

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 866**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03772195 .8**
96 Fecha de presentación: **25.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1542536**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

54 Título: **Células troncales hemotopoyéticas y procedimientos de tratamiento de las enfermedades oculares neovasculares con las mismas**

30 Prioridad:
25.07.2002 US 398522 P
02.05.2003 US 467051 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.03.2012

73 Titular/es:
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
10550 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US

72 Inventor/es:
FRIEDLANDER, Martin;
OTANI, Atsushi y
DASILVA, Karen

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 376 866 T3

DESCRIPCIÓN

Células troncales hematopoyéticas y procedimientos de tratamiento de las enfermedades oculares neovasculares con las mismas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de células troncales hematopoyéticas negativas para el linaje (HSC Lin⁻) derivadas de la médula ósea para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad ocular en un paciente. La invención se refiere asimismo a las HSC Lin⁻ transfectadas y a su utilización para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la angiogénesis retiniana en el ojo de un paciente y para el tratamiento de las enfermedades neovasculares retinianas en un paciente.

Antecedentes de la invención

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y la retinopatía diabética (RD) son las causas principales de la pérdida visual en las naciones industrializadas y lo son como consecuencia de una neovascularización retiniana anormal. Debido a que la retina está constituida por capas bien definidas de elementos vasculares, gliales y neuronales, las perturbaciones relativamente pequeñas tales como las apreciadas en la proliferación vascular o los edemas pueden conducir a una pérdida significativa de la función visual. Las degeneraciones retinianas heredadas, tales como la retinitis pigmentaria (RP), están asimismo asociadas con anomalías vasculares, tales como la atrofia vascular y la estenosis arteriolar. Aunque se ha progresado de manera significativa en la identificación de los factores que promueven e inhiben la angiogénesis, no se dispone en la actualidad de ningún tratamiento para tratar de manera específica la enfermedad vascular ocular.

Durante muchos años ha resultado conocido que existe una población de células troncales en la circulación de un adulto normal y la médula ósea. Pueden diferenciarse diferentes subpoblaciones de estas células en los linajes negativos para linaje (Lin⁻) no hematopoyéticos o positivos para linaje hematopoyéticos (Lin⁺). Además, se ha demostrado recientemente que la población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje (HSC) contiene células progenitoras endoteliales (EPC) que pueden formar vasos sanguíneos *in vitro* e *in vivo*, (ver Ashara *et al. Science* 2175, 964-7 (1997)). Estas células pueden participar en la angiogénesis posnatal patológica y normal (ver Lyden *et al. Nat. Med.* 7, 1194-201 (2001); Kalka *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3422-7 (2000); y Kocher *et al. Nat. Med.* 7, 430-6 (2001)) así como diferenciarse en una variedad de tipos de células no endoteliales que comprenden hepatocitos (ver Lagasse *et al. Nat. Med.* 6, 1229-34 (2000)), microglia (ver Priller *et al. Nat. Med.* 7, 1356-61 (2002)), cardiomiocitos (ver Orlic *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10344-9 (2001)) y epitelio (ver Lyden *et al. Nat. Med.* 7, 1194-201 (2001)). Aunque estas células han sido utilizadas en varios modelos experimentales de angiogénesis, el mecanismo de diferenciación de EPC a la neovasculatura no es conocido y no se ha identificado ninguna estrategia que aumente de manera efectiva el número de células que contribuyen a una vasculatura particular.

Grant *et al.* describen que las células troncales hematopoyéticas adultas proporcionan una actividad de los hemangioblastos funcional durante la neovascularización (ver Grant *et al. Nat. Med.* 8, 607-612 (2002)). Otani *et al. PNAS* 99, 178-183 (2002)).

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona la utilización de una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea que comprende las células progenitoras endoteliales (EPC; conocidas asimismo como células precursoras endoteliales) para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad ocular en un paciente en la que el medicamento es administrado mediante inyección intravítrea en un ojo del paciente en una cantidad suficiente para detener la enfermedad.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje transfectada que comprende una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea, de mamífero, que comprende las células progenitoras endoteliales en la que por lo menos 50% de las células comprenden los marcadores celulares CD31 y c-kit, siendo dicha población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea, de mamífero, transfectada con un gen que codifica un péptido útil terapéuticamente en la que el péptido útil terapéuticamente es un péptido antiangiogénico seleccionado de entre el grupo constituido por fragmento T1 de TrpRS y fragmento T2 de TrpRS.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona la utilización de una población de células troncales transfectadas que comprende una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea, de mamífero, que comprende células progenitoras endoteliales en la que por lo menos 50% de las células comprenden los marcadores celulares CD31 y c-kit para la preparación de un medicamento destinado a la inhibición de la angiogénesis retiniana en el ojo de un paciente que requiera la inhibición de la angiogénesis

retiniana en la que dicha población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea, de mamífero, es transfectada con un gen que codifica un péptido útil terapéuticamente y el medicamento es inyectado por vía intravítrea en el ojo del paciente.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona la utilización de una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje transfectada obtenida a partir de la médula ósea en la que la población de células troncales es transfectada con un gen útil terapéuticamente para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades neovasculares retinianas en un paciente, en la que el medicamento es inyectado por vía intravítrea en el ojo del paciente.

Las formas de realización preferidas de los aspectos de la invención son expuestas en las reivindicaciones 2 a 8, 11, 12, y 14 a 16.

Las EPC en las poblaciones de HSC negativas para linaje descritas en la presente memoria son incorporadas ampliamente en los vasos retinianos en desarrollo y permanecen estables incorporadas en la neovasculatura del ojo. Las poblaciones de HSC negativas para linaje descritas en la presente memoria pueden ser utilizadas para el rescate y la estabilización de la vasculatura retiniana en degeneración en los mamíferos. En una forma de realización de las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria, las células son transfectadas con un gen útil terapéuticamente. Las células transfectadas pueden dianizar selectivamente la neovasculatura e inhibir la formación de nuevos vasos sin afectar a los vasos ya establecidos a través de una forma de terapia génica basada en células. Las células de las poblaciones de HSC negativas para linaje descritas en la presente memoria que han sido transfectadas con un gen que codifica los péptidos inhibidores de la angiogénesis resultan útiles para la modulación del crecimiento de los vasos sanguíneos anormal en enfermedades como ARMD, DR y determinadas degeneraciones retinianas asociadas a una vasculatura anormal.

Una ventaja particular de los tratamientos oculares con la población de HSC Lin⁻ descrita en la presente memoria es un efecto de rescate neurotrófico y vasculotrófico apreciado en los ojos tratados por vía intravítrea con las HSC Lin⁻. Las neuronas y los fotorreceptores retinianos son preservados y la función visual es mantenida en los ojos tratados con las HSC Lin⁻ aisladas.

Las poblaciones de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje que contienen células progenitoras endoteliales son aisladas de la médula ósea, preferentemente la médula ósea adulta.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 (a y b) representa diagramas esquemáticos del desarrollo de la retina de ratón. (a) Desarrollo del plexo primario. (b) Segunda fase de la formación de los vasos retinianos. GCL, capa de células ganglionares.; IPL, capa del plexo interno; INL, capa nuclear interna; OPL, capa del plexo externo; ONL, capa nuclear externa; RPE, epitelio pigmentario de la retina; ON, nervio óptico; P, periferia.

La figura 1 representa la caracterización citométrica de flujo de las células separadas HSC Lin⁻ y HSC Lin⁺ derivadas de la médula ósea. Fila superior: Distribución en línea de puntos de las células no marcadas con anticuerpo, en las que R1 define la zona de selección cuantificable de la tinción PE positiva; R2 indica GFP positiva; fila intermedia: HSC Lin⁻ (C57B/6) y fila inferior: células HSC Lin⁺ (C57B/6), estando marcada cada línea celular con los anticuerpos conjugados con PE para Sca-1, c-kit, Flk-1/KDR, CD31. Los datos Tie-2 se obtuvieron a partir de los ratones Tie-a-GFP. Los porcentajes indican el porcentaje de células marcadas positivas fuera del total de la población HSC Lin⁻ o HSC Lin⁺.

La figura 2 representa el injerto de las células HSC Lin⁻ una retina de ratón en desarrollo. (a) A los cuatro días de la posinyección (P6) las células HSC Lin⁻ eGFP⁺ inyectadas por vía intravítrea se fijaron y diferenciaron sobre la retina. (b) Las HSC Lin⁻ (B6. 129S7-Gtrosa26 ratones, teñidas con anticuerpo β-gal), se establecieron delante de la vasculatura teñidas con anticuerpo de colágeno IV (el asterisco indica la punta de la vasculatura). (c) La mayoría de las células HSC Lin⁺ (eGFP⁺) no pudieron diferenciarse a los cuatro días posinyección (P6). (d) Las EP murinas eGFP⁺ mesentéricas cuatro días tras la inyección (P6). (e) Las HSC Lin⁻ (eGFP⁺) inyectadas en los ojos de un ratón adulto. (f) Aumento bajo de las HSC Lin⁻ eGFP⁺ (flechas) que se alojan y se diferencian a lo largo del patrón de astrocitos preexistente en el ratón transgénico GFAP-GFP. (g) Aumento superior de la asociación entre las células Lin⁻ (eGFP) y el astrocito subyacente (flechas). (h) Control transgénico GFAP-GFP no inyectado. (i) Cuatro días posinyección (P6), las células HSC Lin⁻ eGFP se desplazan a y experimentan diferenciación en la zona del plexo profundo futuro. La figura de la izquierda representa la actividad de las células HSC Lin⁻ en una retina de preparación completa; la figura de la derecha indica la ubicación de las células Lin⁻ (flechas) en la retina (la parte superior es el lado vítreo, la parte inferior es el lado de la esclerótica). (j) Marcado doble con los anticuerpos α-CD31-PE y α-GFP-alexa 488. Siete días tras la inyección, fueron incorporadas las HSC Lin⁻ (Egfp, rojo) a la vasculatura (CD31). Las puntas de las flechas indican las zonas incorporadas. (k) Las células HSC Lin⁻ eGFP⁺ formaron vasos catorce días tras la inyección (P17). (l y m) La inyección intracardiaca de rodamina-dextrano indica que los vasos se encuentran intactos y funcionales en el plexo profundo (m) y primario (l).

La figura 3 (a y b) muestra que las células HSC Lin⁻ eGFP⁺ se dirigen a la gliosis (indicado mediante la GFAP que expresa astrocitos, imagen del extremo izquierdo) inducidas por una lesión mecánicamente (b) y por láser (a) en la retina adulta (el asterisco indica el lugar lesionado). Las imágenes del extremo derecho consisten en un aumento superior, que demuestra la asociación próxima de las HSC Lin⁻ y los astrocitos. Barra de calibración = 20 μm.

La figura 4 muestra que las células HSC Lin⁻ rescatan la vasculatura del ratón con degeneración retiniana. (a-d) Las retinas a los 27 días posinyección (P33) con tinción de colágeno IV; (a) y (b), las retinas inyectadas con las células HSC Lin⁺ (Balb/c) no presentaron ninguna diferencia en la vasculatura respecto a los ratones FVB normales; (c) y (d) las retinas inyectadas con HSC Lin⁻ (Balb/c) presentaron una red vascular abundante análoga a la del ratón de tipo natural; (a) y (c), las secciones congeladas de la retina completa (la parte superior es el lado del vítreo, la parte inferior es el lado de la esclerótica) con tinción con DAPI; (b) y (d), plexo profundo de la preparación total retiniana; (e) gráfico de barras que ilustra el aumento en la vascularidad del plexo vascular profundo formada en las retinas inyectadas con células HSC Lin⁻ (n=6). La extensión de la vascularización retiniana profunda fue cuantificada calculando la longitud total de los vasos en el interior de cada imagen. Fue comparada la longitud total media de los vasos/campo de alta potencia (en micrómetros) para las HSC Lin⁻, HSC Lin⁺ o las retinas de control. (f) Comparación de la longitud del plexo vascular profundo tras la inyección con las células HSC Lin⁻ (R, ojo derecho) o HSC Lin⁺ (L, ojo izquierdo) de ratón *rd/rd*. Son presentados los resultados de los seis ratones independientes (cada color representa cada ratón). (g) y (h) Las células HSC Lin⁻ (Balb/c) rescataron asimismo las vasculatura *rd/rd* cuando fueron inyectadas en los ojos de P15. Son presentados los plexos vasculares profundo e intermedio de las retinas inyectadas con las células HSC Lin⁻ (g) o HSC Lin⁺ (h) (un mes tras la inyección).

La figura 5 representa fotomicrográficos del tejido retiniano del ratón: (a) capa profunda de la preparación total retiniana (ratón *rd/rd*), cinco días posinyección (P11) con HSC Lin⁻ eGFP⁺ (verde). (b) y (c) La vasculatura retiniana de P60 de los ratones Tie-2-GFP (*rd/rd*) que recibieron la inyección de las células Lin⁻ de Balb/c (a) o las células HSC Lin⁺ (b) en P6. La vasculatura se tiñó con anticuerpo CD31 (rojo) y únicamente las células endoteliales endógenas presentaron un color verde. Las flechas indican los vasos teñidos con CD31 pero no con GFP. (d) Tinción con α-SMA de retina de control e inyectada con HSC Lin⁻.

La figura 6 muestra que las HSC Lin⁻ transfectadas con T2-TrpRS inhiben el desarrollo de la vasculatura retiniana de ratón. (a) Representación esquemática de TrpRs, T2-TrpRS humanas y T2-TrpRS con una secuencia señal de Igk en el extremo amino. (b) Las retinas inyectadas con células Lin⁻ transfectadas con T2-TrpRS expresan la proteína T2-TrpRS *in vivo*. 1, T2-TrpRs recombinante producida en *E. coli*; 2, T2-TrpRS recombinante producida en *E. coli*; 3, T2-TrpRS recombinante producida en *E. coli*; 4, retina de control; 5, retina inyectada con HSC Lin⁻ + pSecTag2A (únicamente vector); 6, retina inyectada con HSC Lin⁻ + pKLe135 (igk-T2-TrpRS en PSecTag), A, TrpRS endógena, B, T2-TrpRS recombinante; C, T2-TrpRS de la retina inyectada con HSC Lin⁻. (c-f) plexos secundario (profundo) y primario (superficial) de las retinas inyectadas, siete días posinyección; (c) y (d), ojos inyectados con HSC Lin⁻ transfectadas con plásmido vacío desarrolladas con normalidad; (e) y (f), la mayoría de los ojos inyectados con HSC Lin⁻ transfectadas con T2-TrpRS mostraron una inhibición del plexo profundo; (c) y (e), plexo primario (superficial); (d) y (f), plexo secundario (profundo). El leve contorno de los vasos observado en (f) son imágenes de "solapamiento" ("bleed-through") de los vasos de la red primaria representados en (e).

La figura 7 representa la secuencia de ADN que codifica TrpRS-T2 marcada con His6, SEC ID nº 1.

La figura 8 representa la secuencia de aminoácidos de T2-TrpRS marcada con His6, SEC ID nº 2.

La figura 9 ilustra fotomicrográficos y electrorretinogramas (ERG) de las retinas de ratones cuyos ojos fueron inyectados con las HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria y con las HSC Lin⁺ (controles).

La figura 10 representa líneas estadísticas que presentan una correlación entre el rescate neuronal (eje y) y el rescate vascular (eje x) para las capas vasculares profunda e intermedia (Int.) de los ojos de ratones *rd/rd* tratados con HSC Lin⁻.

La figura 11 representa líneas estadísticas que presentan la inexistencia de correlación entre el rescate neuronal (eje y) y el rescate vascular (eje x) para los ojos de ratones *rd/rd* que fueron tratados con HSC Lin⁺.

La figura 12 es un gráfico de barras de la longitud vascular (eje y) en unidades relativas arbitrarias para los ojos de ratones *rd/rd* tratados con HSC Lin⁻ (barras oscuras) y ojos de ratón *rd/rd* no tratados (barras claras) en los momentos de 1 mes (1M), 2 meses (2M) y 6 meses (6M) posinyección.

La figura 13 comprende tres gráficos de barras del número de núcleos en la capa neuronal externa (ONR) de los ratones *rd/rd* tras 1 mes (1M), 2 meses (2M) y 6 meses (6M) de la inyección, y demuestra un aumento significativo en el número de núcleos en los ojos tratados con HSC Lin⁻ (barras oscuras) con respecto a los ojos de control tratados con HSC Lin⁺ (barras claras).

La figura 14 representa los gráficos del número de núcleos en la capa neuronal exterior para los ratones *rd/rd* individuales, comparando el ojo derecho (R, tratado con HSC Lin⁻) con respecto al ojo izquierdo (L, ojo control tratado con HSC Lin⁺) en los puntos temporales (posinyección) de 1 mes (1M), 2 meses (2M), y 6 meses (6M); cada línea en un gráfico dado compara los ojos de un ratón individual.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria comprenden preferentemente HSC en las que por lo menos aproximadamente 50% de las células contienen antígenos marcadores de las células c-kit y CD31. En una forma de realización preferida, por lo menos aproximadamente 75% de las células HSC comprenden el marcador CD31, más preferentemente aproximadamente 81% de las células. En otra forma de realización preferida, por lo menos aproximadamente 65% de las células comprenden el marcador de las células c-kit, más preferentemente aproximadamente 70% de las células.

