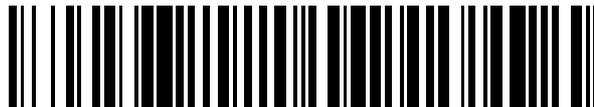


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 433**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2007 E 07736477 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 2049129**

54 Título: **Modulación de receptores de catecolaminas**

30 Prioridad:

22.06.2006 IL 17650706
05.12.2006 IL 17984906

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2013

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**LAPIDOT, TSVEE;
SPIEGEL, ASAF;
RUBINSTEIN, MENACHEM;
KALINKOVICH, ALEXANDER y
SHIVTIEL, SHOHAM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 418 433 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

Modulación de receptores de catecolaminas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a 7-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (7-OH-DPAT) de uso para el tratamiento de una patología hematopoyética mediante terapia de trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas

Antecedentes de la invención

10 El trasplante de médula ósea (BMT) o el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT) es un procedimiento médico existente en el campo de la hematología y la oncología que lleva consigo el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC). El BMT y el HSCT se emplean con la mayor frecuencia para el tratamiento de pacientes aquejados de enfermedades de la sangre o de la médula ósea, o de ciertos tipos de cáncer. El objetivo del trasplante, BMT o HSCT, es dotar al paciente con una población de células pluripotenciales sanas que puedan diferenciarse en células sanguíneas maduras que reemplacen los linajes celulares deficientes o patológicos

15 Las células pluripotenciales hematopoyéticas constituyen una población poco común de células del interior del microambiente de la médula ósea. Las células pluripotenciales hematopoyéticas mantienen activamente la producción continua de todos los linajes de células sanguíneas maduras, que comprenden los componentes principales del sistema inmunitario tales como los linfocitos T y B, durante toda la vida, al tiempo que mantienen una pequeña asociación de células pluripotenciales y células progenitoras sin diferenciar (Mayani, 2003).

20 En el caso de un trasplante de médula ósea (BMT), las HSC son separadas de un hueso largo del donante, típicamente la pelvis, por medio de una aguja larga que alcanza el centro del hueso. Esta técnica se conoce como una recolección de médula ósea y se lleva a cabo bajo anestesia general debido a que, literalmente, se requieren cientos de inserciones de la aguja para obtener suficiente material.

25 Las células pluripotenciales de sangre periférica (PBSC) son actualmente el origen más común de células pluripotenciales para el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas. Las PBSC se recogen desde la sangre mediante un procedimiento conocido como aféresis. El rendimiento de células pluripotenciales periféricas se refuerza con inyecciones subcutáneas diarias de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

30 Otro origen de células pluripotenciales es la sangre procedente de cordón umbilical. La sangre de cordón posee una concentración de HSC mayor que la que se encuentra normalmente en la sangre adulta. Sin embargo, la pequeña cantidad de sangre que puede obtenerse de un cordón umbilical (típicamente, unos 50 ml) hace que este origen sea menos adecuado para el trasplante en adultos. Técnicas más nuevas que utilizan expansión ex-vivo de unidades de sangre de cordón o el uso de 2 unidades de sangre de cordón procedente de donantes diferentes, están siendo exploradas para facilitar los trasplantes de sangre de cordón en adultos.

35 Durante el desarrollo, o en el trasplante experimental y clínico, las células pluripotenciales emigran por medio de la circulación de la sangre y se implantan en la médula ósea (BM), repoblándola con células sanguíneas inmaduras y madurando en células sanguíneas mieloides y linfoides, que a su vez son liberadas a la circulación sanguínea. El proceso de implantación y repoblación de células pluripotenciales hematopoyéticas, que es crucial para la función de las células pluripotenciales y el desarrollo del sistema inmunitario, no está bien comprendido.

40 Con objeto de estudiar los procesos de implantación y repoblación de células pluripotenciales hematopoyéticas, varios grupos han establecido in vivo modelos que incluyen el injerto (la incorporación de tejido o células injertadas en el cuerpo del hospedador) de células pluripotenciales humanas en ratones deficientes de sistema inmunitario tales como ratones irradiados, beige, desprovistos de sistema inmunitario, Xid (inmunodeficiencia ligada a X), SCID y SCID diabéticos, no obesos (NOD/SCID), y en trasplantes de útero en fetos de oveja, que han dado por resultado el injerto con éxito de multilinjajes de ambos tipos de células, células mieloides y células linfoides (McCune et al., 1988; Nolte et al., 1994; Lapidot et al., 1992; Larochelle et al., 1996; Civin et al., 1996).

45 Los presentes inventores han desarrollado un ensayo funcional in vivo de repoblación de ratones SCID con células humanas primitivas (SRCs) basado en su capacidad para repoblar de modo duradero la médula ósea de ratones SCID o NOD/SCID trasplantados por vía intravenosa con niveles elevados de células mieloides y linfoides (Lapidot et al., 1992; Larochelle et al., 1996). Experimentos cinéticos han demostrado que solamente una pequeña fracción de las células trasplantadas se había injertado y que estas células habían repoblado la médula ósea murina mediante proliferación extensa y diferenciación. Además, las células humanas primitivas habían retenido también la capacidad de injertar receptores murinos secundarios (Cashman et al., 1997). El trasplante de poblaciones enriquecidas para expresar el antígeno de superficie de células CD34 y CD38, reveló que el fenotipo de SRC es CD34⁺CD38⁻ (Larochelle et al., 1996). Pueden existir otras células de repoblación, dado que otros estudios realizados sugieren que células CD34⁺ humanas, inmaduras, y células CD34⁺CD38⁺ más diferenciadas, tienen potencial de injerto algo limitado (Zanjani et al., 1998; Conneally et al., 1997)

Se ha encontrado que la implantación de células pluripotenciales humanas y su proliferación y diferenciación subsiguiente en ratones inmunodeficientes trasplantados, dependía de interacciones entre el factor uno derivado estromal de quimioquina (SDF-1), que es expresado por la médula ósea del hospedador, y su receptor CXCR4, que es expresado en las células de alojamiento del donante. La interferencia con interacciones de SDF-1/CXCR4 por tratamiento previo de células CD34⁺ humanas, inmaduras, con anticuerpo anti CXCR4 neutralizante, bloqueaba su implantación y repoblación in vivo, mientras que las células sin tratar podían implantarse al cabo de horas en la médula ósea de ratones receptores [Peled et al., 1999 (a)].

Se ha encontrado que el aumento de la expresión de CXCR4 en la superficie celular de células pluripotenciales, por estimulación de citoquinas, intensificaba la respuesta a SDF-1 de esas células, manifestada por la mejora de la implantación e injerto. Las células CD34⁺ humanas, inmaduras, que no expresan CXCR4 de la superficie celular contienen CXCR4 interior, que puede oscilar in vivo después del trasplante. La prevención de esta regulación en alza de CXCR4 de la superficie celular bloqueaba los bajos niveles de injerto de las células CD34⁺CXCR4⁺ humanas. Así pues, el fenotipo de las células pluripotenciales humanas de repoblación se definió como células CD34⁺CD38⁻/bajo CXCR4⁺ (Kollet et al., 2002)..

El SDF-1 (denominado también CXCL12) es producido por muchos tipos de células que comprenden células estromales y endoteliales de médula ósea, y como se ha indicado, es un quimioatractivo potente de células hematopoyéticas inmaduras y maduras, y regula el tráfico de leucocitos en la homeostasia en estado estacionario. El SDF-1 sirve de factor de supervivencia de células pluripotenciales y progenitoras, y está implicado en el desarrollo de células B inmaduras y en el desarrollo de megacariocitos (McGrath et al., 1999; Nagasawa et al., 1996). El SDF-1 está altamente preservado a través de toda la evolución. Por ejemplo, el SDF-1 humano y del ratón son de reacción cruzada y se diferencian solamente en un aminoácido.

La liberación y movilización de células pluripotenciales desde la médula ósea hacia la circulación se inducen para el trasplante clínico. Se emplean estimulaciones múltiples con citoquinas tales como la G-CSF, para reclutar células pluripotenciales humanas desde la circulación. Se encontró que la interacción de SDF-1/CXCR4 dentro de la médula ósea después de la administración de G-CSF, estaba implicada en el proceso de movilización (Petit et al., 2002).

Se ha encontrado que las enzimas proteolíticas tales como la neutrófilo-elastasa degradaban el SDF-1 en la médula ósea durante la administración de G-CSF. En paralelo, se descubrió que los niveles de expresión de CXCR4 en células hematopoyéticas dentro de la médula ósea, aumentan antes de su movilización. La neutralización con anticuerpo de CXCR4 o SDF-1 reducía la movilización de células pluripotenciales humanas y del ratón, lo que demuestra señalización de SDF-1/CXCR4 en la salida de células (Petit et al., 2002).

Por tanto, la implantación y la liberación/movilización de células pluripotenciales utilizan mecanismos similares, y en ambos procesos las interacciones de SDF-1/CXCR4 desempeñan un papel principal.

El SDF-1 desempeña también un papel importante en la migración de células leucémicas. Mientras que las células normales y leucémicas comparten mecanismos de migración similares, se descubrieron esquemas diferentes de implantación así como de los caminos de señalización del SDF-1 al comparar células Pre-B ALL humanas, malignas (leucemia linfoblástica aguda de precursor de células B) con células CD34⁺ inmaduras normales (Spiegel et al., 2004). En la leucemia mielógena aguda /AML, otra enfermedad maligna, se han encontrado niveles elevados de CXCR4 y SDF-1 intracelulares en todas las células leucémicas, incluyendo células que no expresan CXCR4 superficial. El CXCR4 es esencial para la implantación de estas células en la médula ósea de ratones inmunodeficientes, lo que demuestra la regulación dinámica de CXCR4 en esas células (Tavor et al., 2005).

Se ha encontrado que la expresión de SDF-1 en la superficie celular de células endoteliales del interior de los vasos sanguíneos, era crucial para inducir detención celular bajo flujo de cizalladura, una etapa esencial para una migración transendotelial con éxito, desde la circulación hacia la médula ósea. Además, el SDF-1 activaba las moléculas de adhesión principales tales como CD44, LFA-1, VLA-4 y VLA-5 en la migración de células humanas, pluripotenciales y progenitoras, como parte de proceso de varias etapas de implantación y migración transendotelial (Peled et al., 2000).. Se ha sugerido que el SDF-1 media la adhesión y el anclaje de células pluripotenciales a la matriz extracelular de los nichos biológicos de la médula ósea alterando el citoesqueleto y la expresión de CD44 de la superficie de recolocación (Avigdor et al., 2004)

Los mecanismos que inducen la motilidad y migración celular después de estimulación de SDF-1 y los caminos de transducción de la señal, que son desencadenados por unión del SDF-1 a CXCR4, no son conocidos. Se ha descubierto que la activación de PI3K, pero no de MAPK, se requería para la motilidad de las células CD34⁺ enriquecidas inmaduras. Se encontró que la isoforma atípica PKC zeta era esencial para el proceso de migración. Además, se descubrió que la activación de PKC zeta por SDF-1 era dependiente de PI3K (Petit et al., 2005).

Además del papel que desempeña en la migración y en la adhesión, el SDF-1 está implicado también en la proliferación y en la supervivencia de diversas células que incluyen células CD34⁺ humanas normales y células leucémicas (Lee et al., 1999, y Tavor et al., 2005).

Las catecolaminas derivan del aminoácido tirosina. Las catecolaminas poseen un anillo bencénico con dos grupos hidroxilo, una cadena de etilo intermedia y un grupo amino terminal (Lehninger, Principios de Bioquímica).

Las catecolaminas tales como la epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) y la dopamina pueden considerarse derivadas del pirocatecol ó 1,2-dihidroxibenceno y actúan como sustancias neurotransmisoras (Lehninger, Principios de bioquímica).

5 Los niveles altos de epinefrina en la sangre están asociados con el estrés, que puede ser inducido desde reacciones psicológicas o agentes estresantes medioambientales. La epinefrina ocasiona cambios psicológicos generales tales como aumentos de la frecuencia cardiaca, de la presión sanguínea y de los niveles de glucosa en sangre (Lehninger, Principios de bioquímica).

Algunos fármacos, tales como el tolcapone (un inhibidor de COMT central), elevan los niveles de todas las catecolaminas (Wikipedia).

10 Los receptores adrenérgicos (o adrenoceptores) constituyen una clase de receptores asociados a la proteína G que son dianas de las catecolaminas. Los receptores adrenérgicos se unen específicamente a sus ligandos endógenos, las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, y son activados por ellos (Wikipedia).

Los receptores α -adrenérgicos unen norepinefrina y epinefrina, aun cuando la norepinefrina posee mayor afinidad. La fenilefrina es un agonista selectivo del receptor α (Wikipedia).

15 La dopamina es uno de los tres neurotransmisores principales de las catecolaminas en una diversidad de órganos. Los receptores de dopamina han sido establecidos ampliamente como reguladores clave de funciones cardiovasculares, renales, hormonales, del sistema nervioso central y oculares. En el cerebro, la disfunción del sistema dopaminérgico conduce a la enfermedad de Parkinson y a la esquizofrenia (Lim et al., 2005, Foley et al., 2004, y Goldman et al., 2004). Los subtipos de receptores de dopamina pertenecen a la familia de receptores asociados a la proteína G y comparten la estructura característica de siete dominios transmembranales.

20 Cinco subtipos de receptores de dopamina pueden ser clasificados en dos familias, con referencia a analogías de secuencia y de transducción de señales. Los receptores de dopamina tales como D1 incluyen los receptores de dopamina D1 y D5. Estos receptores se caracterizan por la activación de la adenilil-ciclasa mediada por una proteína Gs, efectuando, por consiguiente, mayores concentraciones del mensajero secundario adenosina-3,5-monofosfato cíclica (cAMP), Los genes de los receptores de dopamina tales como el D1 carecen de intrones. El grupo de receptores tales como el D2 consiste en los receptores de dopamina D2, D3 y D4, que se asocian a proteínas Gi/0 y pueden inhibir la adenilil-ciclasa. En los genes de receptores de dopamina tales como el D2 pueden encontrarse intrones (Sibley et al., 1992).

30 El papel de diferentes receptores 7-transmembranales, neuroquinina-1 y 2, en la hematopoyesis, ha sido indicado recientemente. Este estudio describe que el p53 regula parcialmente el efecto antiproliferativo de uno de los ligandos del receptor NK2, el neurotransmisor neuroquinina-A, en células progenitoras. Este efecto pudo ser invertido por la citoquina GM-CSF (Vishalakumar et al., 2005).

35 Una interacción aguda entre el sistema inmunitario y el sistema neuronal había sido sugerida con anterioridad y que las interacciones neuro-inmunitarias permiten la regulación mutua de los sistemas nervioso e inmunitario. Informes realizados indican que la dopamina es uno de los mediadores importantes de las interacciones neuro-inmunitarias (Basu et al., 200), Ilani et al., 2004) sugirieron un camino por el cual el cerebro afecta y regula las células T inmunoactivadas. Levite et al., (2001) y Besser (2005) han indicado que la dopamina podía activar directamente las células T por medio de sus receptores específicos y han sugerido un posible papel de la dopamina en el tráfico y extravasación de células T mediados por integrina, en el sistema nervioso central y, posiblemente, en la periferia,

40 **Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a los puntos siguientes:

1. Uso de 7-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (7-OH-DPAT) para fabricar un medicamento para tratar una patología hematopoyética por terapia de trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT).
- 45 2. El uso según el punto 1, en donde se usa 7-OH-DPAT en combinación con una citoquina mieloide o un vector de expresión que codifica un receptor de catecolaminas.
3. El uso según el punto 1 ó 2, en donde el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT) es para la repoblación de linajes de células sanguíneas maduras.
- 50 4. El uso según cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde el medicamento es para administración *ex vivo* a las células pluripotenciales antes del trasplante, aumentando con ello la migración, capacidad de injerto y/o proliferación de las células pluripotenciales.
5. El uso según el punto 4, en donde las células pluripotenciales proceden de un donante tratado con G-CSF.
6. El uso según cualquiera de los puntos 2 a 5, en donde la citoquina mieloide es GM-CSF y/o G-CSF.

7. El uso según cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde el medicamento es para administración *in vivo* a un donante sano o a un paciente sometido a terapia de cáncer, aumentando con ello la movilización hacia la sangre de células pluripotenciales que proceden de la médula ósea y otros tejidos y facilitando la recogida de células pluripotenciales desde la sangre para realizar el trasplante.
- 5 8. 7-Hidroxi-2-dipropilaminotetralina (7-OH-DPAT) para uso en el tratamiento de una patología hematopoyética mediante terapia de trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT).
9. 7-OH-DPAT para el uso según el punto 8, en donde se combina 7-OH-DPAT con una citoquina mieloide o un vector de expresión que codifica el receptor de catecolaminas.
- 10 10. 7-OH-DPAT para el uso según el punto 8 ó 9, en donde el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT) es para la repoblación de linajes de células sanguíneas maduras.
11. 7-OH-DPAT para el uso según cualquiera de los puntos 8 a 10, en donde la 7-OH-DPAT es para administración *ex vivo* a las células pluripotenciales antes de realizar el trasplante, aumentando con ello la migración, capacidad de injerto y/o la proliferación de las células pluripotenciales.
- 15 12. 7-OH-DPAT para el uso según cualquiera de los puntos 8 a 11, en donde la citoquina mieloide es GM-CSF y/o G-CSF.
13. 7-OH-DPAT para el uso según cualquiera de los puntos 8 a 10, en donde la 7-OH-DPAT es para administración *in vivo* a un donante sano o a un paciente sometido a terapia de cáncer, aumentando con ello la movilización hacia la sangre de células pluripotenciales que proceden de la médula ósea y otros tejidos, y facilitando la recogida de células pluripotenciales desde la sangre para realizar el trasplante.

