

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 351**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A01N 1/02 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2013** **PCT/IB2013/053250**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013** **WO13160855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2013** **E 13727375 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 2841564**

54 Título: **Composición y método de células madre para la preservación del tejido cardíaco**

30 Prioridad:

24.04.2012 PT 2012106267

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

04.05.2018

73 Titular/es:

STEMLAB, S.A. (100.0%)
Biocant Park, Núcleo 04, Lote 2
3060-197 Cantanhede, PT

72 Inventor/es:

DA SILVA FERREIRA, LINO y
FIDALGO DOS SANTOS SILVA CARVALHO,
ISABEL MARIA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 666 351 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

Composición y método de células madre para la preservación del tejido cardíaco

Campo técnico

5 La divulgación se refiere a una composición y método de células madre hematopoyéticas humanas tratadas con ácido lisofosfatídico que mejora la supervivencia en hipoxia y condiciones privadas de suero y preserva el tejido cardíaco después de un infarto de miocardio.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad cardíaca es la principal causa de muerte y discapacidad tanto en las naciones industrializadas como en el mundo en desarrollo, y representa aproximadamente el 40% de toda la mortalidad humana. Muchos pacientes que sobreviven desarrollan una forma crónica de enfermedad cardíaca llamada insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), que se asocia con un deterioro progresivo del músculo cardíaco, formación de cicatriz, dilatación y disfunción del ventrículo izquierdo (LV). Los pacientes con insuficiencia cardíaca isquémica severa tienen una alta morbilidad y mortalidad, siendo el trasplante cardíaco la única terapia definitiva disponible.

15 Recientemente, se han probado diferentes fuentes de células madre en pacientes humanos que padecieron un MI (infarto de miocardio), incluyendo células madre adultas de sangre periférica (APBSC) y células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) (Losordo, DW, et al., Intramyocardial Transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized Controlled trial. *Circulation*, 2007. 115 (25): páginas 3165-72; Schachinger, V., et al., Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006. 355 (12): páginas 1210-21). La mejora en la fracción de eyección del LV se ha informado en la mayoría de los ensayos (Schachinger, V., et al., Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006. 355 (12): páginas 1210-21, Passier, R., LW van Laake, y CL Mummery, Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*, 2008. 453 (7193): páginas 322-9); sin embargo, la mejoría funcional es aún modesta (fracción de eyección por debajo del 5%). Por lo tanto, existe la necesidad de enfoques alternativos para (i) aumentar el efecto terapéutico de las células madre y para (ii) tratar a los pacientes viejos que tienen células madre adultas con actividad biológica deteriorada (por ejemplo, pacientes diabéticos, etc.) (Passier, R., LW van Laake, y CL Mummery, Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*, 2008. 453 (7193): página 322-9).

30 Las células CD34+ aisladas de sangre de cordón umbilical humano pueden ser una terapia celular promisorias para la regeneración del corazón. Estas células madre pueden usarse en forma autóloga, pueden diferenciarse en células vasculares in vitro o in vivo (Le Ricousse-Roussanne, S., et al., Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cordblood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovasc Res*, 2004. 62 (1): páginas 176-84) y aumentan la neovascularización en modelos animales de isquemia miocárdica (Ma, N., et al., Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res*, 2005. 66 (1): páginas 45-54; Hirata, Y., et al., Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 327 (2): páginas 609-14). Las células CD34+ aisladas de sangre de cordón umbilical humano tienen varias ventajas en comparación con APBSC y BMDSC, incluida una mayor tasa de proliferación, riesgo relativamente bajo de producción de células no deseadas in vivo (en oposición a los riesgos descritos para BMDSC), y una terapia celular adecuada para pacientes que padecieron un MI y tienen células CD34+ de sangre periférica humana con función alterada [5, 10]. Para la eficacia clínica, es imperativo que las células madre o sus progenies sobrevivan e injerten en el tejido del huésped. Desafortunadamente, muchas células mueren pocos días después del injerto (Ma, N., et al., Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res*, 2005. 66 (1): página 45- 54; Hirata, Y., et al., Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 327 (2): páginas 609-14; Henning, RJ, et al., Human umbilical cord blood progenitor cells are attracted to infarcted myocardium and significantly reduce myocardial infarction size. *Cell Transplant*, 2006. 15 (7): páginas 647-58).

