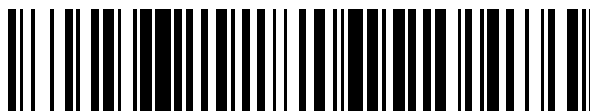


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 180**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 35/39 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2007 E 07827768 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2209481**

54 Título: **Uso de microvesículas (MVS), para preparar un medicamento que tiene actividad de adyuvante en el trasplante de células endoteliales, particularmente en el tratamiento de la diabetes mediante el trasplante de islotes pancreáticos, y método relacionado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2013

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND
GMBH (100.0%)
ELSE-KRÖNER-STRASSE 1
61352 BAD HOMBURG, DE**

72 Inventor/es:

**CANTALUPPI, VINCENZO;
DEREGIBUS, MARIA CHIARA AMILDE y
CAMUSSI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 409 180 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de microvesículas (MVS), para preparar un medicamento que tiene actividad de adyuvante en el trasplante de células endoteliales, particularmente en el tratamiento de la diabetes mediante el trasplante de islotes pancreáticos, y método relacionado.

5 La presente invención en general cae dentro del campo del trasplante de islote pancreáticos-células endoteliales, y en particular se relaciona con el tratamiento terapéutico de la diabetes tipo I y II mediante el trasplante de islote pancreático.

10 En los últimos años, el trasplante de islotes se ha convertido en una creciente opción terapéutica para el tratamiento de la diabetes tipo I y tipo II, después de la introducción de un régimen inmunosupresor libre de glucocorticoides basado en la rapamicina y la mejora de técnicas de aislamiento (1-3). Sin embargo, un gran porcentaje de islotes trasplantados sigue sin injertar en el hígado después de la infusión en la vena porta y, en consecuencia, los páncreas de múltiples donantes son necesarios para garantizar una suficiente masa de islotes, para lograr un beneficio metabólico.

15 Con el fin de aumentar el éxito del procedimiento, sería necesario identificar cuales factores son capaces de mejorar la funcionalidad y la supervivencia de los islotes trasplantados.

Se conoce que las células progenitoras endoteliales (CPEs) son reclutadas en el páncreas en respuesta a la lesión del islote y también se conoce que la neovascularización del páncreas mediada por CPE puede facilitar la recuperación de las células β lesionadas, mejorando la función del aloinjerto del islote (4,5). Sin embargo, el uso de CPEs en trasplante celular no es aconsejable dado el potencial riesgo tumorigénico de las células madre.

20 Las referencias Brissova Marcela et al.: "Intraislet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets", Diabetes, May 2004, vol. 53, No. 5, pages 1318-1325 y Mathews Virkram et al. "Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury", Diabetes, January 2004, vol. 53, No. 1, pages 91-98, revelan el uso de trasplante del islote pancreático en el tratamiento de la diabetes tipo I, y revelan que un co-trasplante con células endoteliales exógenas o CPEs, puede promover el injerto del islote y la revascularización.

25

Actualmente, la presente invención ha encontrado que las microvesículas (MVs) derivadas de células del linaje de la célula endotelial, específicamente a partir de las células progenitoras endoteliales (CPEs), representan una alternativa ventajosa sobre el conjunto de las células madre como un factor adyuvante en la terapia de la diabetes tipo I y tipo II, mediante el trasplante de islotes.

30 La expresión "microvesículas (MVs) derivadas de células del linaje de la célula endotelial" como se utiliza en este documento se refiere a una partícula membranosa, la cual al menos se deriva en parte del compartimento endosomal de una célula del linaje de la célula endotelial bajo fusión con la membrana celular exterior, específicamente a partir del compartimento endosomal de una CPE.

35 Las microvesículas derivadas de células del linaje de la célula endotelial, específicamente de las CPEs, por lo general son de forma esferoide y tienen un diámetro dentro del rango de 100 nm a 5 μ m, generalmente más de aproximadamente 1 μ m. Si la partícula no tiene forma esferoide, los valores mencionados anteriormente se refieren a la mayor dimensión de la partícula.

La expresión "células del linaje endotelial" se refiere a las células que se derivan de precursores hematopoyéticos comunes originados en la médula ósea, capaces de diferenciar en las células endoteliales funcionales maduras (6).

40 Las células del linaje endotelial, específicamente CPEs, se aíslan convenientemente a partir de la sangre periférica mediante centrifugación de densidad y se siembran en placas sobre un medio de cultivo tal como EBM-2 (medio basal endotelial), suplementado con factores de crecimiento endotelial (Deregibus M C et al., Blood. 1 Oct 2007; 110(7):2440-8. Pre-publicado en internet el 29 de Mayo de 2007). A continuación, las microvesículas (MVs) se pueden obtener a partir de los sobrenadantes de las CPEs aisladas, mediante técnicas de ultracentrifugación como se revela en Deregibus, 2007 y en la sección experimental de la presente descripción.

45

Entonces, las MVs aisladas se pueden almacenar hasta su uso, mediante la congelación a muy baja temperatura, por lo general a -80°C, en una suspensión con uno o más agentes crioprotectores. Las sustancias crioprotectoras apropiadas son por ejemplo dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol. El uso de DMSO a una concentración de 10% del volumen de la suspensión celular garantiza una buena conservación de las células y un efecto tóxico limitado en los pacientes a los que se les repite la infusión. Otras sustancias que se pueden citar son los agentes crioprotectores extracelulares, es decir sustancias de alto peso molecular que actúan en la superficie celular formando una barrera bien cerrada que reduce la deshidratación intracelular. El almidón hidroxietílico, se puede citar como ejemplo.

50

Las MVs derivadas de CPE fueron analizadas por los presentes inventores tanto in vitro como in vivo en un modelo experimental de trasplante subcutáneo de islotes en ratones SCID. Los ratones SCID no son capaces de producir células T y B y en consecuencia no son capaces de luchar contra las infecciones y de rechazar el tejido trasplantado.

5 El trabajo experimental llevado a cabo por los presentes inventores, el cual se ilustra con más detalle en la sección experimental de la descripción, demostró que las MVs derivadas de CPE, cuando se administran a un receptor de trasplante de islote pancreático de célula endotelial, y particularmente a un receptor del trasplante del islote pancreático, actúan como un factor adyuvante del trasplante, ya que mejoran la supervivencia y la funcionalidad de células endoteliales trasplantadas. Más particularmente, los inventores observaron que las MVs son capaces de
10 promover la angiogénesis y la formación de las estructuras similares a las capilares a partir de células endoteliales, así como la secreción de la insulina a partir de células β de los islotes, así como la replicación, la resistencia a la apoptosis y la migración de células endoteliales. Lo más importante, el efecto adyuvante mencionado anteriormente de MVs no se inhibe completamente por la incubación con dosis terapéuticas de rapamicina, el inmunosupresor básico en trasplante del islote pancreático. Esto es más sorprendente dado que se conoce que la rapamicina ejerce un efecto dual sobre el endotelio del islote, con la inducción de un efecto inmunomodulador simultáneo a través de la expresión inhibida de los receptores involucrados en la activación y la adhesión de linfocitos, pero también la inhibición de la angiogénesis (7).

