobre una matriz de fibrina como la descrita en el documento de patente ES 200100494.

Ejemplo 1

Los modelos animales deficientes en leptina constituyen herramientas de gran valor para el seguimiento de los efectos inducidos por diversos protocolos tales como la administración de la proteína recombinante o de otros posibles agonistas. Para el seguimiento de la presente invención, se llevaron a cabo trasplantes de pieles artificiales humanas secretoras de leptina en ratones ob/ob inmunosuprimidos o inmunodeficientes capaces de aceptar el xenotrasplante. El ratón ob/ob es un ratón mutante deficiente en leptina (Coleman, D.L. (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14, 141-148). En estos animales la falta de leptina conduce a un fenotipo caracterizado por obesidad severa, debida a un incremento importante de la ingesta diaria, hiperglucemia con hipeinsulinemia (diabetes tipo II) e infertilidad.

Sobre una población de ratones ob/ob deficientes en leptina se aplicó un trasplante de piel artificial realizado de acuerdo con la presente invención. Los niveles circulantes de glucosa y leptina así como la ingesta diaria y el peso se monitorizaron en relación a una población testigo que recibió un trasplante de piel no modificada genéticamente, observándose la normalización progresiva de los mismos y su mantenimiento en el tiempo, tal como se muestra en las figuras 1 a 4.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de una piel artificial autóloga secretora de leptina, **caracterizado** por comprender las siguientes etapas:

- obtención de plasma con plaquetas mediante centrifugación ligera de sangre total de un humano y congelación subsiguiente
- cultivo de células dérmicas a partir de una biopsia de piel por métodos conocidos
- gelificación del plasma con plaquetas, previamente descongelado, mediante la adición de sales de calcio para obtener una matriz de fibrina, sembrando las células dérmicas cultivadas en el interior de la matriz de fibrina
- cultivo de queratinocitos a partir de una biopsia de piel por métodos conocidos
- modificación genética de los queratinocitos; de tal manera que los mismos sean susceptibles de expresar leptina de forma permanente
- cultivo de los queratinocitos genéticamente modificados hasta que están confluentes
- selección de los queratinocitos modificados genéticamente en base a un gen marcador
- sembrado de los queratinocitos seleccionados sobre la dermis artificial obtenida tras las tres primeras etapas descritas.

2. Método de obtención de una piel artificial autóloga productora de leptina, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la modificación genética de los queratinocitos, comprende las siguientes etapas:

- primer ciclo de modificación genética que, partiendo de colonias con un número de células entre 8 y 16 del cultivo de queratinocitos obtenido a partir de la biopsia de

piel, comprende una centrifugación a 3.500 r.p.m. y 30°C durante una hora en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 60 µg/ml, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus, e incubación durante un tiempo de 4 horas,

- segundo ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 2 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus e incubación durante un tiempo de 16 horas,
- tercer ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 4 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus e incubación durante un tiempo de 4 horas,
- cuarto ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 4 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, y cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus.

3. Piel artificial autóloga secretora de leptina, **caracterizada** por incorporar queratinocitos genéticamente modificados susceptibles de expresar leptina de forma permanente.

4. Piel artificial autóloga secretora de leptina, **caracterizada** por incorporar queratinocitos modificados genéticamente mediante su infección con un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana.