En una forma de realización particularmente preferida de las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria, de aproximadamente 50% a aproximadamente 85% de las células comprenden el marcador CD31, de aproximadamente 70% a aproximadamente 75% de las células comprenden el marcador c-kit, de aproximadamente 4% a aproximadamente 8% de las células comprenden el marcador Sca-1, y de aproximadamente 2% a aproximadamente 4% de las células comprenden el marcador Flk-1/KDR.

Las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria pueden asimismo comprender hasta aproximadamente 1% de las células que presentan el marcador antigénico Tie-2.

En las formas de realización preferidas, las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria son derivadas de médula ósea humana o de ratón, preferentemente de la médula ósea humana.

Las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria dianizan selectivamente y son incorporadas a la neovasculatura retiniana cuando son administradas mediante inyección intravítrea en el ojo de la especie de mamífero de la que las células fueron aisladas.

Las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria contienen células EPC que se diferencian en células endoteliales y generan estructuras vasculares en el interior de la retina. Particularmente, las HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria resultan útiles para el tratamiento de las enfermedades degenerativas vasculares retinianas y neovasculares retinianas, y para reparar la lesión vascular retiniana.

Las enfermedades oculares pueden ser seleccionadas de entre el grupo constituido por enfermedades degenerativas retinianas, enfermedades degenerativas vasculares retinianas, retinopatías isquémicas, hemorragias vasculares, fuga vascular, y coroidopatías. Los ejemplos de dichas enfermedades comprenden la degeneración macular relacionada con la edad (ARMD), la retinopatía diabética (DR), síndrome de presunta histoplasmosis ocular (POHS), retinopatía de prematuridad (ROP), anemia drepanocítica, y retinitis pigmentaria, así como lesiones retinianas.

El número de células troncales inyectadas en el ojo es suficiente para detener el estado patológico del ojo del paciente. Por ejemplo, el número de células puede resultar eficaz para reparar el daño retiniano del ojo del paciente, estabilizar la neovasculatura retiniana, madurar la neovasculatura retiniana, y prevenir o reparar la hemorragia vascular y la fuga vascular.

Las células presentes en las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria pueden ser transfectadas con genes útiles terapéuticamente, tales como genes que codifican las proteínas angiogénicas para su utilización en terapia génica a base de células ocular.

Las células transfectadas pueden comprender cualquier gen que resulte útil terapéuticamente para el tratamiento de los trastornos retinianos. Preferentemente, las células transfectadas en las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria comprenden un gen que codifica un péptido antiangiogénico, proteína, o un fragmento de proteína tal como TrpRS o sus fragmentos antiangiogénicos, tal como los fragmentos T1 y T2 de la misma, que son descritos en detalle en la solicitud de patente US nº de serie 10/080.839 en trámite en cotitularidad, cuya exposición es incorporada a la presente memoria como referencia.

Las poblaciones de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje que contienen células progenitoras endoteliales son aisladas de la médula ósea. El aislamiento puede suponer las etapas que consisten en (a) extraer la médula ósea de un mamífero; (b) separar una pluralidad de monocitos de la médula ósea; (c) marcar los monocitos con anticuerpos de panel de linaje conjugados con biotina para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119; y (d) extraer los monocitos que son positivos para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119 de la pluralidad de monocitos para proporcionar una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje que contienen células progenitoras endoteliales.

Las poblaciones de HSC Lin⁻ transfectadas descritas en la presente memoria pueden ser administradas mediante inyección intravítrea en un ojo para el tratamiento de las enfermedades angiogénicas oculares. Dichas poblaciones de HSC Lin⁻ transfectadas comprenden HSC Lin⁻ transfectadas con un gen útil terapéuticamente, tal como un gen que codifica un producto génico antiangiogénico.

Preferentemente, por lo menos aproximadamente 1×10^5 de células HSC Lin⁻ o de células HSC Lin⁻ transfectadas son administradas mediante inyección intravítrea a un ojo que padece una enfermedad retiniana degenerativa. El número de células que debe inyectarse depende de la gravedad de la degeneración retiniana, la edad del paciente y de otros factores que resultarán evidentes para el experto en la materia de tratamiento de las enfermedades retinianas. Las HSC Lin⁻ pueden ser administradas en una dosis única o mediante una administración de dosis múltiples durante un periodo de tiempo, como determine el médico a cargo del tratamiento.

Las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria resultan útiles para el tratamiento de las lesiones retinianas y los defectos retinianos que implican una interrupción o degradación de la vasculatura retiniana.

Las poblaciones de HSC Lin⁻ transfectadas descritas en la presente memoria resultan útiles para el suministro de genes terapéuticos a la retina, particularmente a la vasculatura retiniana.

En una forma de realización preferida, las células en las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria son transfectadas con un gen que codifica un péptido antiangiogénico tal como un fragmento antiangiogénico de la triptófano ARN sintetasa (TrpRS). Los fragmentos particularmente preferidos de la TrpRS comprenden los fragmentos T1 y T2 de la TrpRS. Las células transfectadas en las poblaciones de HSC Lin⁻ que codifican un péptido antiangiogénico descrito en la presente memoria resultan útiles para el tratamiento de la una enfermedad retiniana que implica el desarrollo vascular anormal, tal como la retinopatía diabética y enfermedades similares.

Métodos

Ejemplo 1

Aislamiento y enriquecimiento celular; preparación de las poblaciones de HSC Lin⁻ A y B.

Procedimiento general. La totalidad de las evaluaciones *in vivo* se realizaron según la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del NIH, y la totalidad de los procedimientos de evaluación fueron aprobados por el Animal Care and Use Committee del The Scripps Research Institute (TSRI, La Jolla, CA). Las células de médula ósea fueron extraídas de ratones adultos B6.129s7-Gtrosa26, tie-2GFP, ACTbEGFP, FVB/NJ (ratones *rd/rd*) o Balb/cBYJ (The Jackson Laboratory, ME).

Los monocitos fueron separados mediante separación por gradiente de densidad utilizando un gradiente de polisacarosa HISTOPAQUE[®] (Sigma, St. Louis, MO) y marcados con anticuerpos de panel de linaje conjugados con biotina (CD45, CD3, Ly-6G, CD11, TER-119, Pharmingen, San Diego, CA) para la selección de Lin⁻. Las células positivas para linaje (Lin⁺) fueron separadas y eliminadas de las HSC Lin⁻ utilizando un dispositivo de separación magnética (clasificador AUTOMACS[™], Miltenyi Biotech, Auburn, CA). La población de HSC Lin⁻ resultante, que contiene células progenitoras endoteliales fue caracterizada además utilizando un citómetro de flujo FACS[™] Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) utilizando los anticuerpos siguientes: Sca-1-conjugado con PE, c-kit, KDR, y CD31 (Pharminen, San Diego, CA). Las células de la médula ósea Tie-2-GFP se utilizaron para la caracterización de Tie-2.

Para la recolección de células endoteliales de ratón adultas, el tejido mesentérico fue extraído quirúrgicamente de un ratón ACTbEGFP y dispuesto en colagenasa (Worthington, Lakewood, NJ) para digerir el tejido, seguido por la filtración utilizando un filtro de 45 µm. Se recogió el flujo continuo y se incubó con Endothelial Growth Media (Clonetics, San Diego, CA). Las características endoteliales fueron confirmadas observando la apariencia de adoquín morfológica, mediante tinción con mAB CD31 (Pharminen) y examinando los cultivos para la formación de estructuras similares a un tubo en una matriz MATRIGEL[™] (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Población A de HSC Lin⁻. Las células de la médula ósea fueron extraídas de ratones ACTbEGFP mediante el procedimiento general descrito anteriormente. Las células HSC Lin⁻ fueron caracterizadas mediante citometría de flujo FACS para marcadores antigénicos de superficie celular CD31, c-kit, Sca-1, Flk-1, y Tie-2. Los resultados son representados en la figura 1c. Aproximadamente 81% de las HSC Lin⁻ mostraron el marcador CD31, aproximadamente el 70,5% de las HSC Lin⁻ mostraron el marcador c-kit, aproximadamente 4% de las HSC Lin⁻ mostraron el marcador Sca-1, aproximadamente 2,2% de las HSC Lin⁻ mostraron el marcador Flk-1 y aproximadamente 0,91% de las células HSC Lin⁻ mostraron el marcador Tie-2. En contraste, las HSC Lin⁺ que fueron aisladas de estas células de la médula ósea presentaron un perfil de marcador celular significativamente diferente (a saber, CD31:37,4%; c-kit:20%; Sca-1:2,8%; Flk-1:1,2%; Tie-2:0,05%).

Población B de HSC Lin⁻. Las células de la médula ósea fueron extraídas de ratones BalbC, ACTbEGFP, y C3H mediante el procedimiento general descrito anteriormente. Las células HSC Lin⁻ fueron analizadas respecto a la

presencia de los marcadores de superficie celular (Sca-1, KDR, c-kit, CD34, CD31 y varias integrinas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αL , αM , αV , αX , $\alpha I I b$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ and $\beta 7$). Los resultados son presentados en la tabla 1.

TABLA 1. Caracterización de la población B de HSC Lin⁻.

	Marcador celular	HSC Lin
5	$\alpha 1$	0.10
	$\alpha 2$	17.57
10	$\alpha 3$	0.22
	$\alpha 4$	89.39
	$\alpha 5$	82.47
	$\alpha 6$	77.70
	αL	62.69
15	αM	35.84
	αX	3.98
	αV	33.64
	$\alpha I I b$	0.25
20	$\beta 1$	86.26
	$\beta 2$	49.07
	$\beta 3$	45.70
	$\beta 4$	0.68
	$\beta 5$	9.44
	$\beta 7$	11.25
25	CD31	51.76
	CD34	55.83
	Flk-1/KDR	2.95
	c-kit	74.42
30	Sca-1	7.54

Ejemplo 2

Administración intravítrea de las células

Se realizó una cisura en el párpado con una hoja fina para exponer el globo ocular de P2 a P6. La población A de HSC negativa para linaje descrita anteriormente (aproximadamente 10^5 células en aproximadamente 0,5 μ l a aproximadamente 1 μ l de medio de cultivo celular) fue a continuación inyectada por vía intravítrea utilizando una jeringa con aguja (Hamilton, Reno, NV) de 33 gauge.

Ejemplo 3

Transfección de EPC

Las HSC Lin⁻ (población A) fueron transfectadas con ADN que codifica el fragmento T2 de TrpRS con asimismo una etiqueta His₆ (SEC ID n°: 1, figura 7) utilizando un reactivo de transfección FuGENE™6 (Roche, Indianapolis, IN) según el protocolo del fabricante. Las células de la composición de HSC Lin⁻ (aproximadamente 10^6 células por ml) se suspendieron en un medio opti-MEM® (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene factor de células troncales (PeproTech, Rocky Hill, NJ). La mezcla de ADN (aproximadamente 1 μ g) y de reactivo FuGENE (aproximadamente 3 μ l) se añadió a continuación, y las mezclas fueron incubadas a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 18 horas. Tras la incubación, las células fueron lavadas y recogidas. La tasa de transfección de este sistema fue de aproximadamente 17% que fue confirmada mediante análisis por FACS. La producción de T2 fue confirmada mediante transferencia western. La secuencia de aminoácidos de T2-TrpRS etiquetada con His₆ es representada en la SEC ID n°: 2, figura 8.

Ejemplo 4

Análisis confocal y de inmunohistoquímica

Las retinas son recogidas en diversos momentos y preparadas para la preparación completa o la crio-sección. Para las preparaciones completas, las retinas son fijadas con paraformaldehído al 4%, y bloqueadas en suero fetal bovino (FBS) al 50% y suero caprino normal al 20% durante una hora a temperatura ambiente. Las retinas son tratadas para los anticuerpos primarios y detectadas con anticuerpos secundarios. Los primarios utilizados fueron: anticógeno IV (Chemical, Temecula, CA), anti- β -gal (Promega, Madison, WI), anti-GFAP (Dako Cytomation, Carpintería, CA), anti- α -actina de la musculatura lisa (α -SMA, Dako Cytomation). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron conjugados a Alexa 488 o marcadores fluorescentes 594 (Molecular Probes, Eugene, OR). Las

imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio confocal MRC 1024 (Bio-Rad, Hercules, CA). Las imágenes tridimensionales fueron creadas utilizando software LASERSHARP® (Bio-Rad) para examinar las tres capas diferentes de desarrollo vascular en la retina de preparación completa. La diferencia en la intensidad de píxeles de GFP entre los ratones de GFP aumentada (eGFP) y los ratones de GFAP/wtGFP, distinguida mediante microscopía confocal, se utilizó para crear imágenes en 3D.

Ejemplo 5

Ensayo de cuantificación de la angiogénesis retiniana *in vitro*.

Para el análisis de T2-TrpRS, los plexos profundo y primario son reconstruidos a partir de imágenes tridimensionales. El plexo primario es dividido en dos categorías: el desarrollo normal, o una progresión vascular interrumpida. Las categorías de inhibición del desarrollo vascular profundo son interpretadas sobre la base del porcentaje de la inhibición vascular que comprende los criterios siguientes: la inhibición completa de la formación del plexo profundo fue catalogada como "completa", el desarrollo vascular normal (que comprende una inhibición inferior a 25%) fue catalogado como "normal" y el resto catalogado como "parcial". Para los datos de rescate de los ratones *rd/rd*, se tomaron cuatro zonas separadas del plexo profundo en cada retina de preparación completa utilizando una lente 10x. La longitud total de la vasculatura fue calculada para cada imagen, resumida y comparada intergrupalmente. Para obtener una información precisa, las HSC Lin⁻ fueron inyectadas en un ojo y las HSC Lin⁺ en el otro ojo del mismo ratón. Las retinas de control no inyectadas fueron tomadas de la misma camada.

Ejemplo 6

Modelos de lesión retiniana adulta.

Los modelos de marca y láser fueron creados utilizando un láser diódico (150 mW, 1 segundo, 50 mm) o mecánicamente mediante la punción de la retina con una aguja de 27 gauge. Cinco días tras la lesión, fueron inyectadas las células utilizando un procedimiento intravítreo. Los ojos fueron recogidos tras cinco días.

Ejemplo 7

Rescate neurotrófico de la regeneración retiniana.

Las células troncales hematopoyéticas de linaje derivadas de la médula ósea (HSC Lin⁻) presentan un efecto de rescate neurotrófico y vasculotrófico en un modelo de ratón de degeneración retiniana. Los ojos derechos de los ratones de 10 días fueron inyectados por vía intravítrea con aproximadamente 0,5 microlitros que contienen aproximadamente 10⁵ de las HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria y evaluados 2 meses después respecto a la presencia de la vasculatura retiniana y el recuento nuclear de la capa neuronal. Los ojos izquierdos de los mismos ratones fueron inyectados con aproximadamente el mismo número de HSC Lin⁺ como control, y fueron evaluados de manera similar. Como muestra la figura 9, en los ojos tratados con HSC Lin⁻ la vasculatura retiniana parecía prácticamente normal, la capa nuclear interna era prácticamente normal y la capa nuclear externa (ONL) presentaba de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 capas de núcleos. En contraste, el ojo tratado con HSC Lin⁺ contralateral presentaba una capa vascular retiniana intermedia notablemente atrófica, una capa vascular retiniana externa completamente atrófica; la capa nuclear interna era notablemente atrófica y la capa nuclear externa desapareció completamente. Esto fue particularmente significativo en el ratón 3 y el ratón 5. En el ratón 1, no se produjo ningún efecto de rescate, y esto se cumplió para aproximadamente 15% de los ratones inyectados.

Cuando la función visual fue evaluada con electrorretinogramas (ERG), la restauración del un ERG positivo se observó cuando se apreció tanto un rescate vascular como neuronal (ratones 3 y 5). El ERG positivo no se observó cuando no se produjo rescate neuronal o vascular (ratón 1). Esta correlación entre el rescate neurotrófico y vascular de los ojos de ratón *rd/rd* por las HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria es ilustrada mediante un gráfico de análisis de regresión mostrado en la figura 10. Se observó una correlación entre la recuperación neuronal (eje y) y vascular (eje x) para el tipo de vasculatura intermedia ($r=0,45$) y para la vasculatura profunda ($r=0,67$).

La figura 11 muestra la ausencia de cualquier correlación estadísticamente significativa entre el rescate neuronal y vascular mediante las HSC Lin⁺. El rescate vascular fue cuantificado y los datos presentados en la figura 12. Los datos para los ratones a 1 mes (1M), 2 meses (2M), y 6 meses (6M) tras la inyección, representados en la figura 12, demuestran que la longitud vascular se incrementó de manera significativa en los ojos tratados con las HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria (barras oscuras) con respecto a la longitud vascular en los ojos sin tratar de los mismos ratones (barras claras), particularmente a 1 mes y 2 meses tras la inyección. El efecto de rescate neurotrófico se cuantificó mediante el recuento de los núcleos en las capas nucleares externa e interna aproximadamente dos meses tras la inyección de HSC Lin⁻ o HSC Lin⁺. Los resultados son representados en las figuras 13 y 14.

