

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 675**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/44 (2015.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2006 E 06794234 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 1913130**

54 Título: **Sistema marcador celular/ligando donde el marcador es de tipo Eph, material celular que comprende dicho sistema, proceso de preparación y utilización proangiogénica**

30 Prioridad:

27.07.2005 FR 0508029

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

06.04.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT DES VAISSEaux ET DU SANG (50.0%)
HOPITAL LARIBOISIÈRE, 2, RUE AMBROISE
PARE
75475 PARIS CEDEX 10, FR y
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FOUBERT, PHILIPPE;
SILVESTRE, JEAN-SÉBASTIEN y
LE RICOUSSE-ROUSSANNE, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 565 675 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

Sistema marcador celular/ligando donde el marcador es de tipo Eph, material celular que comprende dicho sistema, proceso de preparación y utilización proangiogénica.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una nueva solución técnica que utiliza un sistema que comprende un marcador celular y un ligando específico de dicho marcador, donde dicho marcador se selecciona de entre el conjunto constituido por los Eph, principalmente el marcador EphB4. Igualmente, se refiere al material celular que comprende dicho sistema, así como a su proceso de preparación y a su utilización terapéutica como agente proangiogénico.

Técnica anterior

- 10 Es conocido que los miembros de la familia de las efrinas y de sus receptores Eph tirosina quinasa, que en un principio se evidenciaron en el sistema nervioso para la guía de las neuronas, son factores que intervienen en la angiogénesis. Se han descrito numerosas isoformas para los receptores Eph y sus ligandos efrinas con especificidad de expresión tisular. En los vertebrados, se conocen al menos 16 receptores Eph, a saber: por una parte 10 receptores EphA (EphA1 a EphA10) y 6 receptores EphB (EphB1 a EphB6) y, por otra parte, al menos 9
- 15 ligandos efrina, a saber: efrina-A1 a efrina-A6 y efrina-B1 a efrina-B3 por otra parte. En su origen, la subdivisión en dos clases, EphA y EphB se basaba en la homología de secuencia de su dominio extracelular, pero dicha subdivisión corresponde también a la unión preferente de sus ligandos, estando en general los ligandos efrina-A unidos a la membrana por un glicosilfosfatidilinositol (GPI) y siendo los ligandos efrina-B transmembrana con un dominio intracitoplásmico que tiene un dominio de unión PDZ.
- 20 Tal como se muestra en la figura 1 a continuación:
- el receptor Eph comprende, en el dominio extracelular, unidades repetidas de fibronectina de tipo III (en inglés: "fibronectin type III repeats"), una región rica en cisteína ("cystein rich region") y un dominio de unión para un ligando específico ("ligand-binding domain"); presenta además una prolongación en el dominio intracelular que comprende un dominio con actividad tirosina-quinasa, un motivo α -estéril ("SAM") y un
- 25 motivo de unión PDZ ("PDZ-binding motif");
- el ligando efrina-A se une a la membrana mediante un GPI ("GPI anchor"); y
 - el ligando transmembrana efrina-B presenta una prolongación intracelular que comprende una cola citoplásmica (en inglés: "cytoplasmic tail") y un motivo de unión PDZ.

- 30 Con respecto a la interacción entre el receptor Eph (principalmente EphB4) con tirosina-quinasa y su ligando (principalmente efrina-B2), proteína transmembrana, se trata de una "señalización bidireccional" ("bidirectional signaling") que comprende una señalización inducida por el receptor Eph en la célula que expresa Eph en su superficie ("forward signaling") y una señalización "inversa" inducida por el ligando efrina en la célula que expresa efrina en su superficie ("reverse signaling"). Dicha señalización bidireccional desempeña un papel en los contactos célula/célula, la migración y la adhesión celular.

- 35 Del artículo de Wang H.U. y col., "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor EphB4", Cell, 1998; 93; 741-753, se conoce la especificidad de expresión arterio-venosa de la pareja EphB4/efrina-B2, siendo expresado EphB4 únicamente por las venas y efrina-B2 por las arterias.

- 40 Los receptores EphB y sus ligandos efrina-B se expresan particularmente durante el desarrollo embrionario. Según Wang Z. y col., "Ephrin receptor, EphB4, regulates ES cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes and blood vessels", Blood, 2004; 103:100-109, EphB4 parece intervenir durante la diferenciación de células embrionarias (ES) en células endoteliales de ratones.

Es también conocido que ciertos receptores Eph, principalmente EphB4, están sobreexpresados en tumores. Dicha observación sugiere que estos receptores Eph desempeñan un papel en la progresión tumoral. El artículo de Noren N. K. y col., "Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth", Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 101:5583-5588, demuestra que la activación de efrina-B2 por EphB4 (señalización inversa) estimula el crecimiento tumoral.

5

Por el contrario, lo que se observa de la literatura anterior es: (i) un incremento de la expresión de efrina-B2 en el transcurso de la tumorigénesis, y subsidiariamente (ii) una suposición de que, debido a dicho incremento, la efrina-B2 sería susceptible de inducir tumores. Esto explica que varias publicaciones propongan utilizar la detección de efrina-B2 como marcador tumoral, por una parte, o inhibir la efrina-B2, por otra parte. Véase en particular (i) WO 02/058538 A, que describe la detección del ligando efrina-B2 como marcador de la vasculatura tumoral y una técnica que permite visualizar dicha vasculatura tumoral, (ii) US 2003/0207447 A, que propone recurrir a un inhibidor de Eph, principalmente EphB4, o a un inhibidor de efrina, principalmente de efrina-B2, para limitar la angiogénesis, impidiendo la interacción entre el receptor y el ligando, (iii) US 6864227 A y WO 03/102144 A, que recomiendan utilizar un anticuerpo, tal como un anti(Eph) [principalmente un anticuerpo anti(EphB4)], una anti(efrina) [principalmente anti(efrina-B2)] para reducir o modular la angiogénesis.

10

15

Para resumir, los documentos de patente publicados relativos al par Eph/efrina se refieren a métodos que tratan principalmente sobre:

- la señalización de las efrina-B (señalización inversa) mediante proteínas que se unen al dominio PDZ, ver WO 02/079382 A y WO 00/031124;
- 20 • la modulación de la expresión de efrina-B2 o de EphB4, ver principalmente US 2004/0110150 A, WO 04/006846 A y WO 04/080418;
- la inhibición de la interacción efrina-B2/EphB4 para tratar cánceres y enfermedades asociadas a la angiogénesis, ver principalmente el documento WO 04/080418A anteriormente nombrado y WO 04/069264 A, y
- 25 • la utilización de efrina-B2 como marcador de la vasculatura tumoral, ver principalmente el documento WO 02/058538 A anteriormente nombrado.