Por lo tanto, una parte de la invención es el uso de microvesículas (MV) derivadas de una célula progenitora endotelial (CPE), para preparar un medicamento que tiene una actividad de adyuvante en el tratamiento de la diabetes tipo I o II, mediante el trasplante de islote pancreático.
20

Como será demostrado en la sección experimental, la actividad de adyuvante de las microvesículas consiste en la mejora de la supervivencia y la funcionalidad de los islotes pancreáticos trasplantados y las células endoteliales.

Adicionalmente, como se menciona anteriormente, la actividad de adyuvante de MVs no está abolida por la administración de dosis terapéuticas de rapamicina como un inmunosupresor. Por consiguiente, las MVs empleadas en la presente invención se utilizan como un agente adyuvante dentro del marco de trasplante del islote pancreático
25 opcionalmente en combinación con la rapamicina. La expresión "en combinación con" no significa que MVs y la rapamicina se deban mezclar necesariamente juntas, ni que necesariamente se deban administrar de forma simultánea. La expresión "en combinación con" simplemente significa que las MVs se administran al receptor del trasplante del islote, preferiblemente junto con los islotes en sí y generalmente mediante infusión intravenosa, dentro del marco de un procedimiento del trasplante del islote pancreático incluyendo al menos una etapa en la cual el receptor se somete a inmunosupresión basada en la rapamicina antes y/o durante y/o después del trasplante. En dicho contexto, la rapamicina generalmente se utiliza para alcanzar niveles plasmáticos por medio de niveles de 12-15 ng/ml en la primera semana después del trasplante de islotes humanos (1).
30

Como se menciona anteriormente, las MVs se pueden administrar mediante infusión intravenosa y generalmente se administran junto con los islotes pancreáticos. La vena porta es el sitio de infusión preferido. Los islotes pancreáticos por lo general se pre-incuban con MVs, antes de que sea infundido en el receptor. Una dosis de MV apropiada que se administra depende de una pluralidad de factores, pero generalmente se comprende entre 0.1 a 10 microgramos/Kg del peso corporal del receptor para el ser humano, preferiblemente 1-5 microgramos/Kg.
35

La presente invención es útil en un método de trasplante de célula endotelial, que comprende la administración de microvesículas (MV) derivadas de una célula progenitora endotelial (CPE), a un sujeto que está en necesidad de dicho tratamiento. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Un beneficio principal que resulta de la administración de MVs es que se mejoran la supervivencia y la funcionalidad de las células endoteliales trasplantadas.
40

La presente invención también es útil en un método para tratar la diabetes tipo I y II, mediante trasplante de islotes pancreáticos, que comprende la administración de microvesículas (MV) derivadas de una célula del linaje de la célula endotelial, preferiblemente de una célula progenitora endotelial (CPE), a un sujeto que tiene necesidad de dicho tratamiento. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Un beneficio principal resultante de la administración de MVs es que la producción de insulina se mejora mediante las células β de los islotes pancreáticos y que se mejora el injerto de los islotes. Con el fin de tratar la diabetes tipo I y II, mediante el trasplante de islote pancreático, los islotes se trasplantan en el hígado del receptor.
45
50

La siguiente sección experimental se provee únicamente a modo de ilustración.

Materiales y métodos

Aislamiento de célula endotelial e islotes humanos

Diez preparaciones diferentes de islotes humanos recientemente purificados, descartados del uso de trasplante de masa de islotes inadecuados se prepararon siguiendo el método Ricordi (3). Los islotes purificados (>90% de pureza) se cultivaron en medio CMRL (Mediatech Inc., Herndon, VA) que contiene 5 mg/mL de albúmina (Kedrion Spa, Lucca, Italy) y glutamina 2 mM (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD).

5 Las líneas de célula endotelial de islote (CEI) pancreático humano se generaron de la siguiente manera. En resumen, la hipertrofia de las células de los islotes se eliminaron mediante tratamiento con tripsina/EDTA y se transfectoraron con 4 mg del vector plásmido pBR322 que contiene gen antígeno grande SV40-T a 250 mV y 960 mF en cubetas de electroporación de 4-mm en un electroporador II (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Los clones se seleccionaron para resistencia de 1 mg/mL de G418 y se detectaron por inmunofluorescencia y expresión FACS de marcadores endoteliales. Los clones positivos además se subclonaron limitando método de dilución y se cultivaron en RPMI (Sigma), que contiene 10% de FCS (Hyclone, Logan, Utah), glutamina 2 mM (GIBCO BRL) y factores de crecimiento endotelial (10 ng/mL de VEGF, 10 ng/mL de bFGF, 10 ng/mL de PDGF y 0.5 U/mL de heparina).

Aislamiento de célula progenitora endotelial humana

15 Las células progenitoras endoteliales humanas (CPEs) se aislaron de PBMC de donantes sanos mediante centrifugación de densidad. Las células purificadas se sembraron en placas en matraces de cultivo recubiertos con fibronectina en un medio suplementado con 5% de FCS y factores de crecimiento endotelial (10 ng/mL de VEGF, 10 ng/mL de bFGF, 10 ng/mL de PDGF y 0.5 U/mL de heparina) y se caracterizaron como se reporta previamente (8). CPEs de 5-10 pasajes fueron utilizados en este estudio.

Aislamiento y caracterización de microvesículas (MVs) a partir de CPEs

20 Las MVs fueron obtenidas a partir de sobrenadantes de CPEs como se describe previamente (Deregibus et al., Blood, 2007). En resumen, después de la centrifugación a 2,000 g durante 20 minutos para eliminar los desechos, los sobrenadantes libres de células se centrifugaron a 100,000 g (Beckman Coulter Optima L-90K ultracentrifuga) durante 1 hr a 4 °C, se lavaron en medio libre de suero 199 que contiene ácido N-2- hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico 25mM (HEPES) (Sigma-Aldrich) y se sometieron a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones. En determinados experimentos. Las MVs derivadas de CPE se etiquetaron con el pigmento PKH26 cromóforo alifático fluorescente rojo (Sigma Aldrich). Después de la marcación, las MVs se lavaron recientemente por ultracentrifugación a 100,000 g durante 1 hr a 4 °C., los pellets de MV se vuelven a suspender en medio 199 y el contenido de proteína se cuantificó mediante el método Bradford (BioRad, Hercules, CA, USA). La caracterización de MV se llevó a cabo mediante microarray, análisis FACS, escaneado y microscopía electrónica de transmisión como se reporta previamente (Deregibus et al., Blood, 2007). Las MVs se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Internalización de MVs derivadas de CPE en islotes humanos y CEI

35 Los islotes humanos (500 IEQ) se cultivaron durante 6 hrs en el sistema de cultivo celular Rotary en la presencia de 10 µg/ml de MVs derivadas de CPE etiquetadas con el tinte fluorescente rojo PKH26 (Sigma). La internalización de MV se evaluó por microscopía confocal (Deregibus et al., Blood, 2007). CEI se cultivaron en placas de 24 pozos en la presencia de vehículo solo o 10 µg/ml de MVs derivadas de CPE marcadas. En experimentos seleccionados 10 mg/ml de anticuerpos bloqueados dirigidos a αvβ3-integrina (BioLegend), α4-integrina, α5-integrina (Chemicon Int.), CD29 (Becton Dickinson Biosciences) o L-selectina (Pharmingen) se adicionaron a CEI MV estimulada. La internalización de MV en CEI se evaluó, mediante microscopía confocal y análisis FACS.