Descripción general

50 Un aspecto de la presente divulgación describe un método para potenciar la supervivencia de células madre hematopoyéticas, preferiblemente CD34+ derivadas de cordón umbilical humano o sangre periférica, en condiciones hipóxicas y privadas de suero cultivando las células en medio que contiene ácido lisofosfatídico, preferiblemente que comprende además un gel, a saber, un gel biomimético.

Esta combinación mejoró sorprendentemente la supervivencia en condiciones de hipoxia y privación de suero y conserva el tejido cardíaco después de un infarto de miocardio. Esta mezcla, especialmente CD34+ derivadas de sangre de cordón umbilical humano tratadas con ácido lisofosfatídico en fibrina, mostró mejores resultados.

En una realización del método divulgado, el gel biomimético puede ser al menos uno de los siguientes: fibrina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, colágeno, derivados de PEG y sus mezclas. Preferiblemente, gel de fibrina, más preferiblemente, el gel de fibrina comprende un fibrinógeno a una concentración final de 1-100 mg/mL y trombina a una concentración final de 1-500 U/mL. Incluso más preferiblemente, el gel de fibrina comprende un fibrinógeno a una concentración final de 10-30 mg/mL y trombina a una concentración final de 2-50 U/mL.

En una realización del método divulgado, la concentración de lisofosfatídico varía entre 1 y 1.000 μ M, preferiblemente 100 mM.

Un aspecto de la presente divulgación describe una composición que comprende: células madre hematopoyéticas, preferiblemente CD34+ derivadas de cordón umbilical humano o sangre periférica; con ácido lisofosfatídico 100 μ M, preferiblemente que comprende además un gel, concretamente un gel biomimético.

Esta combinación mejoró sorprendentemente la supervivencia en condiciones de hipoxia y privación de suero y conserva el tejido cardíaco después de un infarto de miocardio. Esta mezcla, especialmente CD34+ derivadas de sangre de cordón umbilical humano tratadas con ácido lisofosfatídico en fibrina, mostró mejores resultados.

En una realización de la composición divulgada, el gel biomimético puede ser al menos uno de los siguientes: fibrina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, colágeno, derivados de PEG y sus mezclas. Preferiblemente, gel de fibrina, más preferiblemente, el gel de fibrina comprende un fibrinógeno a una concentración final de 1-100 mg/mL y trombina a una concentración final de 1-500 U/mL. Incluso más preferiblemente, el gel de fibrina comprende un fibrinógeno a una concentración final de 10-30 mg/mL y trombina a una concentración final de 2-50 U/mL.

Una realización de la composición divulgada puede comprender 1×10^5 - 1×10^6 células CD34+; y 100 μ M de ácido lisofosfatídico; y 100 - 200 mL de gel biomimético.

En otro aspecto, la composición divulgada se puede usar en medicina o aplicación cosmética, concretamente una composición farmacéutica, médica o cosmética, concretamente con células CD34+ y componentes anteriores de LPA están en una cantidad terapéuticamente eficaz y pueden comprender además cantidades adecuadas de excipiente. En particular, en el tratamiento del tejido cardíaco y/o enfermedades cardíacas, y/o en el tratamiento de la cicatrización de heridas, concretamente, la curación de heridas diabéticas.

En una realización, la composición de divulgación puede ser una formulación inyectable.

En la presente divulgación se muestra que las células madre hematopoyéticas, concretamente las células CD34+, tratadas con ácido lisofosfatídico (LPA) y cultivadas bajo hipoxia y condiciones privadas de suero duplican su supervivencia con respecto a las células no tratadas. Sorprendentemente, las células proliferan y secretan altos niveles de citoquinas tales como IL-4, IL-8 y TNF- α en comparación con los controles. Finalmente, las células tratadas con LPA, pero no las células no tratadas, preservan la función cardíaca después de un infarto de miocardio.