Además, el artículo de MAEKAWA HIROMITSU y col., "Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature", Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology, 2003, 23: 2008-2014, muestra que el ligando efrina-B2 aparejado con la proteína Fc (esto es el fragmento Fc de un anticuerpo), induce la migración de células endoteliales, las HUVECs.

30

Para terminar, de la US 6610534 B se conoce un adenovirus con la secuencia codificante de la esfingosina-quinasa y una secuencia codificante de una proteína angiogénica. El objetivo de esta patente es la expresión de la esfingosina-quinasa y de la proteína angiogénica, que puede ser efrina-B2, después de la inyección local de dicho adenovirus. Por otra parte, se conoce de la publicación US 2005/0049194 A un método para reducir la proliferación anormal de células madres hematopoyéticas, que comprende la administración por inyección de un inhibidor hidrosoluble de efrina-B2.

35

Además, Kawamoto y col. (Circulation, vol. 103, 2001, pp. 634-637) divulga el potencial terapéutico de EPC para la neovascularización del miocardio. El documento de patente WO 98/19712A describe un proceso de regulación de la angiogénesis que utiliza precursores de células endoteliales.

40 **Objetivo de la invención**

Según la invención, se propone una nueva solución, no descrita ni sugerida por la técnica anteriormente citada, al problema técnico de la estimulación de la angiogénesis. Más precisamente, se propone aquí una nueva solución técnica que utiliza un sistema marcador celular/ligando específico de dicho marcador, que se aplica a células

particulares, a saber, precursores de células endoteliales, para resolver el problema de la estimulación angiogénica. El objetivo es mejorar las terapias celulares anteriormente conocidas activando las células antes de su inyección para lograr una mayor eficacia de los procesos de revascularización, principalmente la revascularización post-isquémica.

5 Objeto de la invención

La nueva solución según la invención utiliza un sistema marcador celular/ligando donde dicho marcador está asociado a una célula precursora de células endoteliales. En este sistema, el marcador es un receptor Eph y el ligando específico de Eph es un ligando efrina.

10 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un nuevo sistema proangiogénico de tipo marcador celular/ligando específico donde el marcador celular está presente en la membrana exterior de la célula, y caracterizado porque comprende:

(a) un precursor de célula endotelial (EPC) que comprende un marcador celular seleccionado de entre el conjunto de los marcadores celulares EphB, principalmente EphB4 o EphB1, y

15 (b) un material proteínico de estructura:

L-K (I)

constituido por un ligando (L) seleccionado de entre ligandos efrina-B o un fragmento peptídico de los mismos con la misma actividad biológica, asociado o fusionado con una proteína de unión (K) seleccionada de entre fragmentos Fc de anticuerpos A,

20 donde dicho precursor de célula endotelial (a) y dicho material proteínico (b) se proporcionan separados entre sí,

y porque la incubación de dicho precursor de célula endotelial (a) de dicho material proteínico (b) produce un material celular de estructura:

EPC-EphB-L-K (II)

25 para estimular la angiogénesis.

En otros términos, para estimular la angiogénesis se activan las células EPC que comprenden el marcador Eph mediante el ligando L específico perteneciente a la familia de las efrinas. El ligando L puede estar constituido también por un fragmento peptídico de una efrina, por ejemplo efrina-B2, que tendría entonces la misma actividad biológica.

30

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un material celular capaz de estimular la angiogénesis, caracterizado porque una estructura:

EPC-Eph-L-K (II)

donde dicho ligando L está asociado a o fusionado con una proteína de unión K.

35 Dicho material celular es susceptible (i) de presentarse en forma de un cultivo celular esencialmente purificado o en forma de un cultivo celular en asociación con otras células precursoras, principalmente células mononucleadas, y (ii) de estar, en este caso, congelado.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un proceso para la preparación de dicho material celular, proceso caracterizado porque comprende las etapas consistentes en:

40 • recurrir a EPC que expresan en su membrana exterior un marcador de la familia de los Eph, principalmente EphB4 o EphB1, y

- poner en contacto *in vitro* dichos EPC con un material proteínico L-K, siendo L un ligando específico de dicho marcador seleccionado entre los ligandos Efrina-B o un fragmento peptídico del mismo con la misma actividad biológica; y siendo K una proteína de unión asociada o fusionada con L seleccionada de entre fragmentos Fc de anticuerpos A.

5 Se describe igualmente un medicamento para su uso para reconstituir vasos dañados, caracterizado porque comprende, en asociación con un excipiente fisiológicamente aceptable, una cantidad terapéuticamente aceptable de un material celular según la invención, principalmente como ingrediente activo proangiogénico.

Finalmente, según otro aspecto de la invención, se proporciona una nueva utilización de dicho material celular, utilización caracterizada porque se recurre a dicho material celular como ingrediente activo proangiogénico en asociación con un excipiente fisiológicamente aceptable para preparar un compuesto para uso terapéutico en el tratamiento de las insuficiencias vasculares, principalmente en la revascularización de los tejidos isquémicos, cardíacos, cerebrales o periféricos.

Breve descripción de las figuras

En las figuras anexas,

- 15
- la figura 1, mostrada más detalladamente más adelante, ilustra la técnica anterior y representa esquemáticamente los receptores con tirosina quinasa, Eph, y sus ligandos de tipo efrina-A o efrina-B, y
 - las figuras 2 y 4 muestran gráficamente las propiedades proangiogénicas del material celular según la invención según los ensayos realizados.

20 Descripción detallada de la invención

Se conoce, principalmente del artículo de Pasquale E.B, Curr.Opin. Cell Biol., 1997; 9(5): 608, la especificidad de los componentes del sistema receptor Eph/ligando efrina. Por comodidad, la tabla 2, mostrada más adelante y según dicho artículo (tal como se indica en US 6579683 A), establece dichas especificidades para algunas parejas, con los ligandos en la segunda columna ordenados por afinidad decreciente con respecto a sus receptores, en la primera

25

En el sistema marcador celular/ligando específico según la invención, se puede concebir que los dos componentes del par pueden presentarse en cada caso bajo la forma de una secuencia de aminoácidos o, en su caso, bajo la forma de una secuencia de ácidos nucleicos. No obstante, es claramente preferible disponer al inicio de un receptor Eph expresado en la membrana de EPC en forma de una secuencia de aminoácidos. Asimismo, el ligando efrina preferentemente se utiliza bajo la forma de una secuencia de aminoácidos o de un fragmento peptídico efrina. En efecto, bajo la forma de aminoácidos Eph y efrina se unen con la interacción proteína/proteína necesaria para observar la actividad proangiogénica. Por tanto, a continuación, Eph y efrina intervienen en cada caso exclusivamente bajo la forma proteínica de una secuencia de aminoácidos.