Evaluación de viabilidad y respuesta secretora de la insulina

40 La función del islote se evaluó mediante respuesta secretora de la insulina ELISA (ALPCO Windham, NH). En resumen, los islotes incubados, después de la pre-incubación durante 1 hr en medio de glucosa 2.8 mM seguido mediante 2-hr de incubación en medio de glucosa 25 mM. Los índices de estimulación se calcularon como la relación entre secreción de insulina (mU/L/IEQ) en la presencia de medio de glucosa alto y la media de los niveles de secreción de insulina basal utilizando un lector de placa espectrofotométrico a una longitud de onda de 590-nm.

45 La viabilidad del islote se evaluó mediante tinción doble con diacetato de fluoresceína 0.46 µM y yoduro de propidio 14.34 µM (ambos de Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

ELISA Caspasa-3

50 La actividad de la caspasa-3 se evaluó mediante ELISA (Chemicon, Temecula, CA) basándose en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilida (pNA) después de la escisión a partir del sustrato marcado DEVD pNA, que se reconoce por las caspasas. Los lisados de islotes se diluyeron con una solución reguladora de reacción apropiada y se adicionó DEVDpNA a una concentración final de 50M. Las muestras se analizaron en un lector de ELISA automatizado a una longitud de onda de 405 nm. Cada experimento se realizó por triplicado.

Hipertrofia epitelial a partir de islotes recién purificados

5 Los islotes recién purificados (500 IEQ) se sembraron en placas sobre discos de cultivo de tejido y se incubaron con medio normal en la presencia o ausencia de MVs derivadas de CPE. En experimentos seleccionados, se adicionaron dosis terapéuticas de rapamicina (10 ng/ml) a MVs derivadas de CPE. Un medio que contiene factores de crecimiento endotelial se utilizó como control positivo para hipertrofia celular. La hipertrofia epitelial a partir de islotes se estudió bajo un sistema de microscopio Nikon para análisis de células vivas. Los mismos procedimientos experimentales se realizaron sobre cinco preparaciones diferentes de islotes recién purificados.

Migración de CEI

10 CEI se sembraron en placas y se dejaron en reposo durante 12 hrs con RPMI que contiene 1% de FCS y posteriormente se incuban con diferentes estímulos. La migración celular se estudió con un objetivo 10X fase-contraste bajo el sistema Nikon mencionado anteriormente. La velocidad migratoria neta (línea recta de velocidad) se calculó mediante el software MicroImage, basándose en la distancia de línea recta entre los puntos iniciales y finales divididos por el tiempo de observación. Se analizó la migración de al menos 30 células para cada punto experimental.

15 Ensayo de viabilidad de CEI

20 CEI se cultivaron en placas de 24 pozos (Falcon Labware, Oxnard, CA) a una concentración de 5×10^4 células/pozo, sin alimentación durante 12 hrs, sin FCS y luego se incuban con dosis crecientes de MVs derivadas de CPE (1-50 $\mu\text{g/ml}$) en un medio sin rojo de fenol que contiene 250 $\mu\text{g/ml}$ de XTT (Sigma Aldrich). En experimentos seleccionados, se adicionaron dosis terapéuticas de rapamicina (10 ng/ml) a MVs derivadas de CPE. Un medio que contiene factores de crecimiento endotelial sin MVs derivadas de CPE se utilizó como control positivo. Los valores de absorción se determinaron a una longitud de onda de 450 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Detección de la apoptosis CEI

25 CEI se sometieron a ensayo TUNEL (marcación extremo libre por desoxinucleotidiltransferasa (TdT) terminal - dUTP mediado) (ApopTag, Oncor, Gaithersburg, MD) después de estar sin alimentación durante 12 hrs, sin FCS y la posterior incubación, durante 48 hrs en la presencia o ausencia de MVs derivadas de CPE. En experimentos seleccionados, se adicionaron dosis terapéuticas de rapamicina (10 ng/ml) a las MVs derivadas de CPE. Después de la incubación, las células se fijaron en 1% de paraformaldehído, después de la fijación en ácido acético - etanol 2:1 enfriado previamente, se incuban con enzima TdT en una cámara humidificada a 37° C, durante 1 hr y contra teñidos con anticuerpo antidigoxigenina-FITC y con yoduro de propidio (1 $\mu\text{g/ml}$). Las muestras se analizaron bajo un microscopio de luz UV con un medio de montaje apropiado. Las células apoptóticas teñidas verdes se contaron en diferentes campos microscópicos (ampliación x 100).

Ensayo de angiogénesis in vitro

35 La formación In vitro de estructuras similares a capilares se estudio en 500 islotes humanos IEQ o en CEI-GFP (5 x 10^4 células/pozo) se sembraron en Matrigel reducido-factor de crecimiento (Becton Dickinson, Bedford, MA) diluido 1:1 en hielo con DMEM frío (Sigma Aldrich). Las células se observaron bajo un microscopio invertido Nikon, utilizando una lente objetivo 10x/0.25 NA, y los resultados experimentales se registraron después de 6-hr de incubación con diferentes estímulos a 37°C. El análisis de imagen se realizó a intervalos de 1-hr, mediante el sistema de análisis de MicroImagen (Casti Imaging). Los resultados se dan como el número medio de las estructuras similares a capilares/campo (ampliación x 100) \pm SD de tres diferentes experimentos.

Xenoinjertos en ratones SCID

45 La implantación subcutánea (s.c.) de islotes o CEI-GFP en tapones de Matrigel se realizó para evaluar los efectos angiogénicos de MVs derivadas de CPE in vivo. En resumen, el Matrigel se mantuvo a -20.C hasta su uso y se descongelaron a 4° C, durante la noche inmediatamente antes del implante. Los islotes recién purificados (2000 IEQ), o CEI-GFP (10^4 células) se resuspendieron en 250 mL de medio fresco sin FCS y se mezclaron con 500 mL de Matrigel sobre hielo, utilizando puntas de pipeta refrigeradas en la ausencia o en la presencia de 10 mg/ml de MVs derivadas de EPC y se implantaron s.c. en la región de la nuca del cuello de ratones SCID. Después de 2 semanas los ratones se sacrificaron y los tapones de Matrigel se retiraron para la histología y la inmuno-histoquímica como se reporta a continuación. Se examinaron seis animales para cada grupo experimental.