Resultados

Desarrollo vascular retiniano murino; un modelo para la angiogénesis ocular

El ojo de ratón proporciona un modelo reconocido para el estudio del desarrollo vascular retiniano mamífero, tal como el desarrollo vascular retiniano humano. Durante el desarrollo de la vasculatura retiniana murina, los vasos sanguíneos retinianos causados por isquemia se desarrollan en asociación estrecha con los astrocitos. Estos elementos gliales migran a la retina del feto humano del tercer trimestre, o del roedor neonato, desde el disco óptico a lo largo de la capa de las células ganglionares y se propagan radialmente. A medida que la vasculatura retiniana murina se desarrolla, las células endoteliales utilizan esta matriz astrocítica ya establecida para determinar el patrón vascular retiniano (ver las figuras 1a y b). La figura 1 (a y b) representa unos diagramas esquemáticos de la retina de ratón en desarrollo. La figura 1a representa el desarrollo del plexo primario (líneas oscuras en la izquierda superior del diagrama) superpuesto sobre la matriz de astrocitos (líneas claras) mientras que la figura 1b representa la segunda fase de la formación de los vasos retinianos. En las figuras, GCL significa capa de células ganglionares; IPL significa capa del plexo interno; INL significa capa nuclear interna; OPL significa capa del plexo externo; ONL significa capa nuclear exterior; RPE significa epitelio pigmentario retiniano; ON significa nervio óptico; y P significa periferia.

Al nacer, la vasculatura retiniana está virtualmente ausente. Por el día posnatal 14 (P14) la retina ha desarrollado las capas secundaria (profunda) y primaria (superficial) complejas de los vasos retinianos que coinciden con la aparición de la visión. Inicialmente, los vasos peripapilares en forma de radios crecen radialmente sobre la red astrocítica preexistente hacia la periferia, resultando interconectados de manera progresiva mediante la formación del plexo capilar. Estos vasos crecen como una monocapa en el interior de la fibra óptica a lo largo de P10 (figura 1a). Entre P7-P8 comienzan a aparecer ramificaciones colaterales desde el plexo primario y penetran en la retina hasta la capa plexiforme externa, en la que forman el plexo retiniano profundo, o secundario. En P21, la red completa experimenta un remodelado exhaustivo y un plexo intermedio, o terciario, se conforma en la superficie interna de la capa nuclear interna (figura 1b).

El modelo de angiogénesis retiniana de ratón neonatal resulta útil para el estudio del rol de las HSC durante la angiogénesis ocular por varias razones. En este modelo relevante fisiológicamente, existe una matriz astrocítica amplia antes de la aparición de los vasos sanguíneos endógenos, permitiendo una evolución del rol para la diátesis célula-célula durante un proceso neovascular. Además, es conocido que este proceso vascular retiniano neonatal reproducible y constante es causado por la hipoxia, presentando a este respecto similitudes con muchas enfermedades retinianas en las que es conocido que la isquemia ejerce una función.

Enriquecimiento de la células progenitoras endoteliales (EPC) de la médula ósea

Aunque la expresión de marcadores de superficie celular ha sido evaluada de manera exhaustiva en la población de EPC descubierta en las preparaciones de HSC, están todavía mal definidos los marcadores que identifican únicamente las EPC. Para enriquecer las EPC, se redujeron de las células mononucleares de la médula ósea las células positivas de marcador de linaje hematopoyéticas (Lin^+), es decir, linfocitos B (CD45), linfocitos T (CD3), granulocitos (Ly-6G), monocitos (CD11), y eritrocitos (TER-119). El antígeno Sca-1 se utilizó para enriquecer adicionalmente las EPC. En una comparación de los resultados obtenidos tras la inyección intravítrea de los números idénticos de las células $\text{Lin}^-\text{Sca-1}^+$ o las células Lin^+ , no se detectó ninguna diferencia entre los dos grupos. De hecho, cuando fueron inyectadas únicamente las células $\text{Lin}^-\text{Sca-1}^+$, se apreció una incorporación muy superior en el desarrollo de los vasos sanguíneos.

Las HSC Lin^- descritas en la presente memoria son enriquecidas para las EPC sobre la base de ensayos funcionales. Además, las poblaciones de HSC Lin^+ se comportan funcionalmente de manera muy diferente respecto a las poblaciones de HSC Lin^- . Los epítomos utilizados habitualmente para identificar las EPC para cada fracción (sobre la base de estudios de caracterización *in vitro* de los que se informa anteriormente) fueron asimismo evaluados. Mientras que ninguno de estos marcadores estuvo asociado exclusivamente con la fracción de Lin^- , aumentaron en su totalidad de aproximadamente 70 a aproximadamente 1.800% en las HSC Lin^- , en comparación con la fracción de HSC Lin^+ (figura 1c). La figura 1c ilustra la caracterización citométrica de flujo de las células separadas HSC Lin^- y HSC Lin^+ derivadas de la médula ósea. La fila superior de la figura 1c muestra una distribución en gráfico de puntos de las células troncales hematopoyéticas de las células no marcadas con anticuerpo. R1 define la zona de selección cuantificable de tinción por PE positiva; R2 indica la positiva por GFP. Los gráficos de puntos de HSC Lin^- son representados en la fila intermedia y los gráficos de puntos de HSC Lin^+ son representados en la fila inferior. Las células C57B/6 fueron marcadas con los anticuerpos conjugados con PE para Sca-1, c-Kit, Flk-1/KDR, CD31. Los datos de Tie-2 fueron obtenidos a partir de los ratones Tie-2-GFP. Los porcentajes en las esquinas de los gráficos de puntos indican el porcentaje de las células marcadas positivas de la población de HSC Lin^+ o Lin^- . De manera interesante, los marcadores de EPC aceptados, tales como Flk-1/KDR, Tie-2, y Sca-1 se expresaron mal y, por lo tanto, no se utilizaron para un fraccionamiento adicional.

Células HSC Lin⁻ inyectadas por vía intravítrea que contienen EPC que dianizan astrocitos y se incorporan en la vasculatura retiniana en desarrollo.

Para determinar si las HSC Lin⁻ inyectadas por vía intravítrea pueden dianizar unos tipos celulares específicos de la retina, utilizar la matriz astrocítica y participar en la angiogénesis retiniana, fueron inyectadas aproximadamente 10⁵ células de una población de HSC Lin⁻ descrita en la presente memoria o células HSC Lin⁺ (control, aproximadamente 10⁵ células) aisladas de la médula ósea de ratones adultos (GFP o LacZ transgénicos) en los ojos de ratón posnatal de día 2 (P2). Cuatro días tras la inyección (P6), muchas células de la población de HSC Lin⁻ procedentes de ratones transgénicos GFP o LacZ resultaron adheridas a la retina y presentaron la apariencia alargada característica de las células endoteliales (figura 2a). La figura 2 ilustra el injerto de las células Lin⁻ en la retina de ratón en desarrollo. Como se ha representado en la figura 2a, las HSC Lin⁻ eGFP⁺ inyectadas por vía intravítrea de cuatro días tras la inyección (P6) se unieron y diferenciaron en la retina.

En muchas zonas de la retina, las células que expresan GFP fueron dispuestas en un patrón que se ajusta a los astrocitos subyacentes y los vasos sanguíneos parecidos. Estas células fluorescentes fueron observadas delante de la red vascular en desarrollo, endógena (figura 2b). A la inversa, únicamente un pequeño número de HSC Lin⁺ (figura 2c), o células endoteliales mesentéricas de ratón adulto (figura 2d) se unieron a la superficie retiniana. Con el fin de determinar si las células de una población de HSC Lin⁻ inyectada podrían asimismo unirse a las retinas con vasos ya establecidos, se inyectó una población de HSC Lin⁻ en unos ojos adultos. De manera interesante, no se observó ninguna célula que se uniera a la retina o incorporara en los vasos sanguíneos retinianos normales establecidos (figura 2e). Esto indica que las poblaciones de HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria no afectan a una vasculatura desarrollada normalmente y que no se iniciará una vascularización anormal en las retinas desarrolladas normalmente.

Con el fin de determinar la relación entre una población de HSC Lin⁻ como se ha descrito en la presente memoria y los astrocitos retinianos, se utilizó un ratón transgénico, que expresa la proteína gliofibrilar ácida (GFAP, un marcador de astrocitos) y la proteína fluorescente verde originada por promotor (GFP). El examen de las retinas de estos ratones transgénicos de GFAP-GFP inyectados con HSC Lin⁻ de ratones transgénicos de eGFP demostró la colocalización de las EPC eGFP y los astrocitos existentes (figuras 2f-h, flechas). Los procesos de eGFP+HSC Lin⁻ fueron observados para ajustarse a la red astrocítica subyacente (flechas, figura 2g). El examen de estos ojos demostró que las células marcadas inyectadas únicamente se unieron a los astrocitos; en las retinas de ratón P6, cuando la periferia retiniana no presenta todavía vasos endógenos, se observó que las células inyectadas resultaban adheridas a los astrocitos en estas zonas todavía sin vascularizar. Sorprendentemente, se apreciaron las células marcadas inyectadas en las capas más profundas de la retina en la ubicación precisa en la que los vasos retinianos normales se desarrollarán a continuación (figura 2i, flechas).

Para determinar si las HSC Lin⁻ inyectadas son incorporadas de manera estable en la vasculatura retiniana en desarrollo, fueron examinados los vasos retinianos en diversos momentos. Tan pronto como P9 (siete días tras la inyección), las HSC Lin⁻ fueron incorporadas en las estructuras de CD31⁺ (figura 2j). En P16 (14 días tras la inyección), las células fueron incorporadas ya ampliamente a las estructuras de tipo vascular retinianas (figura 2k). Cuando se inyecta rodamina-dextrano por vía intravascular (para identificar los vasos sanguíneos retinianos funcionales) antes del sacrificio de los animales, la mayoría de las HSC Lin⁻ se alinean con los vasos abiertos (figura 2l). Se observaron dos patrones de distribución de las células marcadas: (1) en un patrón, las células se intercalaban a lo largo de los vasos entre las células endoteliales no marcadas; y (2) el otro patrón mostró que los vasos estaban compuestos en su totalidad de células marcadas. Las células inyectadas se incorporaron asimismo a los vasos del plexo vascular profundo (figura 2m). Mientras que se ha informado previamente de la incorporación esporádica de las EPC derivadas de HSC Lin⁻ en la neovasculatura, esta es la primera constancia de redes neovasculares compuestas en su totalidad de estas células. Esto demuestra que las células de una población de HSC Lin⁻ procedentes de la médula ósea inyectadas por vía intravítrea pueden incorporarse de manera efectiva a cualquier capa del plexo vascular retiniano en formación.

El examen histológico de los tejidos no retinianos (por ejemplo, cerebro, hígado, corazón, pulmón, médula ósea) no demostró la presencia de ninguna célula positiva en GFP cuando se examinaron hasta 5 ó 10 días tras la inyección por vía intravítrea. Esto indica que una subpoblación de células en el interior de la fracción de HSC Lin⁻ dianiza selectivamente los astrocitos retinianos y se incorpora de manera estable en la vasculatura retiniana en desarrollo. Dado que estas células presentan muchas características de las células endoteliales (asociación con los astrocitos retinianos, morfología alargada, incorporación estable en los vasos abiertos y no presencia en las ubicaciones extravasculares), estas células representan las EPC presentes en la población de HSC Lin⁻. Los astrocitos diana son del mismo tipo observado en muchas de las retinopatías hipóxicas; es bien conocido que las células gliales son un componente destacado de las frondas neovasculares observadas en la RD y otras formas de lesión retiniana. En condiciones de gliosis reactiva y neovascularización inducida por la isquemia, los astrocitos activados proliferan, se producen citocinas, y se suprarregula GFAP, similar a lo observado durante la formación de matriz vascular retiniana neonatal en muchas especies mamíferas que comprenden humanas.

Para comprobar si las poblaciones de HSC Lin⁻ como se han descrito en la presente memoria dianizarán los astrocitos activados en ojos de ratón adulto como ocurre en los ojos neonatales, las células HSC Lin⁻ fueron

inyectadas en ojos de adulto con retinas lesionadas mediante fotocoagulación (figura 3a) o punta de aguja (figura 3b). En ambos modelos, se observó una población de células con tinción por GFAP destacada únicamente alrededor del lugar de la lesión (figuras 3a y b). Las células de las poblaciones de HSC Lin⁻ inyectadas se localizaron en el lugar de la lesión y permanecieron asociadas específicamente a los astrocitos positivos en GFAP (figuras 3a y b). En estos lugares, se observó asimismo que las células HSC Lin⁻ se desplazaban hacia el interior de la capa más profunda de la retina a un nivel similar al observado durante la formación neonatal de la vasculatura retiniana profunda (datos no representados). Las partes no lesionadas de la retina no contenían células HSC Lin⁻, igual que se observa cuando son inyectadas las HSC Lin⁻ en retinas de adulto no lesionadas, normales (figura 2e). Estos datos indican que las poblaciones de HSC Lin⁻ pueden dianizar selectivamente las células gliales activadas en las retinas de adulto lesionadas con gliosis así como las retinas neonatales experimentan vascularización.

Las HSC Lin⁻ inyectadas por vía intravítrea pueden rescatar y estabilizar la vasculatura en degeneración

Dado que las poblaciones de HSC Lin⁻ inyectadas por vía intravítrea dianizan los astrocitos y se incorporan en la vasculatura retiniana normal, estas células estabilizan asimismo la vasculatura en degeneración en las enfermedades retinianas degenerativas o isquémicas asociadas a la gliosis y la degeneración vascular. El ratón *rd/rd* es un modelo para la degeneración retiniana que muestra una degeneración profunda de las capas vasculares retiniana y los receptores un mes después del nacimiento. La vasculatura retiniana se desarrolla en estos ratones con normalidad hasta P16, experimentando entonces un retroceso el plexo vascular más profundo; en la mayoría de ratones los plexos intermedio y profundo se han degenerado casi completamente en P30.

Para determinar si las HSC pueden rescatar los vasos en regresión, las HSC Lin⁻ o Lin⁺ (de ratones Balb/c) fueron inyectadas en los ratones *rd/rd* por vía intravítrea en P6. En P33, tras la inyección con las células Lin⁺, los vasos de la capa retiniana más profunda se encontraban prácticamente ausentes (figuras 4a y b). En contraste, la mayoría de las retinas inyectadas con HSC Lin⁻ en P33 presentaban una vasculatura retiniana prácticamente normal con tres capas vasculares bien formadas, paralelas (figuras 4a y 4d). La cuantificación de este efecto demostró que la longitud media de los vasos en el plexo vascular profundo de los ojos de *rd/rd* inyectados con Lin⁻ fue prácticamente tres veces superior que en los ojos tratados con células Lin⁺ o no tratados (figura 4e). De manera inesperada, la inyección de una población de HSC Lin⁻ procedente de médula ósea de ratón adulto *rd/rd* (FVB/N) rescató asimismo la vasculatura retiniana de ratón neonatal *rd/rd* en degeneración (figura 4f). La degeneración de la vasculatura de los ojos de ratón *rd/rd* se observó ya a las 2-3 semanas tras el nacimiento. La inyección de HSC Lin⁻ hasta P15 provocó asimismo la estabilización parcial de la vasculatura en degeneración en los ratones *rd/rd* durante por lo menos un mes (figuras 4g y 4h).

Una población de HSC Lin⁻ inyectada en ratones *rd/rd* más jóvenes (por ejemplo, P2) se incorporó a la vasculatura superficial en desarrollo. En P11, se observó que estas células se desplazaban al nivel del plexo vascular profundo y formaban un patrón idéntico al observado en la capa vascular retiniana externa natural (figura 5a). Con el fin de describir con mayor detalle la manera en la que las células a partir de las poblaciones de HSC Lin⁻ inyectadas se incorporan a, y estabilizan, la vasculatura retiniana en degeneración en los ratones *rd/rd*, se inyectó una población de HSC Lin⁻ procedente de ratones Balb/c en los ojos de ratón Tie-2-GFP FVB. Los ratones FVB presentan el genotipo de *rd/rd* y debido a que expresan la proteína de fusión Tie-2-GFP, todos los vasos sanguíneos endógenos son fluorescentes.

Cuando las células no marcadas de una población de HSC Lin⁻ son inyectadas en los ojos de Tie-2-GFP FVB neonatales y son incorporadas a continuación a la vasculatura en desarrollo, deberían encontrarse espacios no marcados en los vasos marcados de Tie-2-GFP endógenos que corresponden a las HSC Lin⁻ no marcadas incorporadas que fueron inyectadas. La tinción siguiente con otro marcador vascular (por ejemplo, CD-31) delinea a continuación el vaso completo, permitiendo la determinación en cuanto a si las células endoteliales no endógenas forman parte de la vasculatura. Dos meses tras la inyección, los vasos negativos para Tie-2-GFP, positivos para CD31, fueron observados en las retinas de los ojos inyectados con la población de HSC Lin⁻ (figura 5b). De manera interesante, la mayoría de los vasos rescatados contenían las células positivas para Tie-2-GFP (figura 5c). La distribución de los pericitos, como determina la tinción para la actina de la musculatura lisa, no fue modificada por la inyección de HSC Lin⁻, a pesar de que exista un rescate vascular (figura 5d). Estos datos demuestran claramente que las poblaciones de HSC Lin⁻ inyectadas por vía intravítrea como se ha descrito en la presente memoria se desplazan a la retina, participan en la formación de los vasos sanguíneos retinianos normales, y estabilizan la vasculatura en degeneración endógena en un ratón defectuoso genéticamente.