20 **Descripción breve de las figuras**

Las Figs. 1A-1C muestran un receptor de dopamina aumentado en células CD34⁺ de muestras de médula ósea de pacientes tratados con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)- Células CD34⁺ procedentes de médula ósea (BM) de pacientes sin tratar o tratados con G-CSF fueron sometidas a tinción para el receptor 3 de dopamina o el receptor 5 de dopamina. Las células sometidas a tinción con anticuerpos secundarios (Abs) sirvieron solo como control. (A) se expone el promedio de la intensidad media de la fluorescencia de al menos 3 experimentos. (B) análisis representativo de citometría de flujo, (C) ratones quiméricos NODS/SCID previamente injertados con células pluripotenciales humanas fueron o bien sin tratar (BM humana normal) o bien tratados con inyecciones subcutáneas de 300 μ/kg/día de G-CSF durante 5 días (BM tratada con G-CSF). Células humanas recuperadas de la BM de los ratones quiméricos fueron inmunomarcadas indirectamente con anticuerpo anti receptor 3 ó 5 de dopamina humana y con anticuerpo monoclonal anti CD34- APC.CD38-PE, según está indicado. Los resultados del análisis de la citometría de flujo se representan como el tanto por ciento del control de la intensidad media de la fluorescencia del receptor de dopamina con respecto a células de BM CS34⁺/CD38^{alto} de ratones sin tratar.

La Fig. 2 muestra que la expresión de receptores de dopamina es mayor en las células CD34⁺/CD38^{bajo} primitivas que en las células CD34⁺/CD38^{alto} más maduras. Células CD34⁺ humanas de sangre periférica movilizada (MPB) fueron sometidas a tinción para los receptores 3 y 5 de dopamina de la superficie celular (paneles superior e inferior) y con anticuerpo anti CD34-APC.CD38-PE. Los histogramas muestran los niveles de expresión de los receptores de dopamina en las poblaciones de células CD34⁺/CD38^{alto} (R1) y CD34⁺/CD38^{bajo} (R2).

La Fig. 3 muestra que el nivel de expresión de receptores de dopamina en células CD34⁺/CD38^{bajo} aumenta por tratamiento con GM-CSF *in vitro*. Después de una incubación de 3 días con medio RPMI (control) o medio RPMI suplementado con factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), células derivadas de MPB, BM humana normal o sangre de cordón umbilical (CB), fueron sometidas a tinción con anti-CD34-APC, CD38-PE específico humano y para el receptor 5 (panel inferior) o 3 (panel superior), de dopamina.

Las Figs. 4A-4D muestran que agonistas de dopamina aumentan el contenido clonogénico de progenitoras y el potencial de injerto de las células CD34⁺. (A) células CD34⁺ de CB (en una concentración de 1 x10³ células/ml) fueron sembradas en medios de cultivo semisólidos suplementados con las citoquinas Eritropoyetina (Epo), factor de células pluripotenciales (SCF) e interleuquina-3 (IL-3). GM-CSF, G-CSF, y los agonistas SKF ó 7-OH-DPAT fueron añadidos según se ha indicado. 14 días después las colonias fueron calificadas basándose en criterios morfogénicos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la frecuencia de colonias en los cultivos semisólidos de células tratadas, comparada con la de células sin tratar (control) (tratadas con GM-CSF pero no con agonista), (B) ratones NOD/SCID irradiados fueron inyectados con 1-3 x 10⁵ células CD34⁺ humanas de MPB. Donde se indica, antes de la inyección, células CD34⁺ fueron incubadas 2-4 días con SKF, 1 μM, 7-OH-DPAT, 100 ng/ml, o el antagonista de dopamina clozapina. Para determinar el injerto de células CD34⁺ humanas, se sacrificaron ratones 5 semanas después del trasplante, se extrajeron células de médula ósea y se marcaron para el marcador CD45 humano. (C) expone los resultados del nivel de injerto de células CD34⁺ de CB inyectadas en ratones NOD/SCID irradiados. Donde está indicado, las células fueron incubadas durante 2-4 días con 7-OH-DPAT, 1 μM, (con o sin GM-CSF) antes de la inyección. *indica p<0,05. (D) muestra el injerto de células humanas de trasplante secundario

en el ratón. Las células humanas para trasplante secundario son extraídas de BM de ratones quiméricos xenotrasplantados. Los ratones quiméricos se producen por trasplante primario de ratones con células humanas de CB tratadas con agonista de dopamina o con células humanas de CD sin tratar. Por tanto, para el trasplante secundario, ratones NOD/SCID irradiados fueron inyectados con cantidades iguales de células CD45⁺ humanas extraídas de BM de ratones quiméricos producidos con células CD34⁺ humanas procedentes de CB tratadas con el agonista de dopamina 7-OH-DPAT o con células CD34⁺ de CB sin tratar. El nivel de injerto después de trasplante secundario se expresa como % de injerto con respecto al control.

La Fig. 5 muestra que los agonistas de dopamina alteran la masa celular de la médula ósea. Se trataron ratones con cinco inyecciones intraperitoneales diarias del agonista de dopamina 7-OH-DPAT (3 mg/kg), el antagonista flupentoxol (Flu, 1,5 mg/kg) o permanecieron sin tratar (control). Los animales fueron sacrificados y se obtuvieron células de BM del control o de ratones tratados. Los resultados indican el número de cuentas de glóbulos blancos (WBC) de 4 huesos (2 fémures + 2 tibias de cada ratón). Se expone la media de varios ratones.

Las Figs. 6A-6D ponen de manifiesto que los agonistas de dopamina aumentan la polarización celular de células CD34⁺ de CB, y que la dopamina posee potencial quimiotáctico. Células CD34⁺ de CB fueron depositadas sobre cubreobjetos recubiertos con ácido hialurónico (HA) o bien sin tratar (control) o bien en presencia de SKF o de 7-OH-DPAT. Después de lavar los cubreobjetos las células adherentes fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas indirectamente con anti-receptor 5 de dopamina humana o con Tritc-faloidina para detectar actina polimerizada. (A) indica una cuantificación del número de células con morfología alargada y altamente polarizada procedentes de 3 experimentos independientes. * indica $p < 0,05$ comparado con el control (B) muestra representaciones representativas que indican agregación masiva de receptores de dopamina en células polarizadas (flechas blancas). (C) expone los resultados de migración en transpocillos de células CD34⁺ de sangre de cordón humano (pretratadas durante la noche con GM-CSF durante 2 días), hacia 10 nM de dopamina colocada en la cámara inferior. (D) Migración espontánea de células mononucleares de médula ósea obtenidas de ratones tratados con G-CSF y el agonista del receptor de dopamina SKF o 7-OH-DPAT o con G-CSF solo (Control). *indica $p < 0,05$.

Las Figs. 7A-7E muestran que las células CD34⁺ humanas expresan receptores adrenérgicos $\beta 2$ y que los receptores aumentan la formación de colonias, la migración y el injerto de células pluripotenciales hematopoyéticas en respuesta a la estimulación con norepinefrina o epinefrina. (A) muestra que células CD34⁺ humanas de sangre de cordón umbilical expresan receptores adrenérgicos $\beta 2$ en la superficie y que células CD34⁺ de sangre periférica movilizada (MPB) expresan niveles más altos de estos receptores. (B) muestra el efecto de la estimulación de células CD34⁺ con 1 ó 10 nM de norepinefrina (panel izquierdo) o 10 nM de epinefrina (panel derecho) sobre la formación de colonias, en células CD34⁺ de sangre de cordón (comparado con células sin tratar, control). (C) migración de células CD34⁺ humanas de CB (pretratadas durante la noche con GM-CSF durante 1-2 días) hacia 1 ó 10 nM de norepinefrina colocados en la cámara inferior del transpocillo (panel izquierdo) o células CD34⁺ humanas de MPB hacia norepinefrina, 10 nM, colocada en la cámara inferior del transpocillo (panel derecho). (D) injerto de ratones NOD/SCID inyectados con células CD34⁺ de sangre de cordón. Se trataron células durante 2 días con GM-CSF con o sin norepinefrina antes de la inyección. El número indica el nivel de injerto. (E) Injerto de ratones NOD/SCID inyectados con células CD34⁺ de sangre de cordón. Las células fueron tratadas durante 2 días con GM-CSF con o sin epinefrina o norepinefrina antes de la inyección.

Descripción detallada de las realizaciones

Se ha descubierto según la presente descripción, que la actividad de receptores de catecolaminas tales como el receptor de dopamina y el receptor adrenérgico- $\beta 2$ de epinefrina y norepinefrina, desempeñan un papel central en el desarrollo, proliferación, migración y capacidad de injerto de células pluripotenciales hematopoyéticas/progenitoras. Por consiguiente un aspecto se refiere al uso de un agonista o un antagonista de un receptor de catecolaminas y/o agentes capaces de inducir la regulación en alza de niveles de expresión del receptor de catecolaminas para la modulación, proliferación desarrollo, migración, y/o capacidad de injerto de células pluripotenciales y/o progenitoras.

Se ha determinado, ampliamente, que los receptores de dopamina son reguladores clave de muchos procesos biológicos que incluyen funciones cardiovasculares, renales, hormonales, del sistema nervioso central y oculares, respuestas celulares inmunitarias, aun cuando su papel en las células pluripotenciales o en la hematopoyesis se desconoce actualmente. Una publicación reciente de Kiel et al., (2005), describe solamente que células pluripotenciales murinas expresan receptores de dopamina, entre muchos otros genes analizados mediante enfoque de disposición génica. Sin embargo, esta publicación no dice nada sobre el papel de los receptores de dopamina en esas células.

Los inventores exponen en la presente memoria que una población de células enriquecidas con células pluripotenciales CD34⁺ humanas expresan los receptores funcionales de dopamina 3 y de dopamina 5 y que un subconjunto de células más primitivas, células CD34⁺/CD38^{l/bajo}, que son más adecuadas para el trasplante (véase más adelante), expresan niveles más elevados de estos receptores en comparación con un subconjunto de células más diferenciadas, células CD34⁺/CD38^{alto}. Además, exponen que la actividad del receptor de dopamina desempeña un papel central en la proliferación y desarrollo de células pluripotenciales dado que las células CD34⁺ estimuladas con agonistas de receptores de dopamina producían aumento de unidades que forman colonias (CFU-

M) en cultivos en agar (un ensayo in vitro empleado comúnmente para la cuantificación de progenitores hematopoyéticos comprometidos, véase más adelante), la actividad del receptor de dopamina desempeña un papel en el injerto de células pluripotenciales ya que las células pluripotenciales expuestas a agonistas de receptor de dopamina se injertan mejor en la médula ósea (BM) de ratones NOD/SCID receptores que las células no expuestas; la actividad del receptor de dopamina desempeña un papel importante en la motilidad de las células pluripotenciales puesto que la exposición de células CD34⁺ de sangre de cordón (CB) a un agonista de un receptor de dopamina induce polarización y dispersión de las células durante la adhesión a ácido hialurónico; y que la actividad del receptor de dopamina desempeña un papel en la homeostasia del número de células de BM en condiciones de estado estacionario, dado que la administración de agonistas de receptor de dopamina, in vivo, conduce a un aumento de la celularidad de la médula ósea, al tiempo que la administración de antagonistas de receptor de dopamina conduce a una disminución de la celularidad de la médula ósea y, por consiguiente, a una disminución de la capacidad clonogénica.

Se ha encontrado en esta memoria que la estimulación de células pluripotenciales hematopoyéticas con un agente capaz de regular en alza la expresión de receptores de dopamina, tales como GM-CSF y G-CSF, en combinación con un agonista de un receptor de dopamina, aumenta el contenido de células progenitoras clonogénicas y el injerto de células pluripotenciales hematopoyéticas. Por tanto, el efecto de la actividad de los receptores de dopamina sobre las células pluripotenciales puede requerir la regulación en alza de la expresión en las células de los receptores de dopamina, y, por consiguiente, puede requerir la estimulación de las células con un agonista de receptores de dopamina en combinación con un agente capaz de regular en alza la expresión en las células de los receptores de dopamina.

Los descubrimientos de los inventores revelan un fenómeno nuevo, no caracterizado, ya que la función de los receptores de dopamina en células pluripotenciales hematopoyéticas y células progenitoras nunca ha sido indicada. Los inventores han expuesto en la presente memoria que las células pluripotenciales hematopoyéticas y las células progenitoras, humanas, expresan receptores de dopamina y responden a la estimulación inducida por agonistas/antagonistas de receptores de dopamina y que estos receptores, tradicionalmente investigados y que se sabe que son expresados en el sistema neuronal, son esenciales para las funciones de las células pluripotenciales que incluyen, pero no se limitan a migración, auto-renovación, injerto y desarrollo.

Los inventores han encontrado que la actividad de receptores adicionales de neurotransmisores del tipo de las catecolaminas tales como los receptores adrenérgicos β_2 , pueden regular la actividad, función y expansión de las células pluripotenciales hematopoyéticas. Por ejemplo, han descubierto que: las células CD34⁺ expresan receptores adrenérgicos β_2 y que las células CD34⁺ de sangre periférica movilizadas expresan niveles superiores del receptor; que la epinefrina y la norepinefrina aumentan la formación de colonias mediante células CD34⁺ de sangre de cordón; que la norepinefrina posee potencial quimioatractivo que media la migración de células CD34⁺ de sangre periférica movilizadas de sangre de cordón; y que la norepinefrina aumenta la capacidad de injerto de células pluripotenciales hematopoyéticas.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran un papel nuevo de los receptores de neurotransmisores del tipo de las catecolaminas, tales como receptores de dopamina y receptores adrenérgicos β_2 , en la regulación, función y expansión de células pluripotenciales/progenitoras, humanas, tales como células pluripotenciales hematopoyéticas/progenitoras. Notablemente, los descubrimientos in vitro e in vivo revelan que los neurotransmisores del tipo de las catecolaminas regulan directamente la proliferación y migración de células progenitoras hematopoyéticas, que son importantes en la terapia de trasplantes.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere al uso de 7-OH-DPAT para preparar un medicamento para tratar una patología hematopoyética mediante terapia de trasplante de células pluripotenciales. Opcionalmente, puede usarse 7-OH-DPAT con un agente capaz de regular en alza la expresión del receptor de catecolaminas en células pluripotenciales. Por consiguiente, se considera también el uso de una terapia de combinación que comprende un agente capaz de regular en alza el receptor de catecolaminas y una 7-OH-DPAT para facilitar el trasplante de células pluripotenciales.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "agonista de receptor" se define como una molécula que aumenta la actividad del receptor, por ejemplo, ayudando en la unión del ligando al receptor y/o interaccionando con un receptor.

Los fármacos agonistas activan los receptores produciendo la respuesta deseada. Algunos agonistas aumentan la proporción de receptores activados.

Los análogos estructurales de moléculas de agonistas poseen, frecuentemente, propiedades de agonistas.

Un fármaco que actúa como un agonista parcial en un tejido, puede actuar como un agonista total en otro.

Como ejemplos de agonistas de receptores de dopamina se incluyen, pero no se limitan a dopamina y análogos de dopamina; por ejemplo SKF81297 y fenoldopam. Otros ejemplos de agonistas de receptores de dopamina incluyen,

pero no se limitan a pramipexol, ropinirol, 7-OH-DPAT, apomorfina, bromocriptina, pergolida, cabergolina, lisuride y fenoldopam (Wishart DS et al., 2006).

5 Los ejemplos de agonistas de receptores alfa-adrenérgicos incluyen levonordefrina, epinefrina y norepinefrina. Los ejemplos de agonistas de receptores beta-adrenérgicos incluyen, sin limitación, isoproterenol, metaproterenol y terbutalina.

Como ejemplos de agentes capaces de regular en alza la expresión de receptores de catecolaminas, se incluyen, pero no se limitan a citoquinas mieloides tales como GM-CSF, G-CSF e IL-3; estrógeno (Lee et al., 1999); y un vector de expresión que codifica dicho receptor de catecolaminas; y un vector de activación génica endógena (EGA) capaz de inducir la expresión del receptor endógeno de catecolaminas.