Tecnología de matriz génica

El kit GEArray humano para el estudio de marcadores de angiogénesis (SuperArray Inc., Bethesda, MD) se utilizó para caracterizar los perfiles de expresión génica de CEI incubadas con vehículo solo o 10 mg/ml de MVs derivadas de CPE durante 48 hrs. La hibridación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Estudios de inmunofluorescencia

- 5 Los islotes humanos purificados recientemente o CEI se cultivaron en portaobjetos de cámara bajo diferentes condiciones experimentales, se fijaron con 1% de paraformaldehído, se permeabilizaron con 0.1 % de Triton-X-100 (Sigma) cuando fue necesario y se tiñeron durante 1 hr con un anticuerpo policlonal de insulina anti-humano de conejo o con los siguientes anticuerpos dirigidos a antígenos endoteliales: CD31 anti-humano (PECAM-1), tie-2 anti-humano y VEGF-R2 anti-humano (KDR) (todos de Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), VEGF anti- humano
- 10 monoclonal de ratón (US Biological, Swampscott, MA), α V β 3-integrina anti-humana monoclonal de ratón (Chemicon International, Temecula, CA), factor von Willebrand antihumano policlonal de conejo (vWF) o LDL acetilado conjugado de Alexa flúor (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA). Todas las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Flúor apropiados (Invitrogen), durante 30 minutos. Los implantes Matrigel que contienen islotes humanos se fijaron en formaldehído y se embebieron en parafina antes de la tinción. Todas las
- 15 muestras fueron contra teñidas con 1 mg/mL de yoduro de propidio o con 0.5 mg/mL de Hoechst, se montaron con medio de montaje antifade (Vector Laboratories, Burlingame, CA), y se examinaron por microscopía de fluorescencia. La evaluación de la revascularización intra-islote y la internalización de MV se llevó a cabo mediante microscopía confocal (Leica TCS SP2 Heidelberg, Germany) después de la co-tinción de insulina y por los marcadores endoteliales mencionados anteriormente. Se utilizó el software Microlmage para determinar el número y
- 20 la sección/área total de vasos neoformados dentro de los islotes.

Análisis FACS

- CEI estimuladas o sin estimular se separaron de las placas de cultivo de tejido con EDTA y se tiñeron durante 45 min a 4 °C con anticuerpos conjugados con FITC, PE o MVs derivadas de CPE marcadas con rojo fluorescente. Las células luego se fijaron en 1% de paraformaldehído y se sometieron a análisis FACS (Becton Dickinson, Mountain
- 25 View, CA).

Análisis Western blot

- CEI cultivadas bajo diferentes condiciones experimentales se lisaron a 4 °C, durante 1 hr en una solución reguladora de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, que contiene 1% de Triton X-100, PMSF 1 mM, 10 μ g/ml de leupeptina, y 100 unidades/ml de aprotinina). Las alícuotas de los lisados celulares que contienen 30 μ g de proteína, según se
- 30 determina por el método Bradford, se sometieron a gradiente 4-15% SDS-PAGE bajo condiciones de reducción y se electrotransferieron sobre filtros de membrana de nitrocelulosa. Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados: anticuerpo monoclonal dirigido a Akt (Upstate, Charlottesville, VI, USA), fosfo-Akt y anticuerpo policlonal de conejo contra fosfo-eNOS (Cell Signalling, Beverly, MA, USA), anticuerpo monoclonal de ratón contra actina, anti-Bcl-xL monoclonal de ratón y anticuerpo policlonal de conejo contra eNOS (Santa Cruz).

35 Adhesión de linfocito a monocapas de CEI

- Se aislaron PBMC de voluntarios sanos mediante gradiente de densidad y se etiquetaron durante la noche con 10 μ m de kit Vybrant Cell Tracer (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en RPMI y 10% de FBS. Las células etiquetadas se contaron, se volvieron a suspender a 50 X 10⁶/mL en RPMI sin FCS y se adicionaron a monocapa confluyente de CEI cultivadas sobre placas de seis pozos y se incubaron previamente con vehículo solo o
- 40 citoquinas inflamatorias (10 ng/mL de TNF-alfa y 10 ng/mL de IFN-gamma) en la presencia o en la ausencia de 10 μ g/mL de MVs derivadas de CPE. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado durante 1 hr a 37 °C en condiciones de ligera agitación. Al final de la incubación, las placas se llenaron con medio y se aspiraron tres veces para eliminar las células no unidas. Todas las muestras se fijaron con 1% de paraformaldehído y se observaron por microscopía de fluorescencia. Las células fluorescentes verdes se contaron en 10 diferentes campos a una
- 45 ampliación x 200.

Análisis estadístico

Todos los datos de diferentes procedimientos experimentales se expresan como la media \pm SD. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante test-t de Student o ANOVA con prueba de multicomparación Newmann- Keuls cuando sea apropiado.

Resultados

Caracterización de MVs derivadas de CPE

5 Microscopía de electrones de barrido y análisis FACS mostraron la presencia de MVs esféricas en pellets derivados de ultracentrifugación de sobrenadantes de CPE. La mayoría de MVs derivadas de CPE de tamaño de aproximadamente 1 μ m y expresan varias moléculas normalmente encontradas sobre la superficie de CPE tal como molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), α 4 integrina, CD29 (β 1 integrina) y CD44. Adicionalmente, también encontramos en la superficie de nMV derivadas de CPE, la presencia de CD62L (L-selectina), una proteína esencial para la migración de CPE en tejidos lesionados.

MVs derivadas de CPE indujeron la hipertrofia endotelial a partir de islotes

10 En comparación con la incubación con vehículo solo, 10 μ g/ml de MVs derivadas de CPE indujeron hipertrofia celular a partir de la superficie del islote detectable después de 24 hrs y más evidente después de 96 hrs. La hipertrofia celular a partir de islotes se caracterizó como células endoteliales por inmunotinción específica con marcadores endoteliales típicos tales como KDR (VEGFR- 2), CD31 (PECAM-), Factor von Willebrand, CD 105 y nestina. Adicionalmente, las células de la hipertrofia mostraron la capacidad de internalizar LDL acetilado y de formar estructuras similares a capilares, cuando se sembraron en placas cubiertas con Matrigel.

La rapamicina no abolió la hipertrofia endotelial a partir de islotes inducidos mediante MVs derivadas de CPE

20 Como informamos previamente (7), las dosis terapéuticas de rapamicina (10 ng/ml) abolieron la hipertrofia endotelial inducida por la incubación de islotes con un medio enriquecido con factor de crecimiento endotelial. Por lo contrario, la misma dosis de rapamicina no abolió completamente la hipertrofia endotelial inducida por MVs derivadas de CPE, lo que sugiere la implicación de mecanismos diferentes de la estimulación del factor de crecimiento en este proceso angiogénico.

MVs derivadas de CPE mejoraron la secreción de insulina, conservaron la viabilidad del islote y disminuyeron la actividad de caspasa-3

25 La función del islote, evaluada como respuesta de insulina después del desafío de glucosa alto, fue significativamente superior en la presencia de MVs derivadas de CPE con respecto al vehículo solo, después de 2 y 7 días de cultivo. Además, la tinción doble con diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio evidenció una viabilidad de islote sostenida en la presencia de MVs derivadas de EPC. La inhibición de apoptosis del islote inducida por MVs derivadas de CPE además se confirmó por la significativa disminución de la actividad de la caspasa-3 observada en lisados aislados después de 2 y 7 días de incubación con MVs derivadas de CPE (Fig. 1).

30 MVs derivadas de CPE se internalizan en células beta y endotelio del islote

35 La internalización de MV derivada de CPE en islotes humanos se evaluó después de la tinción de las MVs con el tinte fluorescente rojo PKH26. El análisis de microscopía confocal mostró la presencia de MVs etiquetadas en ambas células beta y endotelio del islote detectadas por co-tinción con insulina, GLUT-2 o con los marcadores endoteliales CD31, KDR y Factor von Willebrand. Además, las MVs derivadas de CPE también se incorporan por diferentes líneas de células endoteliales derivadas de islotes (CEI) después de la incubación durante 30 minutos a 37 °C, como se muestra por micrografías de microscopía confocal y análisis FACS. Para identificar el papel de moléculas selectivas involucradas en la internalización de MV, MVs derivadas de CPE se pre-incubaron durante 15 minutos a 4 °C con diferentes anticuerpos bloqueados. Como se reportó previamente para otras líneas de célula endotelial, también en endotelio del islote la presencia de α 4 integrina, CD29 y además L-selectina es esencial para la internalización de MV en células diana.