Inhibición de la angiogénesis retiniana mediante las células transfectadas HSC Lin⁻

La mayoría de las enfermedades vasculares retinianas implican una proliferación vascular anormal más que una degeneración. Las células transgénicas dianizadas a los astrocitos pueden ser utilizadas para suministrar una proteína antiangiogénica e inhibir la angiogénesis. Las células de las poblaciones de HSC Lin⁻ fueron transfectadas con la T2-triptofanil-ARNt sintetasa (T2-TrpRS). La T2-TrpRS es un fragmento de 43 kd de la TrpRS que inhibe potencialmente la angiogénesis retiniana (figura 6a). En P12, las retinas de los ojos inyectados con una población de HSC Lin⁻ transfectada con un plásmido de control (sin gen de T2-TrpRS) en P2 presentaron unos plexos vasculares retinianos secundario (figura 6d) y primario (figura 6c) normales. Cuando la población de HSC Lin⁻ transfectada con

T2-TrpRS descrita en la presente memoria fue inyectada en los ojos de P2 y evaluada 10 días después, la red primaria presentó unas anomalías significativas (figura 6e) y la formación de la vasculatura retiniana profunda fue prácticamente inhibida (figura 6f). Los pocos vasos observados en estos ojos fueron atenuados de manera acentuada con grandes espacios entre los vasos. El grado de la inhibición mediante las células HSC Lin⁻ que secretan T2-TrpRS es presentado en la tabla 2.

La T2-TrpRS es producida y secretada por las células en la población de HSC Lin⁻ *in vitro* y tras la inyección de estas células transfectadas en el vítreo, se observó un fragmento de 30 kD de T2-TrpRS en la retina (figura 6b). Este fragmento de 30 kD fue observado específicamente únicamente en las retinas inyectadas con las HSC Lin⁻ transfectadas descritas en la presente memoria y este descenso en el peso molecular aparente comparado con la proteína sintetizada *in vitro* o recombinante puede deberse al tratamiento o la degradación de la T2-TrpRS *in vivo*. Estos datos indican que las poblaciones de HSC Lin⁻ pueden ser utilizadas para suministrar genes funcionalmente activos, tales como genes que expresan las moléculas angiostáticas, a la vasculatura retiniana mediante la dianización a los astrocitos activados. Aunque es posible que el efecto angiostático observado sea debido a la actividad mediada celularmente es muy improbable debido a que los ojos tratados con poblaciones de HSC Lin⁻ idénticas, pero no transfectadas con T2, presentaban una vasculatura retiniana normal.

Tabla 2. Inhibición vascular mediante las células HSC Lin⁻ que secretan T2-TrpRS

	Plexo primario		Plexo profundo		
	Inhibido	Normal	Completo	Parcial	Normal
TsTrpRs (15 ojos)	60% (9 ojos)	40% (6 ojos)	33,3% (5 ojos)	60% (9 ojos)	6,7% (1 ojo)
Control (13 ojos)	0% (0 ojos)	100% (13 ojos)	0% (0 ojos)	38,5% (5 ojos)	61,5% (8 ojos)

Las poblaciones de HSC Lin⁻ inyectadas por vía intravítrea se dirigen a los astrocitos retinianos, se incorporan en los vasos, y pueden resultar útiles en el tratamiento de muchas enfermedades retinianas. Mientras que la mayoría de las células de las poblaciones de HSC Lin⁻ inyectadas se adhieren a la matriz astrocítica, pocas cantidades migran en profundidad en el interior de la retina, alojándose en regiones en las que la red vascular profunda se desarrollará posteriormente. Incluso aunque no se observaron astrocitos positivos para GFAP en esta zona antes de 42 días tras el nacimiento, esto no descarta la posibilidad de que las células gliales negativas para GFAP se encuentren ya presentes para proporcionar una señal para la localización de las HSC Lin⁻. Los estudios previos han demostrado que muchas enfermedades están asociadas a la gliosis reactiva. En la RD, en particular, las células gliales y su matriz extracelular están asociadas a la angiogénesis patológica.

Dado que las células de las poblaciones de HSC Lin⁻ inyectadas se unen específicamente a las células gliales que expresan GFAP, independientemente del tipo de lesión, las poblaciones de HSC Lin⁻ como las descritas en la presente memoria pueden ser utilizadas para dianizar las lesiones preangiogénicas en la retina. Por ejemplo, en las retinopatías isquémicas como la diabetes, la neovascularización es una respuesta a la hipoxia. Mediante la dianización de las poblaciones de HSC Lin⁻ a los lugares de la neovascularización patológica, puede estabilizarse la neovascularización en desarrollo previniendo las anomalías de la neovascularización tales como la hemorragia o los edemas (las causas de la pérdida de visión asociada a la RD) y pueden paliar la hipoxia que estimuló originalmente la neovascularización. Los vasos sanguíneos anormales pueden ser restablecidos a un estado normal. Además, las proteínas angiostáticas, tales como la T2-TrpRS pueden ser suministradas a los lugares de angiogénesis patológica utilizando las poblaciones de HSC Lin⁻ transfectadas y la activación inducida por láser de los astrocitos. Dado que la fotocoagulación por láser es utilizada de manera común en la oftalmología clínica, este enfoque puede aplicarse en muchas enfermedades retinianas. Mientras que dichos enfoques basados en las células han sido explorados en la terapia del cáncer, su utilización para las enfermedades oculares resulta más ventajosa dado que la inyección intraocular posibilita el suministro de un gran número de células directamente al lugar de la enfermedad.

Rescate neurotrófico y vasculotrófico mediante las HSC Lin⁻

Se utilizó la MACS para separar las HSC Lin⁻ de la médula ósea de los ratones FVB (*rd/rd*), C3H (*rd/rd*), de proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) como se ha descrito anteriormente. Las HSC Lin⁻ que contienen EPC de estos ratones fueron inyectadas por vía intravítrea en los ojos de los ratones P6 C3H o FVB. Las retinas fueron recogidas en varios momentos (1 mes, 2 meses, y 6 meses) tras la inyección. La vasculatura fue analizada mediante un microscopio confocal de escaneado por láser tras la tinción con anticuerpos a CD31 y la histología retiniana tras la tinción nuclear con DAPI. Se utilizó asimismo el análisis de expresión génica en micromatrices del ARNm de las retinas en varios momentos para identificar los genes implicados potencialmente en el efecto.

Los ojos de los ratones *rd/rd* presentaron una degeneración profunda de la vasculatura retiniana y de la retina neurosensorial mediante P21. Los ojos de los ratones *rd/rd* tratados con HSC Lin⁻ en P6 mantuvieron una vasculatura retiniana normal durante 6 meses; las capas intermedia y profunda mejoraron de manera significativa en comparación con los controles en la totalidad de los puntos temporales (1M, 2M, y 6M) (ver figura 12). Además, se observó que las retinas tratadas con HSC Lin⁻ mostraron asimismo un mayor grosor (1M: 1,2 veces; 2M: 1,3 veces;

6M: 1,4 veces) y presentaron un número de células superior en la capa nuclear externa (1M: 2,2 veces; 2M: 3,7 veces; 6M: 5,7 veces) con respecto a los ojos tratados con HSC Lin⁺ como control. El análisis genómico a gran escala de las retinas rd/rd "rescatadas" (por ejemplo, HSC Lin⁻) comparado con las de control (no tratadas o tratadas no Lin⁻) demostró una suprarregulación significativa de los genes que codifican sHSP (proteínas de choque

térmico pequeñas) y los factores de crecimiento específico que correlacionan con el rescate neural y vascular, incluyendo los factores presentados en la tabla 3.

Las HSC Lin⁻ derivadas de la médula ósea descritas en la presente memoria inducen de manera significativa y reproducible el mantenimiento de una vasculatura normal e incrementan de manera radical los fotorreceptores y otras capas celulares neuronales en los ratones rd/rd. Este efecto de rescate neurotrófico correlaciona con una

Tabla 3. Genes sobreexpresados en las retinas de ratón inyectadas con HSC Lin⁻

	Nombre Común	Lin(-)	CD31(-)	Ratones rd de control	Genbank#	Comentarios
20	Tgtp	11.855	0.526	0.664	L38444	proteína específica de linfocitos T
	H-2D4(q)	7.091	0.916	0.694	X52914	antígeno de trasplante
	H2-K2; H-2K2	4.507	0.705	0.547	M27134	glucoproteína de superficie celular
	Lzp-s	6.514	0.648	0.987	X51547	lisozima; lisozima P
	Kcnj5	4.501	0.855	0.722	U33631	canal de potasio controlado por proteína G
25	EST	2.905	1.000	0.750	AA087373	EST
	Scya8	5.186	0.470	0.996	AB023418	precursor MCP-2
	Ly6a	4.020	0.962	0.792	X04653	aloantígeno Ly-6
	Anxa 1	2.490	0.599	0.510	AV003419	EST
	Pip5k1c	3.405	0.944	0.782	AB006916	fosfatidilinositolcinas
30	EST	3.999	0.502	0.975	AU042276	EST
	MAD	3.763	0.560	0.892	X83106	proteína de dimerización MAX
	Cxadr	3.977	0.814	1.000	U90715	CAR
	Isg15	2.218	0.642	0.449	X56602	proteína inducible por interferón
	EST	3.512	0.901	0.978	AA790936	EST
35	Tm4sf1	3.022	0.493	0.697	AV087000	EST
	IgG VH-II	2.644	0.948	0.909	X02463	cadena pesada de Ig; región variable
	Yy1	2.967	0.854	0.874	M74590	factor de transcripción delta
	EST	2.952	0.869	0.822	AA739246	EST
	EST	2.575	0.486	0.650	AW046243	EST
40	Psmb9	3.288	0.492	0.975	D44456	subunidad 2 del complejo de polipéptido
	EST	2.195	0.873	0.904	AV172782	EST
	H2-Aa	2.627	0.878	0.940	X52643	I-E alpha NON, MHC
	EST	2.697	0.791	0.869	AV076889	EST
45	Genes Cristalinos					
	Crybb2	8.726	0.552	0.831	M60559	beta-B2-cristalino
	Cryaa	3.995	0.567	1.000	J00376	alfa-A-cristalino
50	CrygD	2.090	0.740	0.972	AJ224342	gamma-D-cristalino
	Cryba1	6.520	0.930	0.603	AJ239052	beta-A3/A1-cristalino
	Crygs	2.892	0.971	0.854	AF032995	gamma-S-cristalino
	CrygC	5.067	1.000	0.826	Z22574	gamma-C-cristalino
	CrygF	1.942	0.999	0.688	AJ224343	gamma-F-cristalino

Discusión

Se utilizaron los marcadores para las células hematopoyéticas asignadas a un linaje para seleccionar negativamente una población de HSC Lin⁻ derivadas de la médula ósea que contienen EPC. Mientras que la subpoblación de las HSC Lin⁻ derivadas de la médula ósea que pueden actuar como EPC no está caracterizada por los marcadores de superficie celular utilizados habitualmente, el comportamiento de estas células en la vasculatura retiniana lesionada o en desarrollo es completamente diferente que el observado para las poblaciones de células endoteliales adultas o Lin⁺. Un subfraccionamiento adicional de las HSC utilizando marcadores tales como Sca-1, indicó que las células Lin⁻ Sca-1⁺ no presentaron ninguna diferencia sustancial respecto a la utilización de las células HSC Lin⁻ solas. Estas

células dianizan selectivamente los lugares de la angiogénesis retiniana y participan en la formación de los vasos sanguíneos abiertos.

- 5 Las enfermedades degenerativas retinianas hereditarias se presentan habitualmente acompañadas de una pérdida de la vasculatura retiniana. Un tratamiento eficaz de estas enfermedades requiere restaurar la función así como el mantenimiento de la arquitectura tisular compleja. Aunque algunos estudios recientes han examinado la utilización del suministro basado en células de los factores tróficos o las células troncales por sí mismos, alguna combinación de ambos puede resultar necesaria. Por ejemplo, la utilización de la terapia de factores de crecimiento para tratar la enfermedad degenerativa retiniana provocó un crecimiento en exceso desregulado de los vasos sanguíneos que
- 10 provocó una alteración en la arquitectura tisular retiniana normal. La utilización de las células troncales retinianas o neurales para tratar la enfermedad degenerativa retiniana puede reconstituir la función neuronal, pero resultará asimismo necesaria una vasculatura funcional para mantener la integridad funcional retiniana. La incorporación de las células a partir de una población de HSC Lin⁻ como se ha descrito en la presente memoria en los vasos retinianos de los ratones *rd/rd* estabilizó la vasculatura degenerativa sin alterar la estructura retiniana. Este efecto de rescate fue observado asimismo cuando las células fueron inyectadas en los ratones *rd/rd* P15. Dado que la degeneración vascular se inicia en P16 en los ratones *rd/rd*, esta observación amplía el margen terapéutico para el tratamiento con HSC Lin⁻ eficaz. Los fotorreceptores y las neuronas retinianas están preservados y la función visual está mantenida en los ojos inyectados con las HSC Lin⁻.
- 15
- 20 Las poblaciones de HSC Lin⁻ como se han descrito en la presente memoria contienen una población de EPC que puede promover la angiogénesis mediante la dianización de los astrocitos reactivos e incorporarse en una matriz establecida sin alterar la estructura retiniana. Las HSC Lin⁻ descritas en la presente memoria proporcionan asimismo un efecto de rescate neurotrófico a largo plazo inesperado en los ojos que padecen degeneración retiniana. Además, las poblaciones de HSC Lin⁻ autólogas, modificadas genéticamente, contienen EPC que pueden ser trasplantadas
- 25 en los ojos vascularizados de manera anormal o isquémicos y pueden incorporarse de manera estable a los nuevos vasos y suministrar de manera continua moléculas terapéuticas localmente durante periodos de tiempo prolongados. Dicho suministro local de genes que expresan agentes farmacológicos en dosis fisiológicamente significativas representa un nuevo paradigma para el tratamiento de las enfermedades oculares sin tratamiento en la actualidad.

Listado de secuencias

- <110> The Scripps Research Institute
- 5 <120> Células troncales hematopoyéticas y procedimientos de tratamiento de las enfermedades oculares neovasculares mediante las mismas
- <130> TSRI 900.1PC
- 10 <140> EP 03 772 195.8
<141> 25-07-2003
- <150> 60/467.051
<151> 02-05-2003
- 15 <160> 2
- <170> FastSEQ para la versión de Windows 4.0
- 20 <210> 1
<211> 4742
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> ADN que codifica T2-TrpRS humana marcada con His
- <400> 1

tggcgaatgg	gacgcgcacct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	60
cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgcacct	agcgcgcgct	ccttttcgctt	tcttcccttc	120
ctttctcgcc	acgttcgccc	gctttccccc	tcaagctcta	aatcgggggc	tcccttttagg	180
gttccgattt	agtgcctttac	ggcacctcga	ccccaaaaa	cttgattagg	gtgatgggttc	240
acgtagtggg	ccatcgccct	gatagacggg	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacggt	300
ctttaatagt	ggactcctgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggctctattc	360
ttttgattta	taagggattt	tgccgatttc	ggcctatttg	ttaaaaaatg	agctgattta	420
acaaaaattt	aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgttt	acaatttcag	gtggcacttt	480
töggggaaat	gtgögcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taäatacatt	caaatatgta	540
tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	600
gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	660
ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	720
agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	780
agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttta	agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccc	840
tattgacgcc	gggcaagagc	aactcgggtc	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggg	900
tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	960
cagtgcctgc	ataaccatga	gtgataaac	tgccggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	1020
aggaccgaag	gagctaaccg	ctttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccctga	1080
tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	1140
tgacgcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	1200
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaaagt	gcaggaccac	ttctgcgctc	1260
ggcccttccg	gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	1320
cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	1380
gacgggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	1440

actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	1500
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	cttttttgata	atctcatgac	1560
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	1620
aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	1680
accgctacca	gcggtggttt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	1740
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	1800
ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	1860
agtggctgct	gccagtggtg	ataagtctgt	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	1920
accggataag	gcgagcgggt	cgggctgaac	ggggggttcg	tgacacagc	ccagcttgga	1980
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgccacgct	2040
tcccgaagg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaaagcgg	agggctcgga	caggagagcg	2100
cacgagggag	cttcaggggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	2160
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggaggagcc	tatggaaaaa	2220
cgccagcaac	gcggtctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tggtcttttg	ctcacatgtt	2280
ctttcctgcg	ttatcccttg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgaactga	2340
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcagagta	gtgagcagag	aagcgggaaga	2400
gcgcctgatg	cggatatttt	tccttacgca	tctgtgcggt	atttcacacc	gcataatagg	2460
tgactcttca	gtacaatctg	ctctgatgcc	gcatagttaa	gccagtatac	actccgctat	2520
cgctacgtga	ctgggtcatg	gctgcgcccc	gacacccgcc	aacacccgct	gacgcgcctt	2580
gacgggcttg	tctgctcccg	gcctccgctt	acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	2640
gcatgtgtca	gagggttttc	ccgtcatcac	cgaaacgcgc	gaggcagctg	cggtaaagct	2700
catcagcgtg	gtcgtgaagc	gattcacaga	tgtctgcctg	ttcatccgcg	tccagctcgt	2760
tgagtttctc	cagaagcgtt	aatgtctggc	ttctgataaa	gcggggccatg	ttaagggcgg	2820
ttttttcctg	tttggtcact	gatgcctccg	tgtaaggggg	atttctgttc	atgggggtaa	2880
tgataccgat	gaaacgagag	aggatgctca	cgatacgggt	tactgatgat	gaacatgccc	2940
ggttactgga	acgttgtgag	ggtaaacaac	tggcgggtatg	gatgcggcgg	gaccagagaa	3000
aaatcactca	gggtcaatgc	cagcgccttc	ttaatacaga	tgtaggtgtt	ccacagggtta	3060
gccagcagca	tcctgcgatg	cagatccgga	acataatggg	gcagggcgct	gacttccgcg	3120
tttccagact	ttacgaaaca	cggaaaccga	agaccattca	tggtgttgct	caggtcgcag	3180
acgttttgca	gcagcagtcg	cttcacgttc	gctcgcgtat	cggtgattca	ttctgctaac	3240
cagtaaggca	accccgccag	cctagccggg	tcctcaacga	caggagcacg	atcatgcgca	3300
cccgtggcca	ggacccaacg	ctgcccagga	tctcgatccc	gcgaaattaa	tacgactcac	3360
tatagggaga	ccacaacggg	ttccctctag	aaataatttt	gtttaacttt	aagaaggaga	3420
tatacatatg	agtgcaaaa	gcatagacta	cgataagctc	attgttcggg	ttggaagtag	3480
taaaattgac	aaagagctaa	taaaccgaat	agagagagcc	accggccaaa	gaccacacca	3540
cttcctgcgc	agaggcatct	tcttctcaca	cagagatatg	aatcagggtc	ttgatgccta	3600
tgaaaataag	aagccatttt	atctgtacac	gggcccgggc	ccctcttctg	aagcaatgca	3660
tgtaggtcac	ctcattccat	ttattttcac	aaagtggctc	caggatgtat	ttaacgtgcc	3720
cttgggtcatc	cagatgacgg	atgacgagaa	gtatctgtgg	aaggacctga	ccctggacca	3780
ggcctatggc	gatgctgttg	agaatgccaa	ggacatcatc	gcctgtggct	ttgacatcaa	3840
caagactttc	atattctctg	acctggacta	catggggatg	agctcagggt	tctacaaaaa	3900
tgtggtgaag	attcaaaaag	atgttacctt	caaccaagtg	aaaggcattt	tcggcttcac	3960
tgacagcgac	tgcatgggga	agatcagttt	tcctgccatc	caggctgctc	cctccttcag	4020
caactcattc	ccacagatct	tccgagacag	gacggatatc	cagtgcctta	tcccattgtc	4080
cattgaccag	gatccttact	ttagaatgac	aaggagcgtc	gccccagga	tcggctatcc	4140
taaacagacc	ctgttgcaact	ccaccttctt	ccagccctg	cagggcgccc	agacaaaaat	4200
gagtgccagc	gacccaact	cctccatctt	cctcaccgac	acggccaagc	agatcaaaac	4260
caaggtcaat	aagcatgcgt	tttctggagg	gagagacacc	atcgaggagc	acaggcagtt	4320
tgggggcaac	tgtgatgtgg	acgtgtcttt	catgtacctg	accttcttcc	tcgaggacga	4380
cgacaagctc	gagcagatca	ggaaggatta	caccagcgga	gccatgctca	ccggtgagct	4440
caagaaggca	ctcatagagg	ttctgcagcc	cttgatcgca	gagcaccagg	cccggcgcaa	4500
ggaggtcacg	gatgagatag	tgaaagagtt	catgactccc	cggaagctgt	ccttcgactt	4560
tcagaagctt	gcggccgcac	tcgagcacca	ccaccaccac	cactgagatc	cggctgctaa	4620
caaaagccga	aaggaagctg	agttggctgc	tgccaccgct	gagcaataac	tagcataacc	4680
ccttggggcc	tctaaacggg	tcttgagggg	ttttttgctg	aaaggaggaa	ctatatccgg	4740
at						4742

<210> 2
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> T2-TrpRS humana marcada con His

<400> 2

Met	Ser	Ala	Lys	Gly	Ile	Asp	Tyr	Asp	Lys	Leu	Ile	Val	Arg	Phe	Gly
1				5				10						15	
Ser	Ser	Lys	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Thr
		20				25						30			
Gly	Gln	Arg	Pro	His	His	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Ile	Phe	Phe	Ser	His
		35				40						45			
Arg	Asp	Met	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Lys	Pro	Phe
	50					55					60				
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Glu	Ala	Met	His	Val	Gly
65				70						75					80
His	Leu	Ile	Pro	Phe	Ile	Phe	Thr	Lys	Trp	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Asn
				85				90						95	
Val	Pro	Leu	Val	Ile	Gln	Met	Thr	Asp	Asp	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Lys
			100					105						110	
Asp	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Asn	Ala	Lys
		115					120					125			
Asp	Ile	Ile	Ala	Cys	Gly	Phe	Asp	Ile	Asn	Lys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser
	130					135						140			
Asp	Leu	Asp	Tyr	Met	Gly	Met	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asn	Val	Val
145					150					155					160
Lys	Ile	Gln	Lys	His	Val	Thr	Phe	Asn	Gln	Val	Lys	Gly	Ile	Phe	Gly
				165				170						175	
Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Ile	Gly	Lys	Ile	Ser	Phe	Pro	Ala	Ile	Gln
			180					185						190	
Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	Phe	Arg	Asp	Arg
		195					200					205			
Thr	Asp	Ile	Gln	Cys	Leu	Ile	Pro	Cys	Ala	Ile	Asp	Gln	Asp	Pro	Tyr
	210					215						220			
Phe	Arg	Met	Thr	Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Arg	Ile	Gly	Tyr	Pro	Lys	Pro
225					230					235					240
Ala	Leu	Leu	His	Ser	Thr	Phe	Phe	Pro	Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Thr
				245					250					255	
Lys	Met	Ser	Ala	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr
			260					265						270	
Ala	Lys	Gln	Ile	Lys	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	His	Ala	Phe	Ser	Gly	Gly
		275					280					285			
Arg	Asp	Thr	Ile	Glu	Glu	His	Arg	Gln	Phe	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Val
	290					295					300				
Asp	Val	Ser	Phe	Met	Tyr	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Lys
305					310					315					320
Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Asp	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	Gly
				325					330					335	
Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu
			340					345						350	
His	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Phe
		355					360					365			
Met	Thr	Pro	Arg	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala
	370					375					380				

5

Leu	Glu	His	His	His	His	His	His
385							390

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea que comprende las células progenitoras endoteliales para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad ocular en un paciente en la que el medicamento es inyectado por vía intravítrea en un ojo del paciente en una cantidad suficiente para detener la enfermedad.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el número de células troncales resulta eficaz para la reparación del daño retiniano del ojo del paciente, o resulta eficaz para estabilizar la neovascularización retiniana del ojo del paciente, o resulta eficaz para la maduración de la neovascularización retiniana del ojo del paciente.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que la población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje es aislada mediante:
 - (a) la separación de una pluralidad de monocitos de la médula ósea que ha sido extraída de un mamífero;
 - (b) el marcado de la pluralidad de monocitos con anticuerpos de panel de linaje conjugados con biotina para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119; y
 - (c) la extracción de los monocitos que resultaban positivos para linaje para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119 de la pluralidad de monocitos para proporcionar una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje que comprende las células progenitoras endoteliales.
4. Utilización según la reivindicación 3, en la que por lo menos 50% de la población aislada de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje comprenden los marcadores celulares CD31 y c-kit.
5. Utilización según la reivindicación 1, en la que la enfermedad ocular es seleccionada de entre el grupo constituido por enfermedad degenerativa retiniana, retinopatía isquémica, hemorragia vascular, fuga vascular, corioidopatía, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, presunta histoplasmosis ocular, retinopatía de prematuridad, anemia depreanocítica, y retinitis pigmentaria.
6. Utilización según la reivindicación 1, en la que un número de células inductoras de rescate neurotrófico de una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje, derivadas de la médula ósea de mamífero, aislada, que contiene células progenitoras endoteliales en la que por lo menos 50% de las células troncales comprenden marcadores celulares para CD31 y c-kit es utilizada para la preparación del medicamento, el paciente es un mamífero, la enfermedad ocular es una enfermedad degenerativa retiniana, y el medicamento es administrado a un ojo enfermo del animal.
7. Utilización según la reivindicación 6, en la que la población de células troncales es aislada mediante:
 - (a) la separación de una pluralidad de monocitos de la médula ósea que ha sido extraída de un mamífero;
 - (b) el marcado de la pluralidad de monocitos con anticuerpos de panel de linaje conjugados con biotina para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119; y
 - (c) la extracción de los monocitos que son positivos para linaje para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119 de la pluralidad de monocitos para proporcionar una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje que comprenden las células progenitoras endoteliales.
8. Utilización según la reivindicación 6, en la que el mamífero es un humano.
9. Población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje transfectada que comprende una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea, de mamífero, que comprende las células progenitoras endoteliales en la que por lo menos 50% de las células comprenden los marcadores celulares CD31 y c-kit, siendo dicha población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea, de mamífero, transfectada con un gen que codifica un péptido útil terapéuticamente en la que el péptido útil terapéuticamente es un péptido antiangiogénico seleccionado de entre el grupo constituido por el fragmento T1 de TrpRS y el fragmento T2 de TrpRS.
10. Utilización de una población de células troncales transfectada que comprende una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea, de mamífero, que comprende las células progenitoras endoteliales en la que por lo menos 50% de las células comprenden los marcadores celulares CD31 y c-kit para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la angiogénesis retiniana en el ojo de un paciente que requiera la inhibición angiogénica retiniana en la que dicha población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje derivadas de la médula ósea, de mamífero, es transfectada con un gen que codifica un péptido útil terapéuticamente y el medicamento es inyectado por vía intravítrea en el ojo del paciente.

11. Utilización según la reivindicación 10, en la que la población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje transfectada es preparada mediante:

- 5 (a) la separación de una pluralidad de monocitos de la médula ósea que ha sido extraída de un mamífero;
- (b) el marcado de la pluralidad de monocitos con anticuerpos de panel de linaje conjugados con biotina para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119; y

- 10 (c) la extracción de los monocitos que eran positivos para linaje para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119 a partir de la pluralidad de monocitos para proporcionar una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje que comprende las células progenitoras endoteliales.

- 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que por lo menos 75% de la población aislada de las células troncales hematopoyéticas negativas para linaje comprenden el marcador celular CD31.

- 13. Utilización de una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje transfectada derivada de la médula ósea en la que la población de células troncales ha sido transfectada con un gen útil terapéuticamente para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las enfermedades neovasculares retinianas en un paciente, en la que el medicamento es inyectado por vía intravítrea en el ojo del paciente.

- 14. Utilización según la reivindicación 13, en la que la población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje transfectada es preparada mediante:

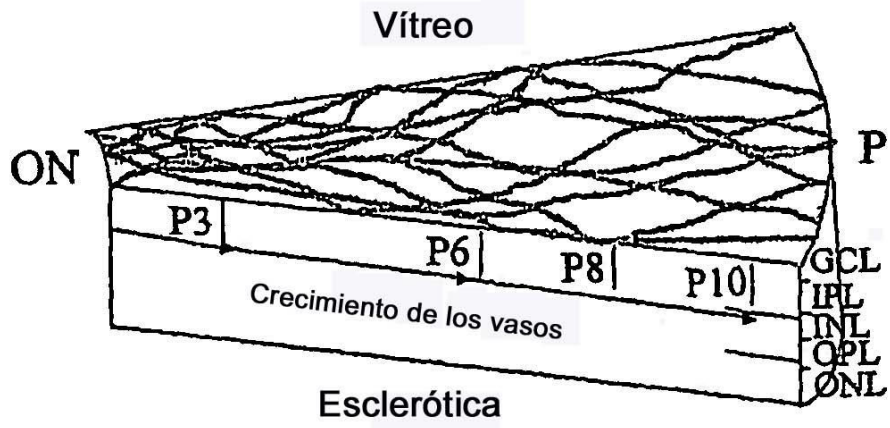
- 25 (a) la separación de una pluralidad de monocitos de la médula ósea que ha sido extraída de un mamífero;
- (b) el marcado de la pluralidad de monocitos con anticuerpos de panel de linaje conjugados con biotina para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119; y

- 30 (c) extraer los monocitos que eran positivos para linaje para CD45, CD3, Ly-6G, CD11 y TER-119 a partir de la pluralidad de monocitos para proporcionar una población de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje que comprenden las células progenitoras endoteliales.

- 15. Utilización según la reivindicación 14, en la que por lo menos 50% de la población aislada de células troncales hematopoyéticas negativas para linaje comprenden los marcadores celulares CD31 y c-kit.

16. Utilización según la reivindicación 13, en la que el gen resulta útil para inhibir la neovascularización retiniana.

a



b

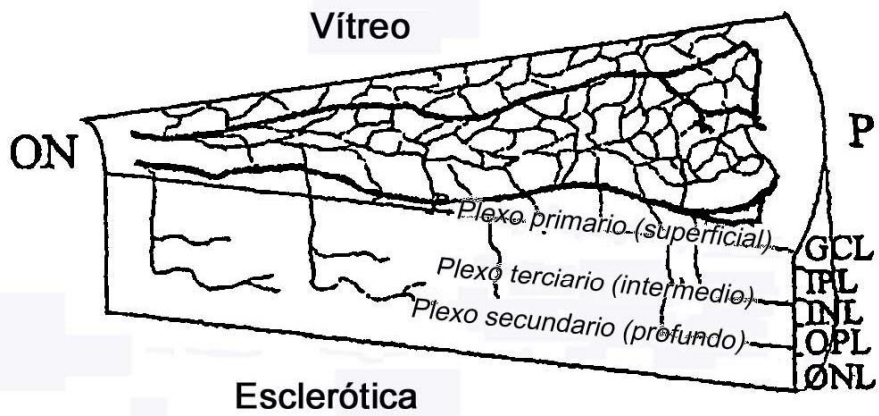


FIG. 1

C

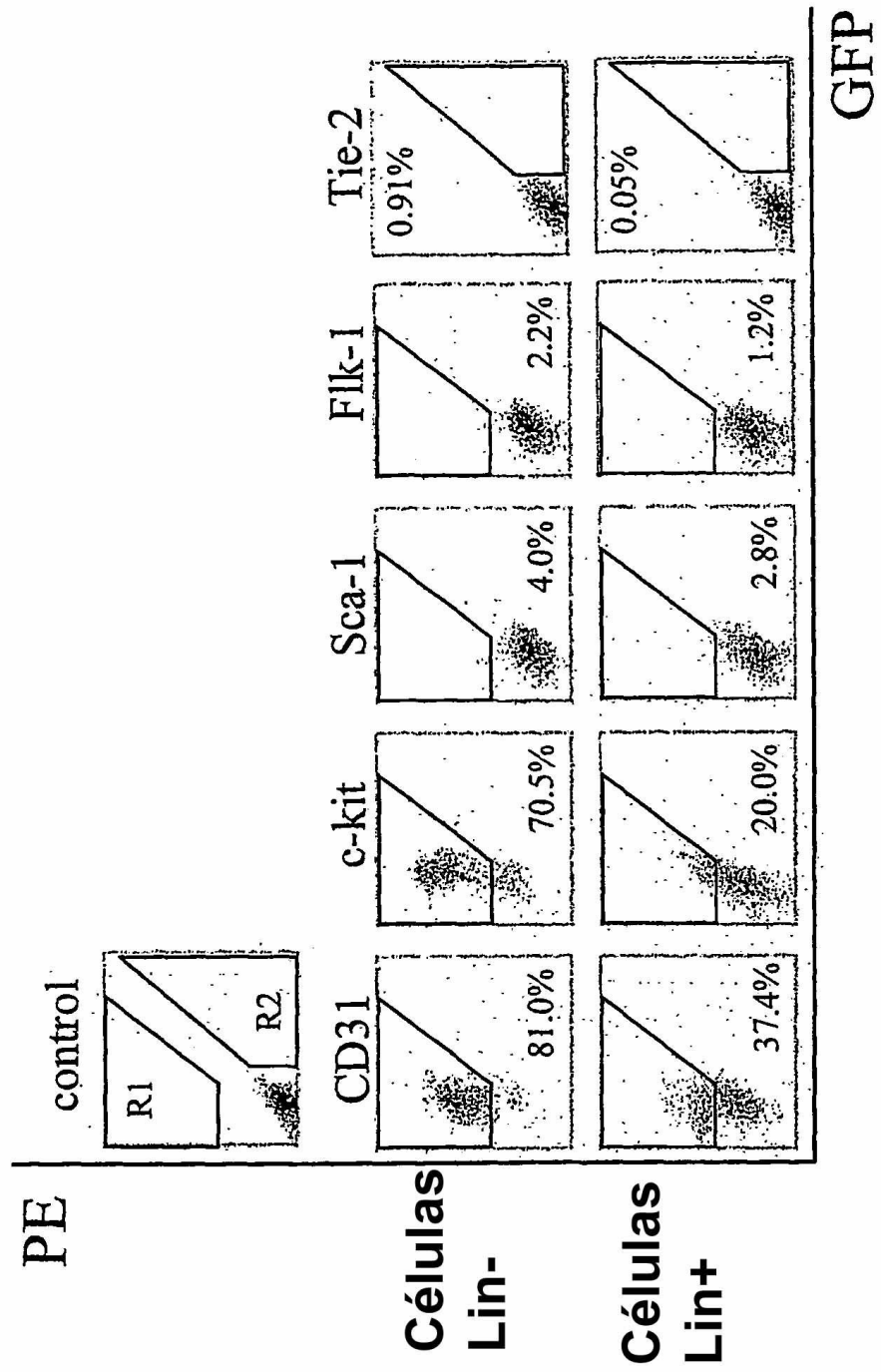


FIG. 1 Cont.