10 Los inventores exponen en la presente memoria que se consigue el trasplante mejorado de células pluripotenciales (SCT) y/o el trasplante mejorado de células progenitoras, empleando para el trasplante un población de células pluripotenciales o progenitoras mejorada o superior que consiste en células pluripotenciales o progenitoras estimuladas con al menos un agonista de un receptor de catecolaminas y/o con al menos un agente capaz de regular en alza la expresión del receptor de catecolaminas. El trasplante mejorado de células pluripotenciales (SCT)
15 y/o el trasplante mejorado de células progenitoras puede conseguirse también utilizando para el trasplante una población de células que comprende células pluripotenciales o progenitoras y una composición que comprende un agonista de un receptor de catecolaminas, opcionalmente en combinación con un agente capaz de regular en alza la expresión del receptor de catecolaminas.

20 En algunos procedimientos operatorios de trasplante, de la invención, las células pluripotenciales pueden ser estimuladas con 7-OH-DPAT antes de realizar el trasplante.

Las células pluripotenciales trasplantadas pueden emigrar hacia la región del daño en que hayan muerto células, por ejemplo la médula ósea (debido a efectos secundarios de la quimioterapia o de la terapia de radiaciones) y pueden diferenciarse en células del tejido dañado.

25 Las células pluripotenciales son células pluripotenciales de cualquier origen utilizado hoy en día o que haya de ser utilizado en el futuro en la terapia con células pluripotenciales, e incluyen, sin limitación, células pluripotenciales adultas, células pluripotenciales embriónicas, células pluripotenciales de sangre de cordón umbilical, células pluripotenciales hematopoyéticas, células pluripotenciales de sangre periférica, células pluripotenciales mesenquimatosas, células pluripotenciales multipotentes, células pluripotenciales neurales, células estromáticas, células progenitoras, y cualquier otro tipo de células pluripotenciales y precursores de las mismas.

30 La terapia de trasplante de células pluripotenciales es similar al proceso de trasplante de órganos, solo que el tratamiento consiste en el trasplante de células pluripotenciales en el cuerpo en vez de órganos enteros, para reemplazar células disfuncionales por células sanas, eliminando o disminuyendo, por tanto, el rechazo, o eliminando o disminuyendo la necesidad de tratamientos terapéuticos con fármacos inmunosupresores, caros y potencialmente peligrosos. La terapia de trasplante de células pluripotenciales se aplica para encontrar la curación de una amplia
35 variedad de enfermedades, patologías o condiciones humanas. Las células pluripotenciales poseen el potencial de regenerar una diversidad de tejidos, como está indicado por gran número de informes. Pueden utilizarse células pluripotenciales embriónicas humanas en algunos procesos clínicos. Las células pluripotenciales adultas pueden salvar las consideraciones éticas y de seguridad impuestas por las células pluripotenciales embriónicas. La terapia de trasplante de células pluripotenciales permite la regeneración de tejidos en muchas condiciones patológicas (como se describe en <http://ora.ra.cwru.edu/stemcellcenter/research/research.hum>). Por ejemplo, la terapia de trasplante de células pluripotenciales puede emplearse para tratar patologías/daños musculoesqueléticos, cardiovasculares, hematopoyéticos y neurológicos. El trasplante de células pluripotenciales mesenquimatosas (MSC) puede emplearse para la regeneración de huesos y cartílagos, las células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC) para la regeneración del miocardio o la regeneración hematopoyética, las células pluripotenciales neurales
40 (NSC) para la terapia de reemplazo neuronal o glial

Las células pluripotenciales tienen la capacidad de auto-renovarse, de proliferar y de diferenciarse en linajes fenotípicos diferentes. Las células pluripotenciales embriónicas pueden dar lugar a células derivadas de tres capas germinales embriónicas: mesodermo, endodermo y ectodermo. Las células pluripotenciales embriónicas derivan de la masa celular interior del blastocisto en una fase anterior a la que pudiera implantarse en la pared uterina.

50 Las células pluripotenciales adultas son células sin especializar que se encuentran en un tejido especializado. Las células pluripotenciales adultas pueden renovarse por sí mismas y llegar a hacerse especializadas proporcionado la totalidad de los tipos de células especializadas del tejido desde el que fueron originadas. Las células pluripotenciales adultas son capaces de auto-renovación a largo plazo, es decir, pueden hacer copias idénticas de ellas mismas durante períodos de tiempo largos y pueden dar lugar a tipos de células maduras que poseen morfologías
55 características y funciones especializadas. Dado que las células pluripotenciales adultas son escasas, es deseable manipular estas células para aumentar su capacidad de proliferación in vitro, de modo que puedan utilizarse células pluripotenciales adultas como fuente suficiente de tejido para trasplantes. Los inventores han expuesto en la presente memoria que el tratamiento de células pluripotenciales y células progenitoras, hematopoyéticas, adultas,

humanas, aisladas, con agonistas de receptores de dopamina intensifican la formación de colonias y, por consiguiente, pueden emplearse agonistas de receptores de dopamina para aumentar la capacidad de las células pluripotenciales y progenitoras, hematopoyéticas, humanas, adultas, para proliferar o expandirse.

5 Las células pluripotenciales adultas de uso en la presente invención pueden aislarse de la médula ósea, sangre periférica, pulpa dental, médula espinal, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitelios de la piel y sistema digestivo, córnea, retina, hígado y páncreas. Las células pluripotenciales adultas son clonogénicas. El término “clonogénicas” significa que tienen la capacidad de generar una línea de células genéticamente idénticas, que después da lugar a los tipos de células diferenciadas apropiadas. La capacidad de las células pluripotenciales adultas para generar una línea de células genéticamente idénticas, que después da lugar a los tipos de células diferenciadas apropiadas, puede demostrarse in vitro, por ejemplo, utilizando ensayos de CFU-M, o in vivo, por ejemplo, poniendo de manifiesto que las células pluripotenciales candidato pueden repoblar un tejido particular, tal como la médula ósea, como se expone en los ejemplos que figuran más adelante.

15 La médula ósea incluye dos poblaciones de células pluripotenciales, células pluripotenciales hematopoyéticas y células estromáticas (o mesenquimatosas), una población celular mixta que genera hueso, cartilago, grasa, tejido conjuntivo fibroso, y el entramado reticular que soporta la formación de células sanguíneas. Si se desea, las células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCs) y las células estromáticas de la médula ósea, pueden separarse y aislarse usando un grupo de marcadores de superficie específicos. Otro modo de separación y aislamiento de ambas poblaciones de células pluripotenciales es por fraccionamiento basado en las propiedades de adherencia de las células. Por ejemplo, las células estromáticas se adhieren a un sustrato en crecimiento, mientras que las células hematopoyéticas no se adhieren.

25 Se definen las células pluripotenciales hematopoyéticas como células pluripotenciales que pueden mantener la producción continua de todos los linajes de células sanguíneas maduras, manteniendo al mismo tiempo un pequeño grupo de células pluripotenciales y progenitoras sin diferenciar (Mayani, 2003). Tres linajes principales de células sanguíneas incluyen el linaje linfoide, por ejemplo, células B y células T, el linaje mieloide, p.ej. monocitos, granulocitos y megacariocitos, y el linaje eritroide, p.ej. los glóbulos rojos. Ciertas células pluripotenciales hematopoyéticas son capaces de diferenciarse a otros tipos de células, que incluyen células cerebrales, y, por tanto, pueden emplearse para regenerar muchos tejidos diferentes (véase plasticidad más adelante).

30 En una realización de la invención se usa 7-OH-DPAT para mejorar o facilitar la terapia de trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT). Son orígenes de células pluripotenciales hematopoyéticas la médula ósea, el hígado fetal, la sangre periférica, y la sangre procedente de cordón umbilical.

Las células pluripotenciales utilizadas para los procedimientos operatorios de trasplante, de la invención, pueden ser autólogas, singeneicas o alogeneicas. Las células pluripotenciales autólogas o células pluripotenciales procedentes de hermanos de igual HLA o de células pluripotenciales procedentes de donantes no igualados en HLA, pueden utilizarse para el trasplante.

35 En una realización de la invención células CD34+ humanas, procedentes de sangre de cordón, médula ósea o células de MPB (aproximadamente 1×10^3 células/ml a 1×10^5 células/ml) son estimuladas ex-vivo con 7-OH-DPAT y con el agente capaz de regular en alza el receptor de dopamina, durante 2, 3 ó 4 días, y luego trasplantadas.

40 En otra realización de la invención, el agente es GM-CSF (p.ej. a 5 ng/ml, aproximadamente) y/o G-CSF (p.ej. a 100 ng/ml, aproximadamente). En otra realización descrita en la presente memoria, el agonista de receptor de catecolaminas es dopamina (p.ej. a 10 nM, aproximadamente), y/o SKF (p.ej. a 1 μ M, aproximadamente) y/o 7-OH-DAPT (p.ej. a 100 nM ó 1 μ M, aproximadamente) y/o norepinefrina (p.ej. a 1-10 μ M y 1-10 nM, aproximadamente), y/o epinefrina (p.ej. a 1 μ M y 10 nm, aproximadamente). Las concentraciones de los agonistas de receptores de catecolaminas pueden estar en el intervalo de 0,1 nM a 10 μ M, ó 1 nM a 1 μ M, ó 1-10 μ M, 100 nM a 1 μ M ó 1 a 10 nM. Las concentraciones del GM-CSF o G-CSF, pueden estar en el intervalo de 1 ng/ml a 500 ng/ml.

45 Células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC) a largo plazo o HSCs de replicación a largo plazo, son células capaces de auto-renovación. Si las células pluripotenciales hematopoyéticas son HSCs de replicación a largo plazo pueden ser ensayadas, por ejemplo, trasplantando células pluripotenciales hematopoyéticas en un ratón y dejándolas injertar en la médula ósea del ratón, creando un ratón quimérico trasplantado. Entones, células humanas procedentes de médula ósea de un ratón quimérico trasplantado que, a su vez, pueden ser trasplantadas a otro ratón irradiado letalmente (trasplante secundario) y restaurar su sistema hematopoyético durante algunos meses, pueden definirse como células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC) a largo plazo o HSCs de replicación a largo plazo. A las células de médula ósea que pueden regenerar inmediatamente todos los diferentes tipos de células sanguíneas, pero que en circunstancias normales no pueden renovarse por si mismas a largo plazo, se alude como células progenitoras o precursoras a corto plazo.

55 Las características que siguen son algunas de las de las células progenitoras o precursoras: estas células son células relativamente inmaduras que son precursoras de una célula totalmente diferenciada del mismo tipo de tejido;

son capaces de proliferación, pero poseen una capacidad limitada para diferenciarse en más de un tipo de células. Los linajes de células progenitoras que siguen derivan de la célula pluripotencial hematopoyética. (1) el eritroide unidad que forma “reventones” (BFU-E); (2) el macrófago granulocito unidad que forman colonias (CFU-GM); y (3) el megacariocito-CFU (GFU-Mk) también CFU-E, CFU-G, CFU-M. y CFU-GEMM.

- 5 Las células progenitoras o precursoras existentes en tejidos fetales o adultos, son células parcialmente diferenciadas que se dividen y dan lugar a células diferenciadas. Las células progenitoras o precursoras se consideran, habitualmente, como “comisionadas” para diferenciación a lo largo de un camino particular de desarrollo celular. Típicamente, una célula progenitora o precursora es un tipo intermedio de células pluripotenciales antes de la consecución de su estado totalmente diferenciado.
- 10 Las células pluripotenciales existentes en tejidos adultos pueden generar los tipos celulares especializados de otro tipo de tejido en el que normalmente residen. Así pues, en los métodos de trasplante de células pluripotenciales, pueden emplearse células pluripotenciales procedentes de un tejido para generar los tipos de células diferenciadas de otro tejido. El término “plasticidad”, al que se hace referencia también como “diferenciación poco ortodoxa” o “transdiferenciación”, significa que una célula pluripotencial que procede de un tejido adulto puede generar los tipos de células diferenciadas de otro tejido. Los tipos de células diferenciadas que resultan de la plasticidad se indican habitualmente teniendo en cuenta las características morfológicas de las células diferenciadas y exponiendo sus marcadores de superficie característicos. Por ejemplo, se ha indicado que las células pluripotenciales sanguíneas (derivadas del mesodermo) pueden ser capaces de generar tanto músculo esquelético (derivadas también del mesodermo) como neuronas (derivadas del ectodermo), y las células pluripotenciales de médula ósea (derivadas del mesodermo) pueden diferenciarse en otro tejido derivado del mesodermo tal como el músculo esquelético, el músculo cardiaco o el hígado. Por tanto, las células pluripotenciales hematopoyéticas estimuladas con el agonista de receptor de dopamina, opcionalmente en combinación con un agente capaz de regular en alza la expresión de receptores de dopamina en las células, pueden emplearse para generar músculo esquelético, neuronas, músculo cardiaco e hígado.
- 25 Los receptores de catecolaminas pueden tener la función de restaurar un tejido no hematopoyético dañado, tal como un cerebro dañado. Se ha descubierto que la actividad dopaminérgica es regulada en alza después de daño cerebral traumático (Walter et al., 2004). que la aptitud de las células pluripotenciales para dejar la BM y emigrar a sitios de daño tales como el cerebro isquémico (Stumm et al., 2002) requiere una maquinaria emigratoria activa, y Nan et al., (2005) han indicado recientemente que la infusión de células sanguíneas de cordón umbilical humano mejora las deficiencias neurológicas de la rata con daño cerebral hemorrágico. Por consiguiente, los receptores de catecolaminas expresados por células pluripotenciales que emigran, pueden participar en la regulación de la motilidad, proliferación y desarrollo celulares y en la recolocación en sitios de daños del cerebro o del SNC, en respuesta a señales transmitidas por esos sistemas.
- 30

Por tanto, se describe una población celular o un grupo de células, que comprende células pluripotenciales y/o progenitoras estimuladas con una composición que comprende un agonista de un receptor de catecolaminas y, opcionalmente, con un agente capaz de regular en alza la expresión del receptor de catecolaminas en células pluripotenciales o progenitoras, y el uso de dicha población de células para fabricar un medicamento para mejorar o facilitar la terapia de trasplante de células pluripotenciales (SCT) o de células progenitoras, para la regeneración de tejidos, la repoblación de tejidos y/o la terapia de células somáticas. Cuando las células son estimuladas con un agente capaz de regular en alza la expresión de un receptor de catecolaminas y con un agonista de un receptor de catecolaminas, pueden ser estimuladas simultáneamente con el agente y el agonista antes de realizar el trasplante, o pueden ser estimuladas primeramente con el agente y después con el agonista. Dado que se ha puesto de manifiesto en esta memoria que las células pluripotenciales estimuladas in vivo con la citoquina mieloide G-CSF exponen niveles más altos de receptores de catecolaminas, la estimulación de las células con el agente capaz de regular en alza la expresión del receptor de catecolaminas en células pluripotenciales o progenitoras, puede llevarse a cabo in vivo. Este procedimiento operatorio se conoce como movilización de células hematopoyéticas hacia la sangre y se realiza típicamente mediante 5 inyecciones consecutivas de G-CSF (Petit et al., 2002). Alternativamente, como se pone de manifiesto en los ejemplos que figuran más adelante, las células pluripotenciales pueden ser estimuladas ex-vivo con el agente tal como una citoquina mieloide semejante a GM-CSF o G-CSF. Antes de la estimulación, las células pluripotenciales/progenitoras pueden mantenerse en un medio suplementado con FCS inactivado por calor y con una o más citoquinas tales como Epo, SCF, IL-3 y Tpo.

35

40

45

50

Ejemplos de enfermedades, patologías o condiciones que pueden tratarse mediante terapia de células pluripotenciales, figuran descritos en http://www.pregnancy-info.net/StemCell/treated_disease.html e incluyen, pero no se limitan a cánceres tales como la leucemia linfocítica aguda (ALL) la leucemia mielógena aguda (AML), la leucemia mielocítica crónica (CML), el síndrome mielodisplástico (MDS), el liposarcoma, el neuroblastoma, el linfoma no de Hodgkin y el sarcoma de Yolk Sac; patologías de la sangre tales como la trombocitopenia amegacariocítica (AMT), la anemia aplásica, la anemia de Diamond-Blackfan, la citopenia congénita, el síndrome de Evans, la anemia de Fanconi, el síndrome de Kostmann, la anemia de células falciformes y la talasemia; patologías metabólicas heredadas tales como la adrenoleucodistrofia, el síndrome de leucocitos perezosos, la disqueratosis congénita, la linfocitosis eritrofagocítica familiar, la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Gunter, el síndrome de Hunter, el síndrome de Hurler, la lipofuscinosis ceroid neuronal heredada, la enfermedad de Krabbe, la histiocitosis de células de Lanegerhans, la enfermedad de Lesch-Nyhan, la deficiencia de adhesión leucocitaria o

55

60

la osteoporosis; e inmunodeficiencias tales como la deficiencia de adenosina desaminasa (ADA o SCID-ADA), la inmunodeficiencia combinada grave (SCID), el síndrome de Wiskott-Aldrich, la enfermedad linfoproliferativa ligada al X (XLP), la inmunodeficiencia de hiper-IgM (HIM), patologías neurológicas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, ALS, (conocida comúnmente como la enfermedad de Lou Gehrigs), o la distrofia muscular; la esclerosis múltiple; la artritis; las lesiones de la médula espinal; las lesiones cerebrales; la apoplejía; la enfermedad cardíaca; la enfermedad hepática y retinal; las diabetes; y para aliviar los efectos secundarios de la quimioterapia o de la terapia de radiaciones, tales como la mielosupresión y la citopenia de la sangre periférica.