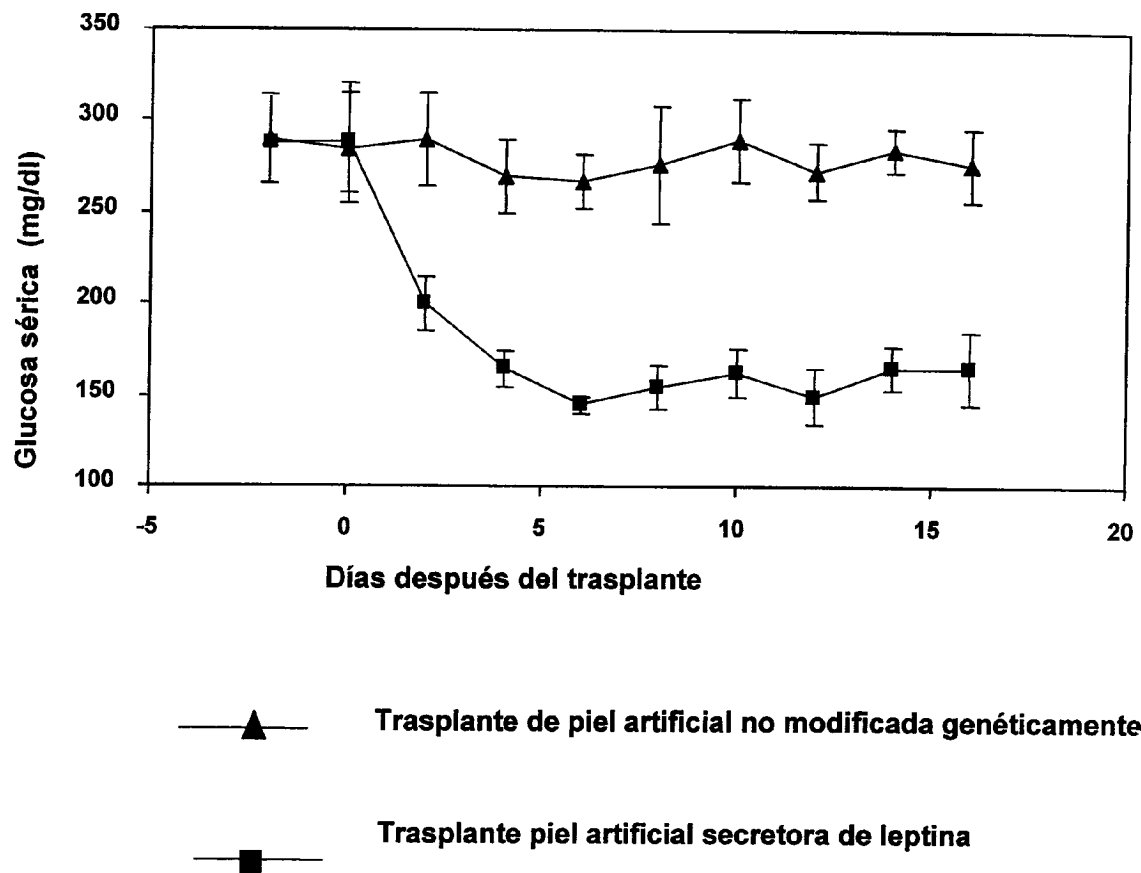


FIG. 1

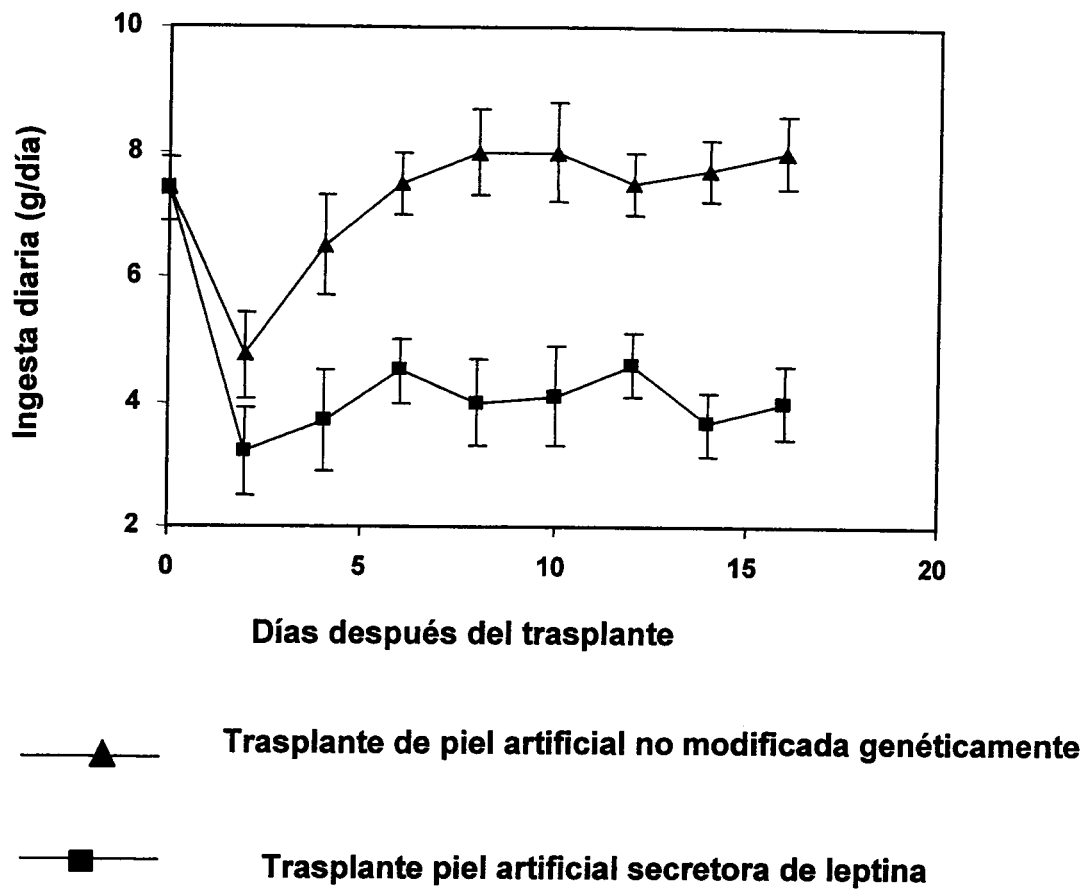


FIG. 2

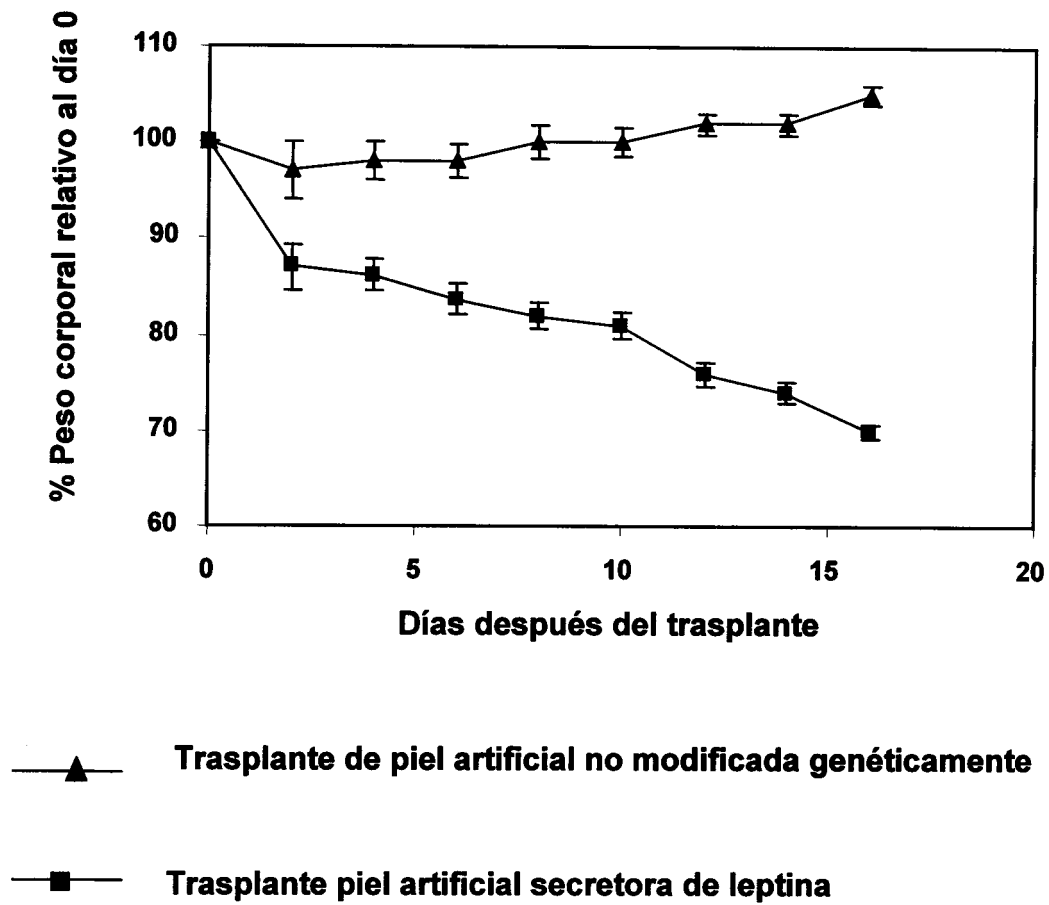


FIG. 3

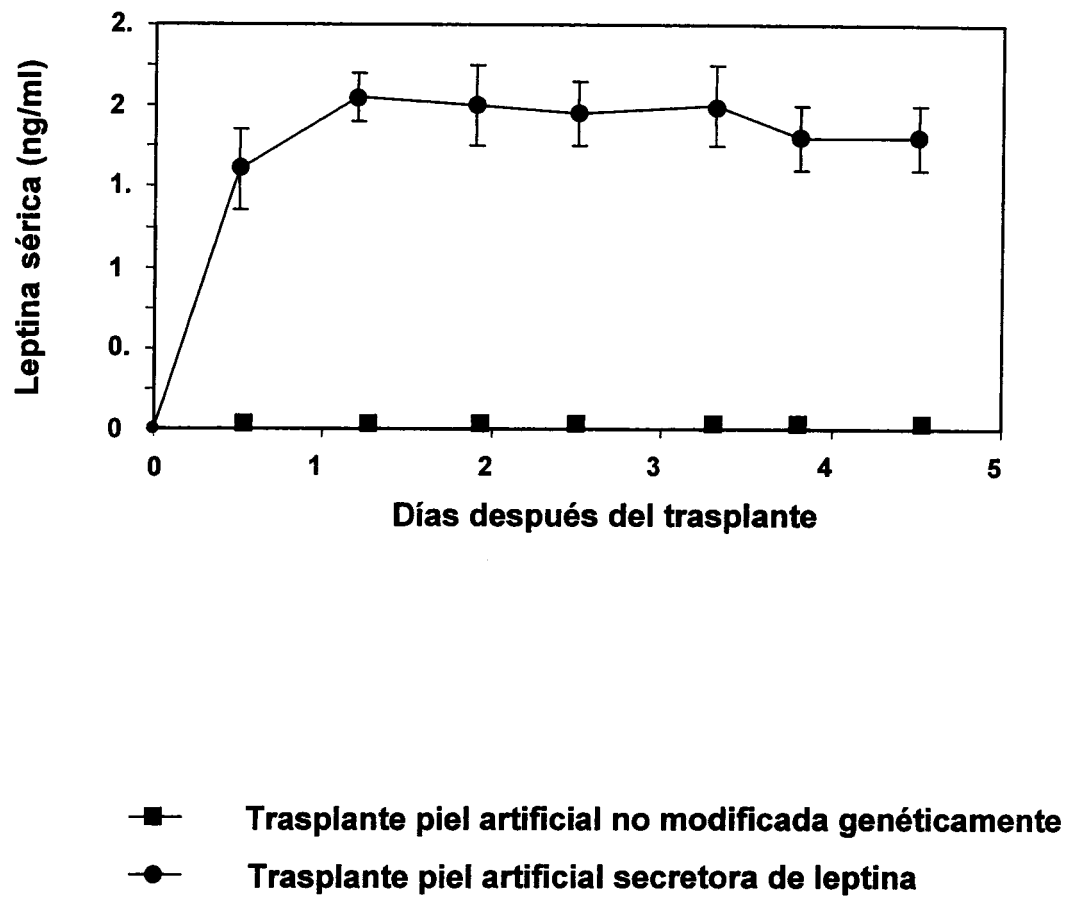


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 184 623
⑫ N.º solicitud: 200101526
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 29.06.2001
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: A61K 48/00, C12N 15/16, 5/06, A61F 2/10, A61P 5/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LARCHER, F. et al.: "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin targeted keratinocyte grafts", julio 2001, FASEB Journal, Vol. 15 (9), páginas 1529-1538, ISSN 0892-6638, todo el documento.	1-4
X	WO 8700201 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15.01.1987, todo el documento, en particular, reivindicación 30.	1-4
X	ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, todo el documento, en particular, reivindicación 7.	1-4
A	US 6001816 A (MORSY M.A. et al.) 14.12.1999, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

28.02.2003

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1