MVs derivadas de CPE aumentan la neoangiogénesis de islotes humanos implantados subcutáneamente en tapones de Matrigel en ratones SCID

45 El efecto de MVs derivadas de CPE sobre la neoangiogénesis del islote se evaluó in vivo después de la inyección subcutánea de islotes recién purificados dentro de tapones de Matrigel en la región de la nuca del cuello de ratones SCID, en un modelo de xenoinjerto descrito previamente (7). En la presencia de MVs derivadas de CPE, los implantes mostraron un marcado aumento de densidad vascular dentro de islotes como se detecta por tinción hematoxilina-eosina y por análisis inmunohistoquímico de los marcadores endoteliales KDR y CD31. Los islotes tratados con MVs derivadas de CPE también presentaron una tinción difusa para insulina. Además, la evaluación del número total y área de vasos neoformados dentro de secciones Matrigel confirmó un significativo aumento de angiogénesis en islotes estimulados con MVs derivadas de CPE. La Figura 2 muestra el recuento del número total y el área (expresada como $\mu\text{m}^2/\text{sección}$) de xenoinjertos del islote en ratones SCID en la presencia o en la ausencia de MVs derivadas de CPE.

MVs derivadas de CPE mejoran la angiogénesis de IEG-GFP in vitro e in vivo

5 Evaluamos la modulación de la angiogénesis in vitro inducida por MVs derivadas de CPE en CEI transducidas por un vector lentiviral que expresa GFP (CEI-GFP). Cuando se sembraron en superficies cubiertas con Matrigel, CEI-GFP formó espontáneamente estructuras similares a capilares. La adición de MVs derivadas de CPE aceleró el proceso angiogénico, dando lugar a una formación mejorada dependiente de la dosis de una red capilarmente organizada. La rapamicina (10 ng/ml) no abolió completamente el efecto angiogénico de MVs derivadas de EPC. La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos, i.e. el efecto dependiente de la dosis de MVs derivadas de CPE en angiogénesis in vitro de CEI y el efecto de rapamicina sobre la angiogénesis inducida por MV (EndoGF = medio enriquecido con factores de crecimiento endotelial).

10 A continuación realizamos los xenoinjertos de CEI-GFP mediante inyección en la región de la nuca del cuello de ratones SCID como se menciona anteriormente. Consistentemente con los resultados de angiogénesis in vitro, CEI mostró una marcada mejora de su capacidad para proliferar y formar neovasos en la presencia de MVs derivadas de CPE, como se detecta por análisis histológicos y de Inmunofluorescencia. Adicionalmente, las MVs derivadas de CPE indujeron un incremento significativo en el número total y área de los vasos en las secciones Matrigel
15 examinadas.

MVs derivadas de CPE ejercen un efecto proliferativo, anti-apoptótico y migratorio sobre CEI

20 Evaluamos el efecto de MVs derivadas de CPE en crecimiento del endotelio del islote. CEI estuvieron sin alimentación durante la noche, sin FCS y posteriormente se incubaron con dosis crecientes de MVs derivadas de CPE. Las MVs derivadas de CPE indujeron un significativo incremento dependiente de la dosis de la proliferación de CEI. El efecto proliferativo fue detectable a dosis de 1 µg/mL y alcanzó una estabilidad a la dosis de 50 µg/mL. Además, encontramos que CEI desafiadas con MVs derivadas de CPE mostraron una mejorada resistencia a la apoptosis inducida por la privación del suero. Los efectos anti-apoptóticos ejercidos por MVs derivadas de CPE sobre CEI no fueron abolidos completamente por la co-incubación con 10 ng/ml de rapamicina. La Fig. 4 muestra el efecto proliferativo dependiente de la dosis inducido por las dosis crecientes de MVs derivadas de CPE sobre CEI.
25

30 A continuación, fueron estudiados los efectos de MVs derivadas de CPE en la migración de CEI, un índice de activación de la célula endotelial, mediante microscopía de grabación de lapso de tiempo. Se encontró que la tasa de migración de CEI referencia, correspondiente a la motilidad espontánea de las células en reposo permanece estable durante todo el período de observación, nunca superior a 5-6 m/hr. Las MVs derivadas de CPE indujeron un incremento significativo dependiente de la dosis en la motilidad espontánea de la célula. Consistente con los datos de apoptosis, 10 ng/ml de rapamicina no bloquearon completamente la actividad migratoria de CEI. La Fig.5 muestra el efecto migratorio dependiente de la dosis de MVs derivadas de CPE sobre CEI cultivadas bajo condiciones de privación del suero y el efecto de la rapamicina sobre la motilidad inducida por MV. (EndoGF= medio enriquecido con factores de crecimiento endotelial).

35 La Figura 6, muestra el efecto anti-apoptótico dependiente de la dosis de MVs derivadas de CPE sobre CEI cultivadas bajo condición de privación del suero y el efecto de rapamicina sobre rescate inducido por MV a partir de la apoptosis (EndoGF= medio enriquecido con factores de crecimiento endotelial).

Rutas involucradas en la angiogénesis de CEI inducidas por MVs derivadas de EPC

40 Investigamos, tanto en el gen como en el nivel de proteína en CEI, la modulación de la expresión de moléculas involucradas en la angiogénesis después de la incubación con MVs derivadas de CPE. En CEI estimuladas con MVs derivadas de CPE, el análisis de matriz génica reveló la mejora en la expresión del Factor relacionado con Diferenciación Endotelial- 1 (EDF-1), del receptor tirosina quinasa efrina, de otros diferentes receptores del factor de crecimiento (FGF-R, VEGF-R1, TGFβ-R), de integrinas pro-angiogénicas (α5 y β3) y moléculas matrices (fibronectina-1), de marcadores endoteliales específicos (CD31) y eNOS (Fig. 7). Además, CEI estimuladas con MVs
45 derivadas de CPE mostraron la expresión inhibida del factor anti-angiogénico trombospondin-1. Mediante el análisis de inmunofluorescencia o western blot, confirmamos que las MVs derivadas de CPE modulan en moléculas del endotelio del islote involucradas en angiogénesis y supervivencia celular tal como Akt/P-Akt, Bcl-xL y eNOS.

Adhesión de linfocitos con hIEC

50 Evaluamos el papel de MVs derivadas de CPE en interacción endotelial-linfocito. La adición de 10 µg/ml de MVs derivadas de CPE inhibió significativamente la adhesión espontánea de linfocito con monocapas de CEI en condición de ligera agitación. La inhibición de adhesión de linfocito fue particularmente evidente en la presencia de un microambiente pro-inflamatorio obtenido después de la incubación de monocapas de CEI con 10 ng/mL de TNF-alfa y 10 ng/mL de IFN-gamma.

