

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 624**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/14** (2015.01)

**C12N 5/078** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09795982 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2379086**

54 Título: **Preparación farmacéutica**

30 Prioridad:

**18.12.2008 EP 08450199**

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

**22.12.2015**

73 Titular/es:

**APOSCIENCE AG (100.0%)  
Rauhensteingasse 4/3  
1010 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**ANKERSMIT, HENDRIK JAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 554 624 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

## Preparación farmacéutica

- 5 La presente invención se refiere a una preparación farmacéutica para tratar estados inflamatorios internos, preferiblemente estados internos asociados con isquemia.

10 Puede producirse hipoxia, un estado de reducción de oxígeno, cuando los pulmones se ven comprometidos o se reduce el flujo de sangre. La isquemia, reducción en el flujo de sangre, puede estar producida por la obstrucción de una arteria o vena por un coágulo sanguíneo (trombo) o por cualquier material circulante extraño (émbolo) o por un trastorno vascular tal como aterosclerosis. La reducción en el flujo sanguíneo puede tener un comienzo repentino y duración corta (isquemia aguda) o puede tener un comienzo lento con duración larga o recurrencia frecuente (isquemia crónica). La isquemia aguda a menudo está asociada con necrosis tisular irreversible, regional (un infarto), mientras que la isquemia crónica está asociada habitualmente con lesión tisular hipóxica transitoria. Si la disminución en la perfusión es prolongada o grave, sin embargo, la isquemia crónica también puede estar asociada con un infarto. Se producen comúnmente infartos en el bazo, riñón, pulmones, cerebro y corazón, produciendo trastornos tales como infarto intestinal, infarto pulmonar, accidente cerebrovascular isquémico e infarto de miocardio.

20 Los cambios patológicos en los trastornos isquémicos dependen de la duración y la gravedad de la isquemia, y de la duración de supervivencia del paciente. Puede observarse necrosis dentro del infarto en las primeras 24 h y se desarrolla una respuesta inflamatoria aguda en el tejido viable adyacente al infarto con migración de leucocitos a la zona del tejido muerto. A lo largo de los días sucesivos, hay una rotura y eliminación gradual de células dentro del infarto por fagocitosis y sustitución con una cicatriz colagenosa o glial.

25 La hipoperfusión o el infarto en un órgano a menudo afecta a otros órganos. Por ejemplo, la isquemia del pulmón, producida por ejemplo por una embolia pulmonar, no sólo afecta al pulmón, sino que también produce estrés hipóxico del corazón y otros órganos, tales como el cerebro. El infarto de miocardio, que a menudo implica bloqueo de arterias coronarias debido a trombosis, vasoespasmos de la pared arterial o infección viral del corazón, puede conducir a insuficiencia cardíaca congestiva e hipotensión sistémica. Pueden desarrollarse complicaciones secundarias tales como encefalopatía isquémica global si el paro cardíaco es prolongado con hipoperfusión continuada. La isquemia cerebral, producida lo más comúnmente por oclusión vascular debida a aterosclerosis, puede oscilar en gravedad desde ataques isquémicos transitorios (TIA) hasta infarto cerebral o accidente cerebrovascular. Aunque los síntomas de TIA son temporales y reversibles, los TIA tienen a recurrir y a menudo van seguidos por accidente cerebrovascular.

35 La enfermedad arterial oclusiva incluye arteriopatía coronaria, que puede conducir a infarto de miocardio y enfermedad arterial periférica, que puede afectar a la aorta abdominal, sus ramificaciones principales y arterias de las piernas. La enfermedad arterial periférica incluye la enfermedad de Buerger, la enfermedad de Raynaud y acrocianosis. Aunque la enfermedad arterial periférica se produce comúnmente por aterosclerosis, otras causas principales incluyen, por ejemplo, diabetes, etc. Las complicaciones asociadas con la enfermedad arterial periférica incluyen intensos calambres en las piernas, angina de pecho, ritmos cardíacos anómalos, insuficiencia cardíaca, ataque cardíaco, accidente cerebrovascular e insuficiencia renal.

45 Los trastornos isquémicos e hipóxicos son una causa principal de morbilidad y mortalidad. Las enfermedades cardiovasculares son responsables del 30% de las muertes en todo el mundo. Entre las diversas enfermedades cardiovasculares, la cardiopatía isquémica y las enfermedades cerebrovasculares producen aproximadamente el 17% de las muertes.

50 En la actualidad, el tratamiento de los trastornos isquémicos e hipóxicos se centra en el alivio de los síntomas y el tratamiento de los trastornos causantes. Por ejemplo, los tratamientos para el infarto de miocardio incluyen nitroglicerina y analgésicos para controlar el dolor y alivio de la carga de trabajo del corazón. Se usan otros medicamentos, incluyendo digoxina, diuréticos, amrinona, betabloqueantes, agentes hipolipidémicos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, para estabilizar el estado, pero ninguna de estas terapias aborda directamente el daño tisular producido por la isquemia y la hipoxia.

55 Debido a las deficiencias en los tratamientos actuales, sigue habiendo una necesidad de métodos que sean eficaces para tratar estados que implican hipoxia. También existe la necesidad de métodos que sean eficaces en la prevención de daño tisular producido por isquemia que se produce debido a, por ejemplo, aterosclerosis, diabetes y trastornos pulmonares.

60 Los estados asociados con isquemia e hipoxia habitualmente van acompañados por inflamación. Por tanto se necesitan medios y métodos que también reduzcan la inflamación.

65 Hojo Y *et al* (J Am Coll Cardiol 35(2000):968-973) encontraron que los pacientes que padecen infarto de miocardio agudo muestran un nivel disminuido de VEGF.

Tatsumi T *et al* (Circ J 71(2007):1199-1207) describen la administración de PBMC no expandidas a pacientes que padecen infarto de miocardio agudo.

5 Tuchinda C *et al* (Photoderm Photoimmunol Photomed 23(2007):2-9) compararon la activación de rutas apoptóticas en PBMC humanas usando diferentes fuentes de radiación UV. PBMC aisladas y lavadas de ese modo se estimularon usando radiación UV.

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar medios que permitan el tratamiento eficaz de estados inflamatorios internos, preferiblemente estados asociados con isquemia.

La presente invención se refiere a una preparación farmacéutica para tratar un estado inflamatorio interno, preferiblemente un estado interno asociado con isquemia, que comprende

15 a) una disolución fisiológica que comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC) apoptóticas, o

b) un sobrenadante de la disolución a), en la que la disolución a) puede obtenerse cultivando PBMC en una disolución fisiológica libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC durante al menos 4 h, en la que las condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, cambio de pH o combinaciones de los mismos.

20 Resulta que la administración de una preparación farmacéutica tal como se definió anteriormente a un paciente que padece un estado inflamatorio interno, preferiblemente un estado interno asociado con isquemia, da como resultado el alivio de los síntomas respectivos y un proceso de curación.

25 La preparación farmacéutica de la presente invención comprende PBMC cultivadas y/o el sobrenadante en que se han cultivado las PBMC. En el transcurso del cultivo de PBMC estas células expresan y secretan sustancias como citocinas que difieren de las expresadas y secretadas en PBMC activadas. Esto significa que el secretoma de las PBMC de la presente invención es diferente del secretoma de las PBMC activadas. Las células de la presente invención experimentan una producción de secretoma no desencadenada por un resto de superficie celular. Por tanto, es sorprendente que PBMC que no han estado en contacto con sustancias de activación de PBMC como PHA o LPS puedan emplearse para tratar estados inflamatorios internos, en particular estados isquémicos, lo que muestra que el secretoma de estas células comprende sustancias que soportan el tratamiento de tales estados o estados similares.

35 Las PBMC según la presente invención pueden obtenerse cultivándolas en una disolución fisiológica que no comprende sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC. Sin embargo, las PBMC se incuban en la disolución fisiológica durante al menos 4 h. Este tiempo de cultivo mínimo se requiere para permitir que las PBMC secreten citocinas y otras sustancias beneficiosas.

40 Las PBMC que forman parte de la preparación según la presente invención pueden obtenerse de sangre completa usando métodos conocidos en la técnica tales como gradiente de Ficoll, lisis hipotónica, etc. Estos métodos se conocen bien en la técnica.

45 Las PBMC de la preparación farmacéutica pueden obtenerse de una reserva de donantes o del mismo individuo al que se le administrará la preparación.

50 La disolución fisiológica de la que se obtiene el sobrenadante comprende al menos 500, preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos  $10^5$ , incluso más preferiblemente al menos  $10^6$ , células por ml de disolución o por unidad de dosificación.

La preparación de la presente invención puede comprender al menos 500, preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos  $10^5$ , incluso más preferiblemente al menos  $10^6$ , PBMC por ml o por unidad de dosificación.

55 "Disolución fisiológica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una disolución líquida en la que las PBMC se cultivan antes de su uso en la preparación farmacéutica según la presente invención.

60 "Disolución fisiológica" también se refiere a una disolución que no conduce a la muerte de las PBMC en el plazo de una hora, preferiblemente en el plazo de 30 min. Si el número de PBMC viables está disminuyendo en una disolución en el 75%, más preferiblemente en el 90% en el plazo de una hora, preferiblemente en el plazo de 30 min, no se considera que la disolución sea una "disolución fisiológica" tal como se define en el presente documento. La "disolución fisiológica" no conduce a una lisis espontánea de las PBMC cuando se ponen en contacto con dicha disolución.

65 En este contexto la etapa de "cultivar" o "poner cultivo" comprende o consiste en la etapa de "incubar", una etapa en la que las células se ponen en contacto con una disolución durante un tiempo definido (al menos 4 h, preferiblemente al menos 8 h, más preferiblemente al menos 12 h) en condiciones que se usan regularmente para

cultivar las PBMC.

El término "estado asociado con isquemia" en el contexto de la presente invención puede usarse de manera intercambiable con el término "estados isquémicos" e indica cualquier estado, enfermedad o trastorno en el que regiones del cuerpo humano o animal se ven privadas de un suministro de oxígeno adecuado dando como resultado daño o disfunción del tejido. Un estado patológico puede estar caracterizado por la reducción o supresión del riego sanguíneo dentro de un órgano o parte de un órgano, lo que puede estar producido por la constricción u obstrucción de un vaso sanguíneo. Tales estados se denominan colectivamente en el presente documento mediante el término "isquemia" o "estados relacionados con isquemia" o "estado relacionado con isquemia". En la cardiopatía, por ejemplo, a menudo se usa isquemia para describir el músculo cardíaco que no está obteniendo la cantidad apropiada de sangre rica en oxígeno debido al estrechamiento o bloqueo de arterias coronarias. Los síntomas de la isquemia dependen del órgano que sea "isquémico". Con el corazón, la isquemia a menudo da como resultado angina de pecho. En el cerebro, la isquemia puede dar como resultado un accidente cerebrovascular. Los estados de isquemia van acompañados por inflamación.

Los ejemplos no limitativos de estados patológicos que están relacionados con inflamación, en particular con isquemia, incluyen heridas, isquemia miocárdica, isquemia de las extremidades, isquemia tisular, lesión por isquemia-reperusión, angina de pecho, arteriopatía coronaria, enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, heridas crónicas, heridas de diabéticos, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto pulmonar, úlcera de la piel, etc.

A pesar de lo anterior, un estado patológico en el contexto de la invención puede estar caracterizado por daño o disfunción de células endoteliales, es decir herida. Ejemplos no limitativos de heridas que pueden tratarse mediante el uso de la preparación según la presente invención son heridas crónicas, heridas de diabéticos, úlcera, quemaduras, enfermedad inflamatoria de la piel y enfermedad intestinal.

Los términos "estado interno", "estado inflamatorio interno" y "estados internos asociados con isquemia" se refieren a estados y enfermedades que se producen dentro del cuerpo de un individuo que están producidos por hipoxia aguda o latente e inflamación en órganos finales de mamífero necesarios para el funcionamiento óptimo (por ejemplo hueso, corazón, hígado, riñón, cerebro, integridad cutánea).

"Disolución fisiológica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una disolución que presenta una presión osmótica que no conduce a la destrucción de las PBMC o subconjuntos de las mismas y puede administrarse directamente a un individuo.

El término "libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC" se refiere a la disolución fisiológica que no comprende sustancias que activan las PBMC e inducen la proliferación de las PBMC o subconjuntos de las mismas. Estas sustancias incluyen PHA, LPS, etc.

Según una realización preferida de la presente invención, el estado inflamatorio se selecciona del grupo de enfermedades de mamíferos que están relacionadas con hipoxia e inflamación de órganos finales funcionales.

Según una realización particularmente preferida de la presente invención, el estado inflamatorio interno, preferiblemente el estado interno asociado con isquemia, se selecciona del grupo que consiste en isquemia miocárdica, isquemia de las extremidades, isquemia tisular, lesión por isquemia-reperusión, angina de pecho, arteriopatía coronaria, enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, traumatismo, enfermedad intestinal, infarto mesentérico, infarto pulmonar, fractura ósea, regeneración tisular tras injerto dental, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades reumáticas, aloinjerto para trasplante y rechazo de aloinjerto.

El subconjunto de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) es preferiblemente células T, células B o células NK. Naturalmente también es posible usar combinaciones de estas células: células T y células B; células T y células NK; células B y células NK; células T, células B y células NK. Se conocen métodos para proporcionar y aislar dichas células.

Sorprendentemente resultó que las PBMC de la presente invención pueden cultivarse en cualquier clase de disolución siempre que dicha disolución no comprenda sustancias que no son farmacéuticamente aceptables, que conduzcan a una muerte inmediata de las PBMC, que activen las PBMC y que estimulen la proliferación de las PBMC (tal como se definió anteriormente). Por tanto, la disolución que va a usarse presenta al menos propiedades osmóticas que no conducen a lisis de las PBMC. La disolución fisiológica es preferiblemente una disolución de sal fisiológica, preferiblemente una disolución de NaCl fisiológica, sangre completa, una fracción sanguínea, preferiblemente suero, o un medio de cultivo celular.

El medio de cultivo celular se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en RPMI, DMEM, X-vivo y Ultraculture.

Las células de la presente invención se cultivan en condiciones de inducción de estrés.

El término "en condiciones de inducción de estrés", tal como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de cultivo que conducen a células sometidas a estrés. Condiciones que producen estrés en las células incluyen entre otros calor, productos químicos, radiación, hipoxia, presión osmótica (es decir condiciones osmóticas no fisiológicas), etc.

El estrés adicional en las células de la presente invención conduce a un aumento adicional de la expresión y secreción de sustancias beneficiosas para tratar estados inflamatorios internos, preferiblemente estados internos asociados con isquemia.

Según la presente invención las condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor (por ejemplo más de 2°C, preferiblemente más de 5°C, más preferiblemente más de 10°C, mayor que la temperatura de cultivo óptima de las PBMC, es decir 37°C), radiación (por ejemplo radiación UV, radiación gamma), productos químicos, presión osmótica (es decir condiciones osmóticas que están elevadas al menos un 10% en comparación con las condiciones osmóticas que se producen regularmente en un fluido corporal, en particular en la sangre), cambio de pH o combinaciones de los mismos.

Si se usa radiación para someter a estrés las PBMC de la presente invención, las células se irradian preferiblemente con al menos 10 Gy, preferiblemente al menos 20 Gy, más preferiblemente al menos 40 Gy, por lo cual se usa preferiblemente como fuente el cesio Cs-137.

Según una realización preferida de la presente invención, las PBMC no activadas se cultivan en un medio durante al menos 4 h, preferiblemente durante al menos 6 h, más preferiblemente durante al menos 12 h.

La preparación farmacéutica según la presente invención puede administrarse de varias formas dependiendo del estado que vaya a tratarse. Por tanto, dicha preparación está adaptada preferiblemente para administración subcutánea, administración intramuscular, administración intraórgano (por ejemplo administración intramiocárdica) y administración intravenosa.

Una preparación farmacéutica según la presente invención puede comprender excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes, estabilizadores, portadores, etc. Dependiendo de la vía administración, la preparación según la presente invención se proporciona en una forma de dosificación respectiva: inyección disolución, etc. El experto en la técnica conoce bien métodos para preparar la misma.

Con el fin de aumentar la vida útil de almacenamiento de la preparación según la presente invención, la disolución a) o el sobrenadante b) se liofiliza. El experto en la técnica conoce bien métodos para liofilizar tales preparaciones.

Antes de su uso, la preparación liofilizada puede ponerse en contacto con agua o una disolución acuosa que comprende tampones, estabilizadores, sales, etc.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar una preparación farmacéutica tal como se da a conocer en el presente documento que comprende las etapas de

a) cultivar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en una disolución fisiológica libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC durante al menos 4 h,

b) aislar las células de la etapa a) y el sobrenadante de las mismas o el sobrenadante de las mismas, y

c) preparar la preparación farmacéutica usando las células y el sobrenadante de la etapa b) o el sobrenadante de la etapa b), en el que las células se someten a condiciones de inducción de estrés antes o en el transcurso de la etapa a), en el que dichas condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, cambio de pH o combinaciones de los mismos.

La preparación según la presente invención puede obtenerse incubando o cultivando PBMC en una disolución fisiológica durante al menos 4 h, preferiblemente al menos 8 h, más preferiblemente al menos 12 h. En el transcurso de esta etapa, las PBMC comienzan a sintetizar y secretar sustancias que son útiles en el tratamiento de estados inflamatorios internos. Antes, después y en el transcurso de la etapa de cultivo, las células no se activan añadiendo sustancias de activación de PBMC como PHA o LPS. Tras la etapa de cultivo, se aíslan las células y/o el sobrenadante del cultivo que va a usarse adicionalmente en la preparación de la preparación farmacéutica final. Tal como se comentó anteriormente, la preparación farmacéutica puede comprender PBMC cultivadas, el sobrenadante del cultivo en el que se habían incubado dichas células o tanto las PBMC cultivadas como el medio de cultivo.

Según la presente invención, las células se someten a condiciones de inducción de estrés antes o en el transcurso de la etapa a), en la que dichas condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica (por ejemplo inducida por la adición de sal, en particular NaCl, con el fin de

obtener una presión osmótica mayor que en la sangre), cambio de pH (es decir variación de pH añadiendo ácidos o hidróxidos para obtener un valor de pH de 6,5 a 7,2 o de 7,5 a 8,0) o combinaciones de los mismos.

5 Según una realización preferida de la presente invención, las células se irradian antes o en el transcurso de la etapa a) con al menos 10 Gy, preferiblemente al menos 20 Gy, más preferiblemente al menos 40 Gy, con ozono, con temperatura elevada o con radiación UV.

10 En una realización preferida de la presente invención, la preparación farmacéutica comprende al menos 500, preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos  $10^5$ , incluso más preferiblemente al menos  $10^6$  PBMC por ml que pueden obtenerse mediante un método tal como se explicó resumidamente antes. De manera correspondiente, se administran al menos 500, preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos  $10^5$ , incluso más preferiblemente al menos  $10^6$ , PBMC a un individuo que va a tratarse.

15 La figura 1 muestra: (a) el protocolo de estudio y los puntos de tiempo de evaluación de la función cardiaca mediante ecocardiografía, histología e inmunohistología; (b) el porcentaje de PBMC de rata irradiadas y no irradiadas teñidas positivamente para anexina tras un periodo de cultivo de 18 h.

20 Figura 2 (a): El análisis de FACS muestra que la irradiación conduce a inducción de apoptosis en PBMC humanas con un aumento dependiente del tiempo de la expresión de anexina a lo largo de 48 h. (b) La coincubación de monocitos o PBMC estimuladas con LPS con PBMC autólogos apoptóticos irradiados demuestra una secreción reducida de la citocina IL-[beta] proinflamatoria de manera dependiente de la dosis, (c) en menor medida este hallazgo también se correlaciona con el perfil de secreción de IL-6 de monocitos y PBMC estimuladas con LPS en presencia de IA-PBMC. (d) La adición de IA-PBMC autólogas en una reacción mixta de linfocitos con estimulación con LPS disminuye la proliferación de células T tal como se mide mediante cuentas por minuto (cpm). (e) El análisis de la expresión de ARN mediante RT-PCR de transcritos de VEGF, IL-8/CXCL8 y MMP muestra una regulación por incremento de IL-8/CXCL8 y especialmente MMP9 en PBMC irradiadas tras un periodo de cultivo de 24 h. (f) El análisis de ELISA de VEGF, IL-8/CXCL8 y MMP9 demuestra que MMP9 se encuentra predominantemente en lisados celulares mientras que permanecen diferencias en la secreción de proteínas VEGF e IL-8/CXCL8 aproximadamente al mismo nivel tanto en células viables como en IA-PBMC. (g) Los fibroblastos humanos incubados en sobrenadantes obtenidos de cultivos celulares de IA-PBMC o viables presentan una fuerte regulación por incremento de transcritos de VEGF, IL-8/CXCL8 y MMP9 en el análisis de RT-PCR, encontrándose valores máximos en fibroblastos incubados en sobrenadantes de IA-PBMC.

35 Figura 3 (a, b, c): Se encontraron predominantemente PBMC singénicas marcadas con CFSE administradas a través de la vena de la cola en ratas tras infarto de miocardio artificial en el bazo (b), en menor medida en el hígado (a) y no se encontraron células en el corazón infartado (c). (d, e, f): Las zonas de infarto teñidas con HE de ratas a las que se inyectó o bien medio (d) o bien PBMC viables (e) muestran un patrón comparable de miocardio isquémico infiltrado por células inmunitarias; los tejidos obtenidos de ratas que recibieron IA-PBMC indican infiltraciones muy densas. (g, h, i): Las ratas tratadas con células viables (h) revelan ligeramente más células teñidas con CD68+ en las ratas infartadas que en las ratas tratadas con medio (g), pero se detectó una cantidad 3 veces superior de CD68+ en animales a los que se inyectó IA-PBMC. (j, k, 1): Se encontraron niveles superiores de células S100β+ en ratas que recibieron medio solo en comparación con la aplicación de IA-PBMC o PBMC viables.

45 Figura 4 (a, b, c): Se detectaron cantidades casi 4 veces superiores de tinción positiva de células para VEGF en tejido miocárdico infartado obtenido de animales a los que se inyectó IA-PCMC (c), en comparación con medio (a) o tratamiento con células viables (b). (d, e, f): Se encontró un patrón de expresión similar para el receptor de VEGF, KDR/FLK1, con valores máximos en el grupo de IA-PBMC (f) en comparación con medio (d) y células viables (e). (g, h, i): No se detectaron diferencias para CD34 en los tres grupos. (j, k, 1) El análisis inmunohistológico para el marcador ckit en corazones infartados muestra una alta cantidad de células teñidas positivamente y localización densa en ratas a las que se inyectó IA-PBMC (1) y menos células en animales que recibieron medio (j) y células viables (k).