Se describen poblaciones de células que comprenden células pluripotenciales o progenitoras mejoradas o superiores, adecuadas para uso en trasplantes, reemplazo de tejidos, injerto de tejidos, regeneración de tejidos, repoblación de tejidos, y(o) terapia celular, y métodos de preparación de estas poblaciones de células. Se describen, además, poblaciones mejoradas que comprenden células pluripotenciales y/o progenitoras estimuladas ex-vivo con un agonista de un receptor de catecolaminas y, opcionalmente, con un agente capaz de inducir la regulación en alza de la expresión del receptor de catecolaminas en células pluripotenciales o progenitoras.

Un método de preparación de una composición mejorada de células pluripotenciales/progenitoras comprende estimular una población de células que comprende células pluripotenciales o células progenitoras con un agente capaz de regular en alza el receptor de catecolaminas en las células pluripotenciales o células progenitoras de la población, ex-vivo o in vivo, y con una composición que comprende un agonista de un receptor de catecolaminas ex-vivo. Cuando la estimulación de las células con el agente se lleva a cabo in vivo, por ejemplo mediante inyección del agente en un individuo, se recoge una población de células que comprende células pluripotenciales y/o progenitoras desde la sangre del mamífero, y se estimulan ex-vivo con la composición que comprende el agonista del receptor de catecolaminas. En una realización, el método permite obtener una composición celular mejorada para usar en el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT) y comprende estimular una población de células que comprende células pluripotenciales hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas, con G-CSF y/o GM-CSF in vivo y/o ex-vivo y con una composición que comprende un agonista de un receptor de catecolaminas tales como dopamina o/y uno de sus agonistas, epinefrina y/o norepinefrina, ex-vivo.

Una población de células que comprende células pluripotenciales o progenitoras mejoradas o superiores, adecuadas para trasplante, puede ser, por ejemplo, una población de células que comprende células pluripotenciales o progenitoras que ponen de manifiesto, cuando se ensayan en el modelo murino, significativamente mayor capacidad de injerto, por ejemplo, aproximadamente doble capacidad de injerto, comparada con la de una población de células de control; cuando se ensayan en un modelo de trasplante secundario el tanto por ciento de injerto es significativamente mayor que en receptores primarios; y/o cuando se someten al ensayo de formación de colonias manifiestan significativamente más formación de colonias que las células de control.

Las HSCs de replicación a largo plazo son importantes para desarrollar terapias celulares a base de HSC. El conjunto siguiente de marcadores proteínicos de células sanguíneas está asociado con el aumento de la probabilidad de que las células sean del tipo HSC a plazo largo: $CD34^+$, $Thy1^{+/\text{bajo}}$, $CD38^{\text{bajo}/-}$, $C-kit^{\text{bajo}}$, lin^- (negativo para marcadores de linajes).

Se ha descubierto que las células $CD34^+/CD38^{-/\text{bajo}}$ expresan niveles más altos de ambos tipos de receptores de dopamina en comparación con un subconjunto de células más diferenciadas $CD34^+/CD38^{\text{alto}}$. Por tanto, la estimulación de una población de células pluripotenciales con una composición que comprende un agonista de un receptor de catecolaminas afectará más probablemente a las células $CD34^+/CD38^{-/\text{bajo}}$ de la población. Asimismo, pueden obtenerse poblaciones celulares mejoradas o superiores para trasplante que comprenden células pluripotenciales y/o progenitoras, mediante un método que comprende estimular una población de células que comprende células pluripotenciales o progenitoras, con un agente capaz de regular en alza la expresión del receptor de catecolaminas, y aislar o clasificar células que expresan niveles aumentados del receptor de catecolaminas en la superficie, por ejemplo, niveles que son 2-4 veces mayores que los niveles de células control sin tratar.

Se ha encontrado que las células pluripotenciales y/o las células progenitoras tales como células pluripotenciales y progenitoras hematopoyéticas que manifiestan niveles aumentados de receptores de catecolaminas en su superficie, son adecuadas para el trasplante. Por ejemplo, se ha encontrado que la estimulación de células pluripotenciales y progenitoras, hematopoyéticas, con G-CSF y GM-CSF inducía una expresión alta de receptores de dopamina en las células $CD34^+/CD38^{-/\text{bajo}}$. Asimismo, las células $CD34^+$ estimuladas (movilizadas) in vivo con G-CSF expresan niveles mayores de receptores adrenérgicos $\beta 2$. También, la inducción de la actividad de esos receptores por estimulación de células pluripotenciales y progenitoras hematopoyéticas movilizadas con epinefrina y norepinefrina, dio por resultado un aumento de la migración y del potencial de injerto de las células pluripotenciales hematopoyéticas y el aumento de proliferación o formación de colonias por las células pluripotenciales hematopoyéticas.

Por consiguiente, se obtienen poblaciones celulares mejoradas o superiores, para trasplante, que comprenden células pluripotenciales y/o progenitoras, mediante un método que comprende estimular una población de células que comprende células pluripotenciales o progenitoras, con un agente capaz de regular en alza la expresión de receptores de catecolaminas (in vivo o ex-vivo); separar las células que expresan $CD34^+/CD38^{-/\text{bajo}}$; separar las células que expresan nivel alto de receptores de catecolaminas en su superficie, por ejemplo células que expresan

niveles de receptores de catecolaminas que son 2-4 veces mayores que los niveles de receptores de catecolaminas de células control (sin tratar con el agente), y estimular las células con el agonista del receptor de catecolaminas. El agente puede ser GM-CSF o G-CSF y la estimulación puede tener lugar durante 2, 3, 4 ó hasta 5 días, o durante períodos de tiempo más cortos o más largos. Pueden emplearse en el método células pluripotenciales y/o progenitoras movilizadas procedentes de un individuo tratado con GM-CSF o G-CSF. Las células pueden clasificarse o aislarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, marcado de células con marcadores específicos y clasificando las células mediante el clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

La faceta característica de las células pluripotenciales hematopoyéticas auténticas es su aptitud para reconstituir a largo plazo cantidades grandes de todos los linajes de células sanguíneas. Se han dedicado esfuerzos considerables por muchos investigadores en el campo de la terapia de trasplante y en la terapia génica para encontrar condiciones adecuadas para inducir la proliferación y expansión, in vitro, de células pluripotenciales humanas. Uno de los requisitos para lograr la expansión con éxito de células pluripotenciales sería el de promover eficazmente la proliferación de células pluripotenciales auténticas sin pérdida simultánea de la capacidad de reconstitución a largo plazo. Dado que se ha expuesto en esta memoria que la exposición de células pluripotenciales a agonistas de receptores de dopamina, in vitro, daba por resultado un aumento del grado de injerto secundario, puede prepararse una población de células pluripotenciales mejoradas que tienen una cantidad intensificada de células de iniciación de cultivos a largo plazo (LTC-IC), empleando un método que comprende estimular una población de células que comprende células pluripotenciales, con un agonista de un receptor de catecolaminas.

Se describe un método para aumentar la capacidad de proliferación, desarrollo, migración, potencial de injerto y/o la capacidad de repoblación de células pluripotenciales o progenitoras de una población de células. Un método tal comprende proporcionar una población de células que comprende células pluripotenciales o progenitoras y poner en contacto la población de células con un agonista de un receptor de catecolaminas y, opcionalmente, con un agente capaz de regular en alza la expresión del receptor de catecolaminas en las células-

Los inventores han encontrado que una población de células que comprende células pluripotenciales, que habían sido estimuladas con un agonista de un receptor de catecolaminas, ex-vivo, mantenía células de iniciación de cultivos a largo plazo. Estas células son células pluripotenciales hematopoyéticas auténticas, que poseen la aptitud de reconstituir a largo plazo cantidades grandes de linajes de células sanguíneas.

Por consiguiente, se describe, además, un método de preparación de células de iniciación de cultivos a largo plazo para trasplante clínico, que comprende estimular una población de células que comprende células pluripotenciales, con un agonista de un receptor de catecolaminas. Las células que inician cultivos a largo plazo, obtenidas mediante este método, son adecuadas para el trasplante de células pluripotenciales, el reemplazo de tejidos, injerto, repoblación y/o terapia celular. Uno de los métodos de preparación de células que inician cultivos a largo plazo comprende proporcionar una población de células que comprende células pluripotenciales, regular en alza la expresión del receptor de dopamina en la células pluripotenciales, y exponer las células a un agonista de un receptor de dopamina. En una realización, el método de preparación de células que inician cultivos a largo plazo para trasplante clínico, comprende proporcionar una población de células que comprende células pluripotenciales hematopoyéticas, estimular la población de células con GM-CSF y/o G-CSF para inducir la regulación en alza de la expresión del receptor de dopamina en las células pluripotenciales, y poner en contacto la población de células con un agonista de un receptor de catecolaminas.

Se describen métodos de terapia de trasplante de células pluripotenciales (SCT) y/o métodos para intensificar el injerto de células pluripotenciales en la médula ósea y/o la repoblación de la médula ósea. Uno de los métodos para mejorar o facilitar la terapia de trasplante de células pluripotenciales (SCT) comprende administrar/inyectar o trasplantar en un paciente necesitado, una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico de células pluripotenciales estimuladas con una composición que comprende un agonista de un receptor de catecolaminas y, opcionalmente, con un agente capaz de regular en alza la expresión del receptor de catecolaminas en células pluripotenciales o progenitoras. En una realización se obtienen las células de un paciente tratado con una citoquina mieloide (p.ej. GM-CSF o G-CSF) y esas células son estimuladas ex-vivo con un agonista de un receptor de catecolaminas. En otra realización, el método es para mejorar o facilitar el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT) y la reconstitución de al menos un linaje de células sanguíneas. En otra realización más, el método comprende administrar a un paciente necesitado, una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células que comprende células pluripotenciales hematopoyéticas estimuladas con GM-CSF o G-CSF y con un agonista de un receptor de catecolaminas ex-vivo. Un método adicional comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células pluripotenciales que antes de administrar habían sido clasificadas por la expresión intensificada de un receptor de catecolaminas.

En ciertas realizaciones de la invención, las células pluripotenciales proceden de donantes tratados con G-CSF. En otras realizaciones, las células pluripotenciales están enriquecidas en CD34+, enriquecidas en CD34+/CD38-/bajo y/o enriquecidas en receptor de catecolaminas, por ejemplo, por clasificación de las células con un anticuerpo específico para el marcado del receptor. Se describen usos, métodos o composiciones para el trasplante de células pluripotenciales, y, en particular, para el trasplante de células pluripotenciales (HSCT). Se describen, además, usos métodos o composiciones para la regeneración de tejidos y/o terapia de reconstitución, tales como regeneración y/o reconstitución de tejidos hematopoyético, óseo, cartilaginoso, cardíaco y neutral

La estimulación, exposición o puesta en contacto de la población de células que comprende células pluripotenciales o progenitoras, con las sustancias que han sido descritas (p.ej. agonista de receptor, antagonista y/o el agente que induce la regulación en alza del receptor en células pluripotenciales o progenitoras) pueden llevarse a cabo mediante la administración de la sustancia in vivo y/o ex-vivo.

- 5 La manipulación genética in vitro de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCs) abre un campo nuevo para la terapia génica somática. La terapia génica somática se define como la distribución de genes obtenidos por ingeniería genética a células somáticas con objeto de tratar una enfermedad. El objetivo final de la terapia génica es el de reemplazar in situ una secuencia génica defectuosa. Utilizando vectores de que se dispone y HSCs como dianas, la transferencia génica somática da como resultado, típicamente, la expresión ectópica del transgeno. Así pues, las
10 células pluripotenciales o células progenitoras pueden comprender células pluripotenciales o células progenitoras que alojan DNA recombinante que codifica un polipéptido terapéutico y, por tanto, que expresan los polipéptidos terapéuticos, y pueden emplearse en terapias celulares tales como la terapia génica somática.

- Por ejemplo, la fibrosis quística (CF), la patología genética fatal, más frecuente, de la población caucásica, está originada por mutaciones del regulador de la conductancia transmembranal de CF (CFTR) Un informe reciente
15 (Wang et al., 2005) describe que las células pluripotenciales adultas tales como las células pluripotenciales mesenquimatosas o estromáticas medulares (MSCs) poseen la capacidad de diferenciación en el epitelio de las vías respiratorias y que las MSCs procedentes de pacientes aquejados de fibrosis quística (CF) son susceptibles a la corrección génica del CFTR.

- La liberación y movilización de células pluripotenciales desde la médula ósea y otros sitios hacia la circulación se induce en pacientes cosechando células pluripotenciales desde la sangre para realizar un trasplante clínico. Actualmente, el método empleado para reclutar y recoger células pluripotenciales humanas desde la circulación para trasplante, para tratar enfermedades tales como el linfoma, lleva consigo la estimulación múltiple con citoquinas mieloides tales como G-CSF y GM-CSF. Sin embargo, algunos individuos fallan en movilizar cantidades adecuadas de células pluripotenciales y, por consiguiente, necesitan ser operados para cosechar células pluripotenciales por
20 medio de aspirados de médula ósea. Los inventores han puesto de manifiesto en esta memoria que los agonistas de receptores de catecolaminas aumentaban la motilidad de las células pluripotenciales, y que las catecolaminas se comportan como agentes quimioattractivos. Por tanto, inyectando agonistas de catecolaminas a la circulación puede aumentarse la quimiotaxis de las células pluripotenciales procedentes de órganos internos (p.ej. médula ósea y bazo) hacia la circulación. Por consiguiente, se describe el uso de agonistas de receptores de catecolaminas para
25 fabricar un medicamento para facilitar la movilización de células pluripotenciales hacia la circulación de un paciente para realizar un trasplante celular autólogo, o hacia la circulación de un sujeto sano para realizar un trasplante alogénico.

- En ciertos casos puede desearse hacer disminuir el crecimiento, desarrollo, migración, potencial de injerto o repoblación de poblaciones de células pluripotenciales o progenitoras, por ejemplo, en enfermedades, trastornos o condiciones en las que la patología o el curso de una enfermedad, trastorno o condición implica poblaciones de células pluripotenciales o progenitoras que expresan características anormales tales como un crecimiento incontrolado. Por ejemplo, la leucemia mielógena aguda (AML) es un tipo de cáncer caracterizado por la abundancia de leucocitos inmaduros, que resultan de una hematopoyesis alterada que conduce finalmente a una
35 disminución de los leucocitos existentes en la médula ósea y en la sangre periférica. Tal disminución del crecimiento, desarrollo, migración, potencial de injerto o repoblación de poblaciones de células pluripotenciales o progenitoras, puede conseguirse empleando un antagonista de receptores de catecolaminas.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "antagonista de receptores" se define como una molécula que hace disminuir la actividad del receptor, por ejemplo, interrumpiendo o impidiendo la unión del ligando al receptor, por interacción con un receptor.

- 45 Los antagonistas evitan la activación de los receptores. El evitar la activación tiene muchos efectos. Los fármacos antagonistas aumentan la función celular si bloquean la acción de una sustancia que, normalmente, hace disminuir la función celular. Los fármacos antagonistas hacen disminuir la función celular si bloquean la acción de una sustancia que, normalmente, aumenta la función celular.

- Los antagonistas de receptores pueden clasificarse como reversibles o irreversibles. Los antagonistas reversibles se disocian fácilmente de su receptor; los antagonistas irreversibles forman un enlace químico estable, permanente o casi permanente, con sus receptores (p.ej. en alquilación). Los antagonistas pseudoirreversibles se disocian lentamente de sus receptores.

- En antagonismo competitivo, la unión del antagonista al receptor evita la unión del agonista al receptor. En el antagonismo no competitivo, el agonista y el antagonista pueden unirse al mismo tiempo, pero la unión del antagonista reduce o evita la acción del agonista. En el antagonismo competitivo reversible, el agonista y el antagonista forman uniones de corta duración con el receptor, y se alcanza un estado estacionario entre agonista, antagonista y receptor. Tal antagonismo puede superarse aumentando la concentración del agonista.

Los análogos estructurales de moléculas de agonistas poseen, frecuentemente, propiedades de antagonistas; tales fármacos se denominan agonistas parciales (eficacia baja), o agonista-antagonistas.

5 Como ejemplos de antagonistas de receptores de dopamina se incluyen, pero no se limitan a clozapina, flupentixol, pimozida, remoxiprida, lupentixol, domperidona, clorpromazina, haloperidol, ziprasidona, loxapina, tioridazina, metoclopramida, clorprotixeno y droperidol (Wishart DS et al., 2006).