Discusión

En este estudio, demostramos que las MVs derivadas de CPE promueven la angiogénesis y secreción de insulina in vitro y en un modelo experimental de trasplante de islotes subcutáneos en tapones de Matrigel en ratones SCID. Además, MVs derivadas de CPE mantienen la proliferación in vitro, resistencia a la apoptosis, la migración, la formación de estructuras similares a capilares y la angiogénesis in vivo de líneas endoteliales de células derivadas del islote.

También demostramos que las MVs derivadas de CPE se internalizan tanto en las células beta como en el endotelio del islote, secreción sostenida de insulina y angiogénesis in vitro a través de un efecto paracrino posible. Adicionalmente, las MVs derivadas de CPE inducen un incremento significativo en el número total y área de vasos neoformados en islotes humanos recientemente purificados xenotrasplantados en tapones de Matrigel en la región de la nuca del cuello de ratones SCID. Estos resultados sugieren una activación directa de angiogénesis del endotelio del islote inducida por MVs derivadas de CPE. Además, la internalización de MVs derivadas de CPE en endotelio del islote y las células β puede promover una liberación adicional de factores paracrinos de ambos tipos de células capaces de sostener la supervivencia en aislamiento perjudicial y condiciones de cultivo.

La absorción de MV se media por proteínas de membrana celular específicas tales como $\alpha 4$, CD29 y L-selectina. En la biología de los leucocitos, diferentes receptores de adhesión regulan su interacción con células endoteliales a través de rodamiento y posterior extravasación en sitios inflamatorios. La familia del receptor de la selectina juega un papel clave en los eventos tempranos de adhesión particular. Demostramos recientemente que CPEs expresan L-selectina sobre su superficie y que esta molécula es esencial para la migración de CPE en sitios de lesión vascular. En este estudio también demostramos que las MVs derivadas de CPE internalizan en células diana vía un mecanismo mediado por la selectina gracias al enlace con residuos fucosilados u otros ligandos oligosacáridos por lo general para favorecer la expresión en tejido expuesto a lesión isquemia-reperusión.

También hemos encontrado que las MVs derivadas de CPE mejoran la proliferación in vitro, la resistencia a la apoptosis inducida por la privación del suero, la migración de líneas celulares del endotelio del islote y la hipertrofia endotelial a partir de islotes. De modo muy interesante, todos estos fenómenos biológicos inducidos por las MVs derivadas de CPE no están abolidos completamente mediante la coincubación con dosis terapéuticas de rapamicina, mientras que la misma dosis de este agente farmacológicamente inhibe completamente los efectos tróficos ejercidos sobre CEI mediante factores de crecimiento soluble adicionados al cultivo medio. Estos resultados sugieren una transferencia de ARNm horizontal putativo entre MVs derivadas de CPE y endotelio del islote, que se confirma mediante la significativa inhibición de efectos inducidos por MV sobre CEI después de su pre-incubación con RNasa. Además, el análisis de matriz génica de moléculas involucradas en la angiogénesis, mostró una mayor expresión de ARNm realizada por MVs derivadas de CPE tal como Bcl-xL y eNOS. Las MVs derivadas de EPC desencadenan la activación de rutas de señalización PI3K/Akt y eNOS en CEI.

Las MVs derivadas de CPE también inducen la expresión inducida de efrinas y EDF-1 en CEI. Las efrinas y sus receptores de la tirosina quinasa relativos están profundamente involucrados en la adhesión y motilidad celular durante el montaje de pared-vasos sanguíneos e induce la quimiotaxis de célula endotelial y remodelación de ramificación. Por expresión en fago y microdissección láser, miembros de la familia efrina y sus receptores se han identificado en endotelio del islote (9). EDF-1 es un polipéptido de peso molecular de expresión reducida en células endoteliales humanas que experimenta diferenciación, quietud y senescencia. Nuestros hallazgos, sugieren que las MVs derivadas de CPE activan un programa de des-diferenciación y proliferación en CEI. Además, en comparación con vehículo solo, las CEI estimuladas con MVs derivadas de CPE muestran aumento de los niveles de CD31 (PECAM-1), una molécula conocida para inhibir la apoptosis del endotelio y la expresión reducida de trombospondin-1 (TSP_1). TSP-1 es un inhibidor de angiogénesis que también promueve la apoptosis en células endoteliales activadas. Recientemente hemos encontrado que TSP-1 favorece la expresión en CEI en respuesta a la rapamicina. Adicionalmente, se ha encontrado que los ratones carentes TSP-1 que presentan hiperplasia de islote se caracterizaron por una mayor densidad de vasos sanguíneos (10).

Otro hallazgo resultante del presente estudio es que en la presencia de MVs derivadas de CPE, los linfocitos muestran propiedades de adhesión disminuidas a la monocapa de CEI. Las células endoteliales del islote juegan un papel clave no solo en la revascularización de islotes trasplantados, pero también en los mecanismos relacionados con allo- y autoinmunidad. De hecho, la activación de la respuesta inmune es otra causa importante de la pérdida de injerto del islote. Se ha mostrado previamente que las CEI son antígenos, que presentan células capaces de adquirir insulina secretada por las células beta contribuyendo así a la especificidad de migración de linfocitos T activados en islotes trasplantados y naïve. Encontramos que, en contraste con los exosomas derivados de otros tipos de células, MVs derivadas de CPE no presentan antígenos de MHC sobre su superficie. Este hallazgo, junto con la reducción significativa en linfocitos a monocapas de CEI, sugiere una acción anti-inflamatoria posible de MVs derivadas de EPC, que pueden limitar la activación de allo- y autoinmunidad en los islotes trasplantados.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio demuestran que el quimerismo entre islotes y CPE promueve la función de las células- beta y la angiogénesis sobre los islotes a través de un mecanismo paracrino mediado por la

liberación de MVs activadas de la superficie celular. Las propiedades angiogénicas de MVs derivadas de CPE también se obtuvieron en la presencia de rapamicina a dosis por lo general adoptadas en el trasplante clínico de islotes. La recolección fácil de CPEs a partir de sangre periférica las indica como una potencial opción terapéutica para mejorar la revascularización del islote después del trasplante. Adicionalmente, aunque se necesitan experimentos adicionales para investigar el beneficio metabólico de este enfoque terapéutico en función de las células- beta, el uso de MVs derivadas de EPC puede ofrecer un interruptor limitado temporal sobre el mecanismo de angiogénesis sin los efectos perjudiciales ejercidos por la infusión de las células completas.

Referencias

1. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238.

2. Biancone L, Ricordi C. Pancreatic islet transplantation: An update. *Cell Transplant* 2002; 11: 309-311.

3. Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW. Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes* 1989; 38(Suppl 1): 140-142.

4. Mathews V, Hanson PT, Ford E, Fujita J, Polonsky KS, Graubert TA. Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury. *Diabetes*. 2004 Jan;53(1):91-8.

5. Contreras JL, Smyth CA, Eckstein C, Bilbao G, Thompson JA, Young CJ, Eckhoff DE. Peripheral mobilization of recipient bone marrow-derived endothelial progenitor cells enhances pancreatic islet revascularization and engraftment after intraportal transplantation. *Surgery*. 2003 Aug;134(2):390-8.

6. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2004 Nov;14(8):318-22.