50 Figura 5 (a, b, c): En el análisis histológico de corazones de rata isquémicos explantados 6 semanas tras la inducción de infarto de miocardio (tinción elástica de van Gieson), los corazones de animales a los que se inyectó medio (a) aparecen más dilatados y muestran una mayor extensión de tejido fibrótico, la extensión de la cicatriz estaba reducida en ratas a las que se inyectaron células viables (b) con menos signos de dilataciones, la menor cantidad de formación de tejido cicatricial se detectó en animales a los que se inyectaron IA-PBMC (c). (d) El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir del análisis planimétrico de muestras recogidas 6 semanas tras la ligación de LAD muestra una extensión de cicatriz media del  $24,95\pm 3,6$  en medio, del  $14,3\pm 1,3$  en PBMC viables y del  $5,8\pm 2$  en animales a los que se inyectó IA-PBMC (media + EEM). (e, f, g): La evaluación de los parámetros de función cardiaca fracción de acortamiento, fracción de eyección y diámetro sistólico final mediante ecocardiografía evidencia una mejor recuperación tras infarto de miocardio en animales a los que se inyectó IA-PBMC.

65 La figura 6a muestra que ni IA-PBMC ni PBMC viables no estimuladas secretan la citocina proinflamatoria derivada principalmente de monocitos, TNF-α. (Las significancias se indican tal como sigue: \* p=0,05, \*\* p=0,001; n=8). La

figura 6b demuestra una fuerte inducción de la secreción de interferón- $\gamma$  y proinflamatorio tras la activación en comparación con PBMC no estimuladas. (Las significancias se indican tal como sigue: \*  $p=0,05$ , \*\*  $p=0,001$ ;  $n=8$ ).

5 La figura 7a muestra resultados reunidos de análisis de citometría de flujo. Las PBMC se separaron de células T y se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25. (Las significancias se indican tal como sigue: \*  $p=0,05$ , \*\*  $p=0,001$ ;  $n=4$ ). La figura 7b muestra un análisis de FACS representativo de PBMC también activadas (PHA, AcM anti-CD3). La separación representa el % de células positivas.

10 La figura 8 muestra altas tasas de proliferación medidas mediante la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina de PBMC estimuladas cuando se comparan con PBMC viables cultivadas en RPMI sin estimulación.

La figura 9 muestra la inhibición de la respuesta de células T de secretomas de PBMC en ensayos de proliferación de células T.

15 La figura 10 (a-f) muestra los niveles en sobrenadante de interleucina-8, Gro- $\alpha$ , ENA-78, ICAM-1, VEGF e interleucina-16. Las PBMC apoptóticas muestran un patrón de secreción marcadamente diferente de estas citocinas y quimiocinas relacionadas con angiogénesis e inmunosupresión en comparación con células viables. Este efecto fue incluso más pronunciado cuando las células se incubaron a altas densidades.

20 La figura 11 muestra la extensión de tejido cicatricial miocárdico 6 semanas tras la ligación de LAD experimental (como % del ventrículo izquierdo). Los animales a los que se infundieron sobrenadantes de cultivo celular derivados de células apoptóticas evidencian una reducción significativa de la deposición de colágeno, menos extensión de la cicatriz y miocardio más viable.

25 La figura 12 (a-c) muestra el aspecto macroscópico de corazones de rata explantados 6 semanas tras infarto de miocardio experimental. Los animales a los que se transfundieron sobrenadantes de células apoptóticas irradiadas (c) evidenciaron deposición de colágeno reducida y zonas infartadas mucho más pequeñas en comparación con medio (a) o sobrenadantes de células viables (b). El tejido cicatricial se tiñó de verde para una mejor visualización.

30 La figura 13 (a-d) muestra análisis ecocardiográficos representativos (modo M). La función cardiaca fue significativamente mejor en ratas a las que se transfundieron sobrenadantes de IA-PBMC (c) en comparación con ratas tratadas con medio (a) y células viables (b). La obtención de imágenes ecocardiográficas de una rata operada de manera simulada se representa en (d).

35 La figura 14 (a, b) muestra análisis ecocardiográficos realizados 6 semanas tras el infarto de miocardio. Las ratas sometidas a terapia con sobrenadantes de PBMC apoptóticas irradiadas evidencian una función cardiaca significativamente mejor en comparación con los animales a los que se infundió medio o sobrenadante de cultivo de células viables.

40 La figura 15 muestra la curva de supervivencia de Kaplan-Meier para los cuatro grupos de tratamiento. Los animales a los que se infundieron sobrenadantes de cultivo de células PBMC tanto viables como apoptóticas evidencian una mejor supervivencia en comparación con ratas inyectadas con medio. ( $p<0,1$ ).

La figura 16 muestra experimentos de estimulación con anticuerpo anti-CD3 y PHA realizados con PBMC.

45 La figura 17 muestra la proliferación de PBMC tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3, PHA y linfocitos mixtos.

La figura 18 muestra el nivel de positividad para anexina V y PI del sobrenadante de células CD4+ incubadas con sobrenadantes de PBMC.

50 La figura 19 muestra la inhibición de la regulación por incremento de CD25 y CD69 en células CD4+ por el sobrenadante de PBMC.

La figura 20 muestra que la retirada de IL-10 y TGF- $\beta$  no aumentó las tasas de proliferación de las células CD4+.

55 **Ejemplos:**

EJEMPLO 1:

60 El infarto de miocardio agudo (AMI) a menudo conduce a insuficiencia cardiaca congestiva. Pese a la revascularización farmacológica y mecánica actual, no se ha definido experimentalmente ninguna terapia eficaz para sustituir el miocardio infartado. Componentes integrales del proceso de remodelación tras AMI son la respuesta inflamatoria y el desarrollo de neoangiogénesis tras AMI. Estos procesos están mediados por citocinas y células inflamatorias en el miocardio infartado que fagocitan tejido apoptótico y necrótico e inician la migración de células dendríticas intersticiales (IDC) y macrófagos. Los ensayos clínicos dirigidos a atenuar la respuesta inflamatoria inducida por AMI se abandonaron puesto que la supresión inmunitaria sistémica (esteroides) conducía a un tamaño

65

de infarto aumentado y a la curación miocárdica retardada. A partir de estos datos, se concluyó que la respuesta inflamatoria tras AMI es responsable de la estabilización tisular y la formación de cicatriz. Surgió un nuevo campo en la medicina cardiovascular regenerativa cuando los investigadores observaron que células madre distantes detectan sitios de daño y promueven la reparación estructural y funcional. Utilizando este enfoque, Orlic *et al.* inyectaron células progenitoras endoteliales (EPC) positivas para c-kit en la zona interna de AMI experimental y aumentaron la neoangiogénesis y la regeneración de estructuras miocárdicas y vasculares. Este trabajo provocó una multitud de publicaciones que demostraban un potencial regenerativo de la "terapia basada en células", sin embargo todavía sigue siendo esquivo si este efecto terapéutico está producido por las propias células trasplantadas, por el reclutamiento de células madre cardíacas residentes o por la activación de mecanismos paracrinos e inmunológicos hasta ahora no identificados. La isquemia en el miocardio infartado produce procesos apoptóticos e inicia alteraciones de los lípidos de la superficie celular en células que están muriendo. La modificación mejor caracterizada es la pérdida de asimetría de fosfolípidos y la exposición de fosfatidilserina (PS). Estas PS se reconocen por los macrófagos y las células dendríticas (células presentadoras de antígenos, APC) a través de ligandos tales como trombospondina, CD14 y CD36. En condiciones fisiológicas, estos receptores sirven para destruir desechos apoptóticos y necróticos e iniciar un proceso de "limpieza" silencioso. Este proceso de fagocitosis mediante APC conduce a una respuesta antiinflamatoria fenotípica tal como se determina por la producción aumentada de IL-10 y TGF- $\beta$  y la función afectada de APC. De relevancia clínica son los informes que demuestran que la infusión de células apoptóticas, en un modelo de trasplante de células hematopoyéticas (HC), conduce a injerto de HC alogénicas y a un retraso de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) aguda. Además, en modelos de trasplante de órganos sólidos, la infusión de células apoptóticas del donante aumentó la supervivencia del injerto de corazón. A diferencia de la inflamación y relevante para el reclutamiento de células progenitoras procedentes de la médula ósea (BM), se mostró que la opsonización de células apoptóticas provoca la producción potenciada de VEGF y CXCR8/IL-8 de APC. Además de estas últimas citocinas, también se identificó que MMP9 era vital para el reclutamiento de EPC y la liberación de la médula ósea.

El actual "status quo" en el tratamiento de AMI se dirige hacia la reperfusión temprana y la reapertura de la arteria coronaria con oclusión aguda y esa inflamación miocárdica tras el infarto se considera beneficiosa pese a que este estado aumenta el daño miocárdico y contrarresta los mecanismos de reparación endógenos.

### Material y métodos

#### *Inducción de apoptosis de PBMC y generación de sobrenadantes*

Para los experimentos *in vivo*, se extrajo sangre de voluntarios jóvenes sanos. Se indujo apoptosis mediante irradiación con cesio Cs-137 con 60 Gy (PBMC humanas) o con 45 Gy para experimentos *in vivo* (PBMC de rata). Se resuspendieron las células en medio de Ultraculture libre de suero (Cambrex Corp., EE.UU.) que contenía sulfato de gentamicina al 0,2% (Sigma Chemical Co, EE.UU.),  $\beta$ -mercaptoetanol al 0,5% (Sigma, EE.UU.), L-glutamina al 1% (Sigma, EE.UU.) y se cultivaron en una atmósfera humidificada durante 24 h para los experimentos *in vitro* (concentración de células,  $1 \times 10^6$  ml). La inducción de apoptosis se midió mediante cotinción con anexina V-fluoresceína/ioduro de propidio (FITC/PI) (Becton Dickinson, EE.UU.) en un citómetro de flujo. Se determinó que la positividad para anexina de PBMC era >70% y en consecuencia se denominaron IA-PBMC. PBMC no irradiadas sirvieron como controles y se denominaron PBMC viables. Se recogieron los sobrenadantes de ambos entornos experimentales y sirvieron como entidades experimentales tal como se describe a continuación (SN-PBMC viables, SN-IA-PBMC).

#### *Experimentos de estimulación con LPS*

Se separaron PBMC y monocitos humanos (pureza >95%) usando un sistema de perlas magnéticas (selección negativa Miltenyi Biotec, EE.UU.). Se cocubaron las PBMC y los monocitos durante 4 h con diferentes concentraciones de PBMC autólogas apoptóticas (positividad para anexina >70%) y lipopolisacárido (LPS 1 ng/ml; Sigma Chemical Co, EE.UU.). Se estabilizaron los sobrenadantes y se mantuvieron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta las pruebas adicionales. Se determinó la liberación de IL-6 e IL-1 $\beta$  usando kits de ELISA disponibles comercialmente (BenderMedSystems, Austria).

#### *Preparación de DC derivadas de monocitos y estimulación de células T*

Se aislaron PBMC de sangre completa heparinizada de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad convencional de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia). Se separaron las células T y los monocitos mediante clasificación magnética usando la técnica de MACS (Miltenyi Biotec). Se obtuvieron células T purificadas a través de depleción negativa de CD11b, CD14, CD16, CD19, CD33 y células positivas para MHC de clase II con el anticuerpo monoclonal respectivo. Se enriquecieron los monocitos usando el AcM frente a CD14 biotinilado, VIM13 (pureza del 95%). Se generaron DC cultivando monocitos de sangre purificados durante 7 días con una combinación de GP4-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (100 U/ml). Posteriormente, se estimularon de manera diferenciada las DC. Se indujo la maduración o bien añadiendo LPS 100 ng/ml de *Escherichia coli* (serotipo 0127-B8, Sigma Chemie) durante 24 h solo o bien añadiendo LPS durante 2 h y cultivando además las células dendríticas con células apoptóticas en una razón 1:1 durante 22 h. Adicionalmente, se trataron las DC con células apoptóticas solas



(1:1) durante 24 h. Para la reacción mixta de leucocitos (MLR), se incubaron células T purificadas alogénicas ( $1 \times 10^5$ /pocillo) en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Corning Costar) con números escalonados de DC estimuladas de manera diferente durante 6 días. Se realizó el ensayo por triplicado. Se monitorizó la proliferación de células T midiendo la incorporación de [metil-3H]timidina (ICN Pharmaceuticals), añadida tras 5 días. Se recogieron las células tras 18 h y se detectó la [metil-3H]timidina incorporada en un contador de centelleo de microplaca.

#### *Cultivo celular, aislamiento de ARN y preparación de ADNc de PBMC viables, IA-PBMC y fibroblastos expuestos a SN*

Se investigaron IA-PBMC, PBMC viables ( $1 \times 10^6$  células, ambas condiciones cultivadas durante 24 h en medio Ultraculture) y fibroblastos expuestos a SN-PBMC viables/SN-IA-PBMC (se cultivaron  $1 \times 10^5$  fibroblastos obtenidos de Cascade Inc. (EE.UU.) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco BRL, EE.UU.) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, PAA, Austria), L-glutamina 25 mM (Gibco, BRL, EE.UU.) y penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco) y se sembraron en placas de 12 pocillos; se coincubaron fibroblastos con SN-PBMC viables, SN-IA-PBMC durante 4 y 24 h, respectivamente). Tras la extracción del ARN de PBMC y fibroblastos (usando RNeasy, QiAGEN, Austria) siguiendo las instrucciones del fabricante, se transcribieron los ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad, EE.UU.) tal como se indica en el manual de instrucciones.

#### *PCR cuantitativa en tiempo real*

Se cuantificó la expresión de ARNm mediante PCR en tiempo real con LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) según el protocolo del fabricante. Los cebadores para VEGF fueron: directo: 5'-CCCTGATGAGATCGAGTACATCTT-3', inverso: 5'-ACCGCCTCGGCTTGTCAC-3'; para IL-8 directo: 5'-CTCTTGGCAGCCTTCCTGATT-3', inverso: 5'-TATGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCA-3'; para MMP9 directo: 5'-GGGAAGATGCTGGTGTTC-3', inverso: 5'-CCTGGCAGAAATAGGCTTC-3' y para  $\beta$ -2-microglobulina  $\beta$  2 M, directo: 5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3', inverso: 5'-CAATCCAAATGCGGCATCT-3'. Se calculó la expresión relativa de los genes diana mediante comparación con el gen de mantenimiento  $\beta$ 2M usando una fórmula descrita por Wellmann *et al.* (Clinical Chemistry. 47 (2001) 654-660, 25). Se determinaron las eficacias de los pares de cebador tal como se describe (A. Kadl, *et al.* Vascular Pharmacology. 38 (2002) 219-227).

#### *Liberación de factores de proangiogénicos y MMP9 mediante PBMC viables e IA-PBMC tras el cultivo*

Se incubaron IA-PBMC ( $5 \times 10^5$ ) y PBMC viables en una atmósfera humidificada durante 24 h. Se recogieron los sobrenadantes tras 24 h y se congelaron inmediatamente a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su evaluación. Los lisados de las células respectivas sirvieron como controles. Se analizó la liberación de factores proangiogénicos (VEGF-A, CXCL-8/IL-8, GM-CSF, G-CSF) y MMP9, un factor de liberación aceptado de células c-kit, utilizando ELISA (R&D, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se leyeron las placas a 450 nm en un contador Wallac Multilabel (Perkin-Elmer, EE.UU.).

#### *Adquisición de PBMC viables e IA-PBMC singénicas para experimento de AMI in vivo*

Se separaron PBMC de rata singénicas para experimentos *in vivo* mediante centrifugación en gradiente de densidad de sangre completa obtenida de ratas previamente heparinizadas mediante punción del corazón. Se indujo apoptosis mediante irradiación con cesio Cs-137 con 45 Gy para los experimentos *in vivo* y se cultivaron durante 18 h tal como se describió anteriormente. (Tinción con anexina  $>80\%$  de IA-PBMC, tinción con anexina  $<30\%$  de PBMC viables,  $1 \times 10^6$ /ml).

#### *Inducción de infarto de miocardio*

Se indujo infarto de miocardio en ratas Sprague-Dawley macho adultas ligando la LAD tal como se describió anteriormente (Trescher K, *et al.* Cardiovasc Res. 2006; 69(3): 746-54). En resumen, se anestesió a los animales por vía intraperitoneal con una mezcla de xilazina (1 mg/100 g de peso corporal) y ketamina (10 mg/100 g de peso corporal) y se ventilaron mecánicamente. Se realizó una toracotomía lateral izquierda y se colocó una ligadura usando Prolene 6-0 alrededor de la LAD por debajo de la aurícula izquierda. Inmediatamente tras el comienzo de la isquemia, se infundieron  $8 \times 10^6$  PBMC apoptóticas suspendidas en 0,3 ml de medio de cultivo celular a través de la vena de la cola. La infusión de medio de cultivo celular solo, PBMC viables y la operación simulada, respectivamente, sirvieron en este entorno experimental como control negativo. El diseño experimental con ratas se muestra en la figura 1 (figura 1a, b).

#### *Seguimiento de células apoptóticas*

Se marcaron  $8 \times 10^6$  PBMC singénicas de rata con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE, Fluka Bio-Chemika, Buchs, Suiza)  $15 \mu\text{M}$  a temperatura ambiente durante 10 min. Se detuvo el marcaje mediante la adición de suero bovino fetal (FCS). Se indujo apoptosis (anexina V  $>70\%$ ) y se inyectaron las células tras el procedimiento de ligación. 72 h tras la operación se sacrificaron las ratas y se procesaron el hígado, el bazo y el corazón siguiendo un procedimiento convencional para secciones congeladas ( $n=4$ ). Se analizaron las muestras

mediante microscopía de barrido láser confocal (microscopio de barrido láser ZEISS LSM 510, Alemania) tal como se describió anteriormente (Ker-jaschki D, J Am Soc Nephrol. 2004; 15: 603-12).

#### *Histología e inmunohistoquímica in vivo*

5 Se sacrificaron todos los animales o bien a las 72 h o bien a las 6 semanas tras el infarto experimental. Se explantaron los corazones y luego se cortaron a nivel de la extensión más larga de la zona infartada (n=8-10). Se fijaron los cortes con formalina tamponada neutra al 10% y se incluyeron en parafina para la tinción (inmuno)histológica. Se tiñeron las muestras de tejido con hematoxilina-eosina (H&E) y elástica de van Gieson (evg).  
 10 Se realizó la evaluación inmunohistológica usando los siguientes anticuerpos dirigidos a CD68 (MCA 341R, AbD Serotec, RU), VEGF (05-443, Upstate/Milipore, EE.UU.), Flk-1 (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), CD34 (sc-52478, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), c-kit (sc-168, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), S100 beta (sc-58841, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.). Se evaluaron las muestras de tejido en un microscopio Olympus Vanox AHB3 (Olympus Vanox AHB3, Olympus Optical Co. Ltd., Japón) a 200x aumentos y se capturaron digitalmente  
 15 usando una cámara ProgRes Capture-Pro C12 plus (Jenoptik Laser Optik Systeme GmbH, Alemania).

#### *Determinación del tamaño de infarto de miocardio mediante planimetría*

20 Con el fin de determinar el tamaño de la zona infartada, se usó el software de planimetría Image J (Rasband, W.S., Image J, U. S. National Institutes of Health, EE.UU.). Se calculó el grado de tejido miocárdico infartado (% de ventrículo izquierdo) dividiendo el área de la circunferencia de la zona infartada entre las áreas de la circunferencia endocárdica y epicárdica totales del ventrículo izquierdo. Se llevó a cabo la evaluación planimétrica en muestras de tejido teñidas con evg para una mejor comparación de las zonas necróticas. El tamaño de infarto se expresó como el porcentaje del área del ventrículo izquierdo total.

25 *Evaluación de la función cardíaca mediante ecocardiografía*

Seis semanas tras la inducción de infarto de miocardio, se anestesiaron las ratas con ketamina 100 mg/kg y xilazina 20 mg/kg. Se realizó el examen sonográfico en un sistema Vivid 5 (General Electric Medical Systems, EE.UU.). Un observador experimentado ciego para los grupos de tratamiento a los que se habían asignado los animales (EW) realizó los análisis. Se registraron los trazados del modo M a partir de una vista del eje corto paraesternal y se obtuvieron los parámetros funcionales sistólicos y diastólicos. Se evaluaron los diámetros y volúmenes ventriculares en sístole y diástole. Se calculó el acortamiento fraccional tal como sigue:  $FS(\%) = ((LVEDD - LVESD) / LVEDD) * 100\%$ .

35 *Métodos estadísticos*

Se realizó el análisis estadístico usando el software SPSS (SPSS Inc., EE.UU.). Todos los datos se obtuvieron como la media  $\pm$  error estándar de la media. Se verificó la distribución normal usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizaron pruebas de la t bilaterales para datos emparejados para variables dependientes, pruebas de la t de datos no emparejados para variables independientes calculando las significaciones. Se usó la corrección de Bonferroni-Holm para ajustar los valores de p para pruebas múltiples. Valores de P < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

#### 45 Resultados

##### *Inducción de apoptosis con irradiación con cesio (IA-PBMC)*

50 Con el fin de evaluar el potencial inmunomodulador de las células apoptóticas, se determinó en primer lugar la respuesta celular a la inducción de apoptosis por irradiación con cesio de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas mediante citometría de flujo utilizando tinción con anexina-V/PI en un citómetro de flujo. La irradiación produjo positividad para anexina en PBMC de manera dependiente del tiempo y tuvo un máximo a las 24 h en comparación con PBMC viables. Las células viables sirvieron como controles (figura 2a). Puesto que la unión de anexina-V fue la más alta tras 24 h, todas las investigaciones *in vitro* adicionales se realizaron tras este periodo de cultivo (IA-PBMC). Las PBMC viables sirvieron en los experimentos de RT-PCR y de sobrenadante como control.

##### *Las IA-PBMC evidencian características de supresión inmunitaria in vitro*

60 La interleucina-1 $\beta$  e IL-6 se reconoce como el mediador proinflamatorio predominante en el infarto de miocardio *in vivo*. Para someter a prueba la hipótesis de que IA-PBMC tienen un efecto sobre la respuesta celular, se coincubaron PBMC y monocitos humanos con IA-PBMC y se estimularon las células diana con LPS. Se encontró una disminución dependiente de la dosis en la secreción de IL- $\beta$  e IL-6 en cultivos de ambos tipos de células tal como se evaluó mediante ELISA (figura 2b, c). Para verificar los efectos anti-proliferativos de IA-PBMC en un modelo alogénico, se utilizó una reacción mixta de linfocitos (MLR). Se utilizaron células T purificadas alogénicas y estas células efectoras se incubaron con dosis escalonadas de células dendríticas con/sin adición de IA-PBMC. La

figura 2d evidencia que la coincubación de IA-PBMC disminuye la tasa de proliferación de una manera dependiente de la dosis.

*IA-PBMC y PBMC viables evidencian transcripción aumentada de ARNm de VEGF, IL-8/CXCL8 y MUMP9*

Para confirmar si la irradiación conduce a transcripción potenciada de ARNm de proteínas que se sabe que están relacionadas con la movilización de EPC, se analizaron PBMC tras la separación, y tras la inducción de apoptosis (24 h). PBMC viables sirvieron como control (PBMC viables o IA-PBMC). La transcripción del ARN mostró poca diferencia de expresión de VEGF tal como se determinó mediante RT-PCR, aunque una fuerte potenciación de IL-8/CXCL8 y MMP9. La inducción de pico para IL-8/CXCL8 en IA-PBMC fue de 6 veces frente a 2 veces en células viables, y de 30 veces frente a 5 veces para MMP9, respectivamente (figura 2e).