Los ejemplos de antagonistas de receptores adrenérgicos incluyen, sin limitación, fentolamina, hidrocloreuro de fentolamina, mesilato, tolazolina, yohimbina, rauwolscina, doxazosina, prazosina, tetrazosina y trimazosina, y beta-bloqueantes tales como labetalol, atenolol, metoprolol, betaxolol, bosoprolol, nadolol, pindolol, maprotilina y bretilio.

10 También se describen composiciones farmacéuticas que incluyen células o moléculas o agentes descritos en la presente memoria y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender células pluripotenciales y/o progenitoras y/o un agonista de un receptor de catecolaminas y/o un agente capaz de inducir el receptor y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende un agonista de un receptor de catecolaminas, un agente capaz de inducir regulación en alza de un receptor de catecolaminas en células pluripotenciales o progenitoras, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización más, la composición farmacéutica comprende un agonista de un receptor de catecolaminas, G-CSF y/o GM-CSF, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Se describe, además, una composición farmacéutica que comprende una población de células pluripotenciales y/o células progenitoras estimulada con un agonista de un receptor de catecolaminas y, opcionalmente, con un agente capaz de inducir regulación en alza de la expresión del receptor de catecolaminas en células pluripotenciales o progenitoras, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe una composición farmacéutica que comprende células pluripotenciales hematopoyéticas CD34+ estimuladas con un agonista de un receptor de catecolaminas y con G-CSF o GM-CSF, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 La composición farmacéutica descrita incluye una cantidad suficiente de células, agonista/antagonista y/o agente para conseguir su finalidad pretendida. Además, la composición farmacéutica puede contener excipientes farmacéuticamente aceptables, que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesado de los compuestos activos en preparados que pueden ser empleados farmacéuticamente y que pueden estabilizar tales preparados para administrar al paciente necesitado de ello, como es bien conocido por los expertos en la técnica.

30 La 7-OH-DPAT según la invención podría administrarse a un paciente necesitado de ello en una diversidad de vías. Las vías de administración incluyen intrahepática, intradérmica, transdérmica (p.ej. en formulaciones de cesión lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Además, la sustancia puede administrarse junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales tensioactivos, excipientes, diluyentes y vehículos, farmacéuticamente aceptables.

35 Se ha indicado en esta memoria que la inyección i.p. de un agonista de un receptor de dopamina es adecuada para aumentar la masa celular de la médula ósea.

40 La dosificación administrada a un individuo, en forma de dosis única o de dosis múltiples, puede variar dependiendo de una diversidad de factores, que incluyen las propiedades farmacocinéticas de la sustancia, la vía de administración, el estado y características del paciente (sexo, edad, peso, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosificación establecidos, están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

45 La definición de "farmacéuticamente aceptable" se entiende que incluye cualquier excipiente que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el hospedador al que se administra.. Por ejemplo, para administración parenteral, la sustancia según la invención puede formularse en forma de dosis unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, seroalbúmina y solución de Ringer.

50 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es tal que cuando se administra, dichas sustancias inducen un efecto beneficioso en el trasplante de células pluripotenciales, regeneración de tejidos, repoblación de tejidos, terapia celular, y/o terapia génica somática, y/o en el tratamiento de lesiones de tejidos. La dosificación administrada a un individuo, en forma de dosis única o de dosis múltiples, puede variar dependiendo de una diversidad de factores que incluyen la vía de administración, el estado y características del paciente (sexo, edad, peso, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

55 Los compuestos a los que concierne la invención pueden prepararse para administrar por cualquier vía consistente con sus propiedades farmacocinéticas.

El ingrediente activo puede administrarse también por vía parenteral en el seno de un medio estéril. Dependiendo del vehículo y de la concentración utilizada, el fármaco puede suspenderse o disolverse en el vehículo.

El término “dosificación” se refiere a la determinación y regulación de la frecuencia y número de dosis.

- 5 La referencia a etapas de métodos que se conocen, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no representa en modo alguno la admisión de que un aspecto, descripción o realización de la presente invención esté descrito, ilustrado o sugerido en la técnica relevante.

Habiendo ahora descrito la invención, ésta será comprendida más fácilmente por referencia a los ejemplos que siguen que se proporcionan a modo de ilustración y que no han de ser considerados como limitaciones de la presente invención.

10 Ejemplos

Se evaluó la expresión de receptores de catecolaminas en células pluripotenciales hematopoyéticas y su papel en el desarrollo y función de estas células.

Materiales y Métodos

- 15 (i) Células humanas y reactivos. Se obtuvieron células mononucleares de sangre de cordón humano (CB), sangre periférica movilizada con G-CSF (MPBL) adulta y BM procedentes de donantes normales o tratados con G-CSF, después de consentimiento informado de acuerdo con los procedimientos aprobados por el comité de ética humana del Instituto Weizmann de Ciencia. La proteína de la superficie celular CD34⁺ se utiliza frecuentemente como marcador para la selección positiva de células pluripotenciales/progenitoras hematopoyéticas humanas en la investigación y en el trasplante. El enriquecimiento de células CD34⁺ se realizó empleando separación con bolas magnéticas según se ha descrito anteriormente (Spiegel A et al., Blood 2004;2900-7). Se cultivaron células en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10%, inactivado por calor, antibióticos y glutamina.

- 20 Se obtuvieron células de CB humano de alumbramientos a término después de consentimiento informado. Se diluyeron las muestras de sangre 1:1 en PBS. Se recogieron MNCs de baja densidad después de separación estándar en Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y se lavaron con PBS. Se llevó a cabo el enriquecimiento de células CD34⁺ humanas con el kit de aislamiento de células MACS y el clasificador celular magnético autoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) según las indicaciones del fabricante. Se obtuvieron células de sangre periférica movilizada, plasma y BM, sobrantes, después de consentimiento informado, de donantes sanos que habían sido sometidos a movilización para trasplante alogénico los días 0, 5 y 6 después de inyecciones diarias de G-CSF (10 µg/kg) (Filgrastim, Roche, Suiza).

- 30 También se obtuvieron muestras de células de médula ósea (BM) y de plasma de donantes sanos. Veinticuatro horas después de una o cinco inyecciones de G-CSF, se recogió BM por aspiración después de consentimiento informado. Las muestras humanas fueron utilizadas según los procedimientos operatorios aprobados por el comité de experimentación humana y ética del Instituto Weizmann.

- 35 En varios ensayos se emplearon los agonistas (+)-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-(1H)-3-benzacepina-7,8-diol, hidrocloreto (SKF-38393) descrito por Undie y Friedman (1992) como selectivo para receptores D1, y 7-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (7-OH-DPAT)(H8653) descrito por Levesque et al. (1992) y Damsma et al. (1993) como inductor de receptores D3; y el antagonista 2-[4-[3-[2-(trifluorometil)tiioxanten-9-ilideno]propil]piperazin-1-il]etanol (Flupentixol)(Sigma). El flupentixol es un antagonista potente de los receptores D1 y D2 de dopamina, ambos, de uso en la esquizofrenia y en la depresión. La clozapina es un antagonista del receptor de dopamina de tipo 2 para el tratamiento de pacientes esquizofrénicos gravemente enfermos, que fallan en responder adecuadamente al tratamiento de la esquizofrenia con fármacos estándar. Todos los agentes fueron empleados en las concentraciones indicadas,

- 40 (ii) Ratones. Ratones NOD/LtSz, PrKdc^{scid}/PrKdc^{scid} (NOD/SCID) se crían y se mantienen en condiciones definidas de flora en el Instituto Weizmann, en jaulas micro-aislantes estériles. Todos los experimentos habían sido aprobados por el comité para el cuidado de los animales, de Instituto Weizmann. Ratones de ocho – diez semanas de edad fueron irradiados subletalmente (375 cGy, procedente de una fuente de Co60) y trasplantados con células humanas según se indica (2x10⁵ células/ratón) 24 horas después de la irradiación.

(iii) Trasplante de células. Se inyectaron células en la vena caudal de los ratones NOD/SCID en el seno de 0,5 ml de medio RPMI suplementado con FCS al 10%.

- 50 (iv) Evaluación del injerto de células. Los ratones receptores fueron sometidos a irradiación con una dosis subletal (350 cGy) procedente de una fuente de cesio 24 horas de inyectar las células. Células CD34⁺ de MPB o de CB (2,3 x 10³/ratón) se trataron con SKF ó 7-OH-DPAT durante 2-4 días, y se inyectaron por vía intravenosa en ratones NOD/SCID. Los ratones fueron sacrificados 5-6 semanas después del trasplante de células humanas para evaluar el asentamiento del injerto de células humanas. Se recogieron células de médula ósea (huesos de fémur, tibia y pelvis, tomadas con una jeringuilla), bazo y sangre periférica y se volvieron a suspender en suspensiones celulares

individuales. Se contaron los leucocitos y en algunos experimentos se aislaron MNCs de las muestras por separación estándar en Ficol.Hypaque (Pharmacia Biotech).

El injerto de células humanas se analizó por citometría de flujo (FACSCalibur, BD). Las células se sometieron a tinción triple con los anticuerpos de CD45-FITC, CD38-PE y CD34-APC (Becton Dickinson). Se empleó plasma humano e IgG de ratón para bloquear los receptores Fc. Se separaron los leucocitos humanos según su expresión del marcador pan-leucocítico CD45 y entre esta población se determinó el porcentaje de células primitivas CD34⁺/CD38⁻bajo.

(v) Movilización. La movilización en ratones BALB/c de 2 a 4 meses de edad (Harlan, Instituto Weizmann) se llevó a cabo del modo siguiente: Los ratones recibieron una inyección subcutánea diaria de G-CSF (Filgrastim, 300 g/kg en el seno de 250 l de NaCl al 0,9%, suero fetal bovino (FCS) al 5%, pH 4,55) durante 4 ó 5 días consecutivos y fueron sacrificados 6 horas después de la última inyección el día último. Se recogió en tubos heparinizados sangre periférica de ratones asfixiados con hielo seco, obtenida por aspiración cardiaca. Se determinó el número de leucocitos (WBC) existente en la sangre periférica, y se sembró 20 µl de sangre para realizar el ensayo de colonias progenitoras como se describe más adelante. Las colonias fueron sometidas a recuento 8 días después de la siembra o más tarde, si se indica.

La movilización en ratones NOD/SCID injertados con células humanas se llevó a cabo del modo siguiente: los ratones recibieron una inyección subcutánea diaria de G-CSF (Filgrastim, 300 mg/kg en el seno de 250 ml de NaCl al 0,9%, suero fetal bovino (FCS) al 5%, pH 4,55) durante 5 días consecutivos y fueron sacrificados 4 horas después de la última inyección. Se recogió en tubos heparinizados mediante aspiración cardiaca, sangre periférica procedente de ratones asfixiados con hielo seco. Se determinó el número de leucocitos existentes en la sangre periférica.

(vi) Análisis de citometría de flujo. Se examinaron los fenotipos de células humanas y células murinas por inmunotinción, seguida de análisis por citometría de flujo en FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA) con el soporte lógico CellQuest. Se prepararon suspensiones celulares individuales en el seno de PBS que contenía azida de sodio al 0,01% y FCS al 1%. Se utilizó plasma humano e IgG de ratón para bloquear los receptores Fc, humano y murino. Se usaron como control anticuerpos de igual fenotipo para excluir las células falsamente positivas. La tinción se llevó a cabo a 4°C durante 39 minutos. Se examinó el injerto de células humanas por tinción con anticuerpo de ratón anti-CD45-Fitc, D38-PE y CD34-APC humanos (Becton Dickinson). Se separaron los leucocitos humanos según su expresión del marcador pan-leucocítico CD45, y entre esta población se determinó el porcentaje de células primitivas CD34⁺/CD38⁻bajo. En varios experimentos se ensayó la expresión del receptor de dopamina en células CD34⁺/CD38⁻bajo, sometidas a tinción triple con anticuerpo de ratón anti-CD38-PE, CD34-APC humanos, y anticuerpo de conejo anti-receptor 3 ó 5 de dopamina, humano (Calbiochem, Nottingham, GB) seguido de anticuerpos secundarios de cabra anti-alexa 488 del conejo, (Molecular Probes, Eugene, OR) Después de la tinción las células fueron lavadas con solución tampón de FACS y analizadas mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACSCalibur y soporte lógico CellQuest, Becton Dickinson).

(vii) Ensayo de formación de colonias (CFU) de células progenitoras. Con objeto de detectar los niveles de células progenitoras humanas, se realizaron cultivos semisólidos según se ha descrito con anterioridad (Peled et al., 1999). Brevemente, células CD34⁺ (1x10³ células/ml) se sembraron en placas, en metilcelulosa (Sigma) al 0,9%, FCS al 30%, 2ME 5x10⁻⁵M, SCF, 50 ng/ml. IL-3, 5 ng/ml, GM-CSF (R y D), 5 ng/ml, y eritropoyetina (Orto Bio Tech, Don Mills, Canadá), 2 u/ml, junto con los agonistas/antagonista de dopamina. En algunos experimentos las células fueron incubadas previamente durante 4 días con los agonistas/antagonista antes de sembrar en el cultivo semisólido. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5% y calificados 14 días después por las colonias mieloides o eritroides siguiendo criterios morfológicos. En experimentos en los que se determinó el nivel de injerto, in vivo, por células humanas primitivas, el medio semisólido contenía plasma humano al 15% y FCS al 15%.

(viii) Ensayos de quimiotaxis. Se realizaron experimentos de quimiotaxis usando trans-pocillos (6,5 mm de diámetro, poro de 5 µm, Corning Inc., Corning, N.Y.) según se ha descrito con anterioridad (1). Células CD34⁺ de CB (típicamente, 50.000-100.000 células en 100 ul) con o sin tratamiento con GM-CSF (5 ng/ml) durante la noche, se colocaron en la cámara superior, y medio suplementado con ácido ascórbico (Sigma) y con o sin dopamina (10 nM; Sigma), se colocó en la cámara del fondo. Se contaron las células que habían emigrado empleando el FACSCalibur (Becton Dickinson)

(ix) Tinción e histoquímica. Células CD34⁺ de CB enriquecidas (1x10⁵ a 2x10⁵ células por pocillo) se depositaron sobre cubreobjetos revestidos con HA durante 2 horas a 37°C, o bien sin tratar o tratadas con SKF ó 7-OH-DPAT. Se procesaron muestras mediante observación microscópica según se ha descrito (Goichberg et al., 2001). Brevemente, las células adherentes fueron fijadas con paraformaldehído al 3% (Merck, Darmstadt, Alemania) y, si se indicó, fueron permeabilizadas con Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,5%. Se inmunomarcaron indirectamente muestras a temperatura ambiente en una cámara humidificada utilizando anticuerpo policlonal de conejo anti-Dopamina D5 humana (Calbiochem, Nottingham, Gran Bretaña) (MCAP89; Serotec). Los anticuerpos secundarios que se emplearon fueron anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con alexa 488 (Molecular Probes, Eugene OR). Faloidina – TRITC utilizada para detectar actina polimerizada, se adquirió de Sigma-Aldrich. Después de marcar, las

células fueron montadas en Elvanol (Mowiol 4-88, Hoechst, Frankfurt, Alemania). Se adquirieron imágenes de inmunofluorescencia fueron empleando una cámara CCD de calidad científica y se procesaron mediante el sistema Delta Vision usando el soporte lógico Resolve3D (Applied Precision, Issaquah, WA).

5 (x) Análisis estadístico. Se determinaron los niveles de significación de los resultados obtenidos mediante análisis emparejados del ensayo de la t de Student de doble cola.

Ejemplo 1: Células pluripotenciales hematopoyéticas humanas expresan receptores de dopamina en su superficie.

10 Se evaluó la expresión de los receptores de dopamina de tipo 3 y 5 en la superficie de células CD34⁺ enriquecidas, que habían sido obtenidas de orígenes diferentes. Las células CD34⁺ humanas enriquecidas se obtuvieron según se ha indicado en la sección de Materiales y Métodos, procedentes de los orígenes siguientes: médula ósea (BM), sangre periférica movilizada, y sangre de cordón umbilical. Se encontró mediante análisis de citometría de flujo que las células CD34⁺ humanas enriquecidas procedentes de todos los orígenes expresan ambos tipos de receptores de dopamina en su superficie. Interesantemente, el nivel de expresión de los receptores variaba dependiendo del origen de las células y de sí el sujeto había sido tratado o no con G-CSF. Por ejemplo, la expresión de receptor de dopamina en la superficie de células CD34⁺ enriquecidas procedentes de médula ósea de donantes sanos tratados con G-CSF era, aproximadamente, 2-4 veces mayor que la de células CD34⁺ enriquecidas procedentes de médula ósea (BM) de donantes humanos sanos sin tratar (Fig 1A, B). Además, se encontró que un subconjunto más primitivo de células CD34⁺, CD34⁺/CD38^{-bajo} (Fig.2, R2), que comprende una población escasa de células pluripotenciales más adecuada para el trasplante, expresa niveles mayores de ambos tipos de receptores de dopamina en comparación con un subconjunto de células más diferenciadas, células CD34⁺/CD38^{alto} (Fig. 1, R1).

20 Ejemplo 2: Las citoquinas mieloides tales como G-CSF y GM-CSF aumentan los niveles de receptor de dopamina en la superficie de células CD34+ humanas.