35

Como marcador Eph, se puede utilizar aquí EphA o EphB. No obstante, se prefiere según la invención que el marcador Eph sea EphB, ya que los marcadores EphB están implicados de modo preponderante en la angiogénesis, mientras que (según lo conocido hasta ahora) los marcadores EphA parecen intervenir principalmente a nivel del sistema nervioso.

Según la invención, ventajosamente el marcador EphB será EphB4 o EphB1; entre los marcadores EphB, es preferente EphB4 a EphB1.

40

Entre los ligando efrina, son preferentes según la invención los ligandos efrina-B, principalmente efrina-B2 o efrina-B1. Además, una variante de efrina-B2, por ejemplo que corresponde a un fragmento peptídico de efrina-B2 que tiene la misma actividad biológica, también puede ser apropiado.

Por tanto, en el sistema según la invención se utilizará ventajosamente el marcador EphB4 o EphB1 por una parte y el ligando efrina-B2 o efrina-B1 por otra, siendo el par Eph/efrina especialmente preferente de la invención el par EphB4/efrina-B2.

5 Para que el ligando L pueda activar EPC-Eph, en la mayoría de los casos es importante que esté asociado a/o fusionado con una proteína de unión K bajo la forma de un material proteínico de estructura:

L-K (I)

siendo la proteína efrina-B2 recombinante, según el Depositante, una sustancia susceptible de activar EPC-Eph sola sin el aporte de dicha proteína de unión K.

10 Entre las proteínas de unión K que convienen según la invención se puede citar principalmente los numerosos fragmentos Fc de anticuerpos (por ejemplo aquellos obtenidos por segmentación de anticuerpos con pepsina, papaína o cualquier otra sustancia apropiada). Por comodidad, se recomienda aquí un fragmento Fc, fácilmente disponible en el mercado como sub-producto de la preparación de anticuerpos tales como Fab¹ y F(ab)².

Como variante y teniendo en cuenta lo anterior, dicho material proteínico L-K puede reemplazarse por una proteína efrina-B2 recombinante, preferentemente humana.

15 Las EPC que convienen según la invención son células que comprenden un marcador celular Eph (principalmente EphB, preferentemente EphB1 o mejor EphB4) expresado a nivel de su membrana exterior. Tales células EPC se obtienen a partir de células mononucleares o de células que expresan CD34 o CD133 procedentes de médula ósea, de sangre periférica o mejor de sangre del cordón umbilical.

20 Las células mononucleares se producen al nivel de la médula ósea, donde se encuentran en una concentración importante, pasan a la circulación sanguínea y se vuelven a encontrar en la sangre del cordón y en la sangre periférica. Constituyen un material privilegiado, ya que, en conjunto, una cantidad importante de células posee el material genético requerido para (i) expresar el marcador Eph (y más particularmente el marcador EphB4), o (ii) comprender en su membrana exterior dicho marcador ya expresado. Las células mononucleares preferentes según la invención son CD34⁺ o CD133⁺, ya que producen, después de la diferenciación, una cantidad relativamente
25 importante de EPC que expresan o comprenden sustancialmente el marcador EphB4.

La concentración de las EPC producidas por diferenciación, contenidas en la población de células mononucleares, varía según el origen de las células. Dicha concentración es más o menos equivalente en la médula ósea y la sangre de cordón umbilical. Por el contrario, es más baja en sangre periférica.

30 El material celular según la invención, representado por la estructura II anterior, donde el material proteínico L-K es susceptible de reemplazarse por proteína efrina-B2 recombinante, está constituido por una o varias células que en su membrana exterior poseen en cada caso un marcador Eph, principalmente EphB4 o EphB1, unido a su ligando específico. Como variante, dicho material celular puede estar constituido por un cultivo que contiene varias células de la estructura II en asociación, en este caso, con otras células no activadas por dicho material proteínico; tal cultivo puede ser entonces una mezcla celular de EPC activadas, de EPC no activadas y de células mononucleares.

35 Según una forma particular de la invención, dicho material celular se obtiene por incubación:

- (a) de un precursor celular endotelial (EPC) que comprende un marcador celular seleccionado de entre el conjunto constituido por los EphB, principalmente EphB4 o EphB1, con
- (b) un material proteínico de estructura:

L-K (I)

40 que está constituido por un ligando (L) específico de dicho marcador, y está asociado o fusionado con una proteína de unión (K) seleccionada de entre un fragmento Fc de anticuerpos A,

antes de ser llevado a su sitio de administración.

Según una forma de realización ventajosa, la incubación se lleva a cabo *in vitro* durante 10 a 60 minutos, principalmente durante 30 minutos, transcurriendo dicho periodo de incubación justo antes de la administración del material celular.

- 5 Como variante, dicho material celular puede encontrarse bajo la forma de un cultivo celular purificado o como una mezcla de células que contiene (i) células EPC activadas por L-K o proteína efrina-B2 recombinante, y (ii) precursores no activados, por ejemplo células mononucleares y/o EPC que no están activadas por L-K o dicha proteína efrina-B2 recombinante. Además, el material celular puede conservarse congelado.

- 10 El material celular preferente según la invención, y según lo indicado anteriormente, tiene una estructura II, siendo dicho marcador EphB4 o EphB1 y siendo dicho ligando efrina-B2 o efrina-B1.

Según una forma de realización preferente, el proceso de la invención para preparar dicho material celular, comprende las etapas siguientes:

1. recurrir a células mononucleares procedentes de médula ósea, de sangre periférica o de sangre de cordón umbilical, y aislar las células mononucleares CD34⁺ y/o CD133⁺;
- 15 2. diferenciar dichas células de la etapa anterior para obtener EPC provistas del marcador EphB, y
3. activar *in vitro* las EPC así obtenidas en la etapa 2, por fijación de efrina-B en EphB.

Dicho proceso comprende una etapa suplementaria entre las etapas 1 y 2, a saber:

1a⁰. aislar las células mononucleares CD34⁺ y/o CD133⁺.