7. Cantaluppi V, Biancone L, Romanazzi GM, Figliolini F, Beltramo S, Ninniri MS, Galimi F, Romagnoli R, Franchello A, Salizzoni M, Perin PC, Ricordi C, Segoloni GP, Camussi G. Antiangiogenic and immunomodulatory effects of rapamycin on islet endothelium: relevance for islet transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Nov;6(11):2601-11.

8. Biancone L, Cantaluppi V, Duo D, Deregibus MC, Torre C, Camussi G. Role of L-selectin in the vascular homing of peripheral blood-derived endothelial progenitor cells. *J Immunol*. 2004 Oct 15;173(8): 5268-74.

9. Yao VJ, Ozawa MG, Trepel M, Arap W, McDonald DM, Pasqualini R. Targeting pancreatic islets with phage display assisted by laser pressure catapult microdissection. *Am J Pathol*. 2005 Feb;166(2): 625-36.

10. Li X, Zhang L, Meshinchi S, Dias-Leme C, Raffin D, Johnson JD, Treutelaar MK, Burant CF. Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006 Nov;55 (11):2965-73.

REIVINDICACIONES

1. Una microvesícula (MV) derivada de una célula progenitora endotelial (CPE) para utilizar como un medicamento, que tiene actividad adyuvante en el tratamiento de la diabetes tipo I y II, mediante el trasplante de islote pancreático.
- 5 2. Las microvesículas (MVs) para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, que están en la forma de un medicamento apropiado para la administración mediante infusión intravenosa.
3. La microvesícula (MV) para utilizar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el medicamento es apropiado para administrar una dosis de microvesícula comprendida entre 0.1 y 10 microgramos/Kg de peso del receptor.
- 10 4. La microvesícula (MV) para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el procedimiento del trasplante del islote pancreático incluye al menos una etapa en la cual el receptor se somete a inmunosupresión basada en la rapamicina antes y/o durante y/o después del trasplante.