25 En el Ejemplo precedente, se ha indicado que células pluripotenciales procedentes de individuos tratados con G-CSF ponían de manifiesto niveles aumentados de receptores de dopamina en su superficie. Se llevó a cabo el experimento siguiente en un modelo de animal, funcional, in vivo, para verificar que el nivel de receptor de dopamina en la superficie de células pluripotenciales humanas aumenta por exposición de las células pluripotenciales a G-CSF. Este modelo comprende la movilización de células pluripotenciales hacia la sangre periférica, inducida por tratamiento de ratones quiméricos NOD/SCID con G-CSF. Los ratones quiméricos NOD/SCID consisten en ratones que habían sido sometidos a xenotrasplante con células mononucleares hematopoyéticas humanas (MNCs) procedentes de sangre de cordón (CB). Dado que, como se ha publicado anteriormente por Petit (2002), se consigue una fuerte movilización de células pluripotenciales hacia la sangre periférica (PB) al cabo de 5 inyecciones consecutivas diarias de G-CSF, se recogieron células de médula ósea en esta fase. Seguidamente, se separaron MNCs sobre Ficoll y se sometieron a tinción las células para verificar los receptores 3 y 5 de dopamina (anticuerpo procedente de Calbiochem), expresión de CD34 y CD38 [con anticuerpo monoclonal humano específico anti-CD34-APC (Pharmingen) y CD38-PE (Becton Dickinson), respectivamente, como se indica en la Fig. 1C. Los resultados obtenidos, medidos mediante citometría de flujo, demostraron que el tratamiento de G-CSF y la movilización iba acompañado de un aumento del nivel de expresión de los receptores de dopamina en la población de células CD34⁺/CD38^{-bajo}. Por tanto, de modo semejante a las células CD34⁺ recogidas de médula ósea humana procedentes de individuos tratados con G-CSF (véase el Ejemplo precedente), las células CD34⁺/CD38^{-bajo} humanas (en comparación con las células CD34⁺/CD38^{alto}) procedentes de ratones quiméricos tratados con G-CSF ponían de manifiesto un aumento de la expresión de receptores de dopamina en su superficie (Fig. 1C).

35 Seguidamente, se ensayó in vitro el efecto directo de citoquinas mieloides sobre la expresión de receptores de dopamina en células pluripotenciales hematopoyéticas. Para este fin, sangre periférica movilizada, médula ósea humana normal, o sangre de cordón, se incubaron durante 3 días con medio RPMI o RPMI suplementado con GM-CSF, 5 ng/ml. Después de esta incubación, las células fueron sometidas a tinción triple con CD34-APC (Pharmingen); CD38-PE (Becton Dickinson), anticuerpo de conejo anti-receptor 3 de dopamina humana, y anticuerpo de conejo anti-receptor 5 de dopamina humana (Calbiochem). Los resultados expuestos en la Fig.3 muestran que una incubación de 3 días con GM-CSF reguló en alza los niveles de ambos tipos, 3 y 5, de receptores de dopamina, en células CD34⁺/CD38^{-bajo}.

50 Los resultados aquí obtenidos indican que las citoquinas mieloides, que inducen la movilización de células pluripotenciales hematopoyéticas y progenitoras hacia la sangre periférica (PB), aumentan directamente los niveles de receptores de dopamina en la superficie las células pluripotenciales y células progenitoras, hematopoyéticas, humanas, en particular de la población más primitiva que incluye células CD34⁺/CD38^{-bajo}.

Ejemplo 3. Los agonistas de dopamina aumentan el contenido progenitor clonogénico de las células CD34+ de sangre de cordón.

55 Se conocen las citoquinas GM-CSF y G-CSF por su papel en la diferenciación mieloides y en la regulación de células pluripotenciales. Es práctica común añadir estas citoquinas al ensayo de formación de colonias (CFU) de células progenitoras, con objeto de facilitar la detección de células progenitoras humanas. En vista del papel de GM-CSF y del G-CSF en la regulación de las células pluripotenciales y sobre el descubrimiento de que estas citoquinas inducen

directamente una expresión relativamente alta de receptores de dopamina en las células CD34⁺/CD38⁻/bajo, primitivas, los inventores han supuesto que los receptores de dopamina pueden desempeñar un papel en la regulación o función de células hematopoyéticas pluripotenciales y progenitoras. Por consiguiente se ensayó si la regulación en alza de los niveles de receptores de dopamina afecta al desarrollo de células progenitoras in vitro. Para esta finalidad, se sembraron células CD34⁺ de sangre de cordón, en cultivos semisólidos (1x10³ células/ml, en 1 ml) suplementados con las citoquinas Epo (2u/ml; Orto Bio Tech, Don Mills, Canadá), SCF (50 mg/ml; R y D) e IL-3 (5 ng/ml R y D) y con GM-CSF (5 ng/ml; R y D) o G-CSF (100 ng/ml; Roche) con objeto de regular en alza los niveles de receptores de dopamina. Para evaluar el efecto del aumento de actividad de los receptores de dopamina, los cultivos semisólidos fueron suplementados con el agonista de dopamina SKF (1 μM) o el 7-OH-DPAT (100 nM) o con medio como control. Como indica la Fig. 4 A, el SKF aumentó la formación de CFU-C de células CD34⁺ de sangre de cordón solamente en presencia de GM-CSF. Del mismo modo, el agonista de dopamina 7-OH-DPAT aumentó la formación de colonias en presencia de GM-CSF, pero el incremento máximo se observó en presencia de G-CSF. No se apreció aumento de la formación de colonias cuando el cultivo no se suplementó con citoquinas mieloides.

Estos resultados demuestran que la actividad del receptor de dopamina ejerce un papel beneficioso en la regulación y diferenciación de células pluripotenciales.

Ejemplo 4. Efecto de agonistas de dopamina sobre el injerto de células CD34⁺ humanas, enriquecidas, en la médula ósea de ratones NOD/SCID.

Se supuso que además de la regulación y diferenciación de células pluripotenciales (según se ha demostrado anteriormente) los receptores de dopamina pueden desempeñar un papel en funciones de las células pluripotenciales tales como la capacidad de injerto y la repoblación. Para apreciar el efecto de receptores de dopamina sobre la capacidad de injerto de células pluripotenciales, células CD34⁺ humanas, enriquecidas, procedentes de sangre periférica movilizada (MPB), tratadas ex vivo con los agonistas de dopamina SKF o 7-OH-DPAT, fueron trasplantadas en ratones NOD/SCID y se determinó la capacidad de injerto de células humanas en la médula ósea murina. Brevemente, 1-3x10⁵ células CD34⁺ de MPB se incubaron durante 2-4 días a 37°C en medio RPMI suplementado con FCS al 10%, penicilina, estreptomycinina y L-glutamina, y se trataron con los agonistas de receptores de dopamina SKF (1 μM) o 7-OH-DPAT (100 ng/ml), o se dejaron sin tratar. Después de la incubación, las células fueron inyectadas en ratones NOD/SCID irradiados. Se sacrificaron los ratones 5 semanas después de la inyección, se extrajo BM y las células de BM fueron marcadas por el marcador de CD45. Los resultados están resumidos en la Fig. 4B y muestran que las células pluripotenciales humanas tratadas con SKF o 7-OH-DPAT antes de inyectar, pusieron de manifiesto una capacidad de injerto en la médula ósea murina, 2 veces mayor en comparación con la de las células de control. La Fig. 4C muestra que el agonista de dopamina solamente intensificó el injerto cuando las células fueron tratadas conjuntamente con GM-CSF y el agonista de dopamina. En efecto, se observó una disminución de 50% de la capacidad de injerto cuando las células se trataron previamente con el antagonista de receptor de dopamina clozapina antes de la inyección (Fig. 4B).

La faceta característica de las células pluripotenciales hematopoyéticas es su aptitud para reconstituir a largo plazo muchos de todos los linajes de células sanguíneas. Un requisito para la expansión con éxito de células pluripotenciales, sería favorecer eficazmente la proliferación de células pluripotenciales auténticas sin pérdida simultánea de la aptitud de reconstitución a largo plazo. Con objeto de ensayar el efecto de agonistas de dopamina sobre células de iniciación de cultivo a largo plazo (LTC-IC), se llevaron a cabo trasplantes secundarios. LTC-IC es un subconjunto de la población de células pluripotenciales que es más primitiva y que permite auto-renovación (Scadden D Nature, 2003; 841-6). En experimentos de trasplante secundario (Fig. 4D), células de médula ósea obtenidas de las quimeras del trasplante primario (y que habían sido inyectadas inicialmente con CD34 tratadas con agonista de dopamina), fueron inyectadas en ratones receptores NOD/SCID. Una cantidad igual de células humanas (normalizada según el tanto por ciento de injerto de los receptores primarios) se inyectó en el trasplante secundario. En resultados preliminares se encontró que el tratamiento con los agonistas de dopamina tiene un efecto beneficioso sobre las LTC-IC dado que el porcentaje de injerto de los ratones trasplantados con el trasplante secundario es mayor que el obtenido en los receptores primarios (Fig. 4D). Por tanto, la estimulación de células pluripotenciales hematopoyéticas con agonistas de receptores de dopamina induce células de iniciación de cultivo a largo plazo como se puso de manifiesto por la capacidad mejorada de reconstitución secundaria.

Los resultados obtenidos sugieren que la estimulación in vitro de células pluripotenciales o progenitoras, hematopoyéticas, con agonistas de dopamina puede mejorar el potencial de repoblación de estas células.

Ejemplo 5. Celularidad reducida de la médula ósea debida a la privación de dopamina.

Se ensayó si la dopamina desempeña un papel importante en la homeostasia de la masa celular existente en la médula ósea. Para esta finalidad, se inyectaron ratones con 5 inyecciones diarias por vía intraperitoneal del agonista de dopamina 7-OH-DPAT (1,5 mg/kg) o del antagonista flupentixol 5 (3 mg/kg), o permanecieron sin tratar, y se determinó la masa celular de la médula ósea. El día 5, 4 horas después de la última inyección, los ratones fueron sacrificados, se extrajeron células de BM desde la médula ósea (con una jeringuilla) y se llevó a cabo un recuento de leucocitos (WBC). Se encontró que el tratamiento de los ratones con el agonista de dopamina 7-OH-DPAT había conducido a un aumento de 50% en la celularidad de la médula ósea, al tiempo que el tratamiento con el antagonista

de dopamina flupentixol había dado por resultado una disminución de 25% de la celularidad de la médula ósea. (Fig. 5)

En conjunto, estos resultados sugieren que la dopamina regula la proliferación hematopoyética en la médula ósea

5 Ejemplo 6. SKF y 7-OH-DPAT inducen en células CD34⁺ de sangre de cordón, polarización y propagación por adhesión de las células a ácido hialurónico.

10 El ácido hialurónico (HA) es un componente importante de la ECM de BM y justifica el 40% de los glicosaminoglucanos producidos por cultivos de células estromáticas derivadas de BM. Resultados recientes indican el papel esencial del HA tanto de la matriz como de la superficie celular en las propiedades de adhesión y migración de HSCs/HPCs (Avigdor et al., 2004). El desarrollo y migración de células hematopoyéticas son procesos fundamentales que están estrechamente ligados. Habiéndose establecido el papel de los receptores de dopamina en la regulación de células pluripotenciales hematopoyéticas (véase el Ejemplo 3), se estudió seguidamente el posible papel de los agonistas de dopamina en la motilidad de células CD34⁺. Las células que responden a estímulos quimiotácticos exponen cambios morfológicos y redistribución de receptores de la superficie celular debidos a la transposición del citoesqueleto. Se apreciaron cambios de morfología de las células CD34⁺ de sangre de cordón, por adhesión a ácido hialurónico en presencia o ausencia de los agonistas de dopamina SKF o 7-OH-DPAT. Como ilustra la Fig 6A, en presencia de los agonistas SKF o 7-OH-DPAT, el porcentaje de células que ponían de manifiesto morfología polarizada, era más del doble en comparación con el de células CD34⁺ de CB sin tratar, control. Muchas de las células tratadas con agonista adquirieron cambios morfológicos manifestados por una intensificación de la propagación, alargamiento celular y protuberancias múltiples. Se llevaron a cabo análisis inmunocitoquímicos para detectar el receptor 5 de dopamina expresado en estas células. Interesantemente, se puso de manifiesto por la formación de "puntos" sobre las células, agrupaciones de receptor 5 de dopamina membranal. La formación de puntos fuertes indica agrupación de receptores y se apreció en células polarizadas (Fig. 6B). Se detectaron cambios de polimerización de la actina en células tratadas con los agonistas de receptores de dopamina, lo que indica transposición del citoesqueleto en presencia de estos agentes.

25 Los resultados obtenidos en esta memoria indican que los receptores de dopamina desempeñan un papel en la migración de células pluripotenciales hematopoyéticas.

30 Se ensayó el efecto de la dopamina (1 nM-1µM) sobre el potencial de migración in vitro de células CD34⁺ humanas, inmaduras, (50.000 - 100.000 células en 100 µl). Se encontró que la dopamina colocada en la cámara inferior de transpocillos, aumentaba de modo importante la migración de células enriquecidas CD34⁺ de sangre de cordón (Fig. 6C). Este efecto no fue detectado cuando las células no habían sido tratadas previamente con la citoquina mieloide GM-CSF (resultados no indicados). Dado que la dopamina es altamente oxidativa, sus agonistas fueron empleados, particularmente, en tratamientos que requerían periodos de incubación más largos (Fig. 6D). Además, también se apreció una mayor migración espontánea de células mononucleares de médula ósea murina (200.000 células en 100 µl) obtenidas de ratones tratados con G-CSF y los agonistas de receptores de dopamina SKF y 7-OH-DPAT (el SKF y el 7-OH-DPAT) se inyectaron a los ratones junto con la citoquina G-CSF, en comparación con la de células obtenidas de ratones tratadas solo con G-CSF (Fig. 6D).

La dopamina y los agonistas de dopamina aumentaron la migración de células CD34⁺ en correlación con el aumento de la polaridad celular.

40 Ejemplo 7: La actividad de receptores de epinefrina y norepinefrina puede regular la función de células pluripotenciales hematopoyéticas.

Se realizaron experimentos con objeto de ensayar si las células CD34⁺ están reguladas por neurotransmisores de catecolaminas adicionales. Empleando análisis de citometría de flujo con un anticuerpo específico y marcado de un receptor adrenérgico beta-2, se encontró que las células CD34⁺ expresan el receptor adrenérgico beta-2 y que las células CD34⁺ de sangre periférica movilizada expresan niveles más altos de estos receptores (Fig. 7A)

45 Seguidamente, se determinó el efecto de los neurotransmisores adrenérgicos epinefrina (10 nM) y norepinefrina (1 y 10 nM) sobre la proliferación de células CD34⁺ humanas. Las condiciones experimentales fueron similares a las empleadas con los agonistas de dopamina. Para el análisis de colonias, se añadió epinefrina y norepinefrina a la metilcelulosa. Se encontró que ambos neurotransmisores aumentan la capacidad clonogénica de las células CD34⁺ humanas procedentes de sangre de cordón (Fig. 7B). Para el ensayo de la capacidad de injerto, se incubaron células durante 2 días en medio RPMI suplementado con GM-CSF, 5 ng/ml. Se encontró que ambos neurotransmisores aumentaban intensificando la capacidad de injerto de células CD34⁺ en el ratón NOD/SCID. (Fig. 7D-7E).

55 Los inventores encontraron también que la capacidad de migración de las células CD34⁺ humanas era afectada por norepinefrina. Por ejemplo, la norepinefrina colocada en el pocillo inferior aumentaba la migración de las células CD34⁺, lo que indica que la migración de células pluripotenciales y progenitoras hematopoyéticas, humanas, puede ser mediada por neurotransmisores de catecolaminas (Fig. 7C).

Los descubrimientos de los inventores in vitro e in vivo, revelan que los neurotransmisores de catecolaminas regulan directamente la proliferación y migración de células progenitoras hematopoyéticas.