- 20 La etapa 1a⁰ implica un proceso ternario 1 + 1a⁰ + 2. No obstante, la realización de dicha etapa 1a⁰ aumenta el coste de producción en relación al proceso binario 1 + 2. En la práctica, como las células EPC no activadas sirven para la dilución de las células EPC activadas en el medio celular que las contiene, sin entorpecer su acción, el proceso binario es actualmente más rentable que el proceso ternario.

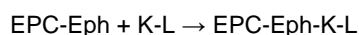
Según el proceso de la invención, dicho ligando L está asociado a/o fusionado con una proteína de unión K para lograr un material celular de estructura:

- 25
$$\text{EPC-Eph-L-K} \quad (\text{II})$$

donde ventajosamente dicho marcador Eph es EphB4 o EphB1 y dicho ligando L es efrina-B2 o efrina-B1.

Como medicamento, el material celular según la invención se puede utilizar para tratar principalmente insuficiencias vasculares, en particular en la revascularización de tejidos isquémicos cardíacos, cerebrales o periféricos.

- 30 El material celular según la invención puede obtenerse en forma de una dosis unitaria, conteniendo cada dosis el material de estructura II. Como variante, se puede prever una elaboración según la cual los componentes de dicho material II, a saber, EPC-Eph y el material proteínico L-K, no están en contacto; incubando según el mecanismo reactivo:



- 35 antes de la administración, principalmente durante los 10 a 60 minutos (preferentemente durante los 20 a 30 minutos) que preceden a dicha administración.

En este caso, es preferente una composición farmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente aceptable de los dos componentes del sistema proangiogénico según la invención, presentados

separadamente, cada uno en un excipiente fisiológicamente aceptable, siendo los dos componentes incubados antes de la administración para proporcionar un material celular de estructura II.

5 Tal como se indica anteriormente, el material celular según la invención es útil para regenerar tejidos vasculares que fueron dañados principalmente a nivel cardíaco, cerebral o periférico. Es particularmente conveniente para la preparación de una composición destinada al tratamiento de la arteritis, la insuficiencia vascular coronaria o cardíaca y la insuficiencia vascular cerebral. En un modelo animal, ha dado buenos resultados en el tratamiento de la isquemia denominada crítica de los miembros inferiores, por una parte, y una garantía de curación que permite evitar la amputación.

10 El material celular según la invención puede ser administrado a mamíferos y en particular al hombre de forma ya conocida. Por ejemplo, dicho material celular es susceptible de ser (i) inyectado a nivel o cerca de la lesión vascular, (ii) inyectado en sangre vía i.v., o también (iii) llevado al lugar de la lesión mediante un vector apropiado. Como variante, se pueden administrar separadamente por vía inyectable (principalmente vía i.v.) las células EPC-Eph, por una parte, y el material proteínico ligado a un vector conocido en el campo de la terapia génica, por otra.

15 En el hombre adulto, se pueden administrar por inyección i.v. células de la estructura II contenidas, en este caso, en una mezcla celular de EPC no activadas. Tal mezcla celular puede comprender un total de aproximadamente 10^5 a 10^9 células por inyección.

Otras ventajas y características de la invención serán mejor comprendidas con la lectura de los ejemplos de preparación y ensayos farmacológicos siguientes. Evidentemente, el conjunto de dichos elementos no es limitativo, se da solo a título ilustrativo, siendo el material celular utilizado el siguiente: EPC-EphB4-efrina-B2-Fc.

20 **Ejemplo 1: Obtención de EPC-EphB4**

(A) Se extraen muestras (de 30 a 50 ml cada una) de sangre de cordón umbilical humano, que se colocan en tubos estériles que contienen una solución anticoagulante de heparina sódica. Por centrifugado de gradiente de densidad con Pancoli (1,077 g/ml, producto comercializado por la empresa DOMINIQUE DUTSCHER S.A., Brumath, Francia), se aíslan células mononucleares de la sangre de cordón umbilical. Las células mononucleares se separan a continuación de las células adherentes por cultivo en cajas de plástico durante 24 horas a 37°C. Se obtiene una mezcla celular que contiene células mononucleares que expresan el marcador EphB4 y células mononucleares que no expresan dicho marcador.

(B) La mezcla celular obtenida al finalizar el ejemplo 1(A) se coloca en los pocillos de una placa de 6 pocillos revestidos con colágeno tipo 1 (producto comercializado por la empresa SIGMA-ALDRICH, Saint-Quentin, Francia) en un medio de cultivo que contiene hVEGF para diferenciación (como se define en el artículo de Le Ricousse-Roussanne S. y col., Cardiovasc, Res., 2004; 62, 176-184). Al cabo de 15 días de cultivo, se recoge una mezcla celular enriquecida con EPC-EphB4.

Ejemplo 2: Obtención de EPC-EphB4

(A) A partir de la mezcla celular obtenida después del ejemplo 1(A), se aíslan y purifican las células CD34+ de las células no adherentes mediante una técnica de separación inmunomagnética estándar, básicamente con el material "CD34 aislamiento Kit" (comercializado por la empresa MILTENYI BIOTECH, Paris, Francia) que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD34. El análisis de las células así obtenidas por citometría de flujo y utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD34 (preferentemente diferente al anterior) acoplado al FITC muestra que el 75% ($\pm 5,6\%$) de las mismas poseen el marcador CD34.

(B) La mezcla celular así obtenida, que contiene $1,5 \times 10^6$ a $3,5 \times 10^6$ células CD34⁺ puede colocarse en los pocillos de una placa de 6 pocillos revestidos con una matriz que contiene fibronectina, laminina, sulfato sódico de heparano y colágeno tipo I y IV (productos comercializados por la empresa SIGMA-ALDRICH anteriormente citada) y en un medio de cultivo que contiene hVEGF, bFGF e IGF1 (productos comercializados por la

empresa R&D SYSTEMS INC., Oxford, Reino Unido). Al cabo de 15 días de cultivo, se recoge una mezcla celular enriquecida con EPC-EphB4.

Ejemplo 3: Obtención de EPC-EphB4-efrina B2-Fc

Después de obtener la mezcla celular según el ejemplo 1(B) que contiene células EPC provistas del marcador EphB4, ésta se trata con 3 µg/ml de proteína de fusión Efrina-B2-Fc, EphB4-Fc o CD6-Fc (CD6-Fc interviene como control negativo para demostrar el efecto observado por la activación de las EPC por efrina-B2) durante un período de incubación de 30 minutos a 37°C. Se separa por enjuague cada proteína de fusión no ligada (se realizan aquí al menos dos enjuagues).