*IA-PBMC y PBMC viables secretan factores paracrinos que producen la liberación de células progenitoras endoteliales (EPC)*

Se cuantificó el SN derivado de IA-PBMC y PBMC viables para determinar VEGF, IL-8/CXCL8, GM-CSF, G-CSF y MMP9 utilizando ELISA tras el cultivo de 24 h. Tal como se observa en la figura 2f, VEGF, IL-8/CXCL8 y MMP9 evidenciaron un incremento. GM-CSF y G-CSF no fueron detectables. De interés fue el hallazgo de que MMP9 evidenció valores máximos en lisados celulares.

*SN derivado de IA-PBMC y PBMC viables aumentan la transcripción de ARNm proangiogénico en fibroblastos mesenquimatosos*

Puesto que las células estromales en la médula ósea son constitutivamente fibroblastos, se buscó investigar si la coincubación de fibroblastos con SN derivado de IA-PBMC y PBMC viables tenía capacidad para aumentar la transcripción de ARNm de VEGF, IL-8/CXCL8 y MMP9, factores responsables de la movilización de EPC. Se realizó RT-PCR a las 4 y las 24 h. Los niveles más altos de inducción se detectaron para IL-8/CXCL8 en células cultivadas en SN de IA-PBMC, alcanzando una inducción de casi 120 veces a las 4 h en comparación con el control. Esta respuesta también está presente a las 24 h. Se encontró una respuesta comparable para VEGF, mientras que se encontró predominantemente regulación por incremento de MMP9 tras 24 h. Estos datos indican que el SN contiene factores paracrinos que potencian que los fibroblastos aumenten los productos de ARNm responsables de los efectos proangiogénicos en la BM (figura 2g).

*Transferencia adoptiva de IA-PBMC marcadas con CFSE en un modelo de infarto de miocardio de rata*

Puesto que pudo demostrarse que las IA-PBMC cultivadas son tanto antiinflamatorias como proangiogénicas, se infundieron PBMC viables e IA-PBMC *in vitro* en un modelo de AMI agudo de rata. En primer lugar, se buscó determinar si estas células cultivadas migran tras el infarto. Se inyectaron IA-PBMC marcadas con CFSE en la vena de la cola de la rata poco después de la ligación de la arteria LAD. Una histología representativa se observa en la figura 3a, b, c. La mayoría de las IA-PBMC marcadas con CFSE quedaron atrapadas en tejido de bazo e hígado en el plazo de 72 h. No se observaron células en el corazón.

*Respuesta inmunitaria inflamatoria desviada en AMI tratado con IA-PBMC*

Tras una investigación más detenida en ratas con AMI tratadas con leucocitos viables (PBMC viables) de control de infarto, con tinción con H.E. se evidenció un infiltrado celular mixto en las zonas heridas según el tejido de granulación con abundancia de neutrófilos, macrófagos/monocitos, células linfomononucleares, fibroblastos y células endoteliales en proliferación activadas mezcladas con cardiomiocitos distróficos (figura 3d, e) en el plazo de 72 h tras AMI. En cambio, ratas con AMI tratadas con IA-PBMC evidenciaron un infiltrado monomórfico denso en las zonas heridas que consistió en células monocitoides de tamaño medio con citoplasma eosinófilo, núcleos densos y una morfología con forma de redonda a ahusada (figura 3f). Además, pudieron detectarse pocas células linfomononucleares, especialmente células plasmáticas, fibroblastos y células endoteliales. El análisis inmunohistoquímico reveló que el infiltrado celular en ratas con AMI tratadas con IA-PBMC estaba compuesto por abundantes monocitos/macrófagos CD68+ (figura 3i) que eran mucho más débiles en los otros dos grupos (MCI, PBMC viables, IA-PBMC, campo de alta potencia, HPF,  $60,0 \pm 3,6$ ,  $78,3 \pm 3,8$ ,  $285,0 \pm 23,0$  (EEM), respectivamente) (figura 3g, h). El contenido en células mesenquimatosas positivas para vimentina era similar en todos los grupos mientras que las células dendríticas S100+ se encontraron preferentemente en control de infarto (AMI, PBMC viables, IA-PBMC, HPF  $15,6 \pm 1,7$ ,  $12,4 \pm 2,3$ ,  $8,4 \pm 1,2$  (EEM), respectivamente en comparación con grupos tratados (figura 3j, k, h histología representativa, n=5)).

*Migración temprana de células VEGF+, Flk1+ y c-kit+ en AMI tratado con IA-PBMC*

Puesto que IA-PBMC evidenciaron un infiltrado monomórfico denso en zonas heridas que consistía en células monocitoides de tamaño medio con citoplasma eosinófilo y núcleos densos, se exploraron marcadores de superficie múltiples relacionados con neoangiogénesis y potencia regenerativa. Esta población de células identificada en la tinción con H.E. en el grupo de AMI tratado con IA-PBMC se tiñó de manera altamente positiva para factor de

crecimiento endotelial vascular (VEGFa), Flk-1 y c-kit (CD 117) (figura 4c, f, i). La expresión de ambos marcadores se redujo en el grupo de AMI control y el grupo de AMI tratado con PBMC viables (figura 4a, b, d, e, j). De manera interesante, AMI tratado con IA-PBMC evidenció un aumento de células CD34+ dentro de la zona infartada densamente poblada que se atribuye a la estructura vascular relacionada supuestamente con la colonización de células 34+ (I) en comparación con el control (G, H) (histología representativa, n=5).

#### *Tamaño de infarto atenuado en AMI tratado con IA-PBMC*

En un análisis planimétrico realizado en muestras de tejido teñidas con EVG de corazones explantados 6 semanas tras inducirse infarto de miocardio, las ratas que reciben solución salina muestran una cicatriz colagenosa que se extiende hasta más del 24,95%±3,58 (EEM) del ventrículo izquierdo con signos de dilatación. En ratas tratadas con IA-PBMC estos signos casi se suprimieron con tamaños de infarto del 5,81%±2,02 (EEM) en comparación con el 14,3%±1,7 (EEM) con tratamiento con PBMC viables (figura 5a, b, c).

#### *La función LV mejora en AMI tratado con IA-PBMC*

La aplicación intravenosa de IA-PBMC cultivadas singénicas mejora significativamente los parámetros ecocardiográficos en comparación con animales tratados con PBMC viables o medio de cultivo. La fracción de acortamiento (SF) evidenció valores del 29,16%±4,65 (EEM) en animales operados de manera simulada, del 18,76%±1,13 (EEM) en animales con AMI tratados con medio, del 18,46%±1,67 (EEM) en el grupo de AMI tratado con PBMC viables y del 25,14%±2,66 (EEM) en ratas tratadas con IA-PBMC (figura 5e). La fracción de eyección (EF) era del 60,58%±6,81 (EEM) en ratas operadas de manera simulada y disminuyó hasta el 42,91%±2,14 (EEM) en animales con AMI tratados con medio, y hasta el 42,24%±3,28 (EEM) en animales que recibieron PBMC viables, mientras que ratas tratadas con IA-PBMC evidenciaron una EF del 53,46%±4,25.

El análisis de los diámetros sistólico final y diastólico final (LVESD, LVEDD), los volúmenes sistólico final y diastólico final (LVESV, LVEDV) mostró un patrón comparable a los valores observados anteriormente. Los animales que recibieron solución salina y las ratas tratadas con PBMC viables mostraron valores de LVEDD de 10,43 mm±0,21 (EEM) y 11,03 mm±0,40 respectivamente, las ratas tratadas con IA-PBMC representaron incluso un diámetro diastólico del ventrículo izquierdo ligeramente reducido de 8,99 mm±0,32 en comparación con 9,47 mm±0,64 en animales operados de manera simulada. Las diferencias en los diámetros sistólicos fueron menos pronunciadas, pero en la misma clasificación (panel 5 (a, b, c)).

#### *Conclusión:*

Estos hallazgos demuestran que PBMC apoptótica irradiada (IA-PBMC) induce supresión inmunitaria *in vitro* y está asociada con secreción de proteínas proangiogénicas. Por tanto, se infundieron PBMC viables e IA-PBMC cultivadas en un modelo de AMI de rata agudo y se demostró que este tratamiento provocaba una migración masiva de EPC positivas para FLK1+/ckit+ al miocardio infartado en el plazo de 72 h y provocaba una recuperación funcional significativa en el plazo de 6 semanas.

El cocultivo de IA-PBMC en ensayos inmunitarios dio como resultado una producción de IL-1β e IL-6 reducida y reacción mixta de linfocitos (MLR) dendríticos alogénicos atenuada. Se describió que ambos parámetros inmunitarios tenían un papel en la inflamación tras la isquemia miocárdica. Además, se evidenció que IA-PBMC y viables secretan CXCL8/IL-8 y MMP9 al medio de cultivo en el plazo de 24 h. Se describió que estas proteínas eran responsables de la neoangiogénesis y el reclutamiento de EPC desde la BM hasta el miocardio isquémico. La quimiocina CXCL8/IL-8 pertenece a la familia CXCL que consiste en polipéptidos de unión a heparina pequeños (<10 kDa) que se unen a y que tienen actividad quimiotáctica potente para células endoteliales. Tres residuos de aminoácido en el extremo N-terminal (Glu-Leu-Arg, el motivo ELR) determinan la unión de quimiocinas CXC tales como IL-8 y Gro-alfa a receptores de CXC 1 y 2 en células endoteliales y están promoviendo la quimotaxis y angiogénesis endoteliales. Además, se identificó que la secreción de MMP9 era fundamental en la movilización de EPC puesto que esta proteinasa de la matriz sirve como señal para liberar ligando kit soluble (sKitL), una quimiocina que provoca la transición de células madre endoteliales y hematopoyéticas (EPC) desde el nicho quiescente hasta el proliferativo en la BM. En un ensayo *in vitro* adicional, pudo demostrarse que el sobrenadante (SN) derivado de IA-PBMC y viables tenía la capacidad de potenciar la transcripción de ARNm de CXCL8/IL-8 y MMP9 en fibroblastos mesenquimatosos. Estos datos indican que el SN derivado de PBMC viables e irradiadas contiene factores paracrinos que confieren una situación biológica en la BM que da como resultado la elución de EPC c-kit+ a la circulación.

Con el fin de demostrar cualquier efecto beneficioso de esta suspensión de células de cultivo *in vivo*, se utilizó un modelo de lesión miocárdica a corazón abierto e IA-PBMC y viables cultivadas infundidas poco después de la ligación de LAD en un modelo animal de rata. En un primer intento, se demostró que se atraparon IA-PBMC marcadas con CFSE mayoritariamente en el bazo y el hígado. Estos datos indican que "la terapia basada en células" no se dirige al infarto de miocardio. Por el contrario, es mucho más probable que los efectos paracrinos, o bien mediante medio de cultivo "modificado" solo o bien la "tormenta de citocinas mediada por el sistema inmunitario"

provocada debida a la exposición a la suspensión de cultivo celular sean los causantes del efecto regenerador en AMI. Puesto que la inflamación inmediata tras la isquemia aguda determina la hoja de ruta para la dilatación ventricular, se realizó un análisis histológico tras 72 h tras AMI. Pudo mostrarse que las ratas tratadas con IA-PBMC evidenciaron una migración masiva de poblaciones celulares de EPC positivas para CD68+ y VEGFa/FLK1/c-kit+ dentro de este periodo de tiempo. En cambio, se encontraron más células dendríticas positivas para S100  $\beta$  en AMI control, indicando inflamación basada en APC potenciada en AMI control.

Los resultados observados en ratas tratadas con IA-PBMC frustran parcialmente el conocimiento aceptado actualmente sobre el transcurso natural del infarto de miocardio. Con respecto a la inflamación: en condiciones normales, los procesos de remodelación están mediados por citocinas y células inflamatorias en el miocardio infartado que inician un proceso de reparación de heridas que está marcado por la fagocitosis y reabsorción del tejido necrótico, hipertrofia de los miocitos supervivientes, angiogénesis y, en un grado limitado, proliferación de células progenitoras. Se mostró que cualquier enfoque experimental hasta este punto que intervenía en la respuesta inflamatoria tras el infarto era perjudicial en modelos de AMI. Cuando se interpretan los presentes datos histológicos a corto plazo, se argumenta que la suspensión de medio con células IA-PBMC en AMI da como resultado una transición avanzada desde la inflamación hasta la fase de reparación de EPC c-kit+. El trabajo anterior ha confirmado que la terapia con médula ósea de células progenitoras circulantes tras AMI mejora la función cardíaca, independientemente de si se produce o no la transdiferenciación de las células en cardiomiocitos. Con respecto a EPC c-kit+, se considera que las células derivadas de médula ósea tienen un papel significativo a la vez que indispensable para la reparación cardíaca. La inhibición farmacológica con mesilato de imatinib y la no movilización de EPC ckit+ dio como resultado una respuesta de miofibroblastos atenuada tras AMI con disminución precipitada en la función cardíaca.

Estos resultados muestran la potencia regenerativa de la infusión de IA-PBMC cultivadas "singénicas" en pacientes que padecen AMI e indican que pacientes que padecen AMI agudo se beneficiarían de la transfusión con IA-PBMC autólogas (es decir, del paciente que va a tratarse o de la misma especie).

#### EJEMPLO 2: Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en reposo evidencian baja cantidad de marcadores de activación y producción de citocinas inflamatorias reducida

Se supone que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas y sus sobrenadantes (SN) son beneficiosos en la regeneración de heridas (Holzinger C *et al.* Eur J Vasc Surg. Mayo de 1994; 8(3): 351-6.). En el ejemplo 1 pudo mostrarse que PBMC no activadas y SN derivados de los mismos tienen efectos beneficiosos en un modelo de herida e infarto de miocardio agudo (AMI) experimental. Puesto que la no activación de PBMC tenía que verificarse experimentalmente, se investigó si el cultivo de PBMC conduce a marcadores de activación de células T (CD69, CD25) potenciados o a secreción de citocinas inflamatorias potenciada (activación de monocitos= $\text{TNF}\alpha$ , activación de células T = $\text{INF}\gamma$ ). En un experimento control, se activaron células T cultivadas mediante estimulación con AcM frente a CD3 o fitohemaglutinina (PHA).

#### Métodos y resultados

Se recogió sangre venosa en tubos con EDTA de voluntarios sanos. Tras la separación en gradiente de densidad de Ficoll-Hipaque, se recogieron PBMC y se dividieron en células apoptóticas irradiadas (IA-PBMC) y viables. Para obtener células apoptóticas, se irradiaron PBMC con 60 Gy (cesio-137). Para el análisis de citometría de flujo, se cultivaron 500.000 PBMC en 200  $\mu\text{l}$  de medio libre de suero. Se estimularon las células o bien con PHA (7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o bien con AcM frente a CD3 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o bien se dejaron sin estimular. Tras 24 h de incubación, se lavaron las células, se tiñeron para detectar CD3, CD69 y CD25 (R&D System) y se evaluaron para determinar marcadores de activación de superficie en un instrumento FC500 (Coulter). Para ensayos de ELISA, se cultivaron PBMC durante la noche a una densidad de  $2,5 \times 10^6$  células/ml, o bien con o bien sin estimulación con PHA o CD3. Tras 24 h, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Se adquirieron kits de ELISA disponibles comercialmente para  $\text{TNF-}\alpha$  (R&D) e  $\text{INF-}\gamma$  (Bender). En resumen, se recubrieron placas MaxiSorp con anticuerpos contra  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{INF-}\gamma$  y se almacenaron durante la noche. Tras 24 h, se lavaron las placas y se añadieron muestras por duplicado a cada pocillo. Tras la incubación y adición de un anticuerpo de detección y estreptavidina-HRP, se añadió el sustrato TMB a cada pocillo. Tras el desarrollo de color, se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de ácido sulfúrico. Se leyeron los valores de densidad óptica en un lector de placas Wallac Victor3.

#### Resultados:

Análisis de FACS: las células T estimuladas con CD3 y PHA mostraron una regulación por incremento de los marcadores de activación CD69 y CD25 tras 24 h de incubación. Células apoptóticas y no estimuladas expresaron sólo bajas cantidades de CD69 y CD25 (figura 6a (muestra representativa, figura 6b, histograma,  $n=4$ ). Se indica significación estadística mediante un asterisco ( $xx p<0,001$ ,  $x p<0,05$ ). Análisis de ELISA: mientras que no se detectaron ni  $\text{TNF-}\alpha$  ni  $\text{INF-}\gamma$  en sobrenadantes derivados de PBMC no estimuladas, los sobrenadantes de PBMC estimuladas con PHA o CD3 evidenciaron altos valores para estas citocinas tal como se indica mediante el análisis de ELISA (asterisco \*\*  $p<0,001$ , \*  $p<0,05$ ,  $n=8$ ). Los resultados muestran claramente un patrón de secreción

diferente de citocinas inflamatorias en comparación con PBMC no estimuladas.

Conclusión:

5 Estos datos indican que "PBMC no estimuladas" evidencian un fenotipo diferente distinto (marcador de activación, secreción de citocinas) en comparación con PBMC estimuladas (AcM frente a CD3 y PHA).

La figura 6a indica que ni IA-PBMC ni PBMC viables no estimuladas secretan la citocina proinflamatoria derivada principalmente de monocitos TNF- $\alpha$ . (Las significancias se indican tal como sigue: \* p=0,05, \*\* p=0,001, n=8).

10 La figura 6b demuestra una fuerte inducción de secreción de interferón- $\gamma$  proinflamatorio tras la activación en comparación con PBMC no estimuladas. (Las significancias se indican tal como sigue: \* p=0,05, \*\* p=0,001; n=8).

15 La figura 7a muestra resultados reunidos de análisis de citometría de flujo. Las PBMC se separaron de células T y se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25. (Las significancias se indican tal como sigue: \* p=0,05, \*\* p=0,001; n=4).

20 La figura 7b muestra un análisis de FACS representativo de PBMC también activadas (PHA, AcM anti-CD3). La separación representa el % de células positivas.

EJEMPLO 3: Actividad proliferativa de PBMC cultivadas en una disolución fisiológica

25 El objetivo de este ejemplo es demostrar que las PBMC no tienen actividad proliferativa en comparación con ensayos inmunitarios que utilizan activación con células T específicas (CD3), no específicas (lectina, PHA) y alogénicas (reacción mixta de linfocitos, MLR) en un ensayo de estimulación de 2 días (CD3, PHA) y de 5 días (MLR).

Material y métodos

30 Se separaron PBMC de voluntarios jóvenes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y se resuspendieron en RPMI (Gibco, EE.UU.) que contenía sulfato de gentamicina al 0,2% (Sigma Chemical Co, EE.UU.), L-glutamina al 1% (Sigma, EE.UU.) a  $1 \times 10^5$  células por 200  $\mu$ l. Se estimularon las células que respondían mediante AcM frente a CD3 (10  $\mu$ g/ml, BD, NJ, EE.UU.), PHA (7  $\mu$ l/ml, Sigma Chemical Co, EE.UU.) o con PBMC alogénicas irradiadas a una razón 1:1 (para MLR). Se incubaron las placas durante 48 h o 5 días y luego se pulsaron durante 18 h con 3[H]-timidina ( $3,7 \times 10^4$  Bq/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Se recogieron las células y se midió la incorporación de 3[H]-timidina en un contador de centelleo líquido.

Resultados

40 Las PBMC estimuladas mostraron altas tasas de proliferación medidas mediante la incorporación de 3[H]-timidina cuando se comparan con PBMC viables cultivadas en RPMI sin estimulación (figura 8). Se observó este efecto añadiendo estímulos específicos de células T (PHA, CD3) así como en ensayos en los que la proliferación se activó mediante células presentadoras de antígenos (MLR).

45 Conclusión

Este conjunto de experimentos implica que PBMC viables mantenidas en cultivo durante hasta 5 días no proliferan mientras que PBMC estimuladas de diferentes modos mostraron una respuesta proliferativa marcada. Se concluye que el cultivo de PBMC sin estimulación no conduce a una respuesta proliferativa.

50 EJEMPLO 4: Secretomas de PBMC separadas mantenidas en condiciones de cultivo estériles presentan capacidad neoangiogénica

55 Puesto que la neoangionéisis e inflamación están fuertemente vinculadas *in vivo*, se investigó si estos secretomas de PBMC también presentaban efectos antiproliferativos sobre células T y por tanto interferían con una respuesta inmunitaria inflamatoria.

Material y métodos

60 Se obtuvieron secretomas incubando PBMC ( $2,5 \times 10^6$ /ml) de voluntarios jóvenes sanos separadas mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll durante 24 h en RPMI (Gibco, CA, EE.UU.) que contenía sulfato de gentamicina al 0,2% (Sigma Chemical Co, EE.UU.), L-glutamina al 1% (Sigma, EE.UU.). Se separaron los sobrenadantes de la fracción celular y se almacenaron a -80°C. Para ensayos de proliferación, se resuspendieron PBMC alogénicas a  $1 \times 10^6$  por 200  $\mu$ l de RPMI tras la separación. Se estimularon las células que respondían o bien mediante AcM frente a CD3 (10  $\mu$ g/ml, BD, EE.UU.) o bien mediante PHA (7  $\mu$ l/ml, Sigma Chemical Co, EE.UU.). Se

añadieron diferentes diluciones de sobrenadantes. Se incubaron las placas durante 48 h y luego se pulsaron durante 18 h con 3[H]-timidina ( $3,7 \times 10^4$  Bq/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Se recogieron las células y se midió la incorporación de 3[H]-timidina en un contador de centelleo líquido.

##### 5 Resultados:

Los secretomas de PBMC alogénicas evidenciaron una reducción significativa de las tasas de proliferación medidas mediante la incorporación de 3[H]-timidina cuando se comparan con controles positivos (figura 9). Este efecto era dependiente de la dosis y pudo observarse tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3 así como con PHA.

10

##### Implicación:

Este conjunto de experimentos implica que los secretomas obtenidos a partir de PBMC viables mantenidas en cultivo durante 24 h presentan efectos antiproliferativos significativos *in vitro*. Estos datos indican que el sobrenadante derivado de PBMC o en forma liofilizada puede servir como posible fórmula terapéutica para tratar enfermedades humanas que están relacionadas con inflamación inducida por hipoxia u otras enfermedades hiperinflamatorias (por ejemplo enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias de la piel).

15

##### 20 EJEMPLO 5: Los factores paracrinos secretados por células mononucleares de sangre periférica preservan la función cardíaca

En el ejemplo 1 se mostró que la transfusión de células apoptóticas irradiadas cultivadas derivadas de sangre periférica mejoraba significativamente la recuperación cardíaca funcional tras infarto de miocardio experimental en ratas. Esta mejora se basaba en las características inmunosupresoras de las células apoptóticas, efectos proangiogénicos e inducción de migración aumentada de células progenitoras endoteliales (EPC) c-kit+.