Descripción de las figuras

Las siguientes figuras proporcionan formas de realización preferidas para ilustrar la descripción y no deben verse como limitativas del alcance de la invención.

Figura 1: Estructura química de LPA. Supervivencia, apoptosis y necrosis de células CD34+ cultivadas en hipoxia durante 24 h en medio libre de suero con o sin fármacos. Los resultados son el promedio $\pm$ SEM (n = 2-13).

Figura 2: El LPA mejora la supervivencia de células CD34+ en células cultivadas en condiciones de hipoxia y privación de suero. (A) Supervivencia, apoptosis y necrosis de células CD34+ cultivadas en medio libre de suero durante 24 h en normoxia, hipoxia e hipoxia con tratamiento con LPA. (B) Efecto de la concentración de LPA en la supervivencia de las células CD34+ cultivadas en medio libre de suero durante 24 h en hipoxia o normoxia. (C) Efecto de LPA en la supervivencia de células cultivadas en hipoxia durante 1 (H1) o 3 días (H3), en hipoxia durante 1 día y 3 días en normoxia (H1 + N3), o normoxia durante 1 (N1) o 4 días (N4). En todos los gráficos, las células se cultivaron con o sin LPA (100 μ M). Los resultados son el promedio $\pm$ SEM (n = 4-50). En todas las figuras, * denota significancia estadística: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Figura 3: El LPA afecta la proliferación celular y tiene un impacto mínimo en la diferenciación celular en condiciones de hipoxia y privación de suero. (A) Número de total de células después de 1 día en hipoxia y 3 o 6 días en normoxia. (B) Diferenciación celular medida por citometría de flujo (n = 1). Las células se cultivaron en hipoxia durante 1 día seguido o no por 6 días en normoxia. En todos los gráficos, las células se cultivaron con o sin LPA (100 μ M).

Figura 4: El LPA afecta la supervivencia celular en células CD34+ encapsuladas en gel de fibrina y cultivadas en hipoxia y condiciones privadas de suero. (A.1) Las células se cultivaron en medio sin suero con o sin LPA (100 μ M) y en hipoxia durante 1 día. (A.2) Las células se cultivaron en medio sin suero con o sin LPA (100 μ M) y en hipoxia durante 3 días. En todos los gráficos, los resultados son el promedio $\pm$ SEM (n = 3-6). En todas las figuras, * denota significancia estadística: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Figura 5: El LPA induce la supervivencia de células CD34+ principalmente a través del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR). Las células se cultivaron en medio libre de suero con LPA. Las células se trataron previamente con inhibidor de Rho quinasa (Y-2762, 50 μ M), inhibidor de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (PD98059, 60 μ M), inhibidor específico de LPA1 y LPA3 (Ki16425, 10 μ M) o inhibidor del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) (GW9662, 50 μ M) durante 1 hora antes de la hipoxia y medio celular que contiene LPA (100 μ M) durante 24 h. Las células sin ningún pretratamiento y cultivadas en medio libre de suero con o sin LPA, en hipoxia durante 24 h, se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Los resultados son el promedio $\pm$ SEM (n = 3-6). * Denota significancia estadística: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Figura 6: Las células CD34+ tratadas con LPA preservan la función cardíaca después de un infarto de miocardio. Los infartos de miocardio fueron inducidos por la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). (A) Acortamiento fraccional cardíaco en animales con (células simuladas, gel + células CD34+, células CD34+ tratadas con LPA + gel) o sin ligadura de LAD (normal). En células CD34 tratadas con LPA, las células se trataron con 100 μ M de LPA, 1 h antes del trasplante. Se administraron células (1×10^6 células) en una solución precursora de gel de fibrina (100 mL) en el corazón infartado de ratas desnudas. (B) Acortamiento fraccional cardíaco en la semana 3 normalizado en la semana 1. En todos los gráficos, los resultados son los promedios $\pm$ SEM (n = 6-10). * Denota significancia estadística: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

Descripción detallada

En la presente divulgación se muestra que las células madre hematopoyéticas, concretamente las células CD34+ tratadas con ácido lisofosfatídico (LPA) cultivadas bajo hipoxia y condiciones privadas de suero, sorprendentemente duplican su supervivencia con respecto a las células no tratadas. Preferiblemente, las células proliferan y secretan altos niveles de citoquinas tales como IL-4, IL-8 y TNF- α en comparación con los controles. Los resultados muestran que la supervivencia de las células CD34+ está mediada principalmente por el receptor activado por el proliferador de peroxisomas. Finalmente, la presente divulgación muestra que las células tratadas con LPA, pero no las células no tratadas preservan la función cardíaca después de un infarto de miocardio.