Se obtienen tres mezclas celulares, de las cuales una contiene el material celular según la invención de estructura EPC-EphB4-efrina-B2-Fc, la segunda contiene material celular resultante de la activación de EPC por la proteína de fusión EphB4-Fc y la tercera contiene el material celular resultante de la activación de EPC por la proteína de fusión CD6-Fc.

Ejemplo 4: Obtención de EPC-EphB4-efrina-B2-Fc

Se procede tal como se indica en el ejemplo 3 para obtener células de estructura EPC-EphB4-efrina-B2-Fc, con la diferencia de que la mezcla celular de partida es la obtenida después del ejemplo 2(B). Se obtienen las células activadas anunciadas.

Protocolo de los ensayos

En el momento $T = 0$, se procede a la ligadura de la arteria femoral derecha de ratones machos Nudes de 7 semanas (un lote de 6 animales por ensayo y por producto para testar, incluidos los controles PBS, EPC no activadas y HUVEC) para inducir una isquemia. En el momento $T = +4,5$ horas, se procede a la incubación según el ejemplo 3 para obtener el material celular de estructura EPC-EphB4-efrina-B2-Fc según la invención y los dos otros materiales celulares comparativos. A continuación, en el momento $T = 5$ horas, se inyecta vía intravenosa a nivel del sinus retro-orbital cada una de las tres mezclas celulares obtenidas en el ejemplo 3 (10^6 células/ratón). En el momento $T = 12$ días, los ratones se sacrifican y se extraen los músculos gastrocnemios de la pata isquémica y de la pata no isquémica. Se determina:

- la puntuación angiográfica
- la densidad capilar (esto es capilares/mm²) y
- el flujo sanguíneo cutáneo.

En las figuras 2-4 se muestran los valores numéricos obtenidos en forma $\text{media} \pm \text{SEM}$.

30 Ensayo 1: Puntuación angiográfica

La puntuación angiográfica (esto es la densidad de los vasos) se determina por microangiografía. Más precisamente, la densidad de los vasos en el miembro isquémico con respecto al miembro no isquémico se mide mediante microangiografía de alta definición (ver modalidades operatorias en el artículo de Sivestre J.S. y col., Cir, Res., 2001; 89; 259-264). Los resultados obtenidos, en la forma de relación (pata isquémica /pata no isquémica) se muestran en el gráfico de la figura 2.

Se observa que la inyección de las EPC no activadas o activadas por la proteína de fusión EphB4-Fc o CD6-Fc aumenta levemente y a niveles comparables la densidad de los vasos con respecto al grupo control, que ha recibido PBS. Cuando las células EPC están activadas por la proteína de fusión efrina-B2-Fc, se constata que el incremento de la densidad de los vasos es un 25,5% más importante que el observado después de la inyección de las EPC no activadas, esto es un incremento de la puntuación angiográfica de 1,34 veces.

Ensayo 2: Densidad capilar (capilares/mm²)

La densidad capilar del músculo isquémico se estudia mediante marcado de cortes del músculo gastrocnemio con un anticuerpo dirigido contra el marcador CD31 específico de las células endoteliales, en comparación con cortes del mismo músculo del miembro no isquémico. Los resultados obtenidos en forma de relación (pata isquémica /pata no isquémica) se muestran en el gráfico de la figura 3.

- 5 Se observa que la densidad capilar es un 36,7% más importante cuando los ratones fueron tratados por inyección con las EPC activadas con la proteína de fusión efrina-B2-Fc según la invención, en comparación con las EPC no activadas, esto es un incremento de la densidad capilar de 1,57 veces.

Ensayo 3: Flujo sanguíneo cutáneo

- 10 Se realizó también una evaluación cuantitativa del flujo sanguíneo expresada como la ratio del flujo sanguíneo en miembro isquémico/miembro no isquémico para verificar que la variación de la cantidad de vasos corresponde a una adaptación funcional y, por tanto, a una variación de la perfusión del miembro isquémico. Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico de la figura 4.

- 15 Se observa que la inyección de las EPC activadas según la invención por la proteína de fusión efrina-B2-Fc aumenta la ratio del flujo sanguíneo del miembro isquémico con respecto al miembro no isquémico 1,37 veces (incremento del 27,1%).

Ejemplo 5: Función del marcador EphB4

En este último ejemplo, se demostró la función del marcador EphB4 gracias a preparados celulares donde se había inhibido la síntesis proteínica del marcador EphB4.

- 20 Para ello, se recurrió a “ARN interferentes” o “siRNA”, en inglés, capaces principalmente de degradar específicamente los ARN mensajeros codificadores para un gen dado y, en particular en este caso, para el gen que expresa el marcador EphB4. La acción específica de dichos ARN interferentes se denomina transfección.

Estos preparados celulares fueron administrados a ratones machos Nude según un protocolo de ensayos análogo al protocolo de ensayos anteriormente citado.

- 25 En primer lugar, se cultivan células endoteliales progenitoras o EPC hasta un 80% de confluencia. Se diluyen soluciones de siRNA EphB4, es decir que contienen el ARN de interferencia capaz de inhibir la síntesis proteínica del marcador EphB4, en un medio M199 que no contiene ni antibióticos, ni suero y se incuban durante cinco minutos a temperatura ambiente. Por otra parte, una solución de “siRNA control” que no corresponde a ningún gen particular se diluye en las mismas condiciones. Esta última solución diluida, que no tiene por tanto ningún efecto biológico en la expresión del marcador EphB4, permite simplemente verificar que los ARN interferentes no tienen actividad propia independientemente de su función inhibidora.

- 30 Por otra parte, un agente de transfección, Dharmafect2 (Dharmacon, Perbio) se prepara en las mismas condiciones que las soluciones anteriormente nombradas y se mezcla con dichas soluciones, que a continuación se incuban.

- 35 Dichas soluciones incubadas se ponen entonces en contacto con células endoteliales progenitoras EPC de modo que, en un primer preparado celular, provocan la inhibición de la síntesis proteínica del marcador EphB4 y, en un segundo preparado celular, donde la expresión del gen codificador para el marcador EphB4 no está inhibido, constituyen un control.