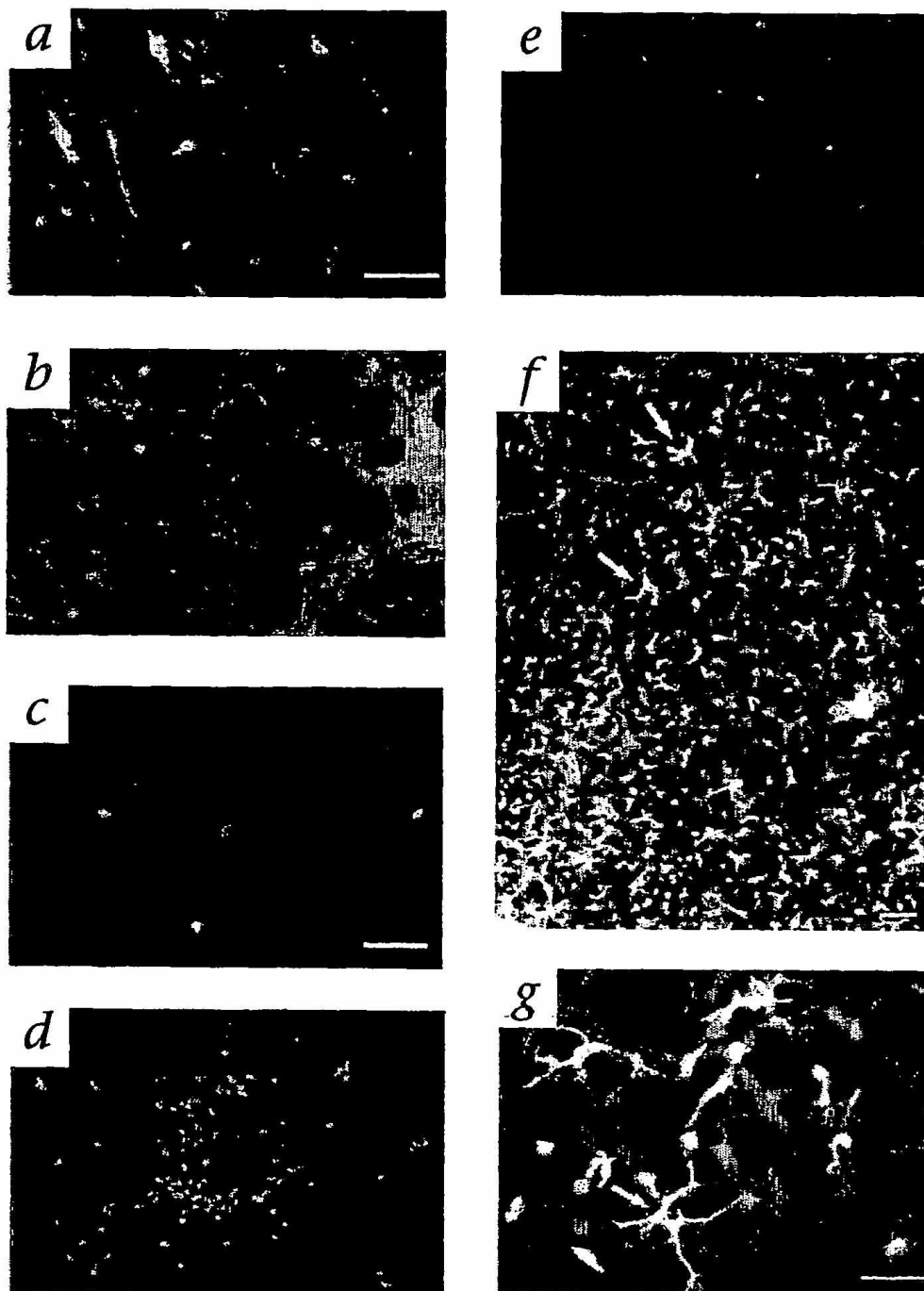


FIG. 2

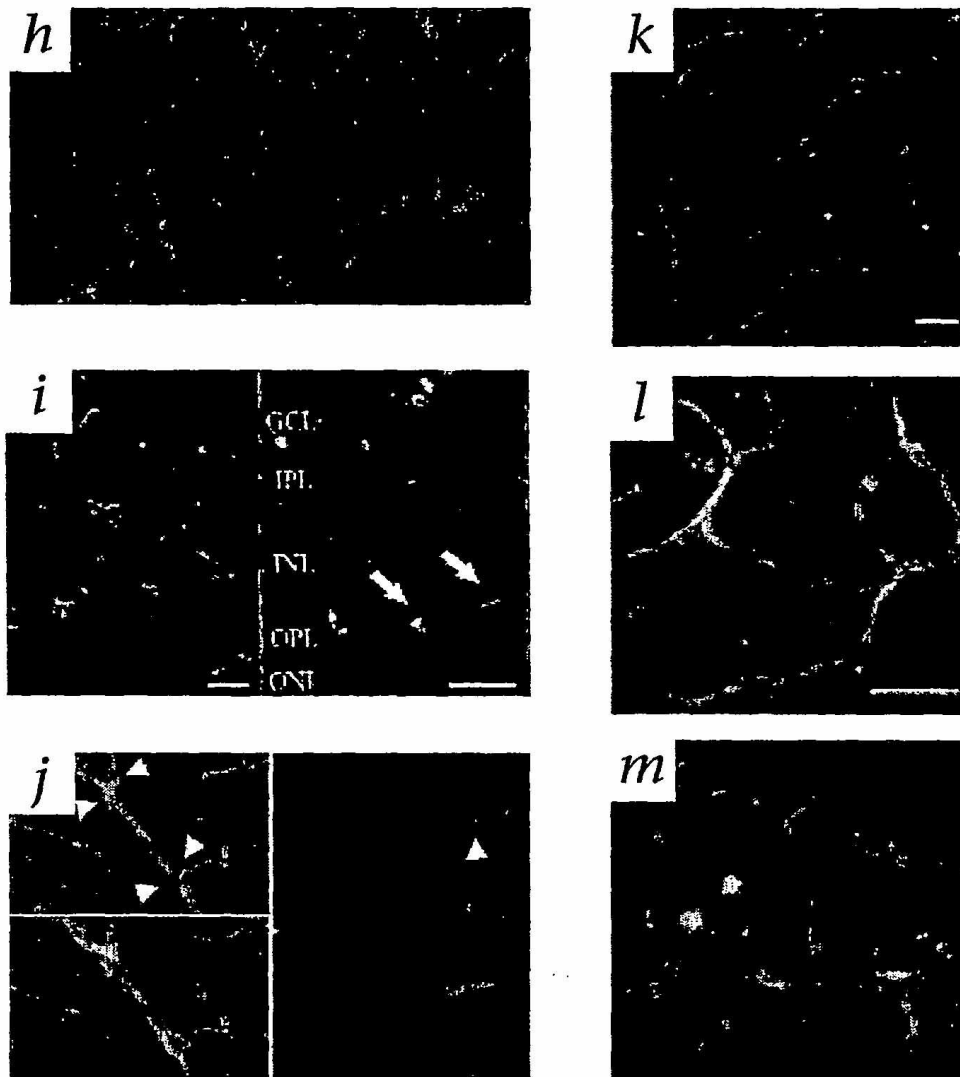


FIG. 2 Cont.