La presente invención permite el sorprendente aumento de la supervivencia de las células madre hematopoyéticas, concretamente las células CD34+, (en número y magnitud) la proliferación celular y el efecto terapéutico sobre la regeneración tisular y mantienen el efecto del ácido lisofosfatídico.

Este efecto se observó inesperadamente en condiciones de hipoxia y privación de suero, y se observó también sorprendentemente que las células madre hematopoyéticas, en particular las células CD34+ expresan RLPA (receptores de LPA) y los efectos enumerados anteriormente se logran tratando a CD34+ con ácido lisofosfatídico (LPA).

Realizaciones

Aislamiento de células CD34+ de UCB. En una realización, se recogieron todas las muestras de sangre de cordón umbilical (UCB) humano de los donantes, que firmaron un formulario de consentimiento informado, de conformidad con la legislación portuguesa. La recolección fue aprobada por el comité de ética de Maternidade Daniel de Matos. Las muestras se almacenaron en bolsas estériles que contenían 35 mL de solución anticoagulante de citrato-fosfato-dextrosa. Las células CD34+ se aislaron a partir de células mononucleares, obtenidas de muestras de UCB después de separación por gradiente de densidad Ficoll (preferiblemente, Histopaque-1077 Hybri Max, preferiblemente, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Las células CD34+ se seleccionaron positivamente (2 veces) usando el sistema de separación inmunomagnética mini-MACS (preferiblemente, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania, <http://www.miltenyibiotec.com>), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células CD34+ se usaron inmediatamente para estudios de encapsulación celular o experimentos *in vivo* sin tratamiento adicional. Las células aisladas tenían una pureza superior al 95% para el antígeno CD34 según lo confirmado por FACS. Estas células son CD34+CD45+CD31+KDR-vWF-CD14 (Pedroso, D.C., et al., Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. PLoS One, 2011. 6 (1): página E16114).

Tratamiento celular. En una realización, se incubaron células CD34+ de UCB (1×10^6 células/mL) en medio X-Vivo (Lonza) en una cámara de hipoxia durante 24 h (0,5% de O₂ y 5% de CO₂), en presencia o ausencia de medicamentos farmacológicos, para una evaluación adicional de la supervivencia/apoptosis celular y necrosis mediante análisis FACS de la expresión de anexina V y PI, respectivamente. Preferiblemente, las células se trataron

previamente con los fármacos respectivos durante 1 hora antes de la hipoxia, y el tratamiento se mantuvo durante la hipoxia.

Inmunotinción. En una realización, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) (preferiblemente, EMS, Hatfield, EE.UU.) durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Después de bloquear durante 30 minutos con solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (p/v) (preferiblemente, Sigma-Aldrich), las células se tiñeron durante 1 h con anticuerpos monoclonales antihumanos PPAR γ y CD34. En cada experimento de inmunofluorescencia, se usó un control de IgG de isotipo coincidente. La unión de anticuerpos primarios a células específicas se detectó con UN conjugado Cy3 de IgG antirratón (preferiblemente, Sigma-Aldrich). El núcleo de las células se tiñó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (preferiblemente, DAPI, Sigma-Aldrich). Después de marcación indirecta, las células se examinaron preferiblemente con un microscopio de fluorescencia Zeiss.