Ambos preparados celulares a su vez son divididos respectivamente en dos y uno de ellos se estimula con la proteína de fusión efrina B2-Fc antes de inyectarse vía intravenosa a ratones que han sufrido una ligadura de la arteria femoral derecha. Así, se administran a los ratones cuatro preparados celulares diferentes.

- 40 En la tabla 1 siguiente se muestra una síntesis de los resultados del ejemplo 5.

Tabla 1

Nº	PBS	1	2	3	4
Punt. Angiografía	100	161,5±10,7	218,8±12,8	153,5±2,9	158,9±12,5
Flujo Sanguíneo	100	144,5±4,5	193,5±4,7	151,1±8	138,5±14,1
Densidad capilar	100	147,4±10,7	201,7±12,8	142,6±11	140,8±11,3

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. EPC transfectadas con siRNA control y no estimuladas antes de inyección; 2. EPC transfectadas con siRNA control y estimuladas con efrina-B2-Fc antes de inyección; 3. EPC transfectadas con siRNA EphB4 y no estimuladas antes de inyección; 4. EPC transfectadas con siRNA EphB4 y estimuladas con efrina-B2-Fc antes de inyección. |
|--|

Se señala aquí también que las medidas de la puntuación angiográfica, del flujo sanguíneo y de la densidad capilar para los cuatro preparados celulares administrados evolucionan de forma ligeramente paralela.

5 Por otra parte, es inmediatamente evidente que el resultado de las medidas de los preparados celulares nº 1, 3 y 4 son esencialmente idénticos, mientras que el resultado del preparado celular nº 2 es superior a casi un 40%.

10 Considerando la hipótesis de que evidentemente la actividad proangiogénica se ve favorecida por la asociación del marcador EphB4 y del material proteínico efrina-B2-Fc, se constata con la lectura de la tabla 1, comparando los resultados de los preparados celulares nº 1 y 4, que el efecto de las células endoteliales progenitoras que incorporan "siRNA control" pero no asociadas al material proteínico efrina-B2-Fc es ligeramente equivalente al efecto de las células endoteliales progenitoras cuya expresión del marcador EphB4 está inhibida pero que están asociadas al material proteínico efrina-B2-Fc. Así, se demuestra que los ARN interferentes no tienen actividad propia independientemente de su función inhibidora y que las células endoteliales progenitoras EPC que expresan al marcador EphB4 no tienen más actividad que las células endoteliales progenitoras EPC que no expresan el marcador y que están asociadas al material proteínico efrina-B2-Fc.

15 Por otra parte, comparando los resultados de las medidas de los preparados celulares nº 1 y 3, se observa que las células endoteliales progenitoras EPC solas que expresan al marcador EphB4 o no tienen una actividad comparable.

Además, y aquí reside lo esencial, se demuestra con los resultados del preparado celular nº 2 y en comparación con cualquiera de los preparados que la asociación específica del marcador EphB4 y del material proteínico efrina-B2-Fc presenta una actividad proangiogénica importante.

20

Tabla 2

Especificidad para algunos pares Eph/efrina	
Receptores Eph	Ligandos efrina (afinidad decreciente)
EphA1	efrina-A1
EphA2	efrina-A3, -A1, -A5, -A4
EphA3	efrina-A5, -A2, -A3, -A1
EphA4	efrina-A5, -A1, -A3, -A2, -B2, -B3
EphA5	efrina-A5, -A1, -A2, -A3, -A4
EphA6	efrina-A2, -A1, -A3, -A4, -A5
EphA7	efrina-A2, -A3, -A1
EphA8	efrina-A5, -A3, -A2
EphB1	efrina-B2, -B1, -A3
EphB2	efrina-B1, -B2, -B3
EphB31	efrina-B1, -B2, -B3
EphB4	efrina-B2, -B1

REIVINDICACIONES

1. Sistema proangiogénico del tipo marcador celular/ligando específico, sistema donde el marcador celular está presente en la membrana exterior de la célula, caracterizado porque comprende:
- 5 a) un precursor de célula endotelial (EPC) que comprende un marcador celular seleccionado de entre el conjunto constituido por los marcadores celulares EphB, principalmente EphB4 o EphB1, y
- b) un material proteínico de estructura:

L-K (I)

constituido por un ligando (L) seleccionado de entre ligandos efrina-B o un fragmento peptídico de los mismos con la misma actividad biológica y que está asociado a o fusionado con una proteína de unión (K) seleccionada de entre fragmentos Fc de anticuerpos A,

10 disponiéndose dicho precursor de célula endotelial (a) y dicho material proteínico (b) separados entre sí, y porque la incubación de dicho precursor de célula endotelial (a) de dicho material proteínico (b) produce un material celular de estructura:

15 EPC-EphB-L-K (II)

para estimular la angiogenesis.

2. Sistema según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho marcador EphB está presente en forma de una secuencia de aminoácidos.
- 20

3. Sistema según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque dicho marcador es EphB4 o EphB1 y porque el ligando es efrina-B2.

4. Sistema según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque dicho marcador y dicho ligando son respectivamente EphB4 y efrina-B1.
- 25

5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las EPC se obtienen a partir de células mononucleares seleccionadas de entre CD34⁺ y CD133⁺, o de células que expresan CD34 o CD133 que proceden de médula ósea, de sangre periférica o especialmente de sangre de cordón umbilical.
- 30

6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque las EPC se obtienen a partir de sangre periférica o de sangre de cordón umbilical.
- 35

7. Material celular para estimular la angiogénesis, caracterizado porque una estructura:

EPC-EphB-L-K (II)

donde dicho ligando L se selecciona de entre los ligandos efrina-B o un fragmento peptídico del mismo con la misma actividad biológica, está asociado a/o fusionado con una proteína de unión K seleccionada de entre fragmentos Fc de anticuerpos A, siendo dicho material celular susceptible (i) de presentarse en forma de un cultivo celular purificado o en forma de un cultivo celular en asociación con otras células precursoras, principalmente células mononucleares y (ii) de estar en este caso congelado.