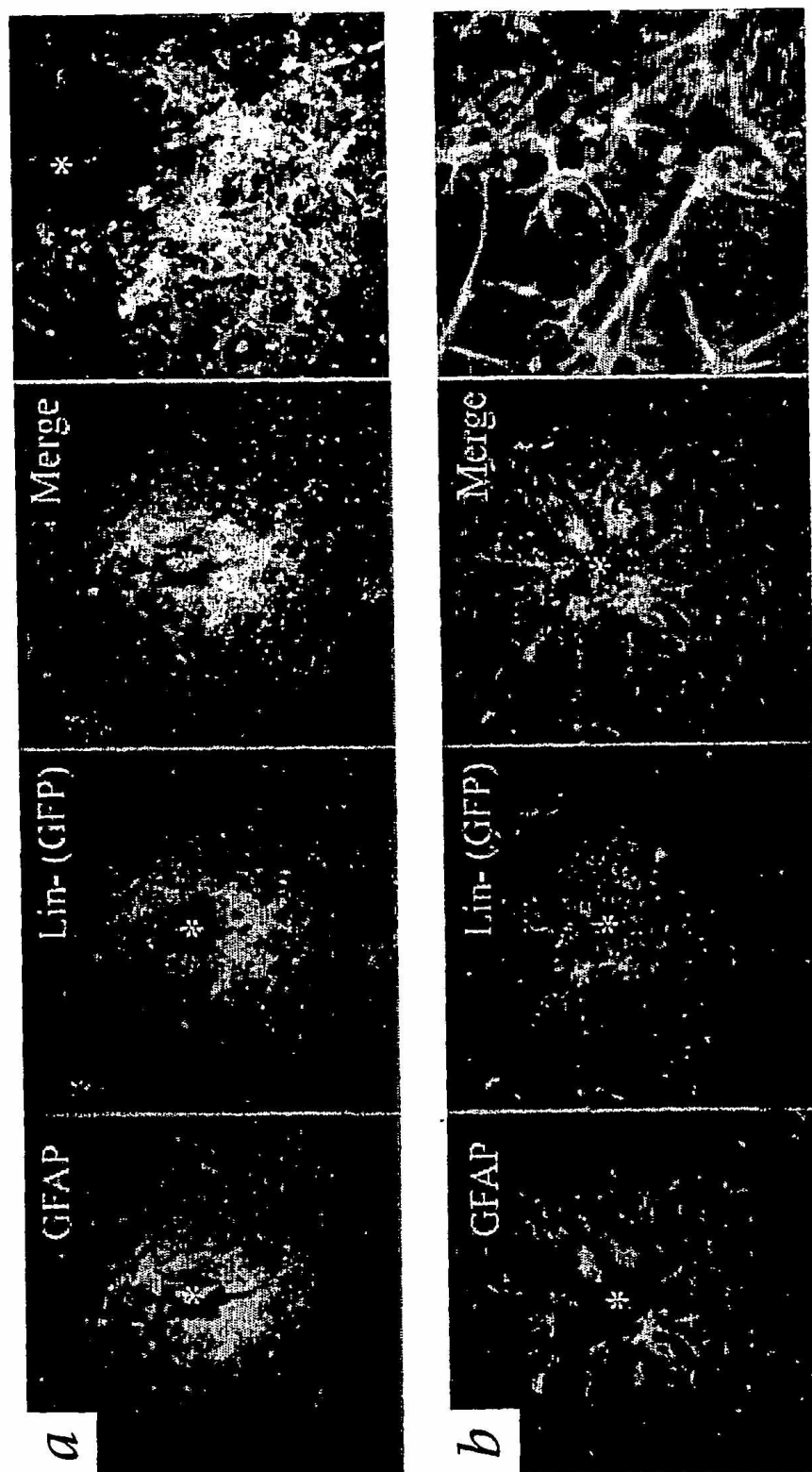


FIG. 3

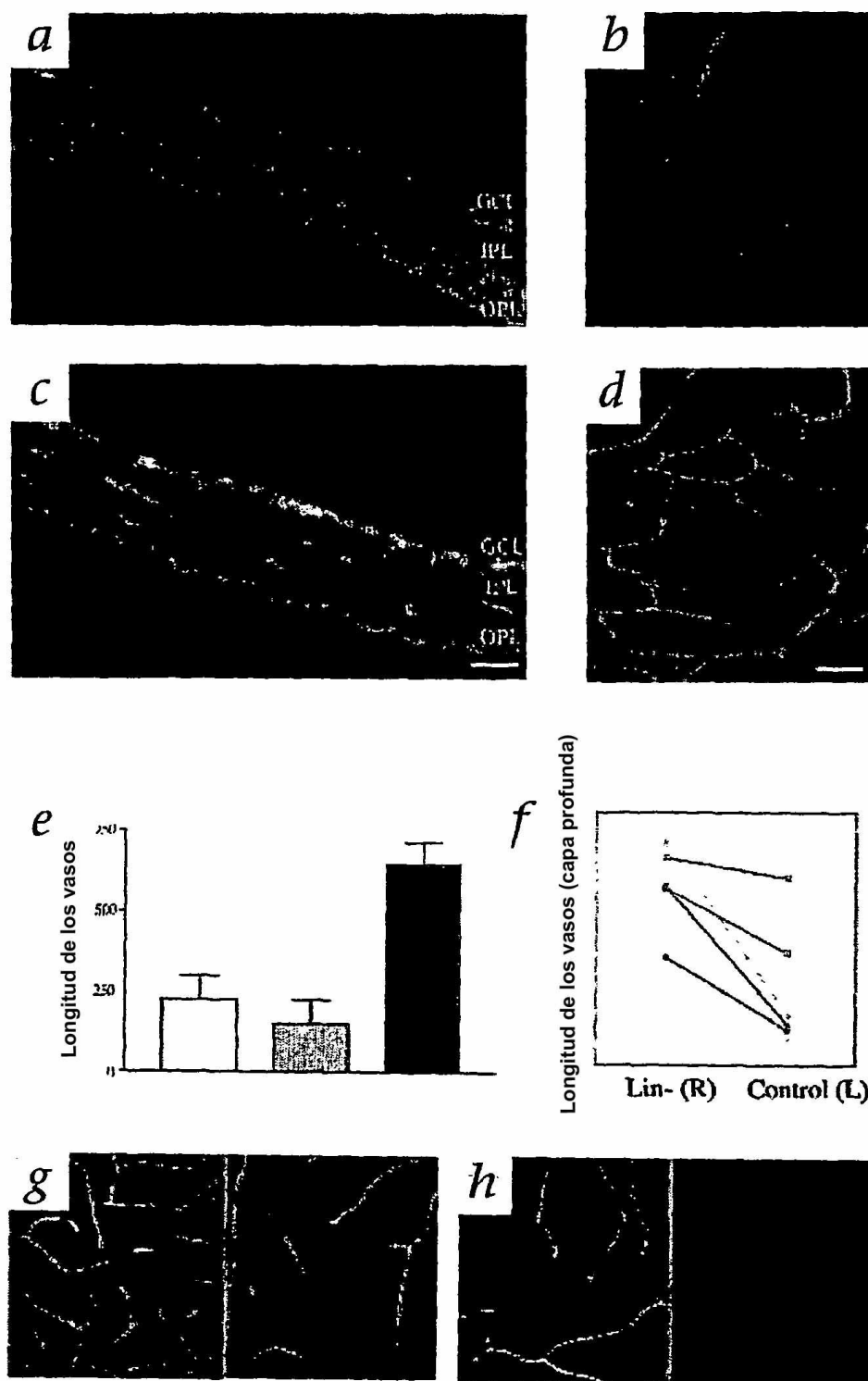


FIG. 4

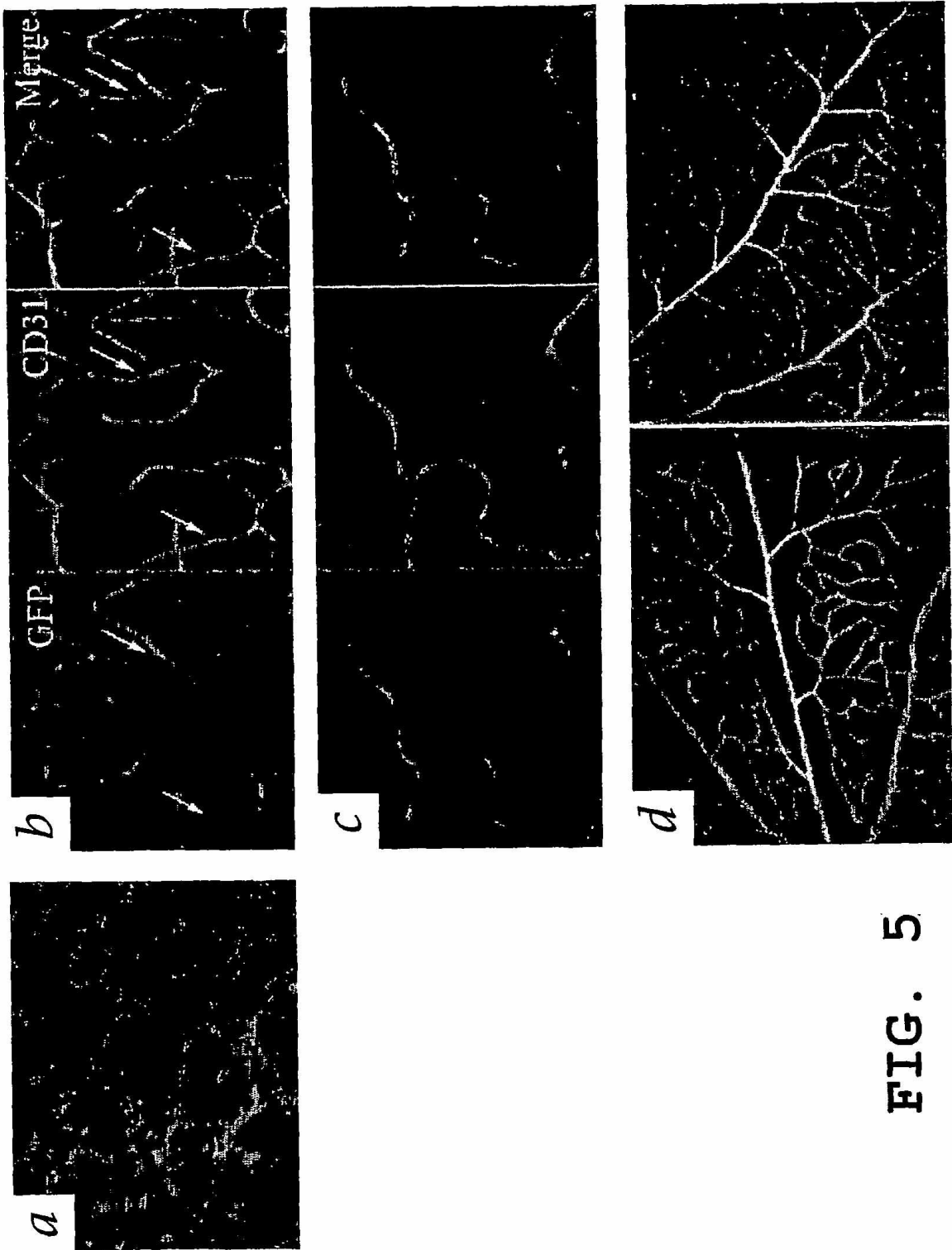


FIG. 5

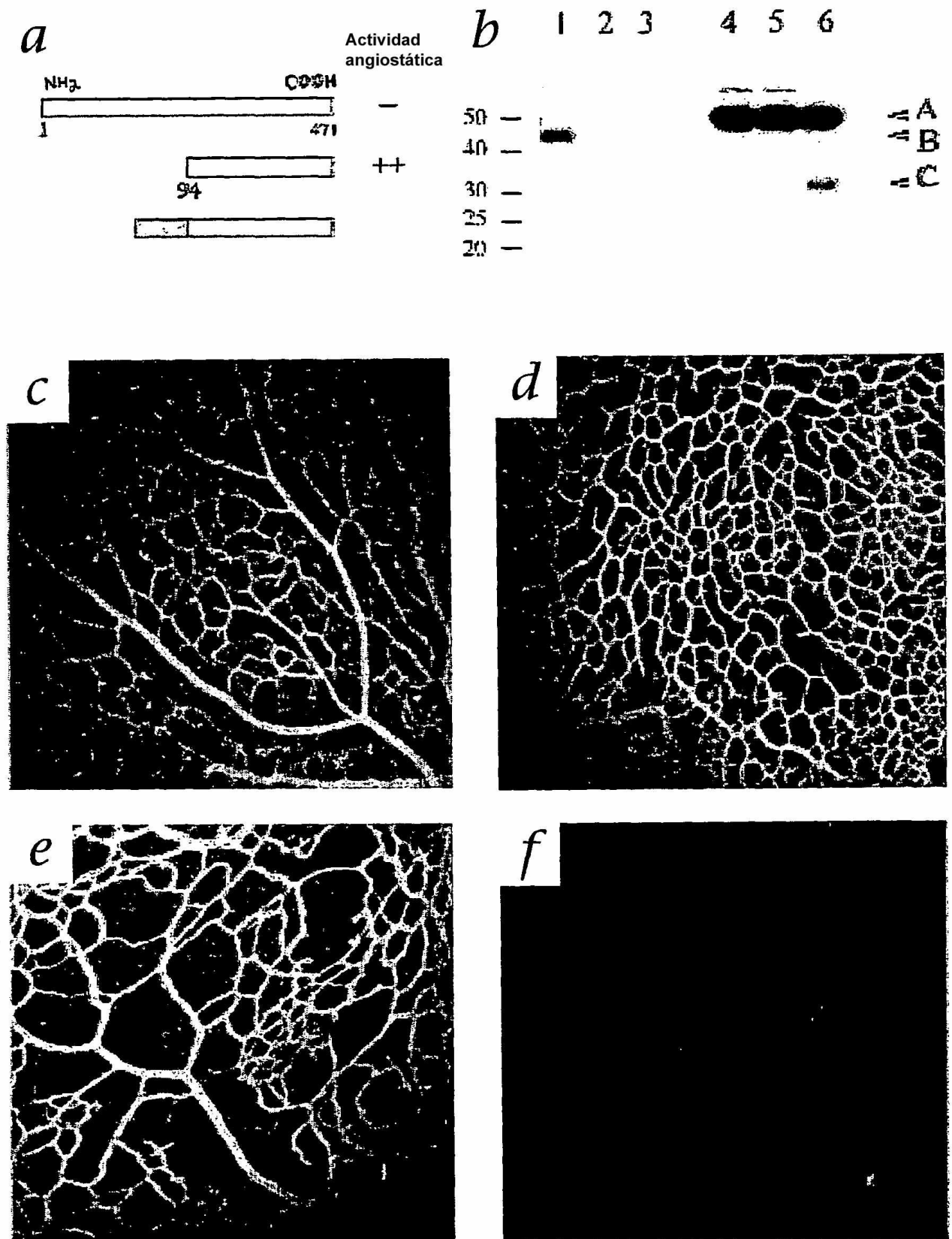


FIG. 6

ADN que codifica el fragmento T2 marcado con His de la TrpRS humana

tggcgaatgg	gacgcgccct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	60
cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgcctt	agcgcgccgt	ccttttcgctt	tcttcccttc	120
ctttctcgcc	acgttcgccg	gctttccccc	tcaagctcta	aatcgggggc	tcccttttagg	180
gttccgattt	agtgcctttac	ggcacctcga	ccccaaaaaa	cttgattagg	gtgatgggtc	240
acgtagtggg	ccatcgccct	gatagacggg	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacgtt	300
ctttaatagt	ggactccttg	tccaaactgg	aacaacactc	aacctatct	cggctctattc	360
ttttgattta	taagggaattt	tgccgatttc	ggcctatttg	ttaaaaaatg	agctgattta	420
acaaaaattt	aacgcgaatt	ttaacaaaat	attaacgttt	acaatttcag	gtggcacttt	480
tccgggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	540
tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	600
gagtattcaa	catttcocgtg	tgcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	660
ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	720
agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	780
agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcg	tattatcccg	840
tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggctc	cgcatacac	tattctcaga	atgacttggg	900
tgagtactca	ccagtacacg	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	960
cagtgtgcgc	ataaccatga	gtgataaacac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	1020
aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga	1080
tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	1140
tgcagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	1200
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	1260
ggcccttccg	gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	gccgggtgagc	gtgggtctcg	1320
cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	1380
gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	1440
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	1500
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	1560
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	1620
aggatcttct	tgagatcctt	ttttctcgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaac	1680
accgctacca	gcgggtgggtt	gtttgcccga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaagg	1740
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	1800
ccaccacttc	aagaactctg	tagcacccgc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttaac	1860
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	1920
accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	gggggggttc	tgcacacagc	ccagcttgga	1980
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgccacgct	2040
tcccgaagg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	2100
cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	2160
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcggagcc	tatggaaaaa	2220
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatggt	2280
ctttcctgcg	ttatcccttg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agttagctga	2340
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcagatca	gtgagcgagg	aagcggaaaga	2400
gocgctgatg	cggtattttc	tccttacgca	tctgtgcggg	atttcacacc	gcatatatgg	2460
tgcactctca	gtacaatctg	ctctgatgcc	gcatagttaa	gccaagtatac	actccgctat	2520
cgctacgtga	ctgggtcatg	gctgcgcccc	gacaccgcgc	aacacccgct	gacgcgccct	2580
gacgggcttg	tctgctcccg	gcacccgctt	acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	2640
gcatgtgtca	gaggttttca	ccgtcatcac	cgaaacgcgc	gaggcagctg	cggtaaagct	2700
catcagcgtg	gtcgtgaagc	gattcacaga	tgtctgcctg	ttcatccgcg	tccagctcgt	2760
tgagttttct	cagaagcggt	aatgtctggc	ttctgataaa	gcggggccatg	ttaagggcgg	2820
ttttttcctg	tttggtcact	gatgcctccg	tgtaaagggg	attttctgttc	atgggggtaa	2880
tgataccgat	gaaacgagag	aggatgctca	cgatacgggt	tactgatgat	gaacatgcc	2940
ggttactgga	acgttgtgag	ggtaaacaa	tggcgggatg	gatgcggcgg	gaccagagaa	3000
aaatcactca	gggtcaatgc	cagcgttcg	ttaatacaga	tgtaggtgtt	ccacagggtta	3060
gccagcagca	tcctgcgatg	cagatccgga	acataatggt	gcagggcgct	gacttcgcg	3120
tttccagact	ttacgaaaca	cggaaaccga	agaccattca	tgttggtgct	caggtcgcag	3180
acgttttgca	gcagcagtcg	cttcacgttc	gctcgcgtat	cgggtgattca	ttctgctaac	3240
cagtaaggca	accccgccag	cctagccggg	tcctcaacga	caggagcacg	atcatgcgca	3300

FIG. 7

```

cccggtggcca ggacccaacg ctgcccgaga tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac 3360
tataggggaga ccacaacggt ttccctctag aaataatttt gtttaacttt aagaaggaga 3420
tatacat atg agt gca aaa ggc ata gac tac gat aag ctc att gtt cgg 3469
ttt gga agt agt aaa att gac aaa gag cta ata aac cga ata gag aga 3517
gcc acc ggc caa aga cca cac cac ttc ctg cgc aga ggc atc ttc ttc 3565
tca cac aga gat atg aat cag gtt ctt gat gcc tat gaa aat aag aag 3613
cca ttt tat ctg tac acg ggc cgg ggc ccc tct tct gaa gca atg cat 3661
gta ggt cac ctc att cca ttt att ttc aca aag tgg ctc cag gat gta 3709
ttt aac gtg ccc ttg gtc atc cag atg acg gat gac gag aag tat ctg 3757
tgg aag gac ctg acc ctg gac cag gcc tat ggc gat gct gtt gag aat 3805
gcc aag gac atc atc gcc tgt ggc ttt gac atc aac aag act ttc ata 3853
ttc tct gac ctg gac tac atg ggg atg agc tca ggt ttc tac aaa aat 3901
gtg gtg aag att caa aag cat gtt acc ttc aac caa gtg aaa ggc att 3949
ttc ggc ttc act gac agc gac tgc att ggg aag atc agt ttt cct gcc 3997
atc cag gct gct ccc tcc ttc agc aac tca ttc cca cag atc ttc cga 4045
gac agg acg gat atc cag tgc ctt atc cca tgt gcc att gac cag gat 4093
cct tac ttt aga atg aca agg gac gtc gcc ccc agg atc ggc tat cct 4141
aaa cca gcc ctg ttg cac tcc acc ttc ttc cca gcc ctg cag ggc gcc 4189
cag acc aaa atg agt gcc agc gac cca aac tcc tcc atc ttc ctc acc 4237
gac acg gcc aag cag atc aaa acc aag gtc aat aag cat gcg ttt tct 4285
gga ggg aga gac acc atc gag gag cac agg cag ttt ggg ggc aac tgt 4333
gat gtg gac gtg tct ttc atg tac ctg acc ttc ttc ctc gag gac gac 4381
gac aag ctc gag cag atc agg aag gat tac acc agc gga gcc atg ctc 4429
acc ggt gag ctc aag aag gca ctc ata gag gtt ctg cag ccc ttg atc 4477
gca gag cac cag gcc cgg cgc aag gag gtc acg gat gag ata gtg aaa 4525
gag ttc atg act ccc cgg aag ctg tcc ttc gac ttt cag aag ctt gcg 4573
gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac tgagatccgg ctgctaacaa 4623
agcccgaaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag caataactag cataaccct 4683
tggggcctct aaacgggtct tgagggggtt tttgctgaaa ggaggaacta tatccggat 4742

```

FIG. 7 Cont.

Fragmento T2 marcado con His de la TrpRS humana

Met	Ser	Ala	Lys	Gly	Ile	Asp	Tyr	Asp	Lys	Leu	Ile	Val	Arg	Phe	Gly
1				5					10					15	
Ser	Ser	Lys	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Thr
			20					25					30		
Gly	Gln	Arg	Pro	His	His	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Ile	Phe	Phe	Ser	His
		35					40					45			
Arg	Asp	Met	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Lys	Pro	Phe
	50					55					60				
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Glu	Ala	Met	His	Val	Gly
65				70						75					80
His	Leu	Ile	Pro	Phe	Ile	Phe	Thr	Lys	Trp	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Asn
				85					90					95	
Val	Pro	Leu	Val	Ile	Gln	Met	Thr	Asp	Asp	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Lys
			100					105					110		
Asp	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Asn	Ala	Lys
		115					120					125			
Asp	Ile	Ile	Ala	Cys	Gly	Phe	Asp	Ile	Asn	Lys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser
	130					135					140				
Asp	Leu	Asp	Tyr	Met	Gly	Met	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asn	Val	Val
145					150					155					160
Lys	Ile	Gln	Lys	His	Val	Thr	Phe	Asn	Gln	Val	Lys	Gly	Ile	Phe	Gly
				165					170					175	
Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Ile	Gly	Lys	Ile	Ser	Phe	Pro	Ala	Ile	Gln
			180					185					190		
Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	Phe	Arg	Asp	Arg
		195					200					205			
Thr	Asp	Ile	Gln	Cys	Leu	Ile	Pro	Cys	Ala	Ile	Asp	Gln	Asp	Pro	Tyr
	210					215					220				
Phe	Arg	Met	Thr	Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Arg	Ile	Gly	Tyr	Pro	Lys	Pro
225					230					235					240
Ala	Leu	Leu	His	Ser	Thr	Phe	Phe	Pro	Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Thr
				245					250					255	
Lys	Met	Ser	Ala	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr
			260					265					270		
Ala	Lys	Gln	Ile	Lys	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	His	Ala	Phe	Ser	Gly	Gly
		275					280					285			
Arg	Asp	Thr	Ile	Glu	Glu	His	Arg	Gln	Phe	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Val
	290					295					300				
Asp	Val	Ser	Phe	Met	Tyr	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Lys
305					310					315					320
Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Asp	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	Gly
				325					330					335	
Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu
			340					345					350		
His	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Phe
		355					360					365			
Met	Thr	Pro	Arg	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala
	370					375					380				
Leu	Glu	His	His	His	His	His	His								
385					390										