Fig. 1

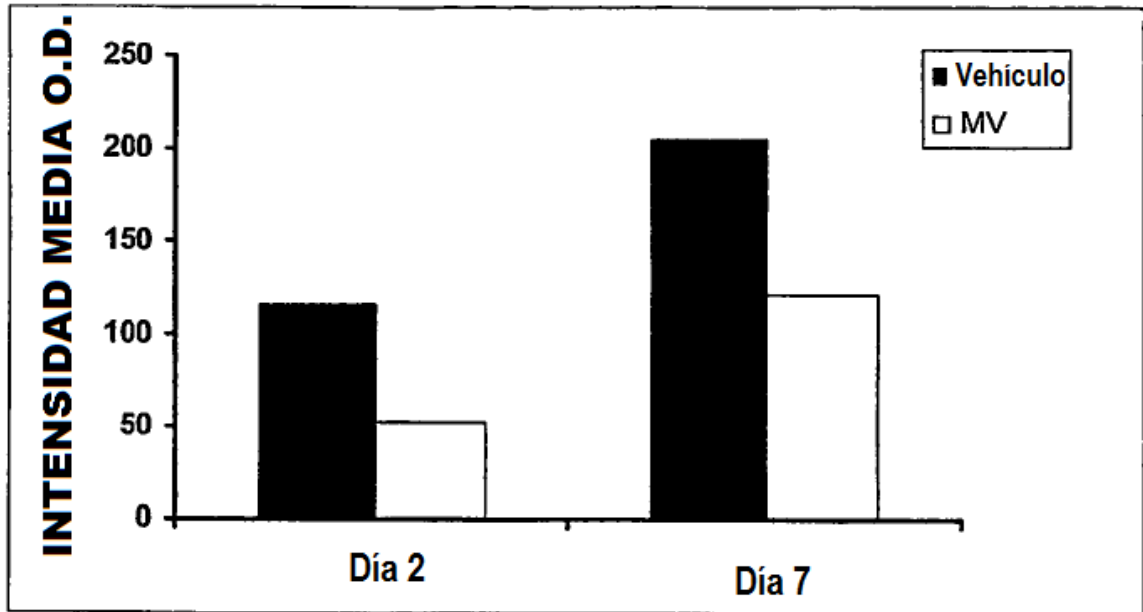


Fig. 2

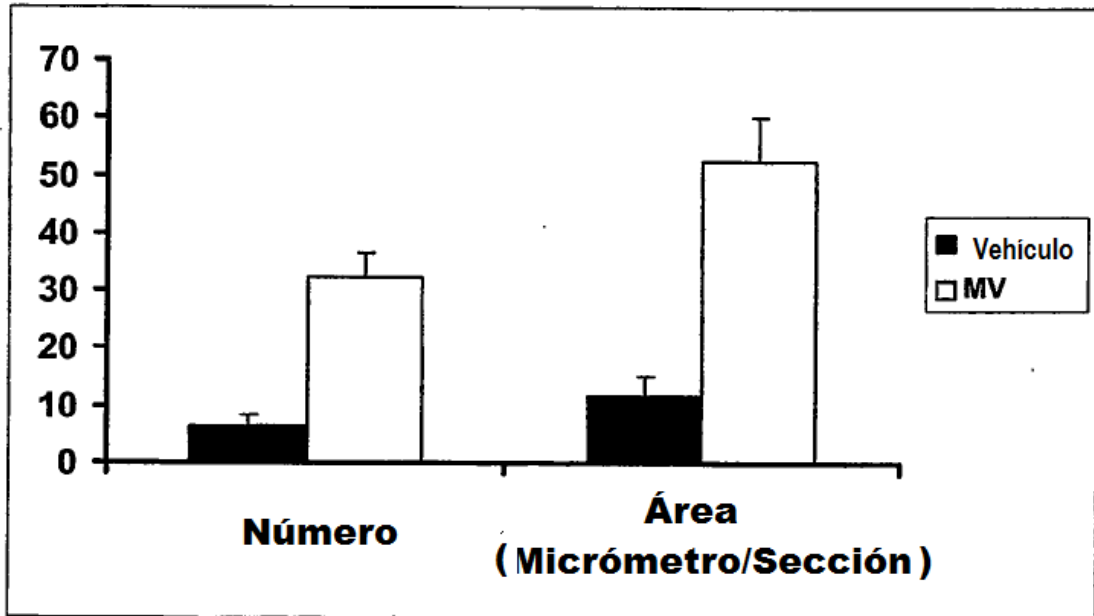


Fig. 3

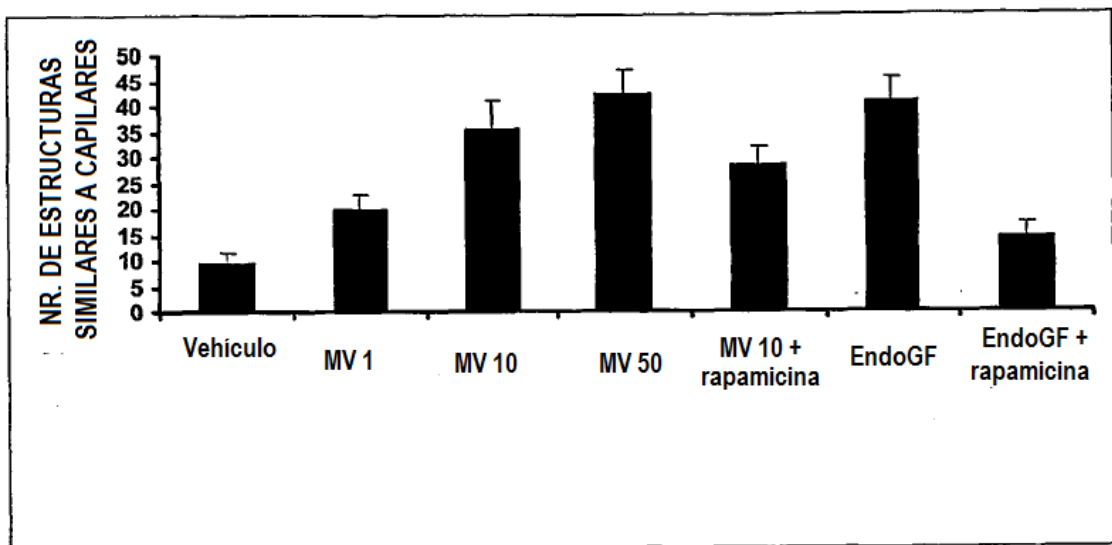


Fig. 4

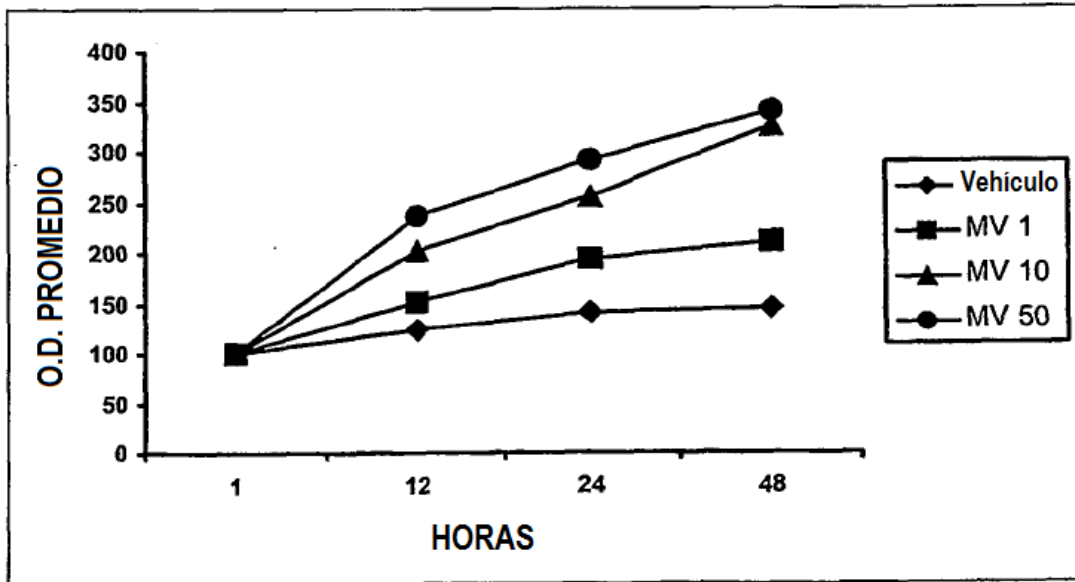


Fig. 5

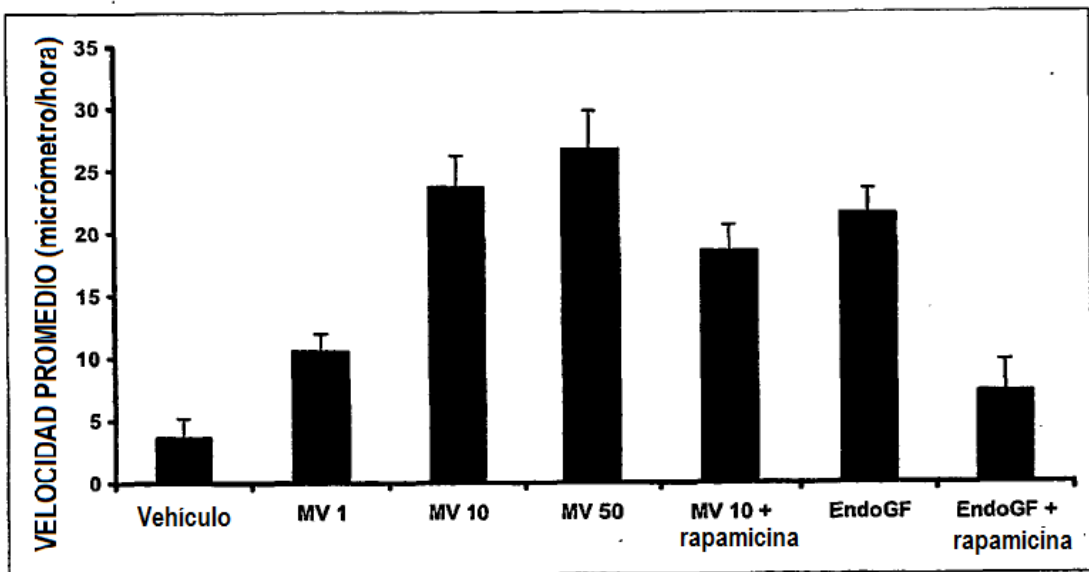


Fig. 6

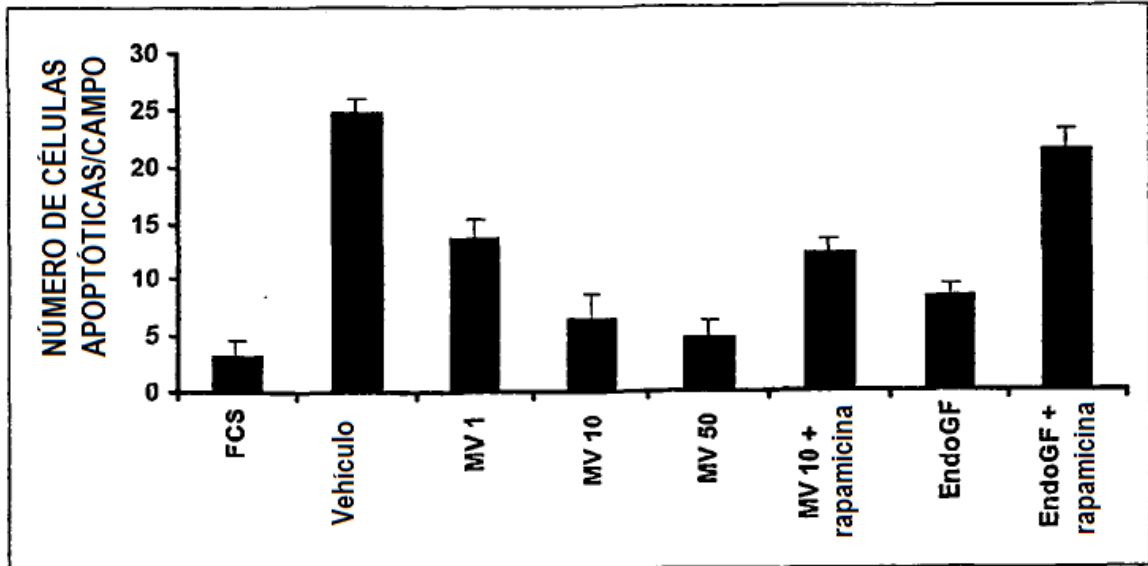


Fig. 7