40

8. Material celular según la reivindicación 7 caracterizado porque se obtiene por incubación
- (a) de un precursor de célula endotelial (EPC) que comprende un marcador celular seleccionado de entre el conjunto constituido por marcadores celulares EphB, principalmente EphB4 o EphB1, con
- 45

(b) un material proteínico de estructura:

L-K (I)

- 5 constituido por un ligando (L) específico de dicho marcador y asociado o fusionado con una proteína de unión (K) seleccionada de entre un fragmento Fc de anticuerpo A, antes de ser llevado a su lugar de administración.
9. Material celular según la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque dicho marcador es EphB4 o EphB1 y porque dicho ligando es efrina-B2.
- 10 10. Proceso para la preparación de un material celular según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado porque comprende las etapas que consisten en:
- recurrir a EPC que expresan en su membrana exterior un marcador de la familia de EphB, principalmente EphB4 o EphB1, y seleccionado de entre ligandos efrina-B o un fragmento peptídico de los mismos con la misma actividad biológica;
 - poner en contacto *in vitro* dichas EPC con un material proteínico L-K, donde L es un ligando específico de dicho marcador y se selecciona de entre ligandos Efrina-B o un fragmento peptídico de los mismos con la misma actividad biológica; y K es una proteína de unión asociada o fusionada con L seleccionada de entre fragmentos Fc de anticuerpos A.
- 15
- 20 11. Proceso según la reivindicación 10, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
1. recurrir a células mononucleares procedentes de médula ósea, de sangre periférica o de sangre de cordón umbilical, y aislar las células mononucleares CD34⁺ y/o CD133⁺;
 2. diferenciar dichas células de la etapa anterior para obtener las EPC provistas del marcador EphB, y
 3. activar *in vitro* las EPC así obtenidas en la etapa 2 por fijación de efrina-B en EphB.
- 25
12. Proceso según la reivindicación 11, caracterizado porque, en la etapa 1, las células mononucleares proceden de sangre periférica o de sangre de cordón umbilical.
- 30 13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 caracterizado porque dicho ligando L se selecciona entre ligandos efrina-B o un fragmento peptídico de los mismos con la misma actividad biológica y está asociado a/o fusionado con una proteína de unión K para lograr un material celular de estructura:

EPC-EphB-L-K (II)

donde K se selecciona de entre un fragmento Fc de anticuerpo A.

- 35 14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque el marcador es EphB4 o EphB1 y porque dicho ligando L es efrina-B2.
- 40 15. Medicamento para su uso para reconstituir vasos dañados, caracterizado porque comprende, en asociación con un excipiente fisiológicamente aceptable, una cantidad terapéuticamente aceptable de un material celular según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, principalmente como ingrediente activo proangiogénico.

- 5
16. Composición farmacéutica para reconstituir vasos dañados, caracterizada porque comprende una cantidad terapéuticamente aceptable de los dos componentes del sistema proangiogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se presentan por separado, cada uno en un excipiente fisiológicamente aceptable, incubándose los dos componentes antes de la administración, para lograr un material celular de estructura II.
- 10
17. Utilización de un material celular, utilización caracterizada porque se recurre a un material celular según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, como ingrediente activo proangiogénico, en asociación con un excipiente fisiológicamente aceptable, para la preparación de una composición para su uso terapéutico en el tratamiento de insuficiencias vasculares, principalmente en la revascularización de tejidos isquémicos cardíacos, cerebrales o periféricos.
- 15
18. Utilización según la reivindicación 17, caracterizada porque dicho compuesto está destinado al tratamiento de arteritis, insuficiencia coronaria, insuficiencia cardíaca o insuficiencia cerebral.