Referencias bibliográficas

- 5 Abraham Avigdor, Polina Goichberg, Shoham Shivtiel, Ayelet Dar, Amnon Peled, Sarit Samira, Orit Kollet, Rami Hershkoviz, Ronen Alon, Izhar Hardan, Herzl Ben-Hur, David Naor, Amon Nagler, and Tsvee Lapidot "CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow" *Blood*, Vol. 103, No. 8, pp. 2981-2989, (200).
- Basu, S. & Dasgupta, P.S. "Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system". *J Neuroimmunol* 102, 113-24 (2000).
- 10 Besser MJ, Ganor Y, Levite M. "Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNFalpha or both" *J Neuroimmunol*. Dec;169(1-2):161-71. (2005).
- Cashman, J., Bockhold, K., Hogge, D. E., Eaves, A. C., and Eaves, C. J. "Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood". *Br J Haematol* 98, 1026-1036 (1997)
- 15 Civin, C.I., Porada, G.A., Lee, M.J., Terstappen, L., and Zanjani, E.D. "Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo" *Blood* 88, 4102-4109 (1996)
- Conneally E., Cashman J., Petzer A., and Eaves C.J. "Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9836-9841(1997)
- 20 Damsma G, Bottema T, Westerink BH, Tepper PG, Dijkstra D, Pugsley TA, Mac- Kenzie RG, Heffner TG and Wikstrom H "Pharmacological aspects of R-(+)-7-OH-DPAT, a putative dopamine D3 receptor ligand." *Eur J Pharmacol* 249: R9-R10(1993)
- Foley, P., Gerlach, M., Double, K.L. & Riederer, P. "Dopamine receptor agonists in the therapy of Parkinson's disease" *J Neural Transm* 111, 1375-446 (2004)
- 25 Goichberg P, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger B. "Recruitment of beta-catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction". *J Cell Sci.*;114: 1309-1319 (2001)
- Goichberg, P. et al. "cAMP-induced PKC activation increases functional CXCR4 expression on human hematopoietic progenitors" *Blood*. Feb 1;107(3):870-9 (2006)
- 30 Goldman-Rakic, P.S., Castner, S.A., Svensson, T.H., Siever, L.J. & Williams, G.V. "Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction" *Psychopharmacology (Berl)* 174, 3-16 (2004).
- Ilani, T., Strous, R.D. & Fuchs, S. "Dopaminergic regulation of immune cells via D3 dopamine receptor: a pathway mediated by activated T cells" *Faseb J* 18, 1600-2 (2004).
- Kiel, M.J. et al. "SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells" *Cell* 121, 1109-21 (2005).
- 35 Kollet O, Petit I, Kahn J, Samira S, Dar A, Peled A, Deutsch V, Gunetti M, Piacibello W, Nagler A, Lapidot T. "Human CD34(+)CXCR4(-) sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation" *Blood* 100(8):2778-86 (2002).
- Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D.E., and Dick, J.E. "Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice" *Science* 255, 1137-1141(1992).
- 40 Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C. Y., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., Williams, D. A., and Dick, J. E. "Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mice using retroviral gene marking and cell purification: implications for gene therapy" *Nat. Med.* 2, 1329-1337. (1996).
- 45 Lee SH, Mouradian MM. R "Up-regulation of D1A dopamine receptor gene transcription by estrogen" *Mol Cell Endocrinol*. 156(1-2):151-7 (1999)
- Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, You M, Kohli L, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Miyazawa K, Ohyashiki K, Broxmeyer HE. "Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood*" 99(12):4307-17. (2002)

- D Levesque, J Diaz, C Pilon, M Matres, B Giros, E Souil, D Schott, J Morgat, J Schwartz and P Sokoloff "Identification, Characterization, and Localization of the Dopamine D3 Receptor in Rat Brain Using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-Propyl-2- Aminotetralin" Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol 89, 8155-8159, Copyright © by National Academy of Sciences (1992)
- 5 Levite M, Chowders Y, Ganor Y, Besser M, Hershkovits R, Cahalon L. "Dopamine interacts directly with its D3 and D2 receptors on normal human T cells, and activates beta1 integrin function" *Eur J Immunol.* (12):3504-12(2001)
- Lim, E. "A walk through the management of Parkinson s disease" *Ann Acad Med Singapore* 34, 188-95 (2005).
- Mayani H et al."Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation" *Arch Med Res* 34:476-488 (2003).
- 10 McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L.D., Lieberman, M., and Weissman, I.L. "The SCID-Hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function" *Science* 241, 1632-1639. (1988)
- McGrath, K.E., Koniski, A.D., Maltby, K.M., McGann, J.K., and Palis, J. "Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4" *Dev. Biol.* 213:442-456 (1999).
- 15 Nagasawa, T. et al. "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1" *Nature.* 382:635-638 (1996).
- Nan, Z., Grande, A., Sanberg, C.D., Sanberg, P.R. & Low, W.C. "Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury" *Ann N Y Acad Sci* 1049, 84-96 (2005).
- 20 Nishii K, Katayama N, Miwa H, Shikami M, Masuya M, Shiku H, Kita K. "Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein" *Br J Haematol.* 105(3):701-10.(1999)
- Peled, A. et al. "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow" *J Clin Invest* 104, 1199-211(1999).
- 25 Peled, A. et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283, 845-8 (1999).
- Peled, A. et al. "The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice" *Blood* 95, 3289-3296 (2000).
- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4" *Nat Immunol Jul;3(7):687-94(2002) Erratum in: Nat ImmunolAug;3(8):787(2002)*
- 30 Petit, I. et al. "Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells" *J Clin Invest* 115, 168-76 (2005).
- Sibley, D.R. & Monsma, F.J., Jr. "Molecular biology of dopamine receptors" *Trends Pharmacol Sci* 13, 61-9 (1992).
- 35 Spiegel A, Kollet O, Peled A, Abel L, Nagler A, Bielgorai B, Rechavi G, Vormoor J, Lapidot T. "Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling" *Blood.* 103(8):2900-7. (2004)
- Stumm, R.K. et al. "A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia" *J Neurosci* 22, 5865-78 (2002).
- 40 Tavor S, Petit I, Porozov S, Goichberg P, Avigdor A, Sagiv S, Nagler A, Naparstek E, Lapidot T. "Motility, proliferation and egress to the circulation of human AML cells in transplanted NOD/SCID mice are elastase dependent" *Blood.* (2005)
- Undie AS, Friedman E. "Selective dopaminergic mechanism of dopamine and SKF38393 stimulation of inositol phosphate formation in rat brain" *Eur J Pharmacol.*;226(4):297-302(1992)
- 45 Vishalakumar, S., Patel, H., Moharita, A.L., Harrison, J.S. & Rameshwar, P. "The anti-proliferative effect of neurokinin-A on hematopoietic progenitor cells is partly mediated by p53 activating the 5' flanking region of neurokinin-2 receptor" *Cell Signal* (2005).
- Walter, B. et al. "Age-dependent effects of severe traumatic brain injury on cerebral dopaminergic activity in newborn and juvenile pigs" *J Neurotrauma* 21, 1076-89 (2004).

Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, Lanson NA Jr, Spees JL, Bertucci D, Peister A, Weiss DJ, Valentine VG, Prockop DJ, Kolls JK. "Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(1):186-91 (2005).

5 Wishart DS et al., DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 1 ;34 (2006).

Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Livingston, A.G., Flake, A.W., and Ogawa, M."Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cell" *Exp. Hematol.* 26, 353-360(1998).

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de 7-hidroxi-2-dipropilaminotetralina (7-OH-DPAT) en la fabricación de un medicamento para tratar una patología hematopoyética mediante terapia de trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT).
- 5 2.- El uso según la reivindicación 1, en donde se usa 7-OH-DPAT en combinación con una citoquina mieloide o un vector de expresión que codifica un receptor de catecolaminas.
- 3.- El uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT) es para la repoblación de linajes de células sanguíneas maduras,
- 10 4.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medicamento es para administración *ex vivo* a las células pluripotenciales antes del trasplante, aumentando con ello la migración, capacidad de injerto y/o proliferación de las células pluripotenciales.
- 5.- El uso según la reivindicación 4, en donde las células pluripotenciales proceden de un donante tratado con G-CSF.
- 6.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la citoquina mieloide es GM-CSF y/o G-CSF.
- 15 7.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medicamento es para administración *in vivo* a un donante sano o a un paciente sometido a terapia de cáncer, aumentando con ello la movilización de células pluripotenciales desde la médula ósea y otros tejidos, hacia la sangre, y facilitando la recogida de células pluripotenciales desde la sangre para el trasplante.
- 8.- 7-Hidroxi-2-dipropilaminotetralina (7-OH-DPAT) para uso en el tratamiento de una patología hematopoyética, mediante terapia de trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT).
- 20 9.- 7-OH-DPAT para el uso según la reivindicación 8, en donde se combina 7-OH-DPAT con una citoquina mieloide o un vector de expresión que codifica el receptor de catecolaminas.
- 10.- 7-OH-DPAT para el uso según la reivindicación 8 ó 9, en donde el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSCT) es para la repoblación de linajes de células sanguíneas maduras.
- 25 11.- 7-OH-DPAT para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la 7-OH-DPAT es para administración *ex vivo* a las células pluripotenciales antes del trasplante, aumentando con ello la migración, capacidad de injerto y/o proliferación de las células pluripotenciales.
- 12.- 7-OH-DPAT para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde la citoquina mieloide es GM-CSF y/o G-CSF.
- 30 13.- 7-OH-DPAT para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la 7-OH-DPAT es para administración *in vivo* a un donante sano o a un paciente sometido a terapia de cáncer, aumentando con ello la movilización de células pluripotenciales desde la médula ósea y otros tejidos, hacia la sangre, y facilitando la recogida de células pluripotenciales desde la sangre para el trasplante .