25

En el presente ejemplo se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o bien viables o bien irradiadas con una dosis de 60 Gray durante 24 horas para generar sobrenadantes de cultivo celular condicionados. Se liofilizaron los sobrenadantes y se mantuvieron congelados hasta su uso en experimentos *in vivo*. Se indujo infarto de miocardio en ratas Sprague-Dawley ligando la arteria descendente anterior izquierda. Tras el comienzo de la isquemia, se resuspendieron sobrenadantes liofilizados y se inyectaron por vía intravenosa. Se obtuvieron muestras de tejido para evaluaciones histológicas e inmunohistológicas tres días y seis semanas tras el infarto de miocardio. Se evaluó la función cardíaca mediante ecocardiografía seis semanas tras AMI. Animales no tratados y operados de manera simulada sirvieron como controles.

35

Las ratas en las que se infundieron sobrenadantes obtenidos de PBMC apoptóticas evidenciaron angiogénesis miocárdica aumentada y migración potenciada de células progenitoras endoteliales en el plazo de 72 horas en comparación con los controles. La evaluación planimétrica de zonas fibróticas indicó un tamaño de infarto reducido en animales tratados con sobrenadantes de células apoptóticas. Además, la ecocardiografía mostró una mejora significativa con respecto a la remodelación tras AMI tal como se evidencia por una pérdida atenuada de fracción de eyección y una geometría ventricular preservada. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) en ratas que recibieron sobrenadantes de células apoptóticas evidenció un valor medio del  $56 \pm 4\%$  en comparación con el  $60 \pm 5\%$  en animales operados de manera simulada, mientras que los animales no tratados o en los que se infundieron células viables mostraron una disminución significativa de LVEF hasta el  $44 \pm 3\%$  y el  $41 \pm 4\%$  respectivamente ( $p < 0,001$ ).

40

45

Estos datos indican que la infusión de sobrenadantes derivados de PBMC apoptóticas irradiadas en AMI experimental sorteó la inflamación y provocó una migración preferente de EPC regenerativas conduciendo a la preservación de la función ventricular.

50

##### Métodos

###### *Cultivo celular de PBMC humanas para ensayos in vitro*

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll tal como se describió anteriormente. Para inducir apoptosis en PBMC humanas, se irradiaron las células con 60 Gy (irradiación automática para productos de sangre humana, Departamento de Hematología, Hospital General de Viena). Se incubaron PBMC tanto viables como apoptóticas irradiadas (IA-) a 37<sup>o</sup> grados Celsius durante 24 horas a diversas densidades de células ( $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  y  $25 \times 10^6$  células/mililitro, n=5). Entonces se obtuvieron sobrenadantes y se midieron los niveles de proteínas secretadas mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.), según los protocolos suministrados por el fabricante.

55

60

###### *Adquisición de PBMC viables e IA-PBMC singénicas para experimento in vivo de AMI*

Se separaron PBMC de rata singénicas para experimentos *in vivo* mediante centrifugación en gradiente de densidad

65

de sangre completa obtenida de las ratas heparinizadas anteriores mediante punción de la aurícula derecha. Se indujo apoptosis mediante irradiación con cesio Cs-137 con 45 Gy para experimentos *in vivo* y se cultivaron a 37° grados Celsius a una densidad de células de  $25 \times 10^6$  células/mililitro). Se midió la inducción de apoptosis mediante irradiación mediante citometría de flujo (tinción de anexina V >80% para IA-PBMC, tinción de anexina V <20% para PBMC viables). Se incubaron las células durante 24 h en una atmósfera humidificada (el 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C, humedad relativa del 95%). Se retiraron los sobrenadantes y se dializaron con un punto de corte de 3,5 kDa (Spectrum laboratories, Breda, Países Bajos) frente a acetato de amonio 50 mM durante la noche a 4°C. Entonces se esterilizaron por filtración los sobrenadantes y se liofilizaron. Se almacenaron los secretomas liofilizados a -80°C y se resuspendieron de manera reciente para cada experimento. Se tomaron muestras al azar de los secretomas para determinar su valor de pH. Se almacenó el polvo liofilizado a -80° grados Celsius antes que se realizaron experimentos adicionales.

#### *Inducción de infarto de miocardio*

El comité para investigación con animales, Universidad de Medicina de Viena, aprobó experimentos con animales. Todos los experimentos se realizaron según la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio) de los National Institutes of Health (NIH). Se indujo infarto de miocardio en ratas Sprague-Dawley macho adultas ligando la arteria descendente anterior izquierda (LAD). En resumen, se anestesió a los animales por vía intraperitoneal con una mezcla de xilazina (1 mg/100 g de peso corporal) y ketamina (10 mg/100 g de peso corporal) y se ventilaron mecánicamente. Se realizó una toracotomía lateral izquierda y se colocó una ligadura usando Prolene 6-0 alrededor de la LAD por debajo de la aurícula izquierda. Inmediatamente tras el comienzo de la isquemia, se infundieron sobrenadantes liofilizados obtenidos de  $8 \times 10^6$  PBMC apoptóticas resuspendidas en 0,3 ml medio de cultivo celular sobre la vena femoral. La infusión de medio de cultivo celular solo, sobrenadantes de PBMC viables y la operación simulada sirvieron como controles negativos en este entorno experimental, respectivamente. El diseño experimental con ratas se muestra en la figura 1.

#### *Histología e inmunohistoquímica in vivo*

Véase el ejemplo 1.

#### *Determinación del tamaño de infarto de miocardio mediante planimetría*

Véase el ejemplo 1.

#### *Evaluación de la función cardíaca mediante ecocardiografía*

Véase el ejemplo 1.

#### *Métodos estadísticos*

Se realizó el análisis estadístico usando el software Graph Pad Prism (EE.UU.). Todos los datos se obtuvieron como la media  $\pm$  error estándar de la media. Se utilizaron pruebas de la t bilaterales de datos emparejados para variables dependientes, pruebas de la t de datos no emparejados para variables independientes calculando las significaciones.

Se compararon las diferencias entre grupos con respecto a la supervivencia de infarto de miocardio agudo mediante el análisis actuarial de Kaplan-Meier. Se usó la corrección de Bonferroni-Holm para ajustar los valores de p para pruebas múltiples. Valores de  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

#### Resultados

#### *Determinación de factores paracrinos secretados por IA-PBMC y PBMC viables mediante ELISA*

Los resultados se muestran en las figuras 10 a 15.

#### EJEMPLO 6. Factores paracrinos secretados por células mononucleares de sangre periférica poseen características inmunosupresoras

En el ejemplo 1 se evidencian los efectos antiinflamatorios del secretoma de PBMC en un modelo animal de infarto de miocardio (AMI) agudo. En este ejemplo se muestra que la aplicación del secretoma de PBMC tras la inducción de AMI inhibe el daño inflamatorio del músculo cardíaco mediante la regulación por disminución masiva de la respuesta inmunitaria.

Basándose en estos hallazgos se investigaron los posibles efectos inmunosupresores del secretoma en experimentos *in vitro*. Las células CD4+ desempeñan un papel clave en la orquestación de la respuesta inmunitaria ya que son fundamentales para la asistencia de otros leucocitos (por ejemplo macrófagos, células B, células T



citotóxicas) en los procesos inmunológicos.

### Material y métodos

#### 5 *Producción de secretomas de PBMC*

Se separaron PBMC de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Se resuspendieron las células en medio Ultraculture (Lonza, Basilea, Suiza) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml (sob. de células vivas). Para la producción de secretomas a partir de PBMC apoptóticas se indujo apoptosis mediante irradiación con 60 Gy (sob. de APA). Se incubaron las células durante 24 h en una atmósfera humidificada (el 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, humedad relativa del 95%). Se retiraron los sobrenadantes y se dializaron con un punto de corte de 3,5 kDa (Spectrum Laboratories, Breda, Países Bajos) frente a acetato de amonio 50 mM durante la noche a 4°C. Entonces se esterilizaron por filtración los sobrenadantes y se liofilizaron. Se almacenaron los secretomas liofilizados a -80°C y se resuspendieron de manera reciente para cada experimento. Se tomaron muestras al azar de los secretomas para determinar su valor de pH.

#### *Separación de células CD4*

Se separaron células CD4+ mediante depleción de células T distintas de CD4+ utilizando un sistema de perlas MACS (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). Se prepararon las células de manera reciente y se usaron inmediatamente para cada experimento.

#### *Medición de apoptosis*

Se detectó la apoptosis mediante citometría de flujo usando un kit de anexina V/PI disponible comercialmente (BD, New Jersey, EE.UU.). Se definió la apoptosis mediante tinción positiva para anexina, apoptosis tardía mediante positividad para PI.

#### *Experimentos de proliferación*

Se diluyeron PBMC o células CD4+ purificadas en medio Ultraculture complementado con 0,2 cm de sulfato de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), β-mercaptoetanol al 0,5% (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) y GlutaMAX-I al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) hasta una concentración de  $1 \times 10^5$ /pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se estimularon las células con o bien PHA (7 µg/ml, Sigma, EE.UU.), CD3 (10 µg/ml, BD, New Jersey, EE.UU.), IL-2 (10 U/ml, BD, EE.UU.) o una razón 1:1 de PBMC irradiadas alogénicas (60 Gy) para MLR. Se incubaron las células durante 48 h o 5 días (MLR) con diferentes concentraciones de secretoma de PBMC, IL-10 o TGF-β. Entonces se pulsaron las células durante 18 h con 3[H]-timidina ( $3,7 \times 10^4$  Bq/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se recogieron las células y se midió la incorporación de 3[H]-timidina en un contador de centelleo líquido.

#### *Marcadores de activación*

Se estimularon las células CD4+ purificadas con anticuerpo anti-CD3 (10 µg/ml) y se coincubaron con diferente concentración de secretoma de PBMC. Se tiñeron las células para CD69 y CD25 siguiendo un protocolo de tinción para citometría de flujo convencional y se analizaron en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.).

### Resultados

En experimentos preliminares, se sometieron a prueba las propiedades antiproliferativas de los sobrenadantes de PBMC a partir de células viables (sup liv). En experimentos de estimulación con anticuerpo anti-CD3 y PHA, las tasas de proliferación se redujeron significativamente mediante la adición de secretoma (n=10).

Basándose en estos hallazgos, se evaluó el efecto del secretoma de PBMC en el compartimento de células T cooperadoras, puesto que estas células desempeñan un papel fundamental en el impulso y la perpetuación de una respuesta inmunitaria. En analogía con la figura 16, las células CD4+ altamente purificadas perdieron su capacidad proliferativa por la adición de secretoma. Este fenómeno se observó para el sobrenadante de PBMC vivas así como irradiadas apoptóticas (figura 17, n=5).

La siguiente etapa fue determinar los posibles efectos del secretoma sobre la viabilidad celular. Por tanto, se incubaron células CD4+ en reposo con sobrenadante y se evaluó la positividad para anexina V y PI. Los sobrenadantes de PBMC tanto vivas como apoptóticas evidenciaron efectos proapoptóticos notables (figura 18, n=5).

Para someter a prueba si el secretoma de PBMC podía inhibir la activación de células CD4+, se evaluaron los marcadores de activación de células T CD25 y CD69 tras estimulación con anticuerpo anti-CD3 de células CD4+. La

regulación por incremento de ambos marcadores se inhibió significativamente y de manera dependiente de la dosis por el secretoma de PBMC (figura 19, n=5).

5 En un último conjunto de experimentos, se examinó el efecto de las citocinas inmunosupresoras, IL-10 y TGF- $\beta$ , mediante la adición de anticuerpos neutralizantes en estos experimentos. Se encontró que ni IL-10 ni TGF- $\beta$  eran responsables de los efectos antiproliferativos del secretoma de PBMC, puesto que la retirada de estas citocinas no aumenta las tasas de proliferación (figura 20, n=5).

10 *Conclusión*

Estos experimentos evidencian por primera vez que el secretoma de PBMC posee características inmunosupresoras *in vitro*. Se mostró que el sobrenadante a) reduce las tasas de proliferación en experimentos de estimulación con anticuerpo anti-CD3, PHA y MLR, b) tiene la capacidad de inducir apoptosis e inhibir la activación de células CD4+ tras la activación de células T.

15 **Lista de secuencias**

<110> Aposcience AG

20 <120> Preparación farmacéutica

<130> R 55121

<150> Documento EP 08450199.8

25 <151> 18-12-2008

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador

<400> 1

40 ccctgatgag atcgagtaca tctt 24

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

50

<400> 2

accgcctcgg cttgtcac 18

<210> 3

<211> 21

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

60

<400> 3

ctcttggcag ccttctgat t 21

<210> 4

65 <211> 28

<212> ADN

# ES 2 554 624 T3

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador  
5 <400> 4  
tatgcactga catctaagtt cttagca 28  
10 <210> 5  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> Cebador  
<400> 5  
gggaagatgc tgggttca 19  
20 <210> 6  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
25 <220>  
<223> Cebador  
<400> 6  
cctggcagaa ataggcttc 19  
30 <210> 7  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Cebador  
<400> 7  
gatgagtatg cctgccgtgt g 21  
40 <210> 8  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
45 <220>  
<223> Cebador  
50 <400> 8  
caatccaaat gggcatct 19

**REIVINDICACIONES**

1. Preparación farmacéutica para uso en el tratamiento de un estado inflamatorio interno, preferiblemente un estado interno asociado con isquemia, que comprende
- 5 a) una disolución fisiológica que comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC) apoptóticas, o
- b) un sobrenadante de la disolución a), en la que la disolución a) puede obtenerse cultivando PBMC en una disolución fisiológica libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC durante al menos 4 h,
- 10 en la que las PBMC se someten a condiciones de inducción de estrés antes o en el transcurso del cultivo, en la que las condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, cambio de pH o combinaciones de los mismos.
2. Preparación farmacéutica para uso según la reivindicación 1, caracterizada porque el estado inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en isquemia miocárdica, isquemia de las extremidades, isquemia tisular, lesión por isquemia-reperfusión, angina de pecho, arteriopatía coronaria, enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular isquémico, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, traumatismo, enfermedad intestinal, infarto mesentérico, infarto pulmonar, fractura ósea, regeneración tisular tras injerto dental, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades reumáticas, aloinjerto para trasplante y rechazo de aloinjerto.
- 15 20
3. Preparación farmacéutica para uso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la disolución fisiológica es una disolución de sal fisiológica, preferiblemente una disolución de NaCl fisiológica, sangre completa, una fracción sanguínea, preferiblemente suero, o un medio de cultivo celular.
- 25
4. Preparación farmacéutica para uso según la reivindicación 3, caracterizada porque el medio de cultivo celular se selecciona del grupo que consiste en RPMI, DMEM, X-vivo y Ultraculture.
5. Preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque las PBMC se someten a estrés durante el cultivo con al menos 10 Gy, preferiblemente al menos 20 Gy, más preferiblemente al menos 40 Gy, con ozono, con temperatura elevada o con radiación UV.
- 30
6. Preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque dicha preparación está adaptada para administración subcutánea, administración intramuscular, administración intraórgano y administración intravenosa.
- 35
7. Preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque la disolución a) o el sobrenadante b) se liofiliza.
- 40
8. Preparación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque las PBMC se cultivan en dicha disolución durante al menos 6 h, más preferiblemente durante al menos 12 h.
9. Método para preparar una preparación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende las etapas de
- 45 a) cultivar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en una disolución fisiológica libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC durante al menos 4 h,
- b) aislar las células de la etapa a) y el sobrenadante de las mismas o el sobrenadante de las mismas, y
- 50 c) preparar la preparación farmacéutica usando las células y el sobrenadante de la etapa b) o el sobrenadante de la etapa b), en el que las células se someten a condiciones de inducción de estrés antes o en el transcurso de la etapa a), en el que dichas condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, cambio de pH o combinaciones de los mismos.
- 55
10. Método según la reivindicación 9, caracterizada porque las células se irradian antes o en el transcurso de la etapa a) con al menos 10 Gy, preferiblemente al menos 20 Gy, más preferiblemente al menos 40 Gy, con ozono, con temperatura elevada o con radiación UV.

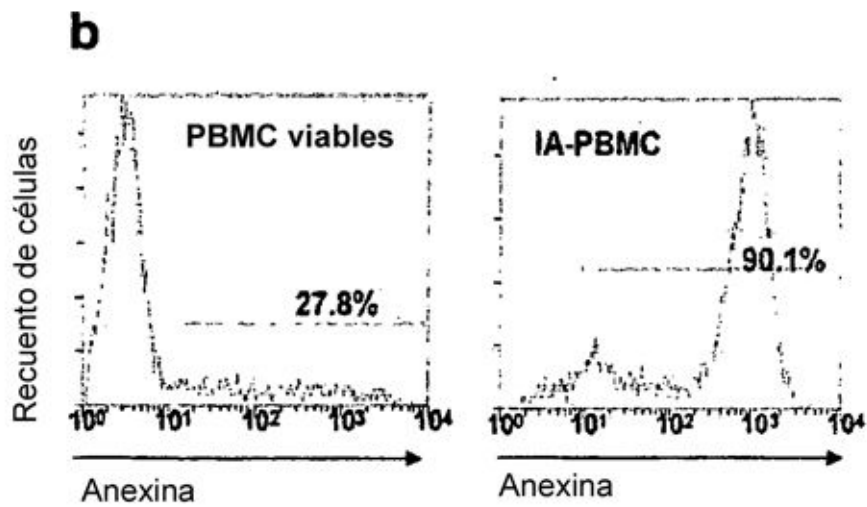
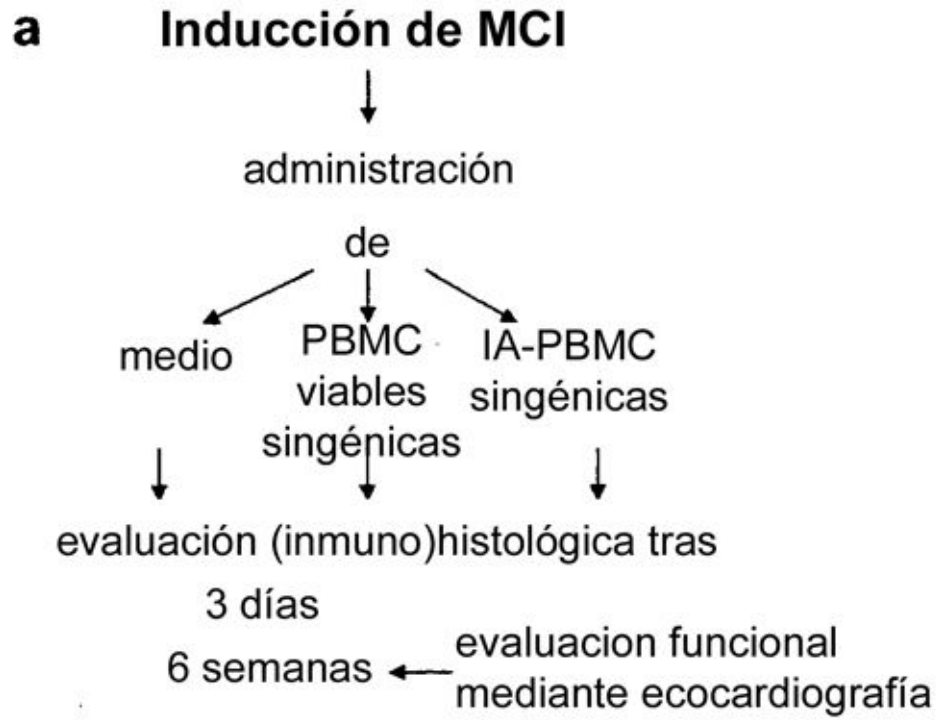


Fig. 1

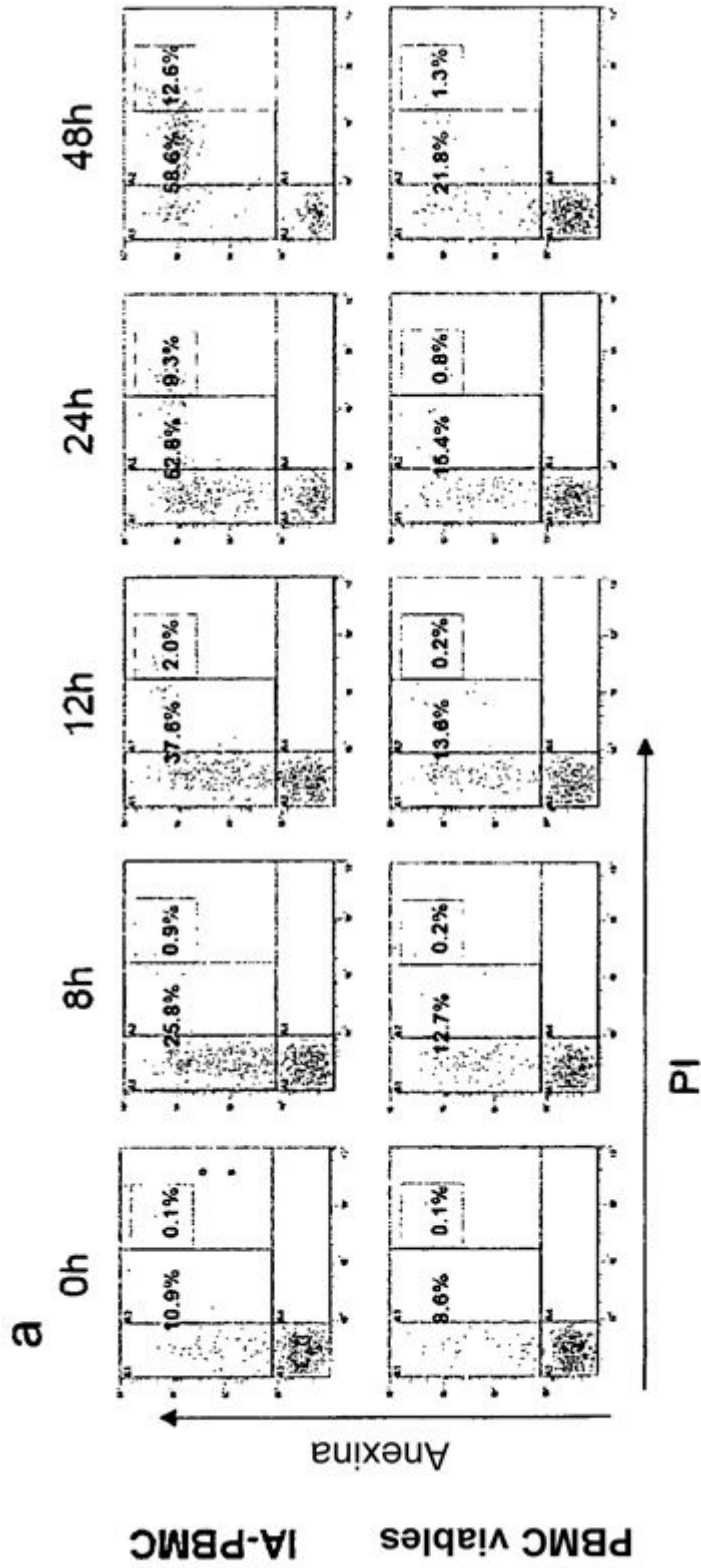


Fig. 2

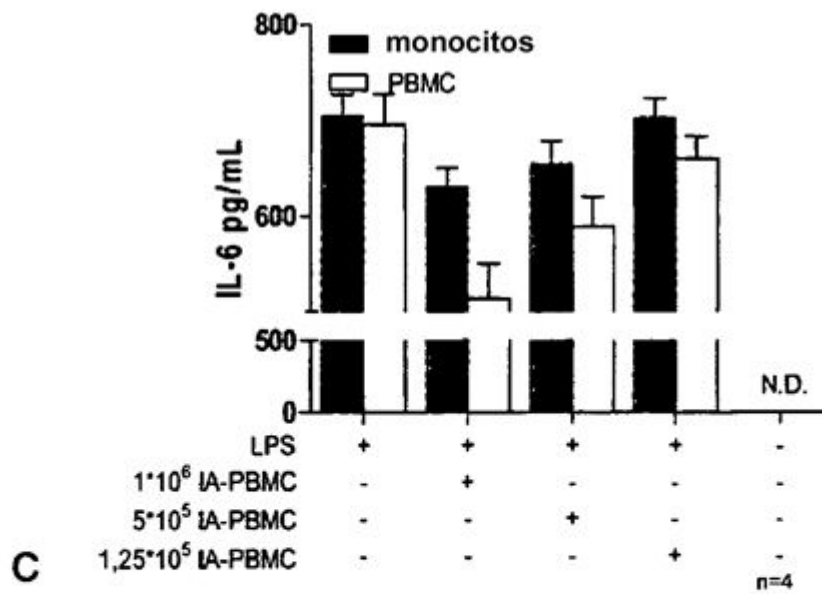
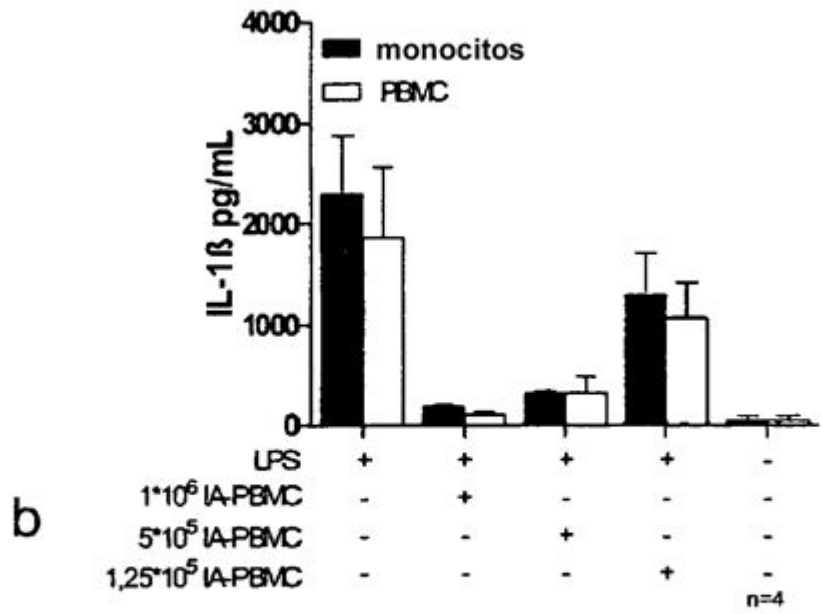