Fig. 1

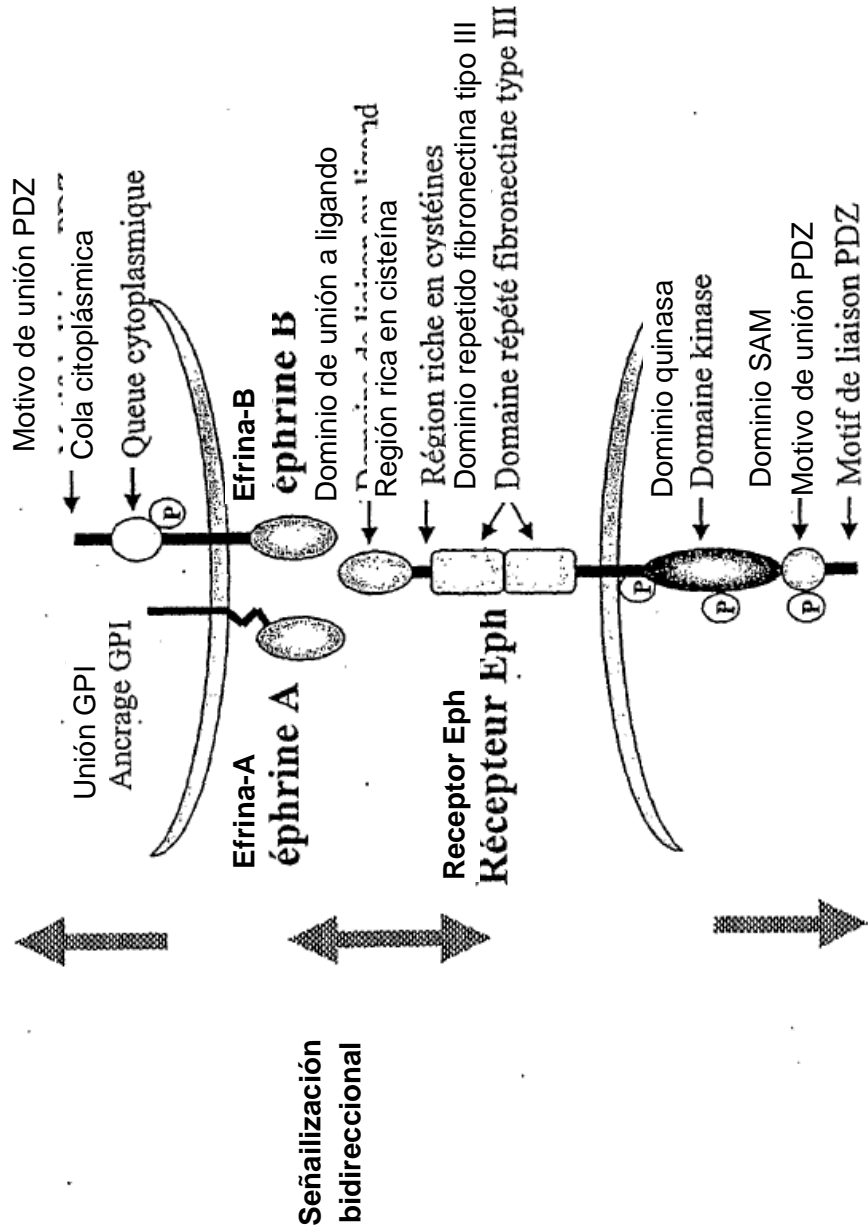
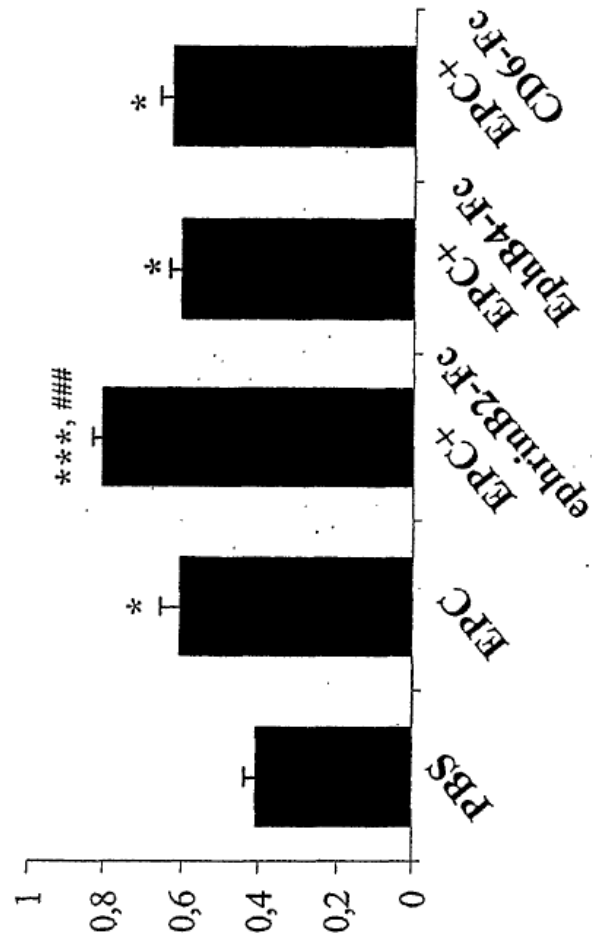
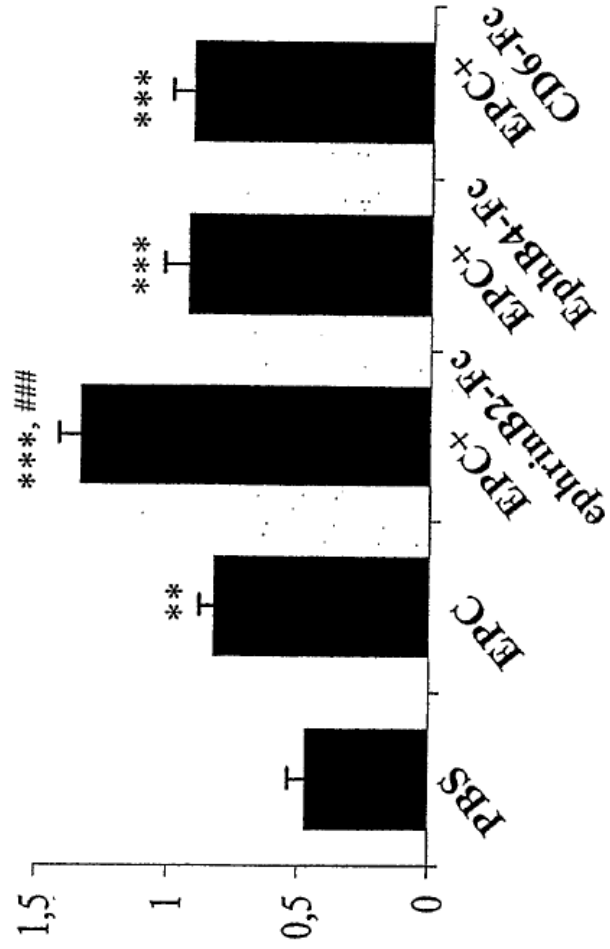


Fig. 2

Puntuación angiográfica
(pata isquémica/pata no isquémica)



Número de capilares (marcador CD31 /mm²
(pata isquémica/pata no isquémica)



Flujo sanguíneo cutáneo
(pata isquémica/pata no isquémica)

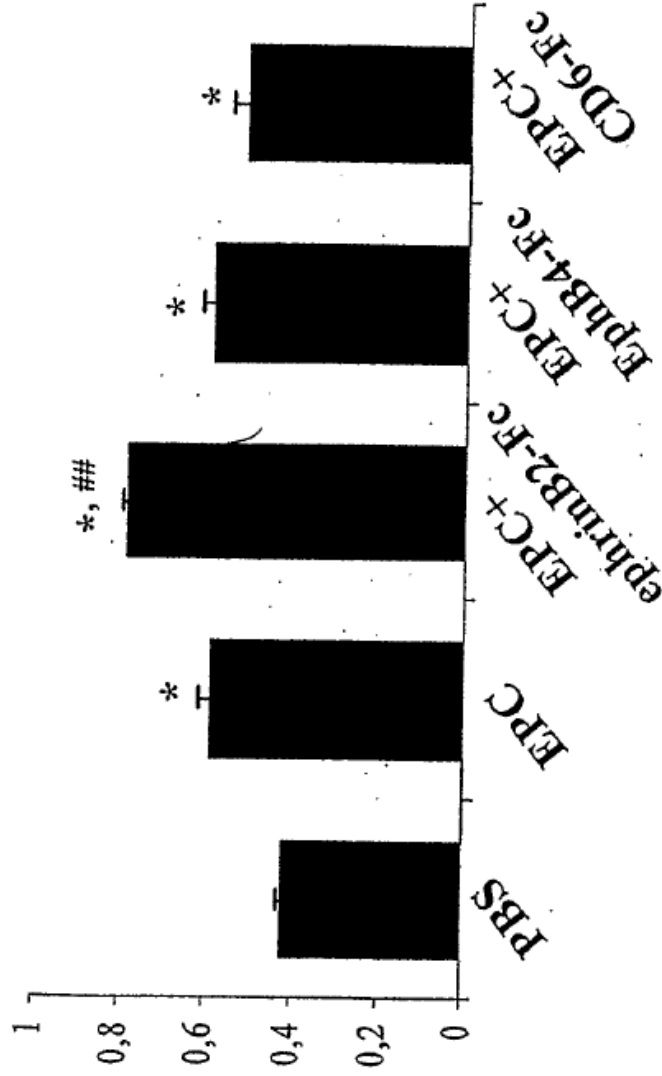


Fig. 4