FIG. 8

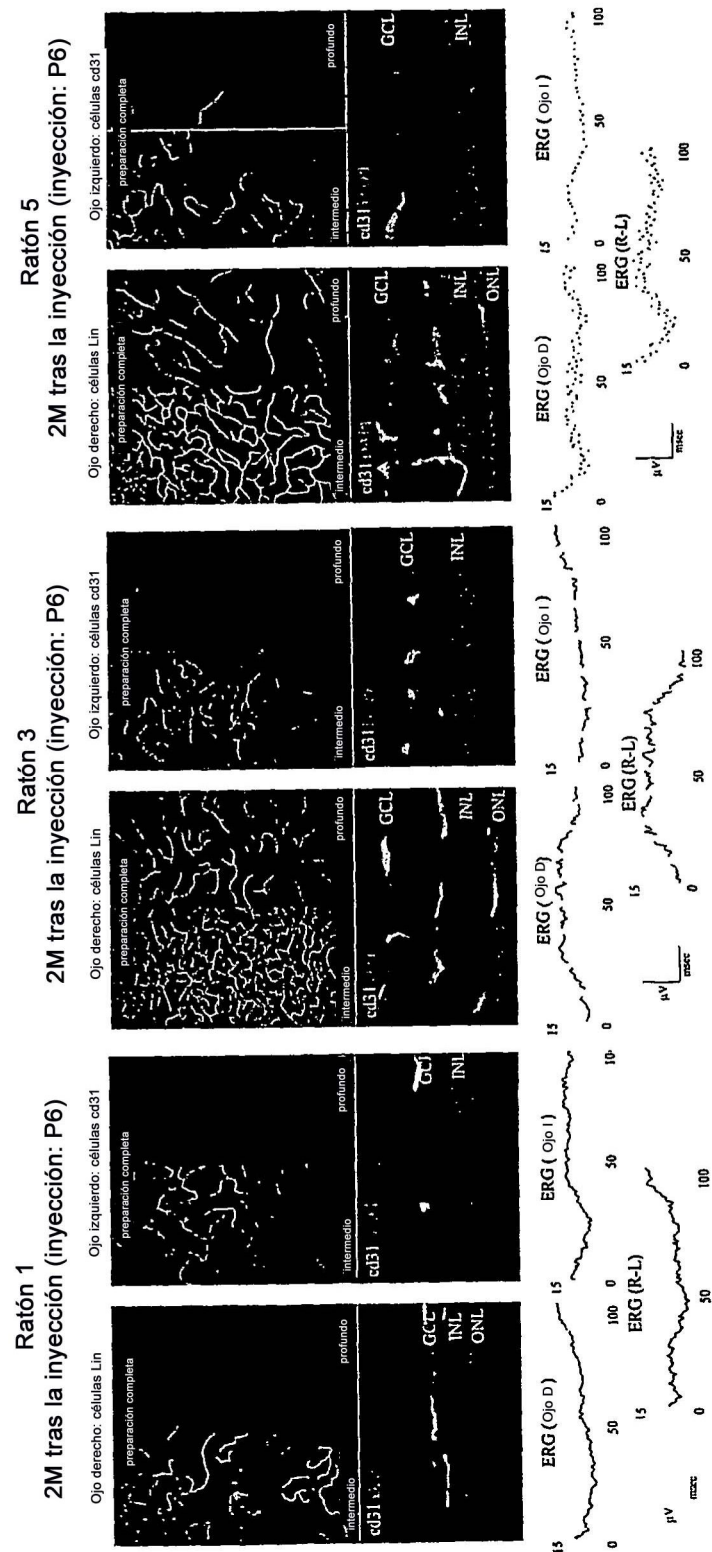


FIG. 9

Análisis de regresión simple - 2M

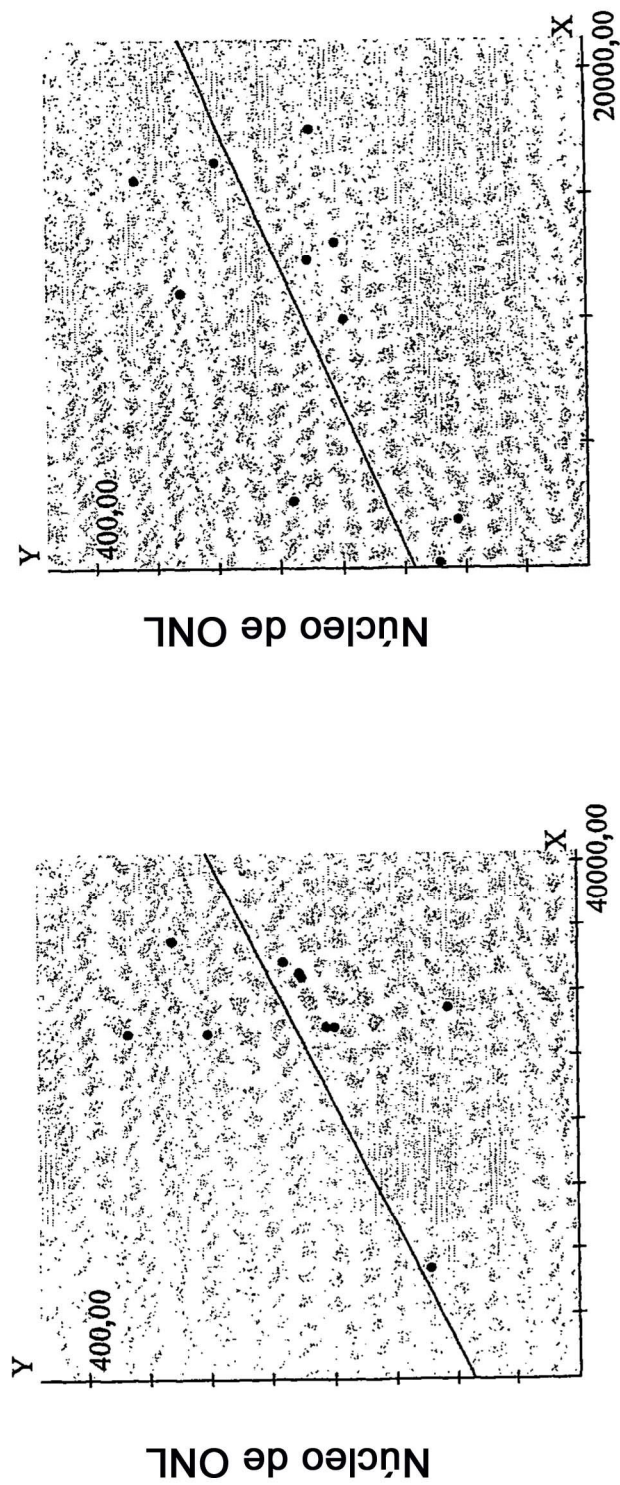


FIG. 10

Análisis de regresión simple - 2M

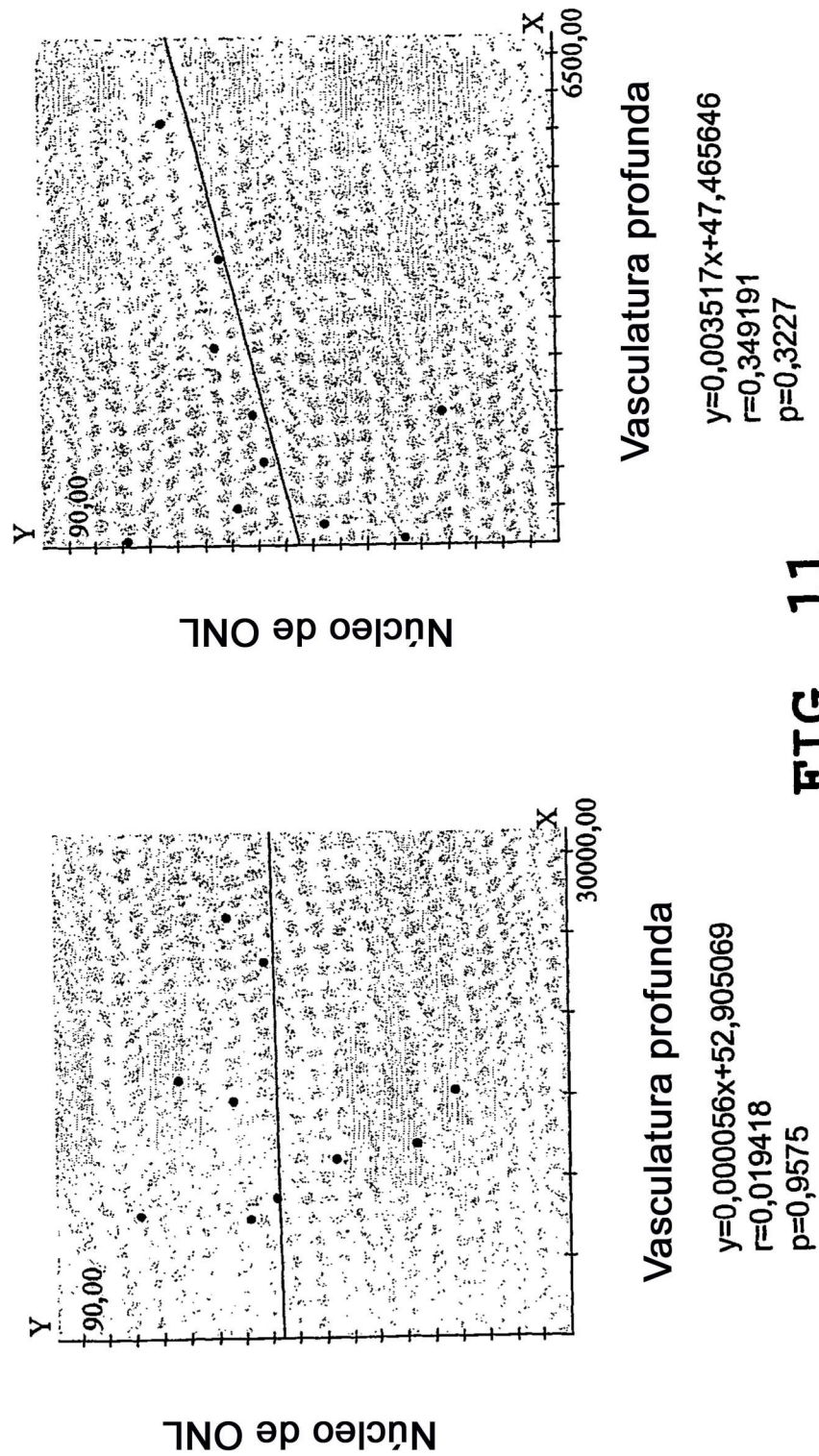


FIG. 11

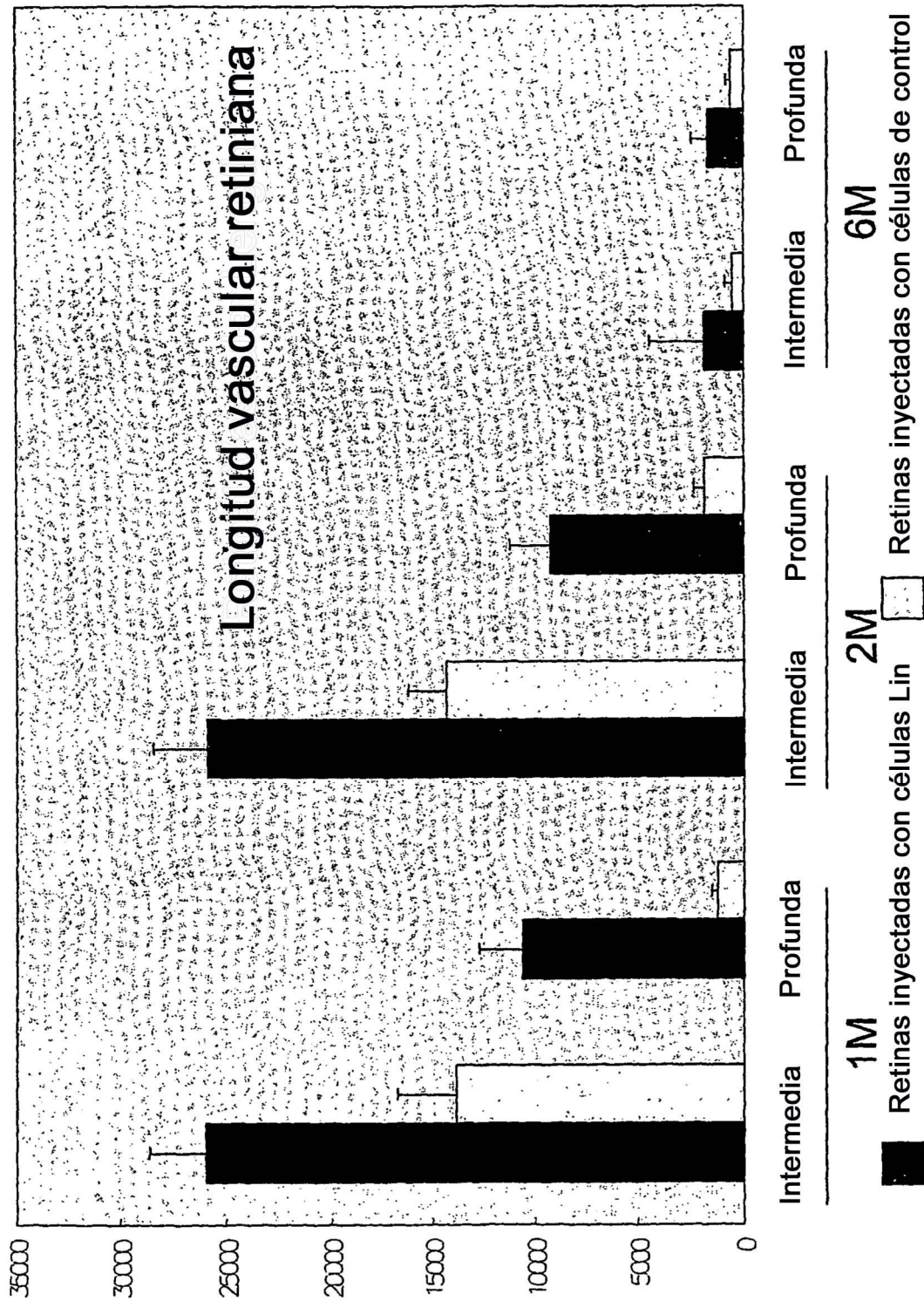


FIG. 12

Número de núcleos en la ONL

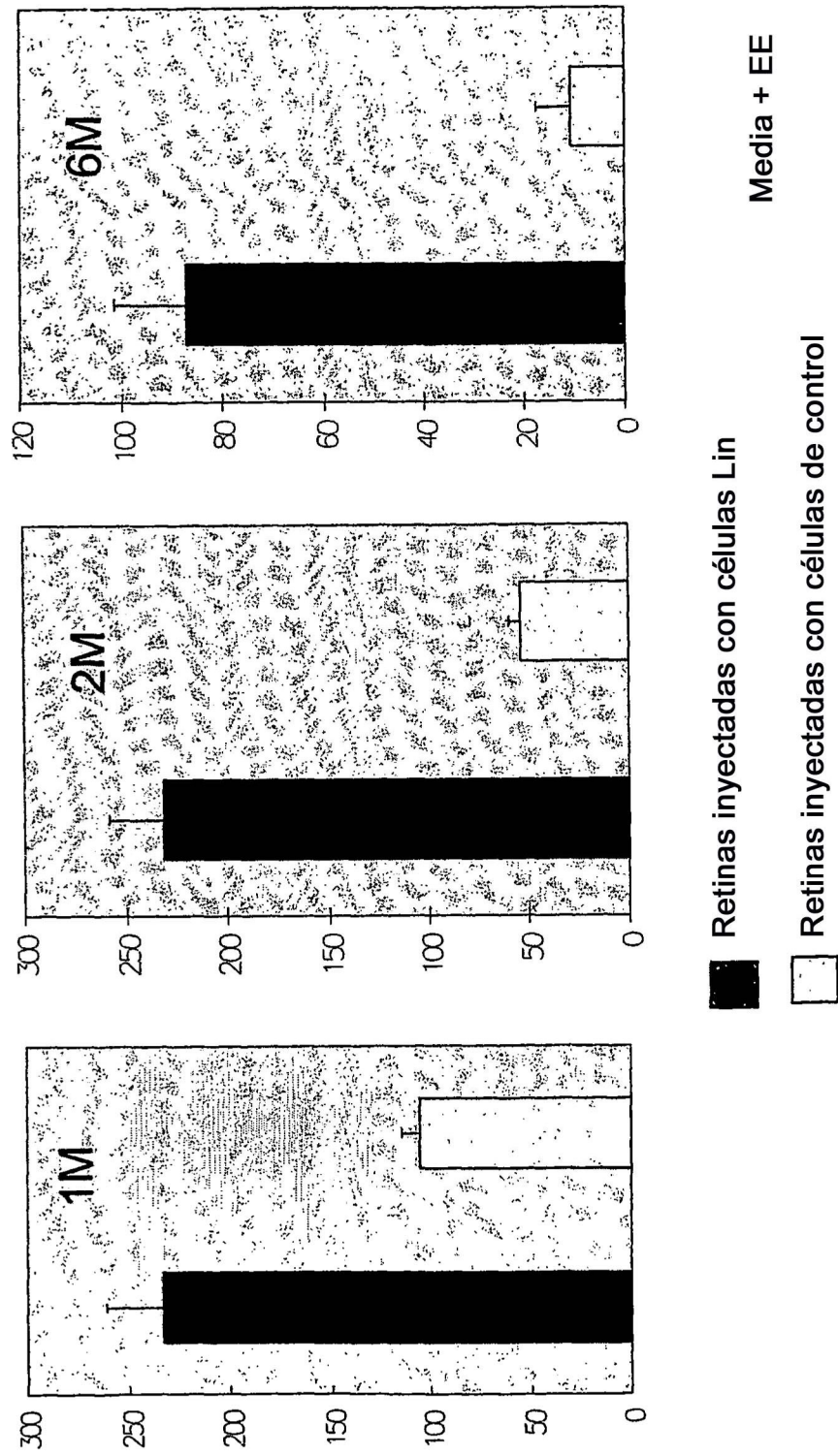


FIG. 13

Número de núcleos en la ONL

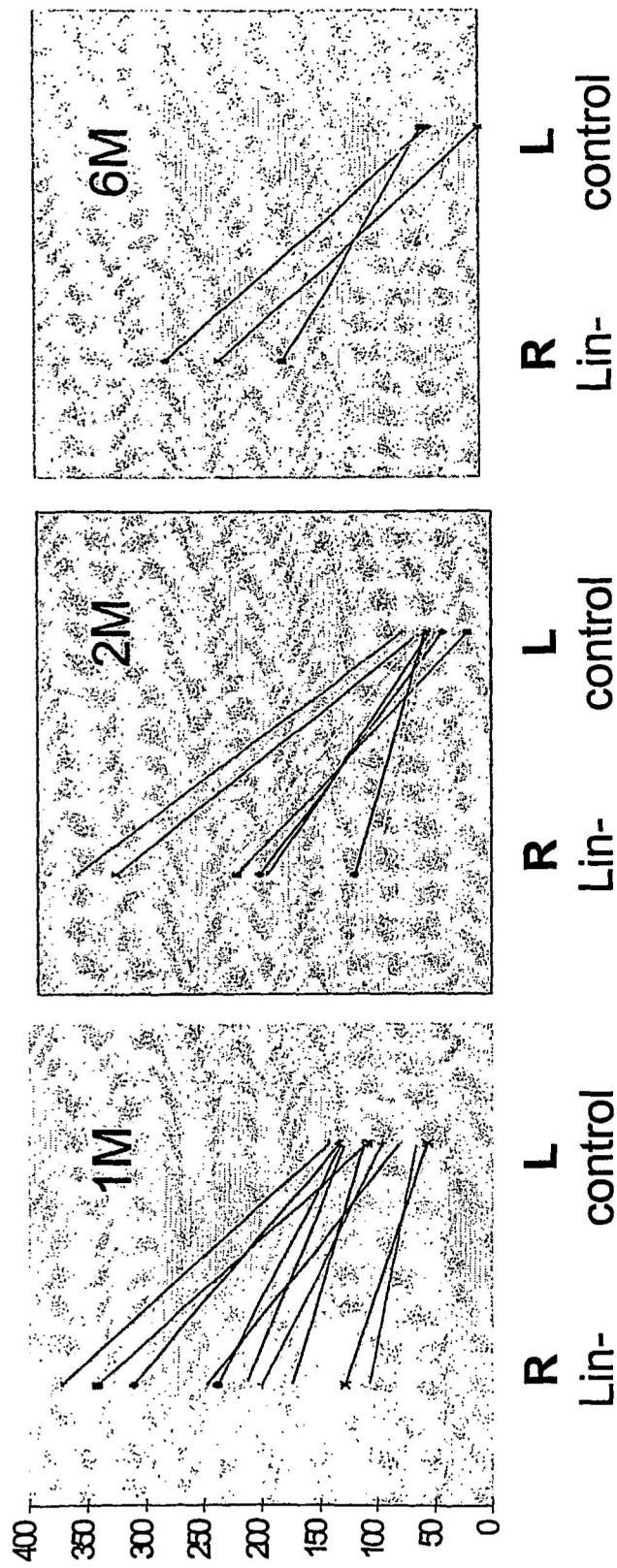


FIG. 14