Fig. 2 cont

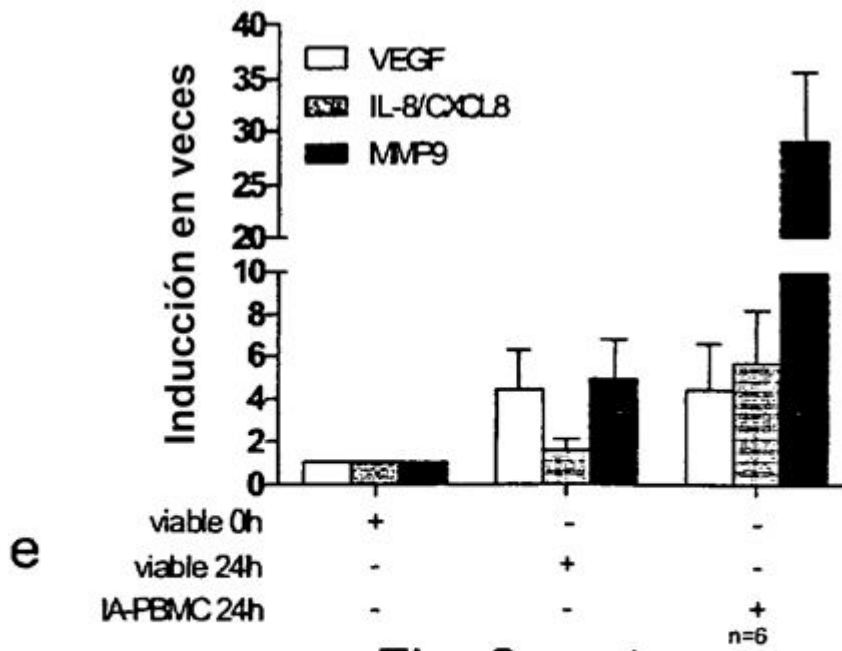
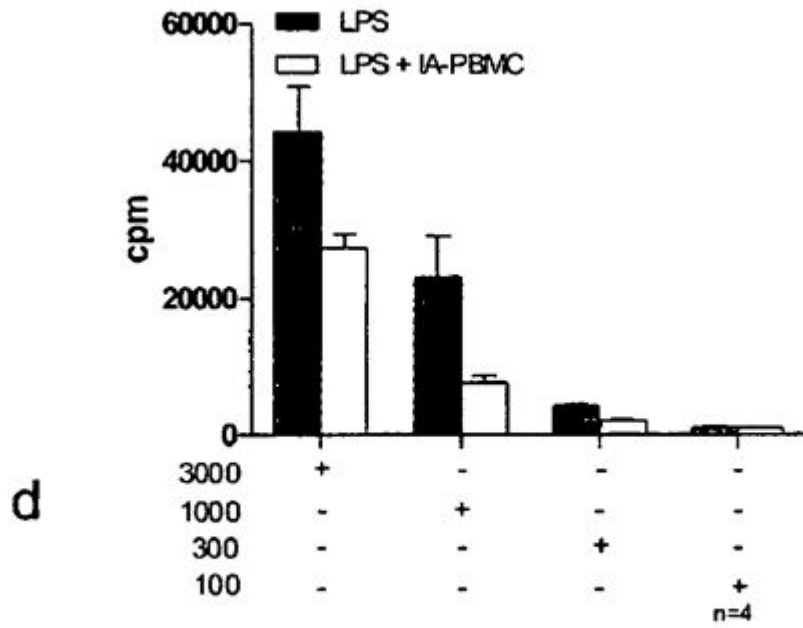


Fig. 2 cont



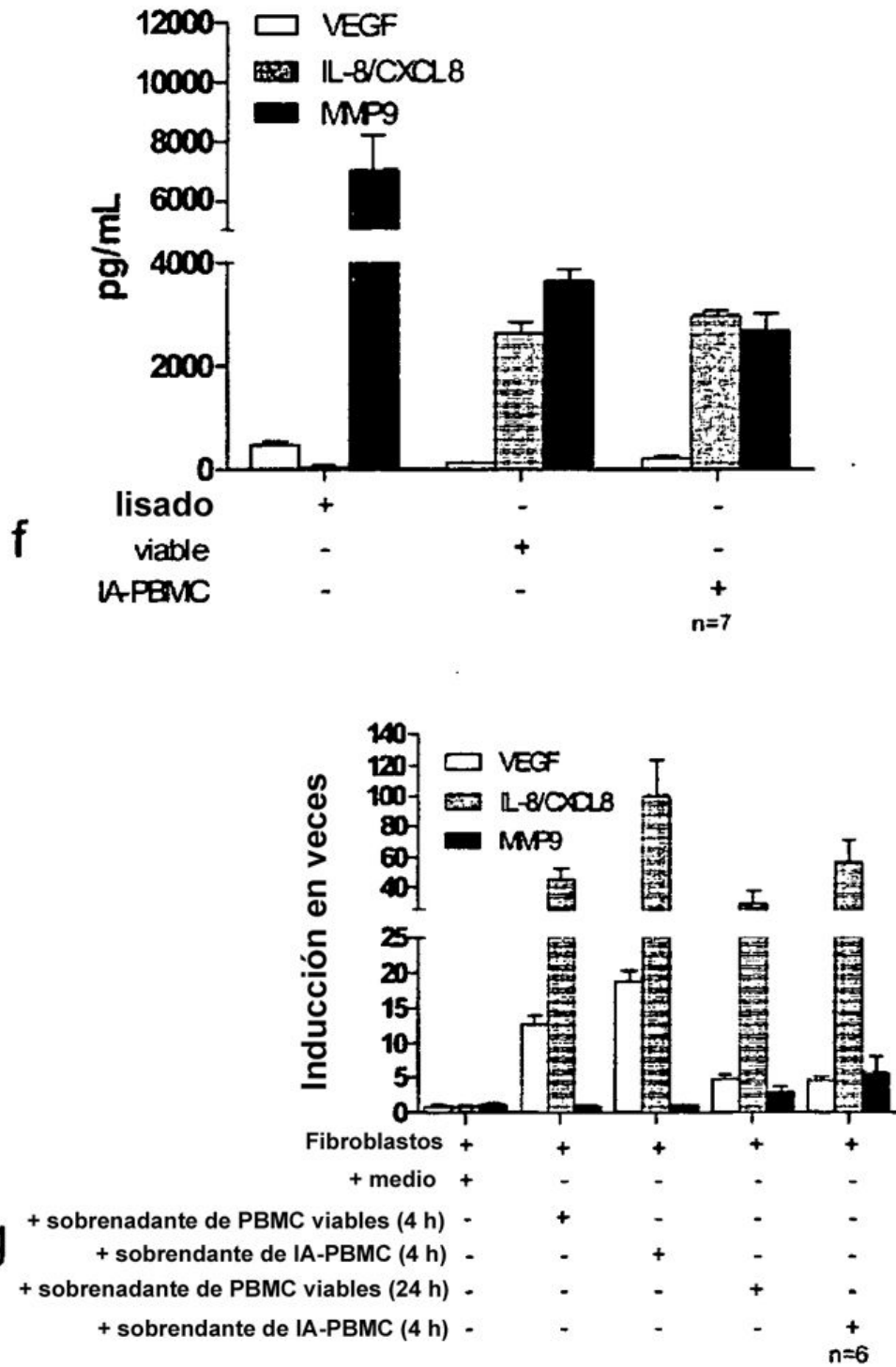


Fig. 2 cont

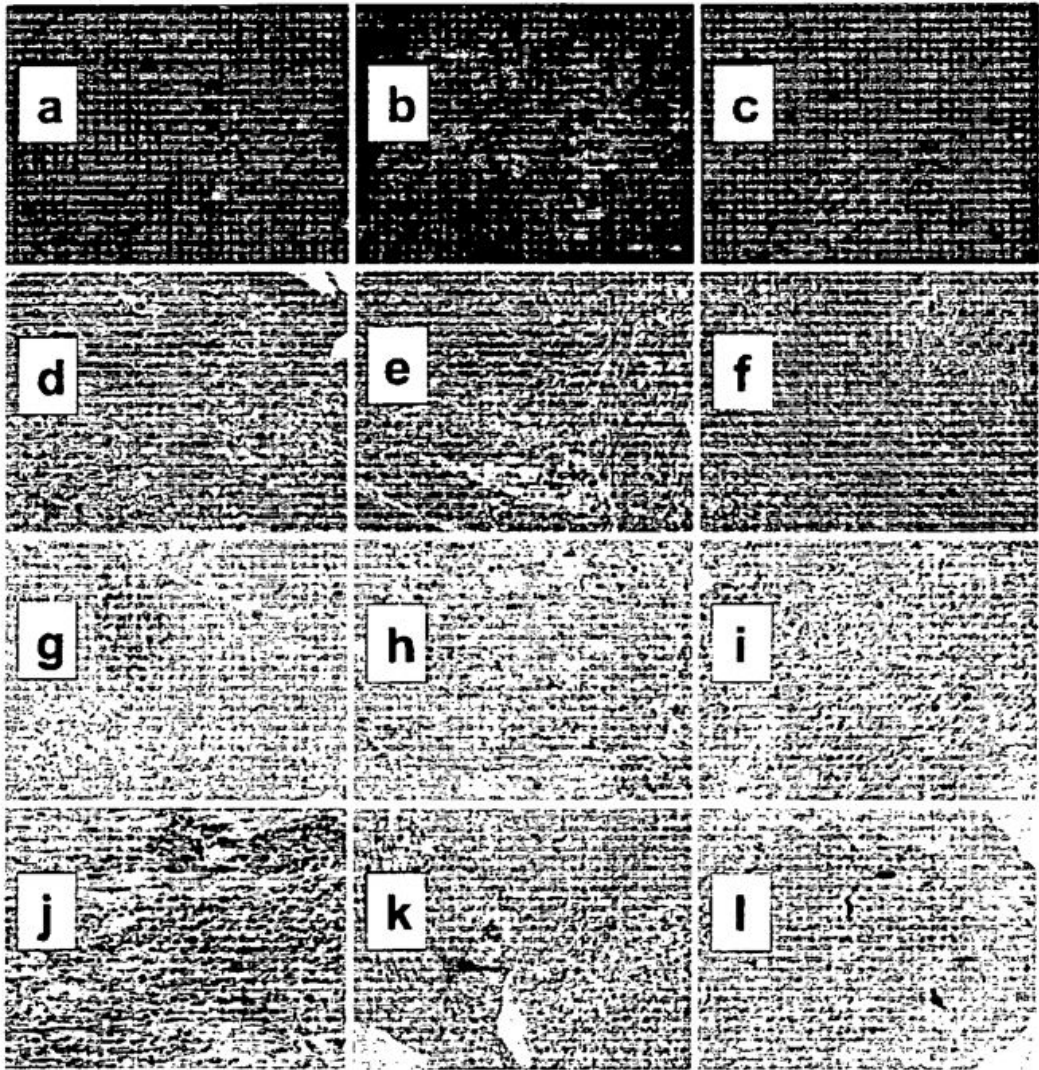


Fig. 3

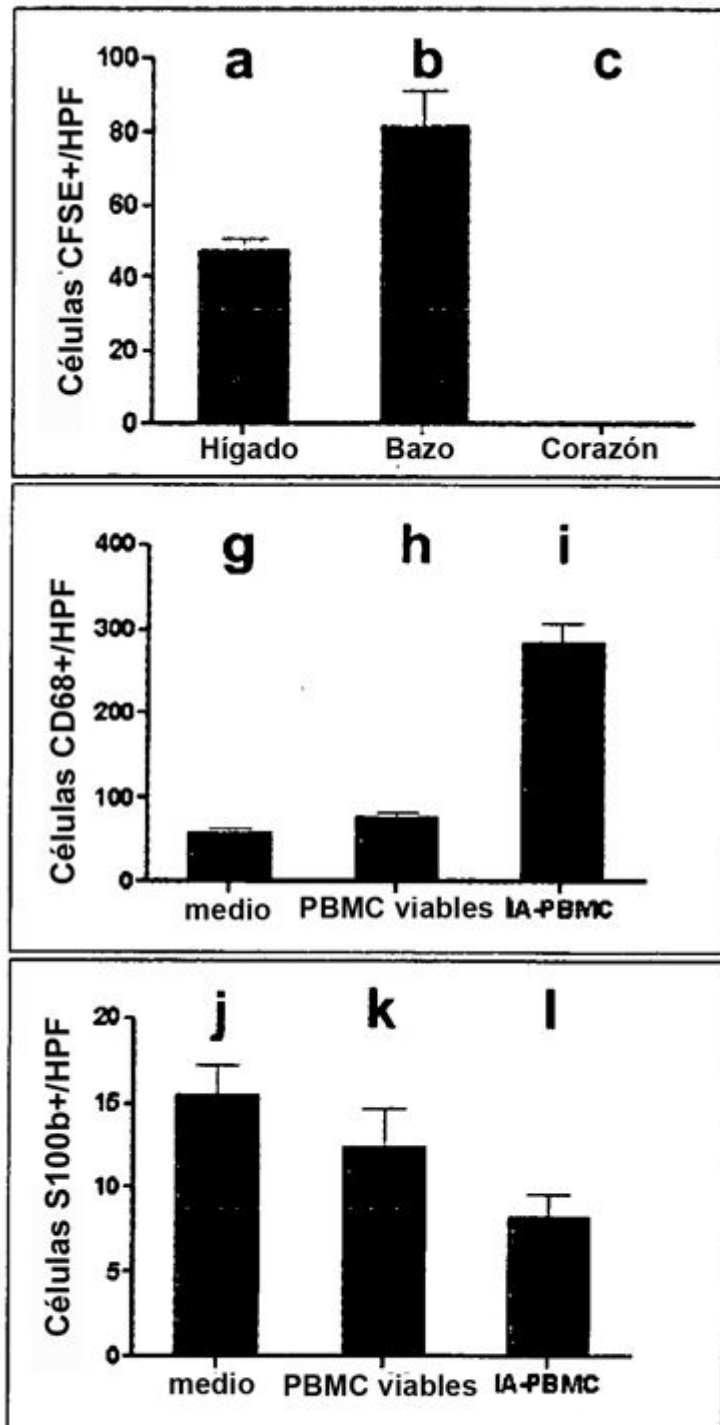


Fig. 3 cont.

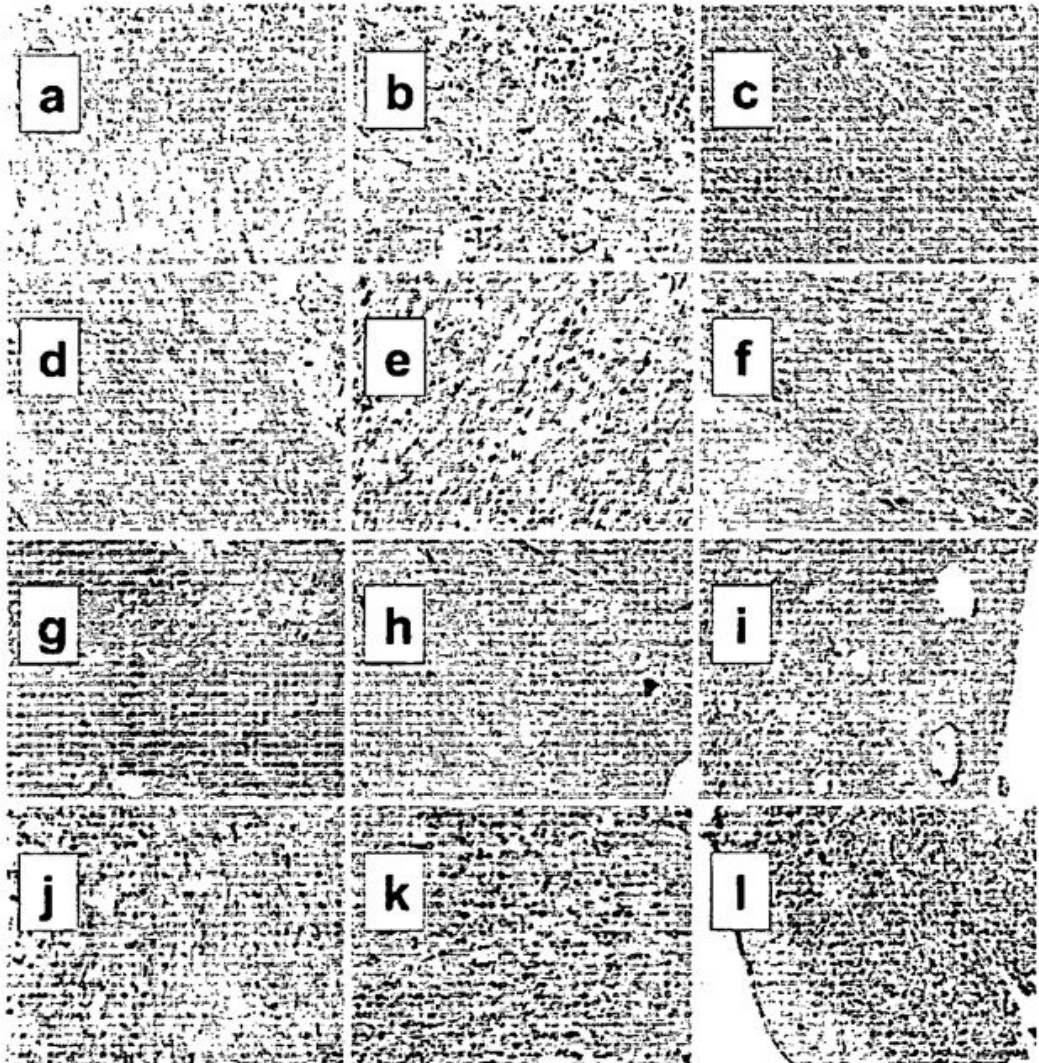


Fig. 4

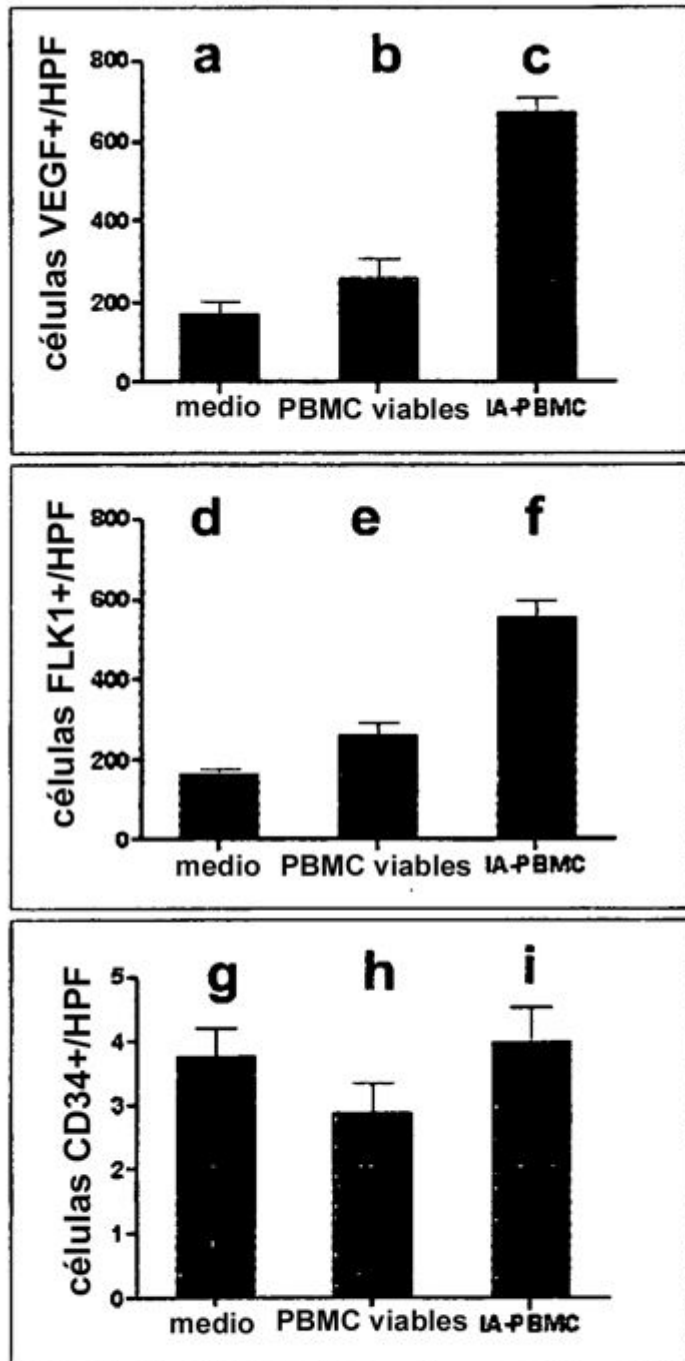


Fig. 4 cont.