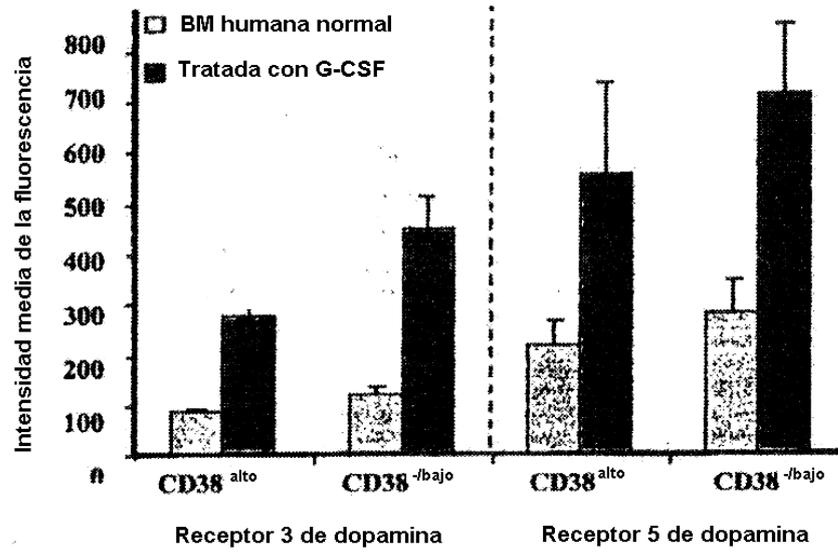


Fig. 1A

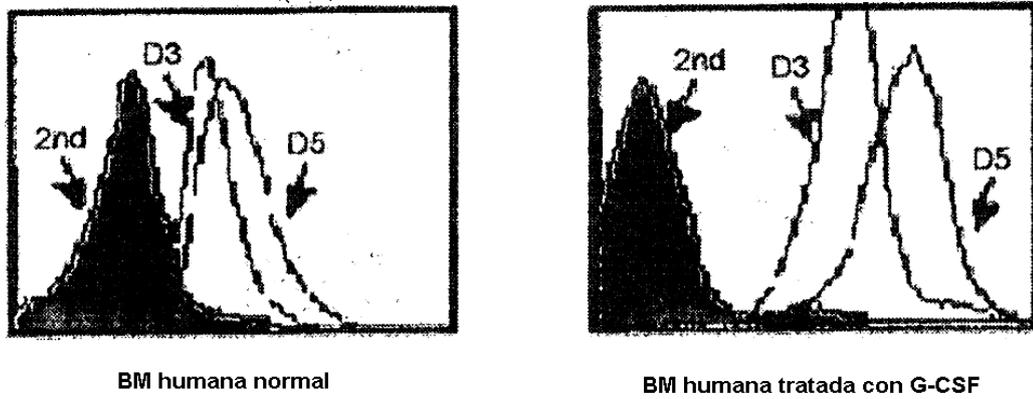


Fig. 1B

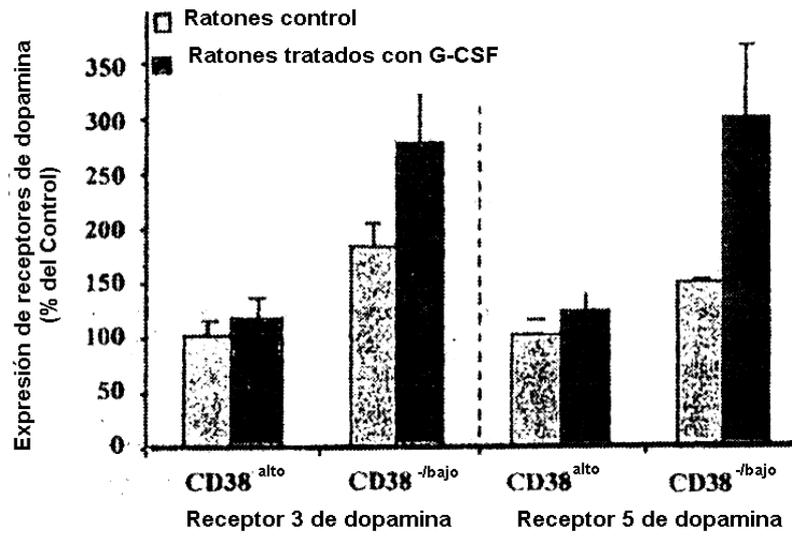


Fig. 1C

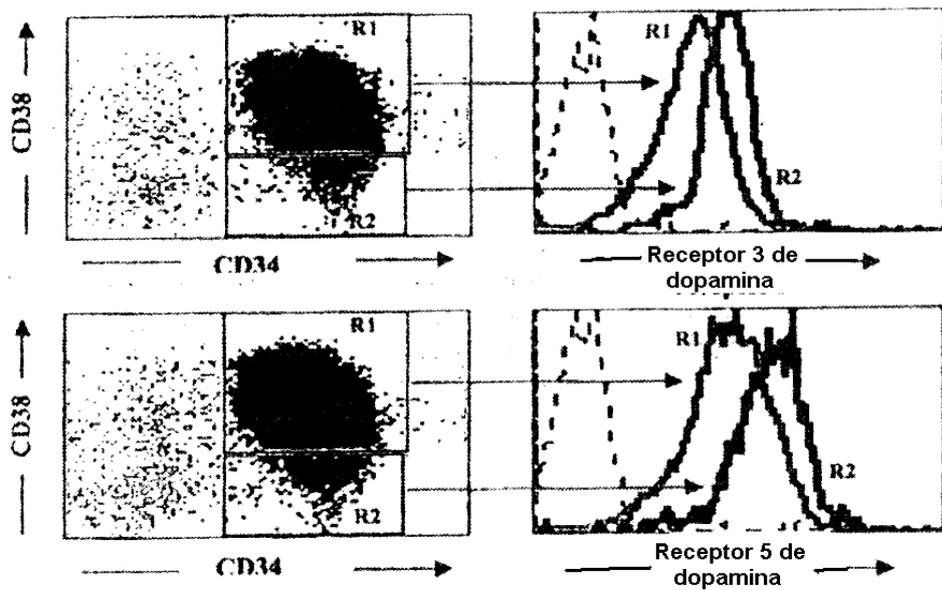


Fig. 2

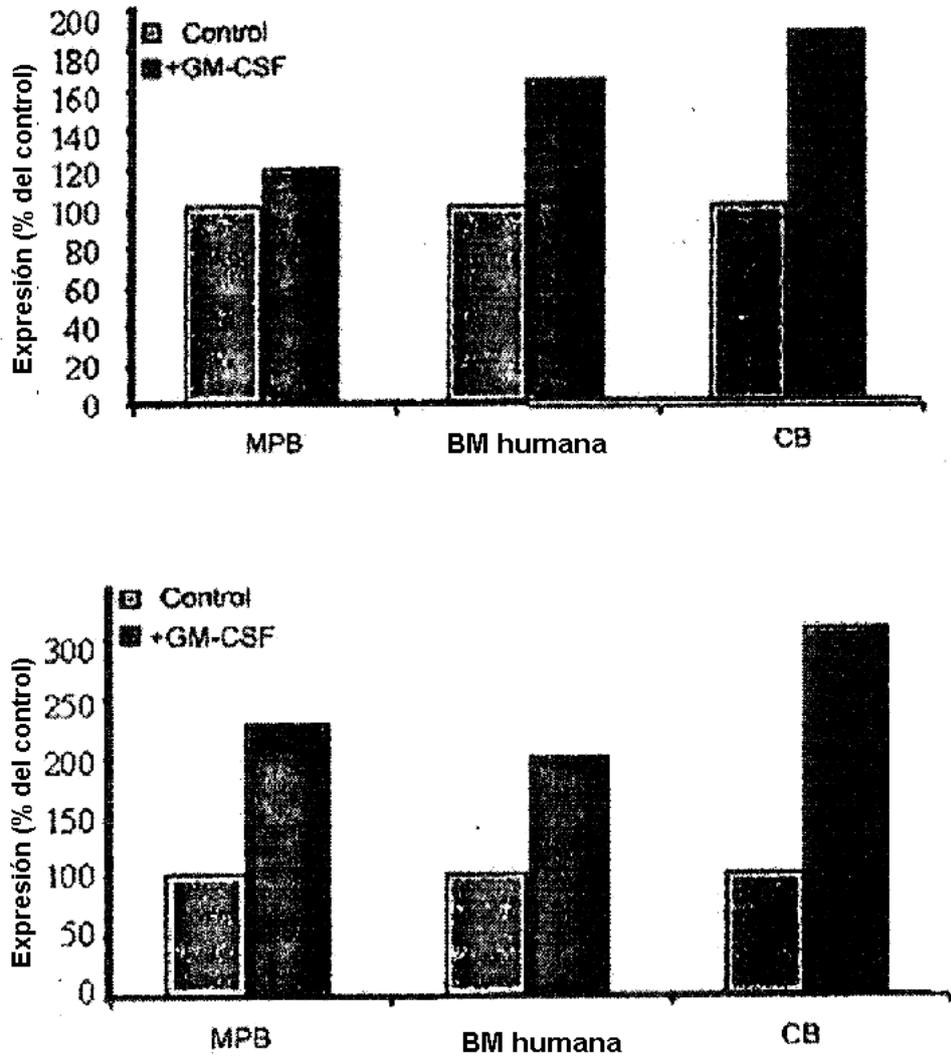


Fig. 3

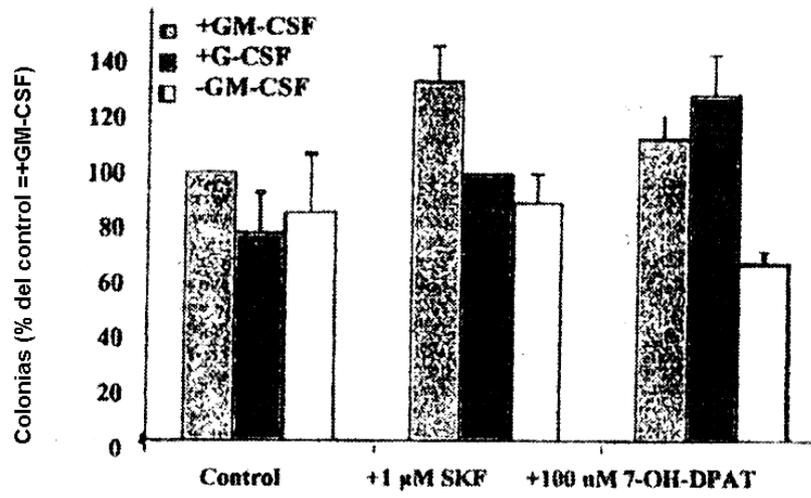


Fig. 4A

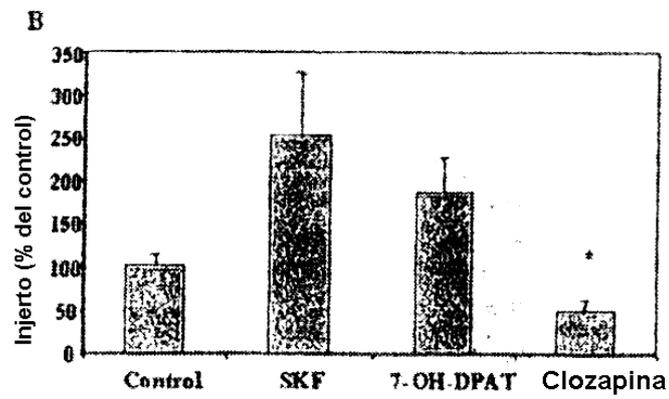


Fig. 4B

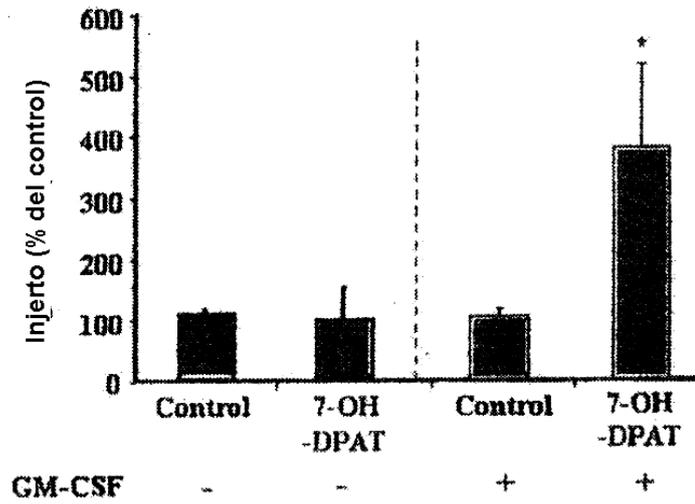


Fig. 4C

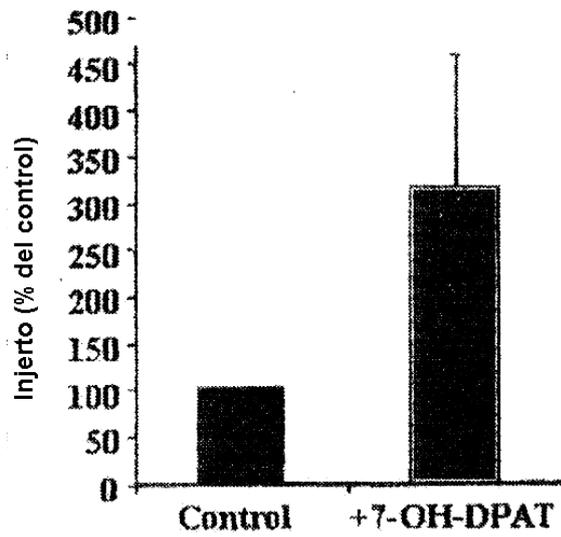


Fig. 4D

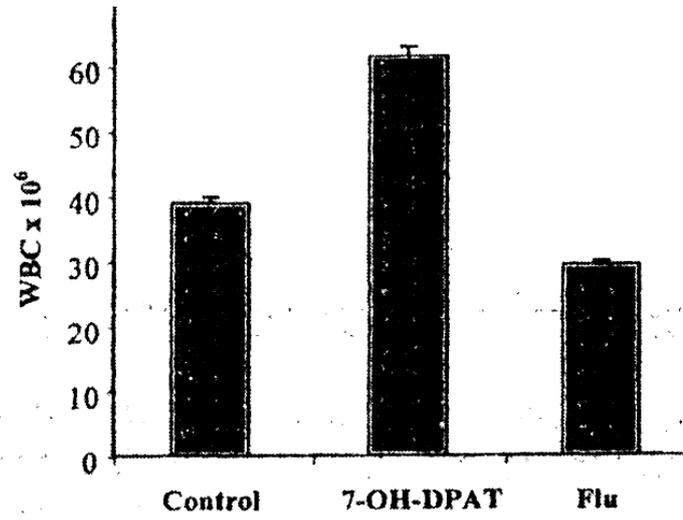


Fig. 5

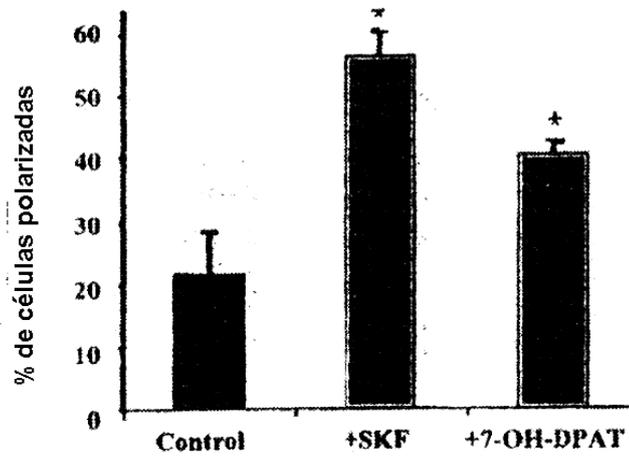


Fig. 6A

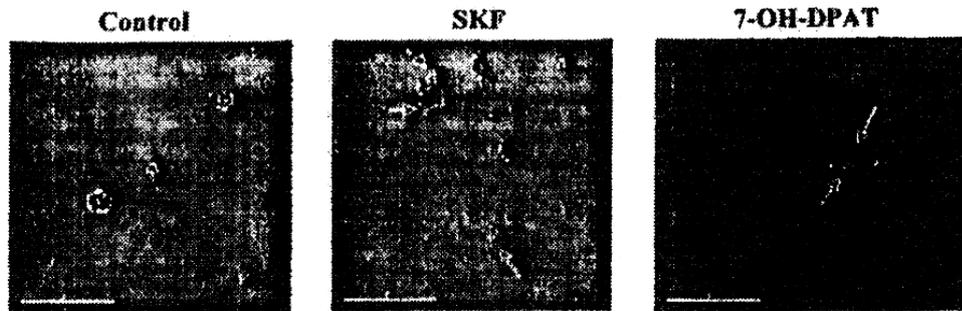


Fig. 6B

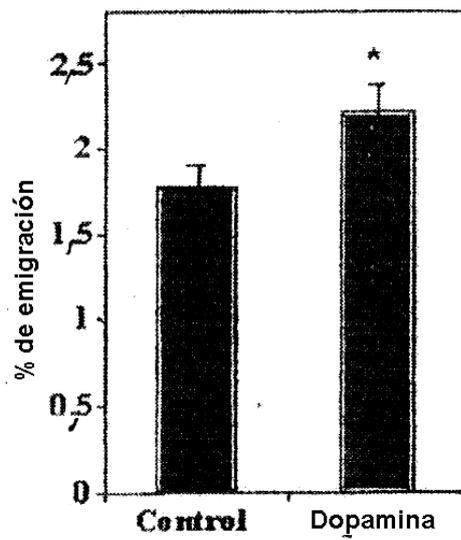


Fig. 6C

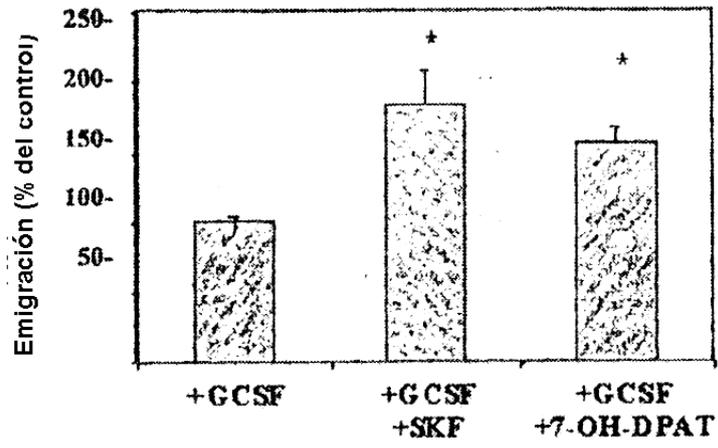


Fig. 6D

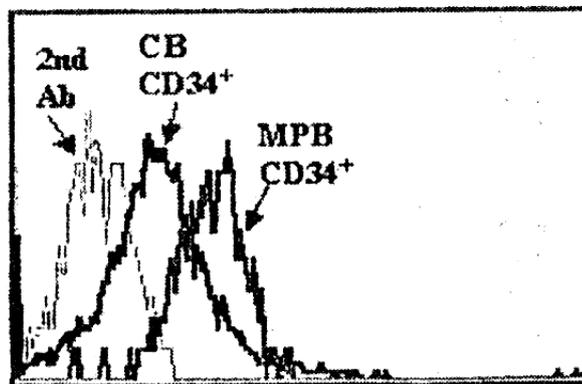


Fig. 7A

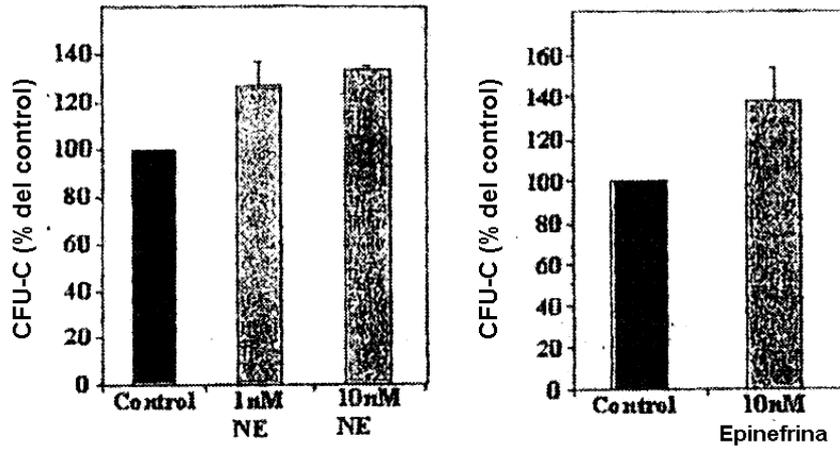


Fig. 7B

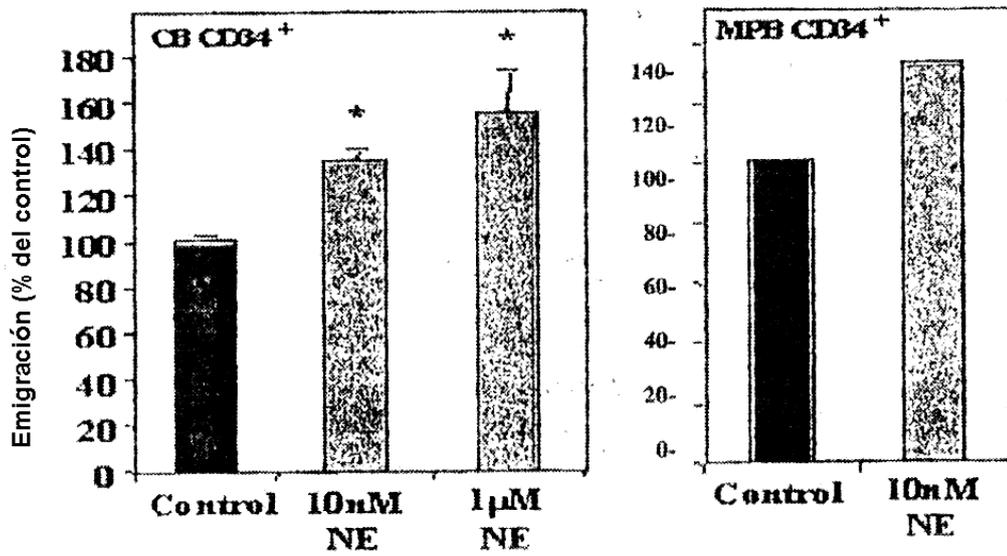


Fig. 7C

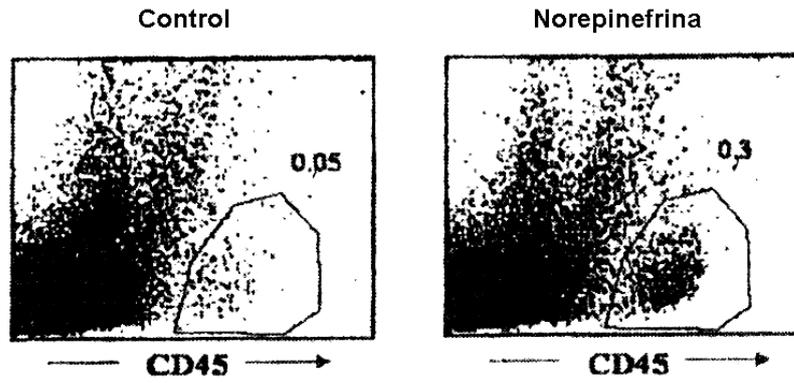


Fig. 7D

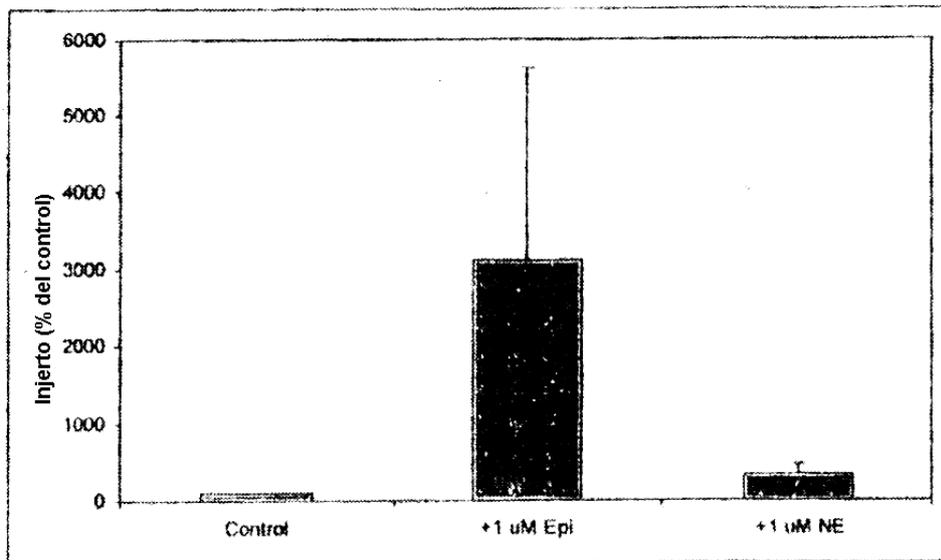


Fig. 7E