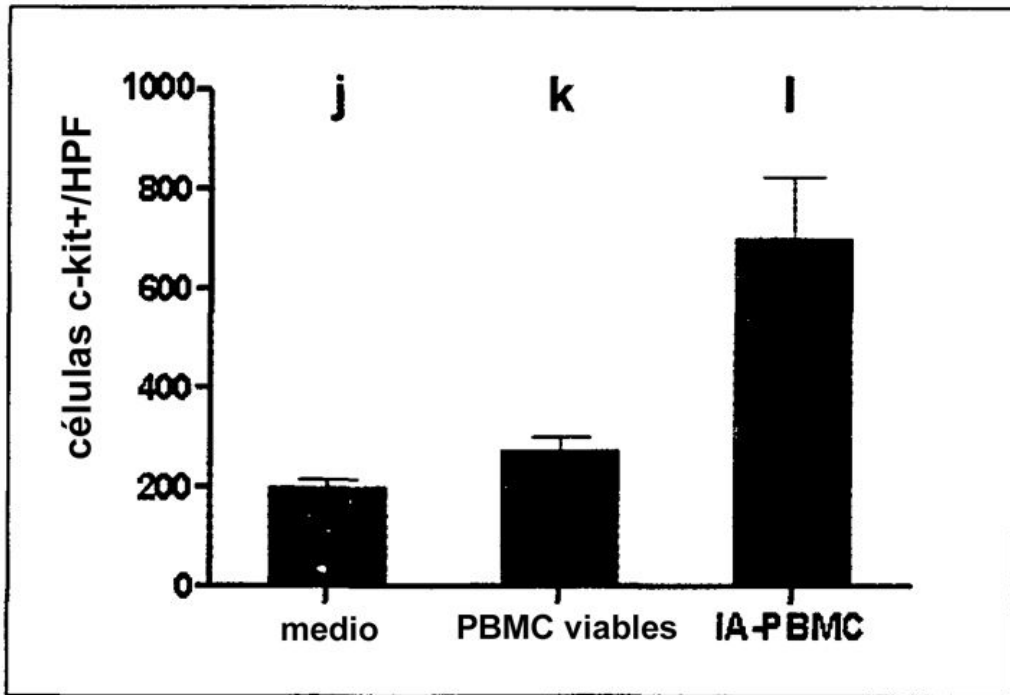
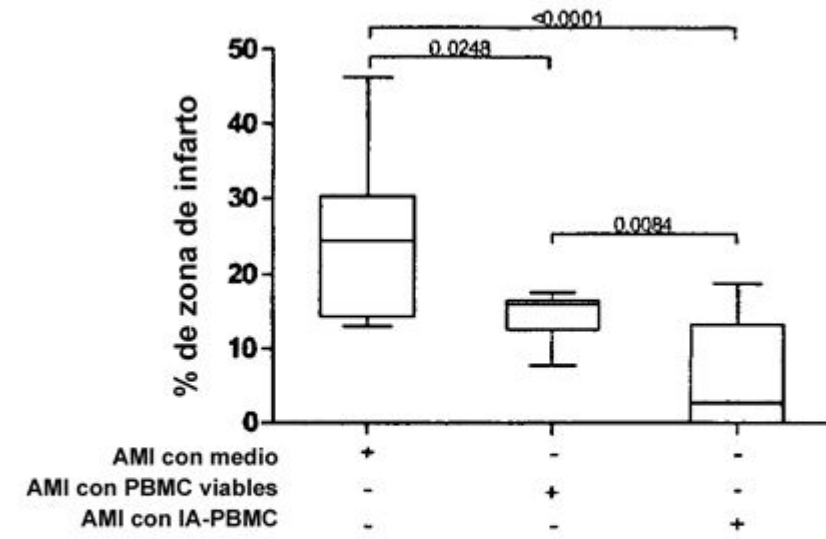


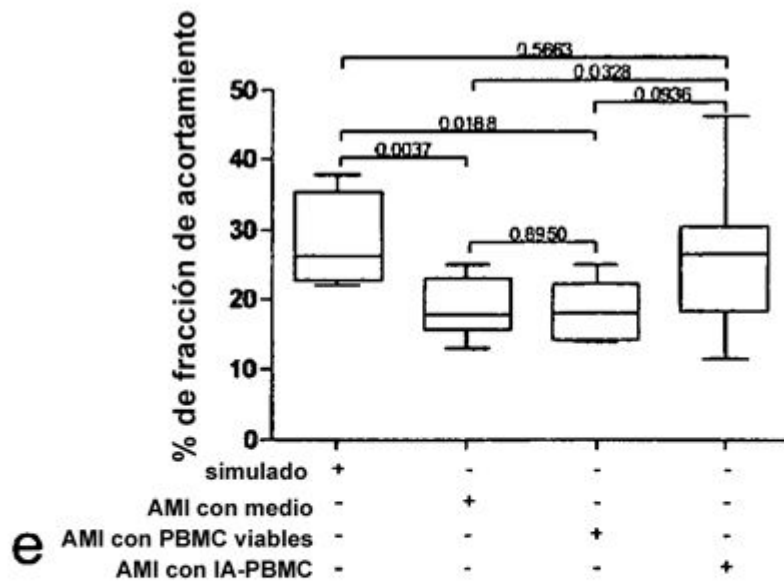
Fig. 4 cont.



Fig. 5



**d**



**e**

Fig. 5



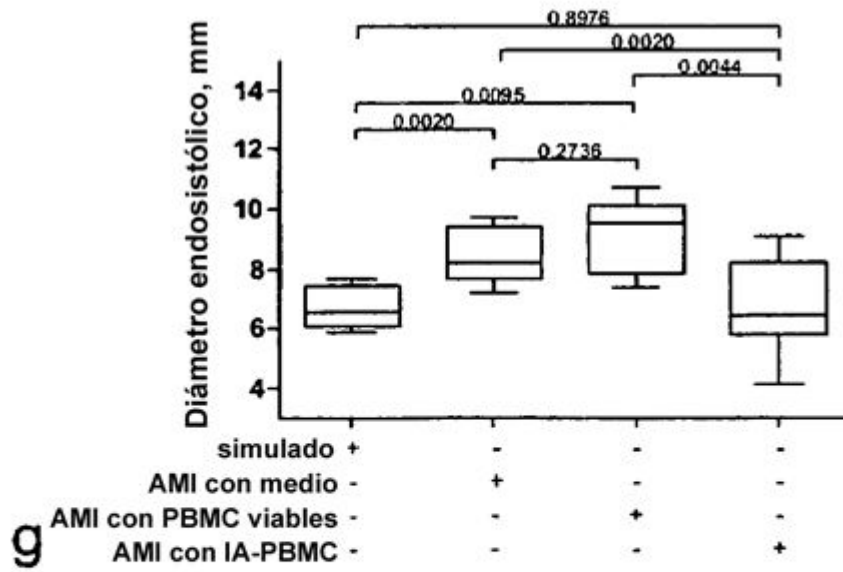
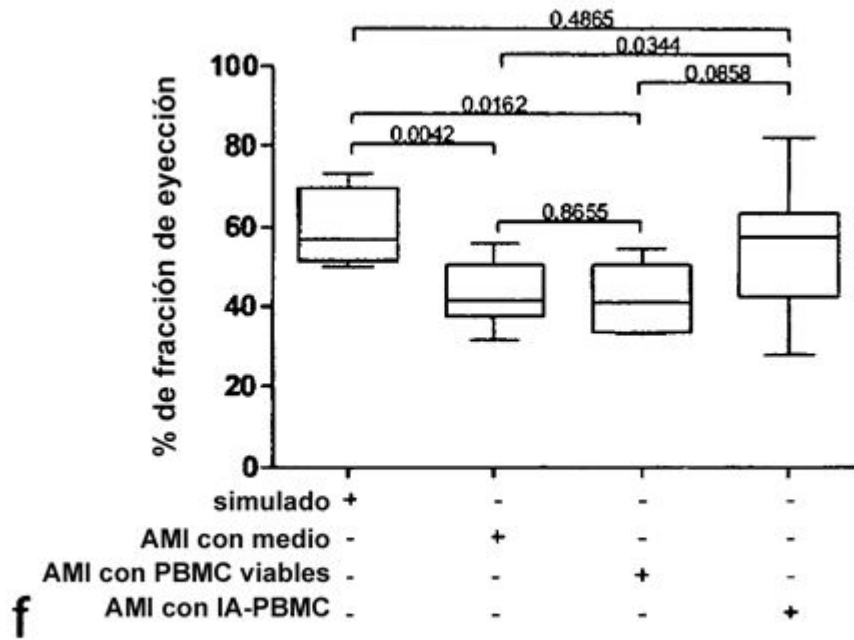


Fig. 5 cont

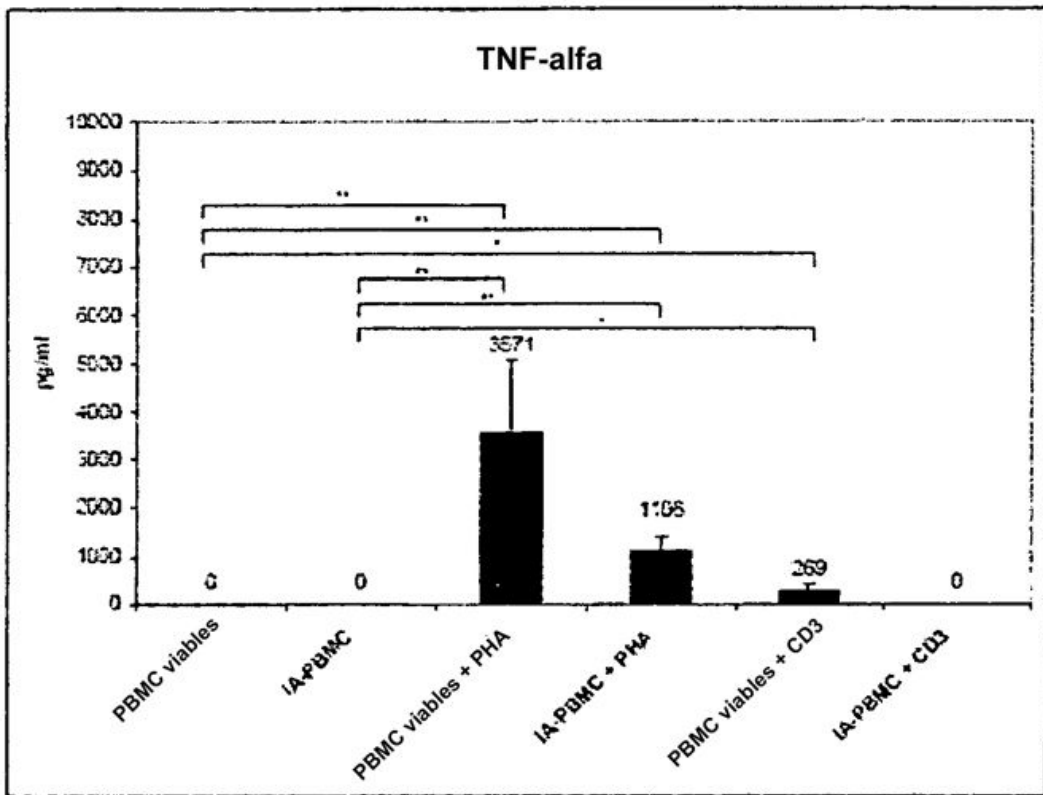


Fig. 6a

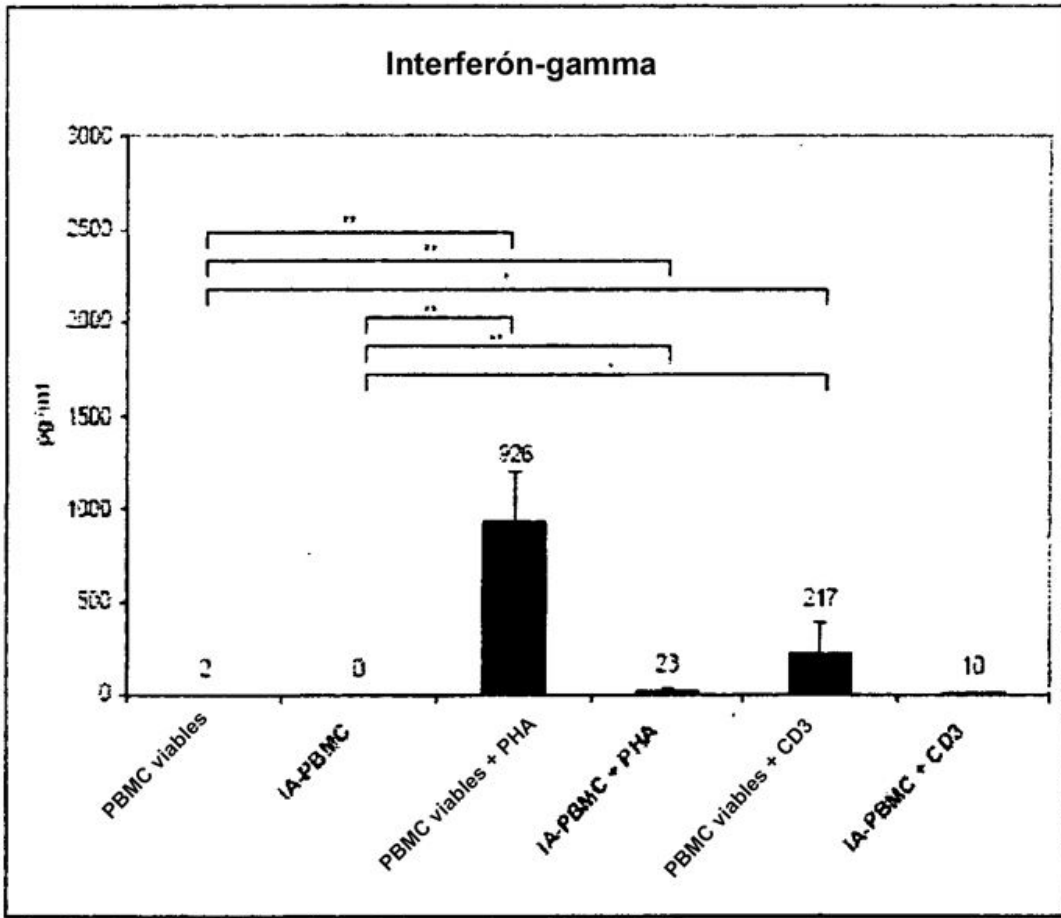


Fig. 6b

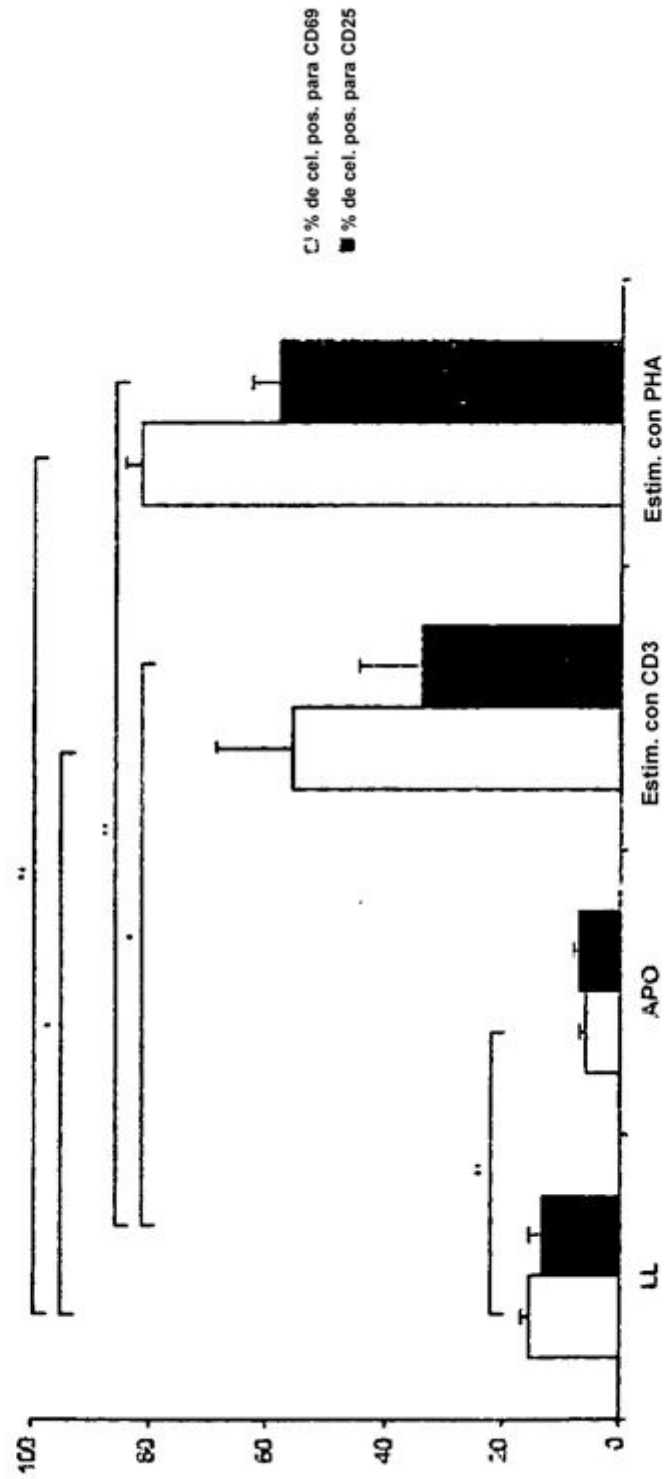


Fig. 7a

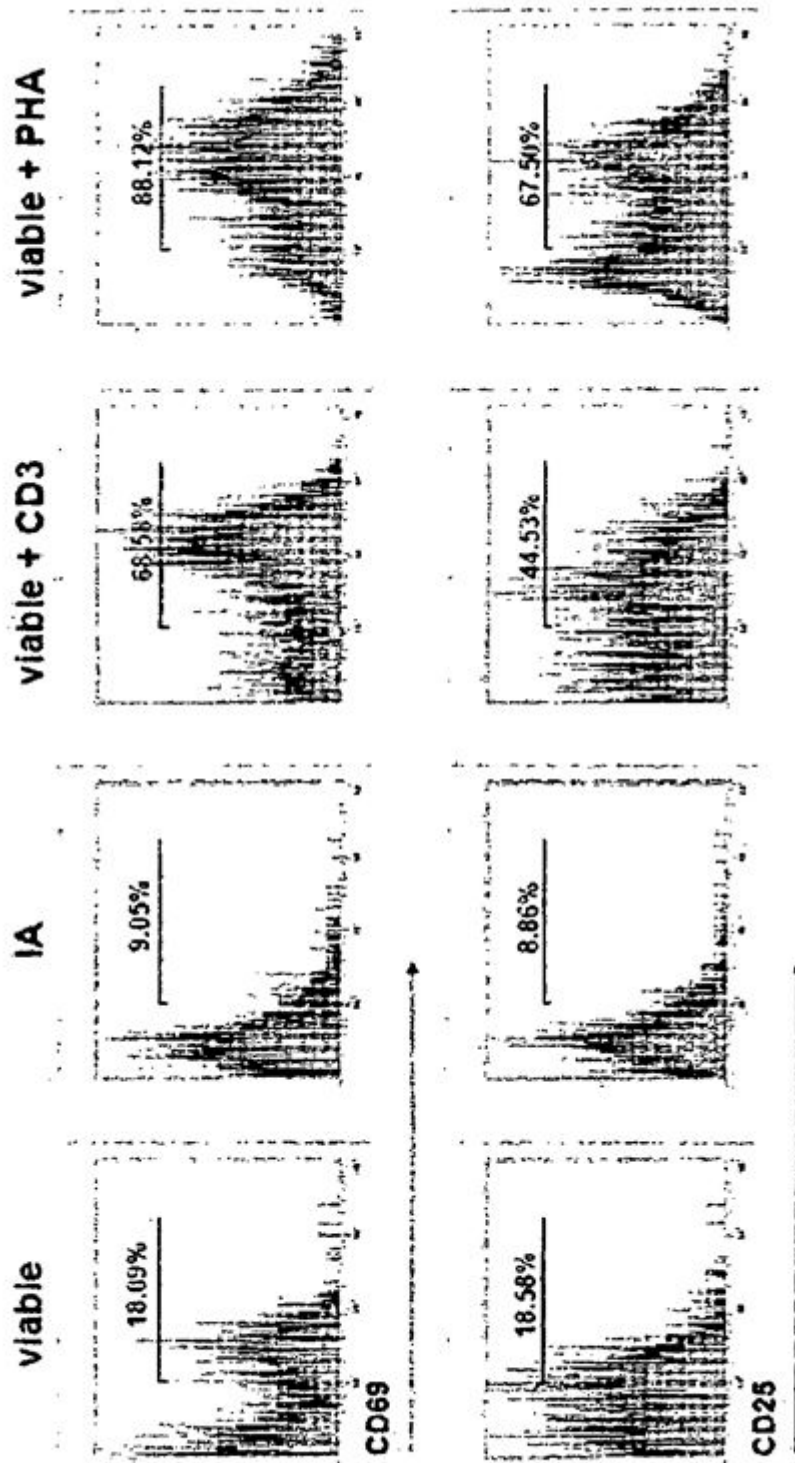


Fig. 7b

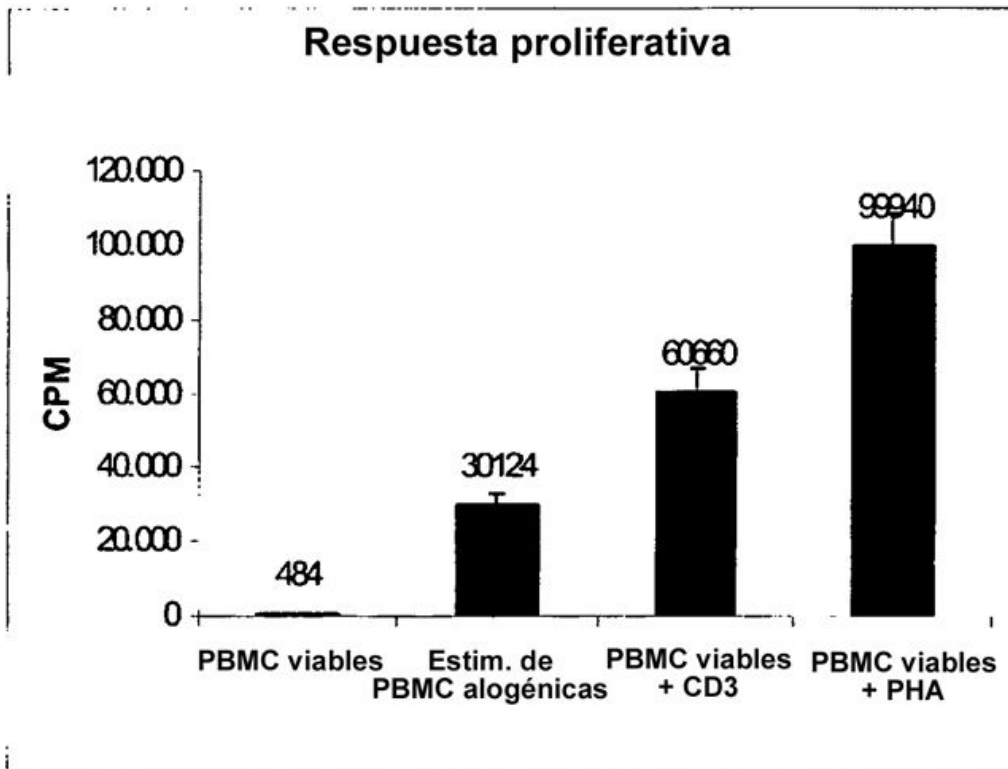


Fig. 8

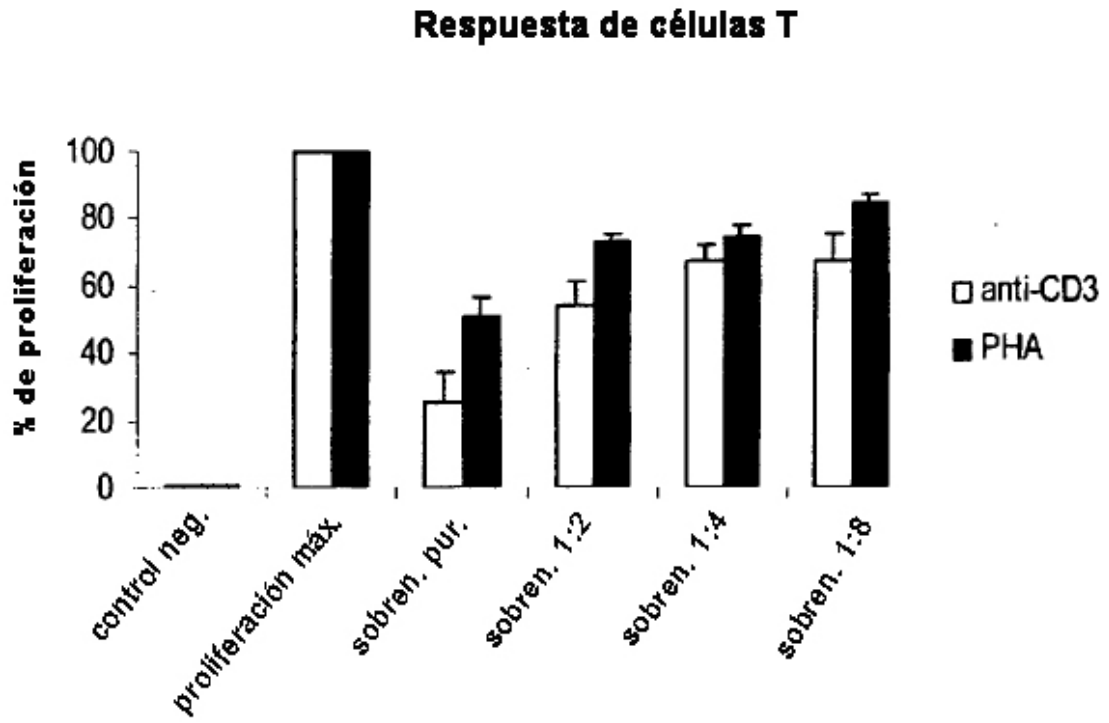


Fig. 9

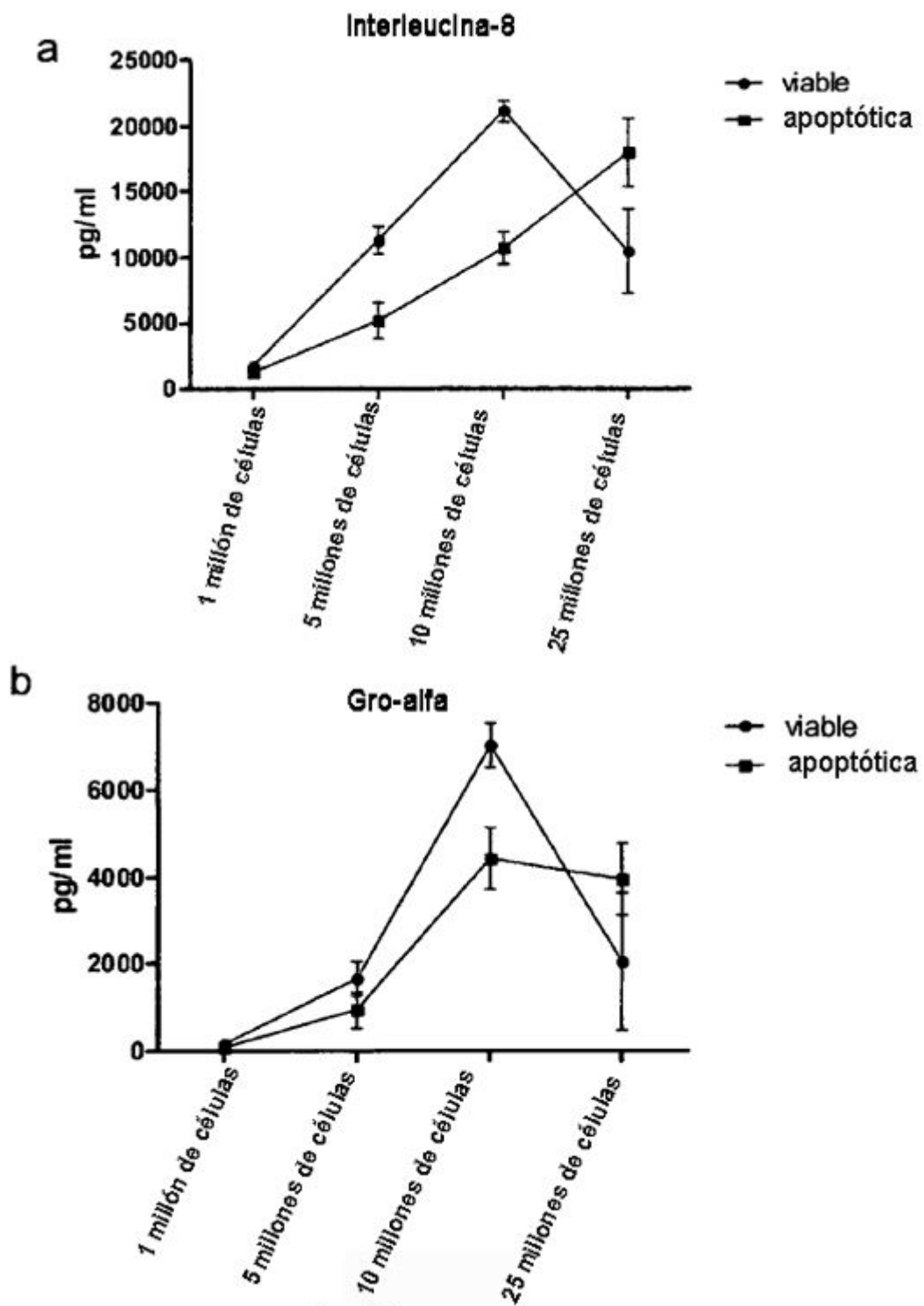
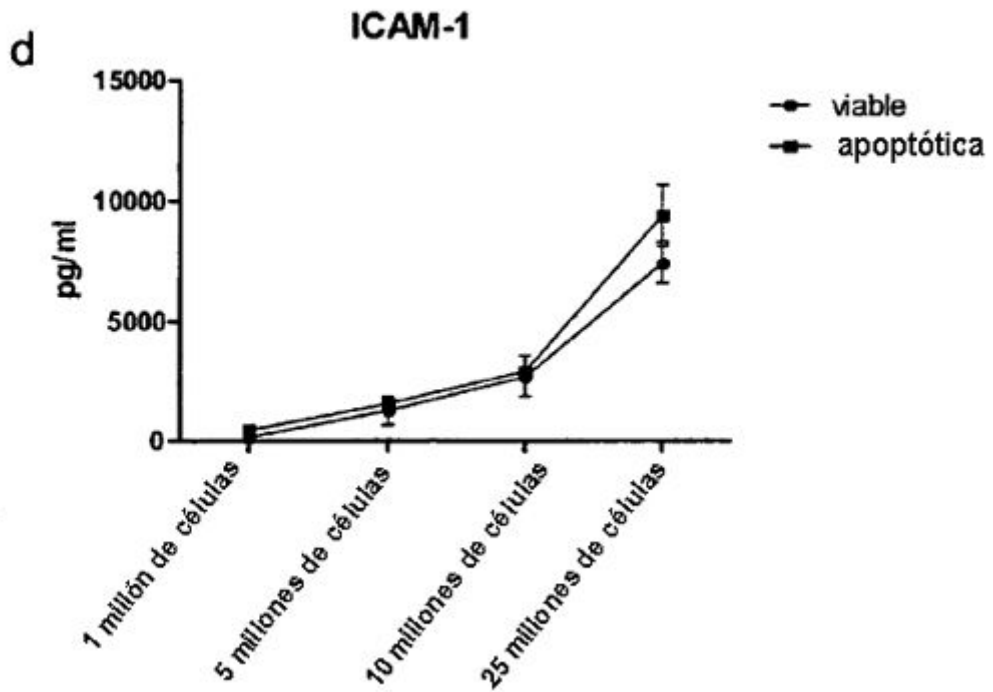
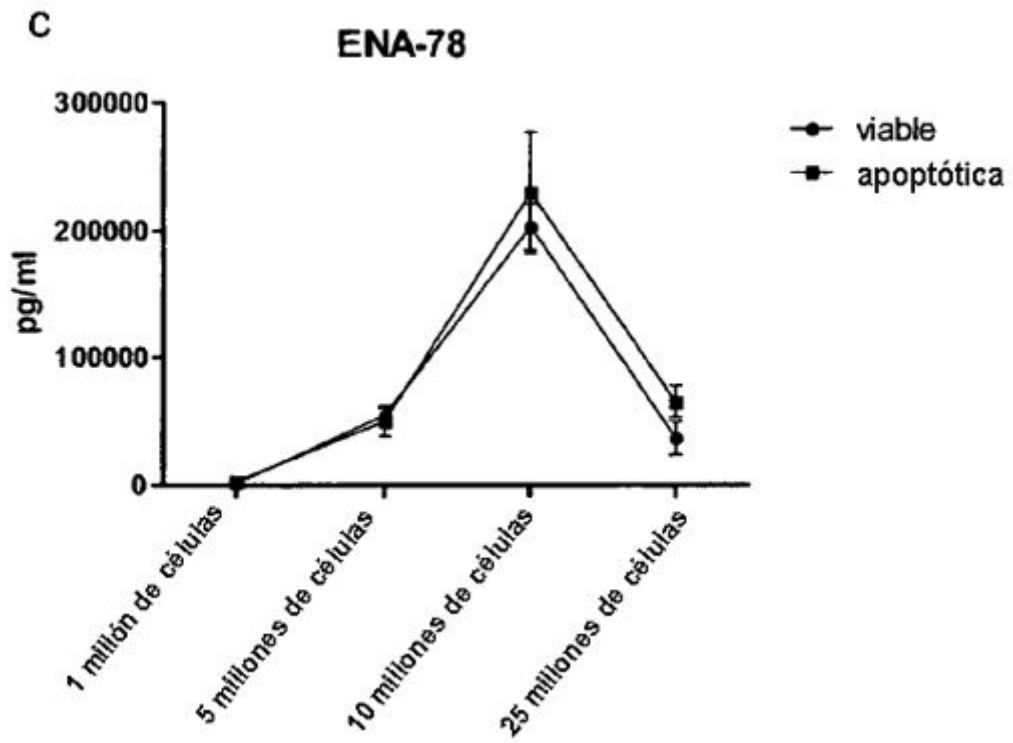
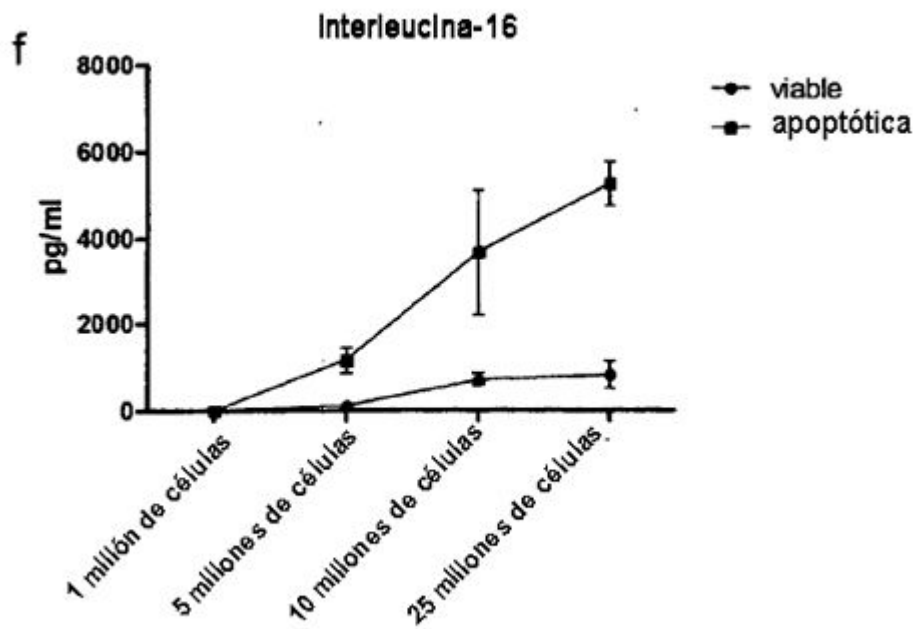
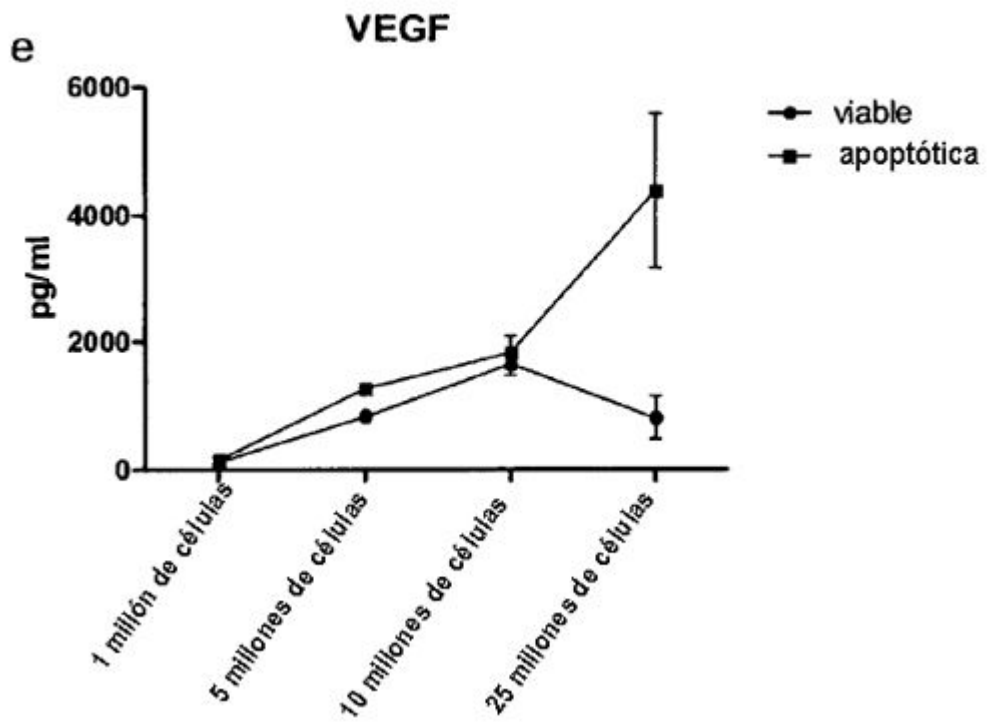


Fig. 10





**Fig. 10 cont.**



**Fig. 10 cont.**

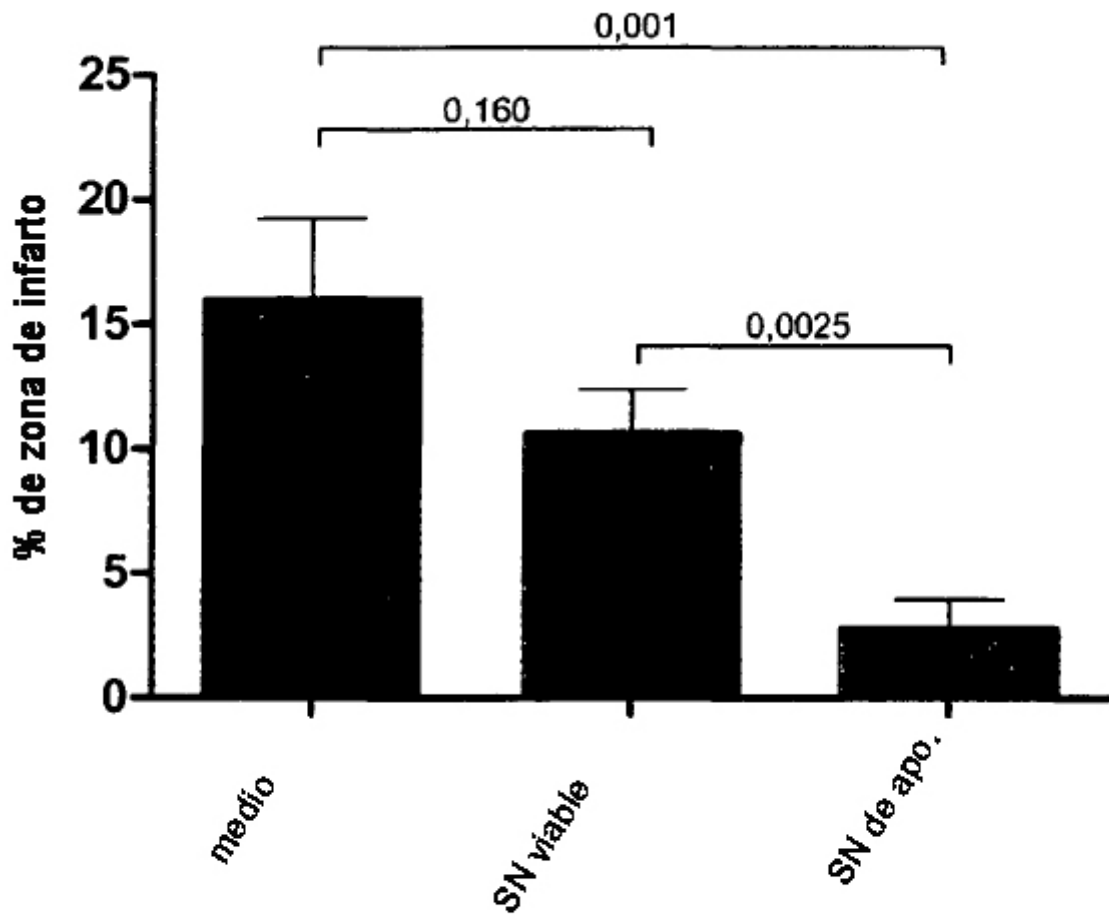


Fig. 11

a



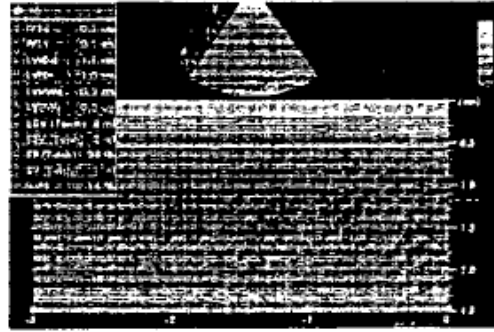
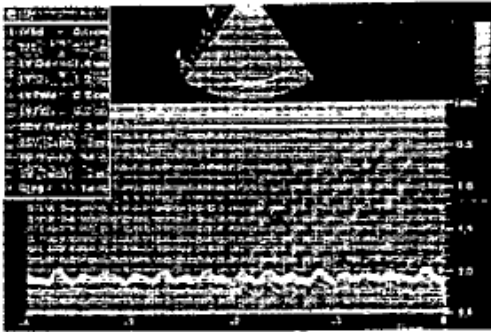
b



c

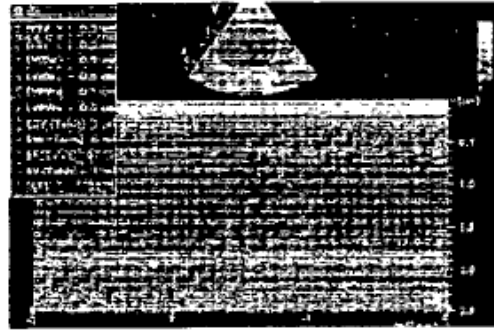
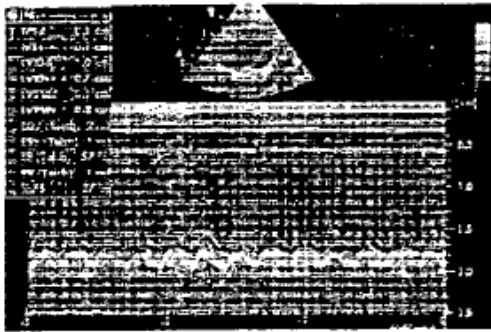


Fig. 12



a

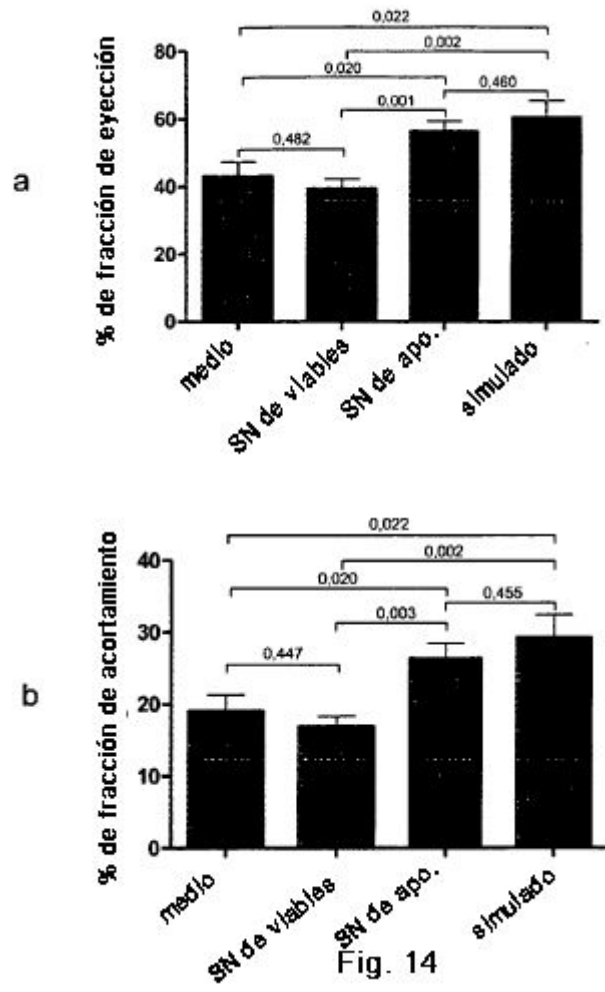
b



c

d

Fig. 13



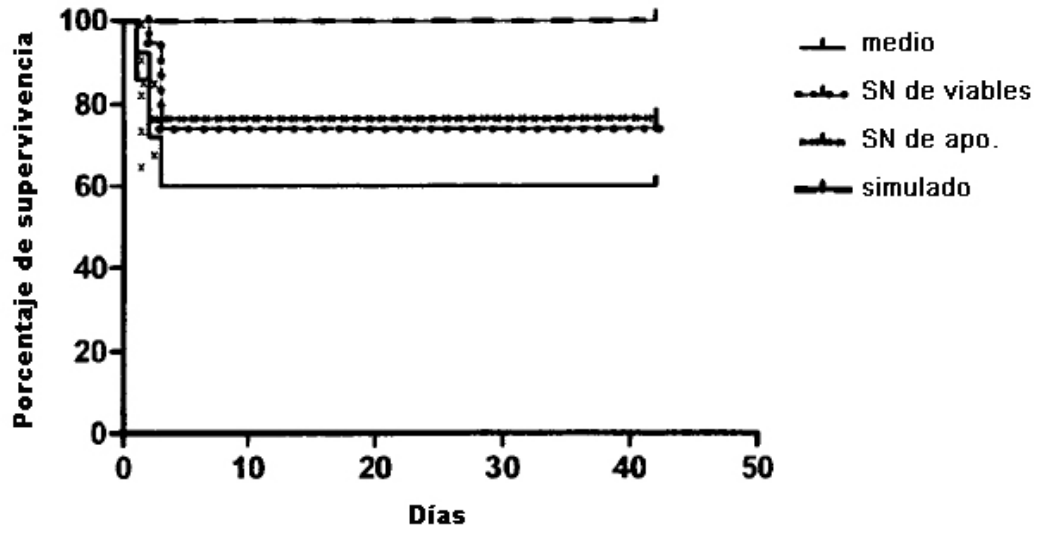


Fig. 15

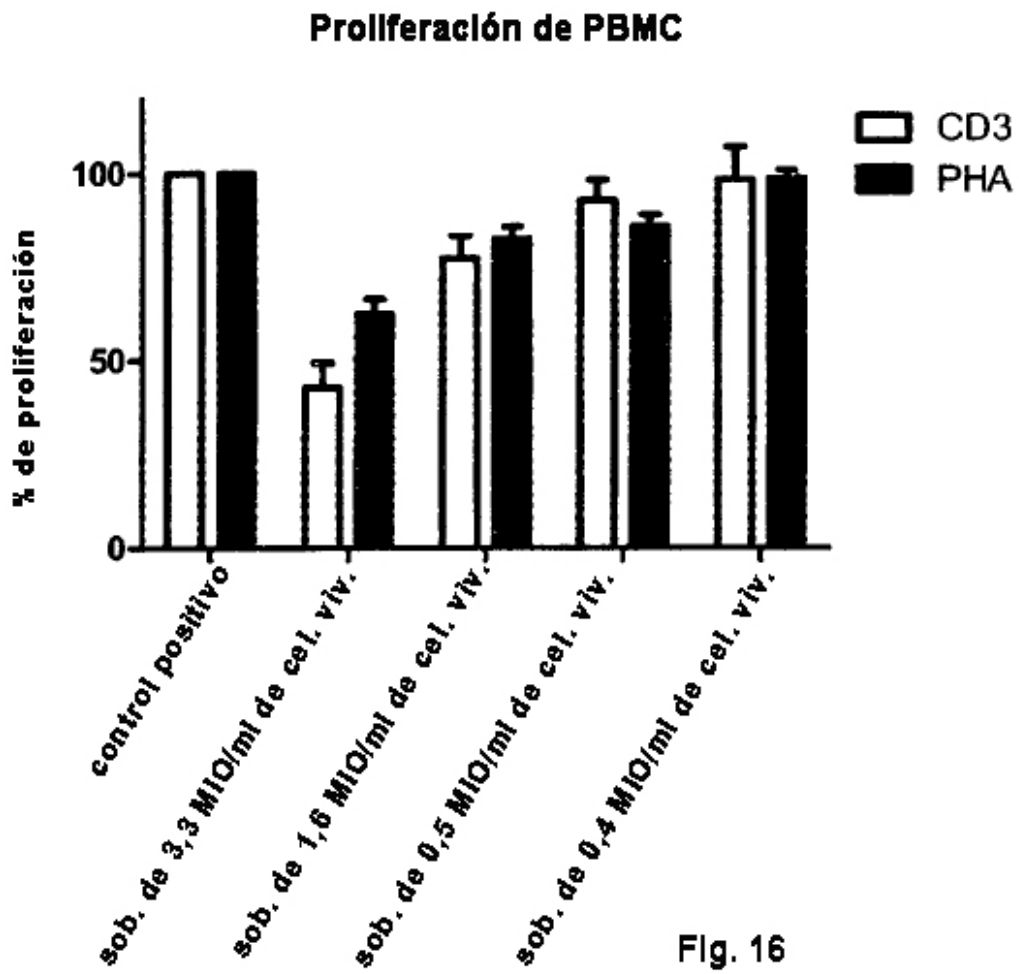


Fig. 16



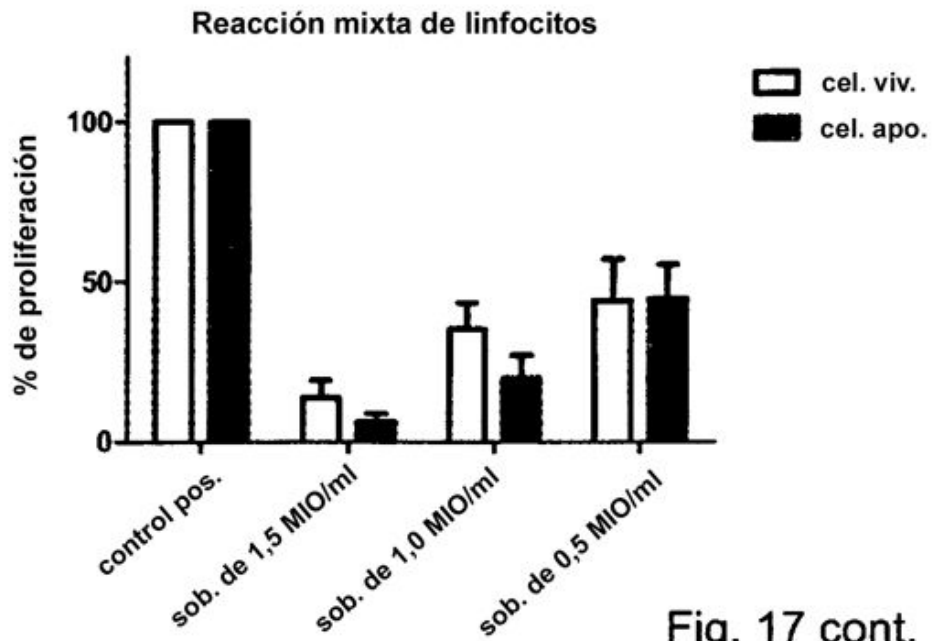
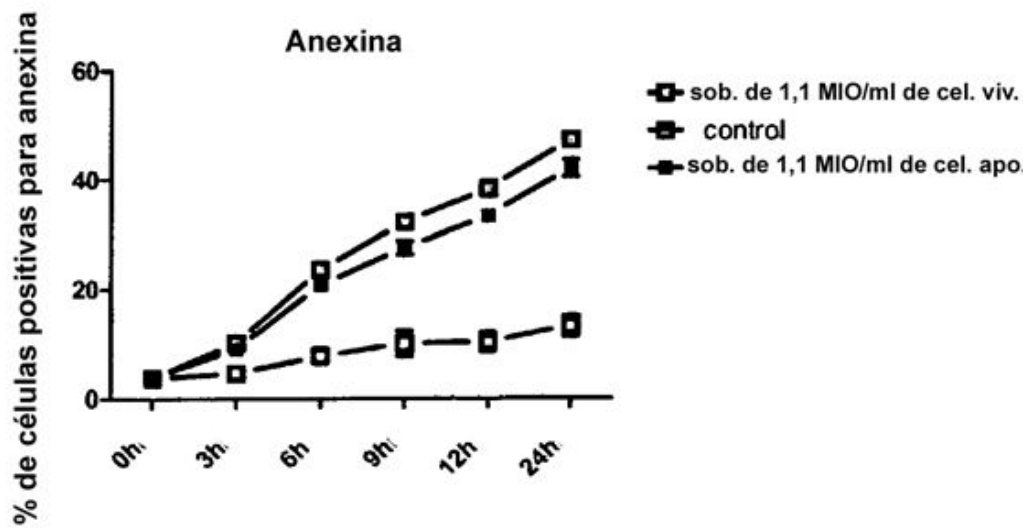


Fig. 17 cont.

Fig. 18



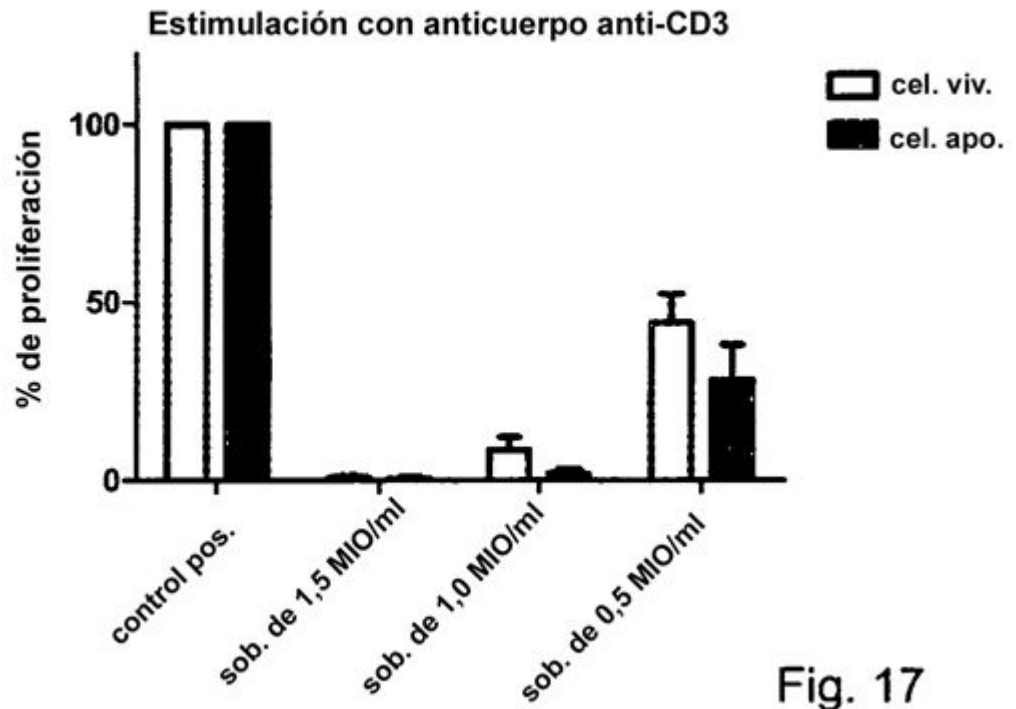
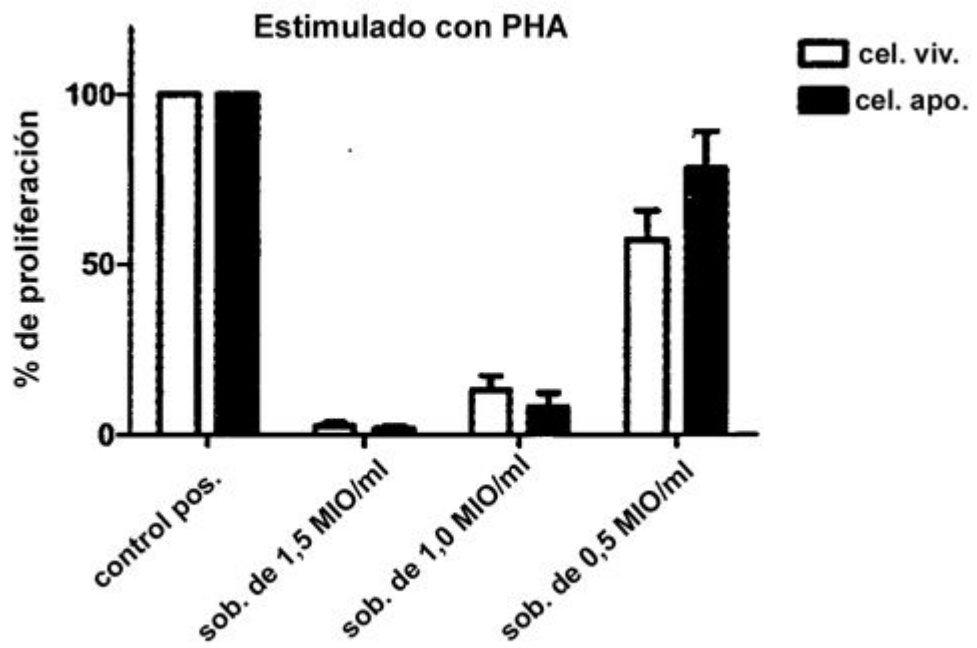


Fig. 17



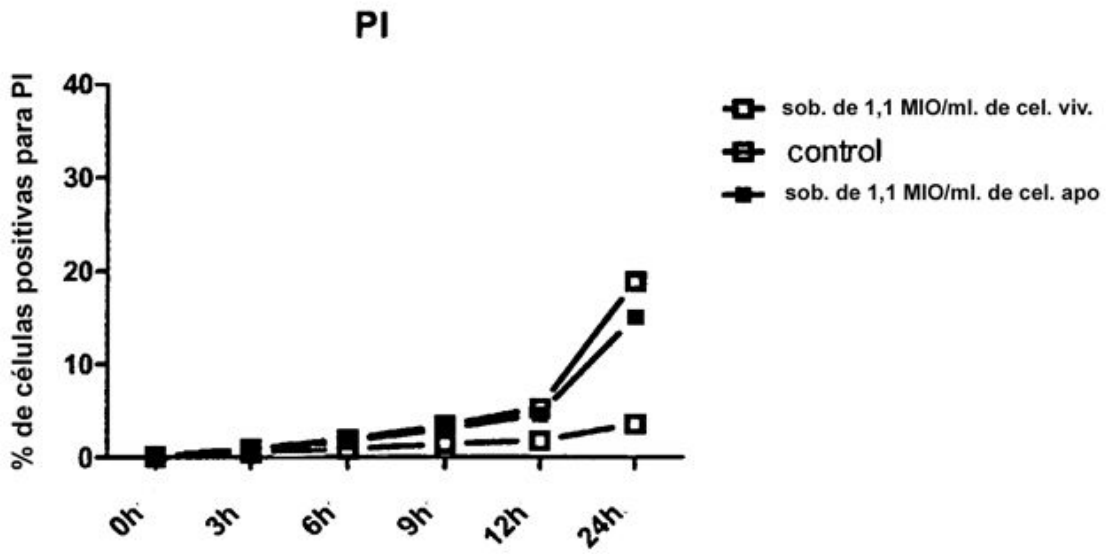
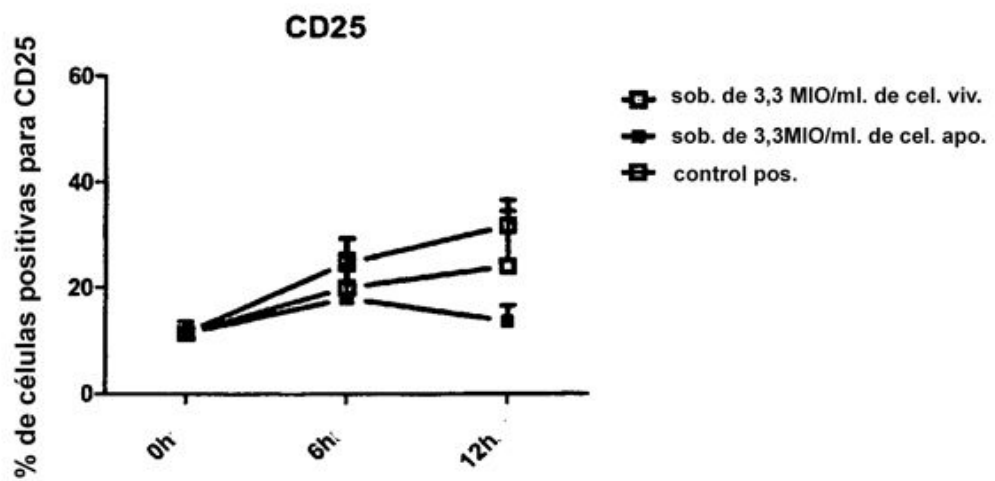


Fig. 18 cont.

Fig. 19



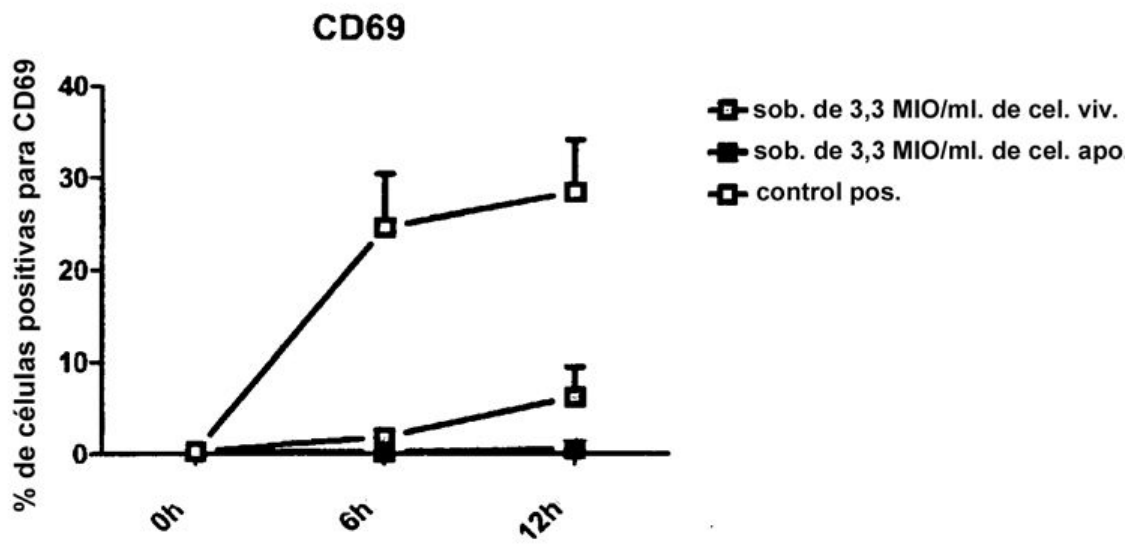


Fig. 19 cont.

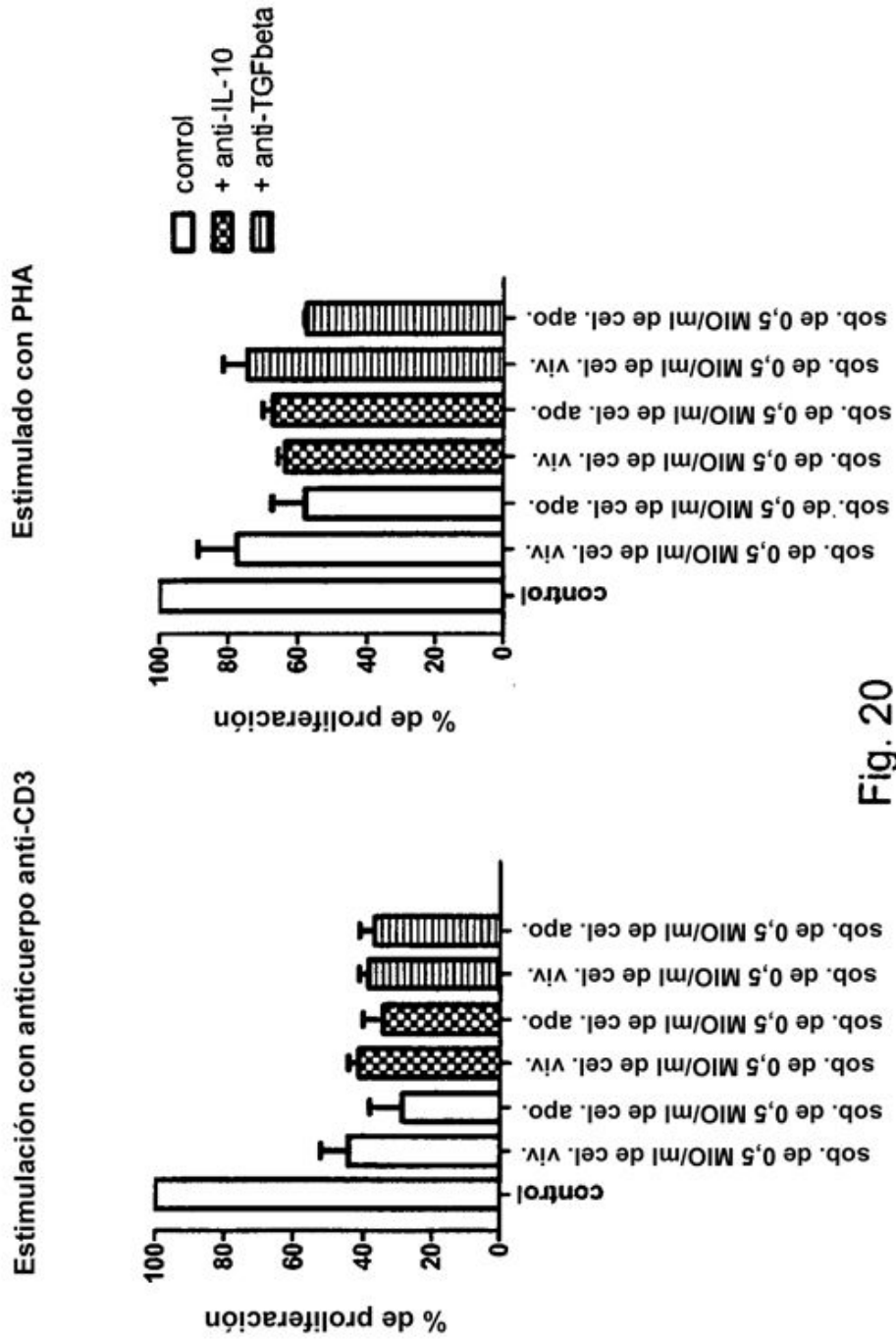


Fig. 20