Citometría de flujo. En una realización, se realizó un análisis multicolor para fenotipado de células madre y progenitoras en un citómetro FACS Calibur (preferiblemente, Becton Dickinson). Las células se tiñeron durante 1 h APC o CD45 antihumano con azul pacífico (preferiblemente, e-Bioscience), CD45 antirratón con FITC (preferiblemente, e-Bioscience), CD33 antihumano con PeCy7 (preferiblemente, BD Bioscience), CD11b antihumano con PE (preferiblemente, BD eBioscience), antihumano CD19 con FITC (preferiblemente, BD Bioscience), CD3 antihumano con PeCy7 (preferiblemente, BD Bioscience), Glicoforina A antihumana con PE (preferiblemente, BD Bioscience), CD41 antihumano con FITC (preferiblemente, e-Bioscience), y CD56 antihumana con PeCy7 (preferiblemente, BD Bioscience), se lavó con medio de tinción y se analizó.

Preparación de geles de fibrina. En una realización, los geles de fibrina se formaron mediante entrecruzamiento de fibrinógeno en presencia de trombina (ambos de Sigma-Aldrich). La solución de fibrinógeno se preparó disolviendo fibrinógeno humano en solución salina regulada con Tris (TBS) (preferiblemente, Sigma-Aldrich), pH 7,4 (20 mg/mL), y luego se esterilizó filtrando a través de un filtro de jeringa de 0,22 μ m (Acrodisc, Pall, NY, EE.UU.). Se prepararon soluciones de trombina frescas disolviendo trombina humana en TBS a pH 7,4 a una concentración de 50 U/mL. Se prepararon geles de fibrina (200 μ L, a menos que se indique lo contrario) mezclando tres componentes diferentes: fibrinógeno (10 mg/mL), CaCl₂ (preferiblemente, Merck, NJ, EE.UU.) (2,5 μ M) y trombina (0,2 U/mL). Esta solución se dejó gelificar a 37°C y 100% de humedad relativa.

Degradación de geles de fibrina. En una realización, la solución de precursor de gel se preparó mezclando conjugado de fibrinógeno humano Alexa Fluor® 488 (preferiblemente, Invitrogen) (0,156 mg) con fibrinógeno no marcado (9,844 mg) en 1 mL de TBS. La tasa de degradación de geles de fibrina con o sin células a lo largo del tiempo se estimó indirectamente mediante la disminución de su fluorescencia. Su fluorescencia se midió inmediatamente en el tiempo cero y en los puntos de tiempo deseados. La degradación completa de los geles se indujo mediante incubación con 200 μ L de una solución de plasmina humana (preferiblemente, Sigma-Aldrich) en TBS (0,006 U por gel) durante la noche a 37°C. Después de la centrifugación, la fluorescencia de las fracciones de sobrenadante se midió a 520 nm en un lector de microplacas de fluorescencia SPECTRAmax Gemini EM (preferiblemente, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU., www.moleculardevices.com).

Análisis de secreción de citoquina. En una realización, se evaluaron los sobrenadantes del cultivo celular para determinar la presencia y las concentraciones de citoquinas usando un ensayo de panel Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-Plex (preferiblemente, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en un Sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad, www.bio-rad.com). El panel 17-Plex del Grupo I humano consistió en los siguientes analitos: interleuquina-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8; IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), proteína quimiotáctica de monocitos (factor activador quimiotáctico de monocitos [MCP-1 (MCAF)], proteína β inflamatoria de macrófagos (MIP-1 β) y factor α de necrosis tumoral (TNF- α). Se recogieron muestras del medio sobrenadante, se centrifugaron para eliminar los precipitados y congelar. Se usó un intervalo estándar de 0,2 a 3.200 pg/mL. Las muestras y controles se corrieron por triplicado, estándares y blancos por duplicado.

Análisis de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). En una realización, el ARN total en las células se extrajo usando el Kit RNeasy Mini (preferiblemente, Qiagen, Valencia, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se centrifugaron inicialmente y se homogeneizaron en Trizol. En todos los casos, se preparó ADNc a partir de 1 μ g de ARN total usando reactivos de transcripción inversa Taqman (preferiblemente, Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (preferiblemente, Applied Biosystems) y la se llevó a cabo detección en un sistema 7500 de PCR rápida en tiempo real (preferiblemente, Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com). La cuantificación de los genes objetivo se realizó con respecto a la referencia (humano o ratón, dependiendo del tipo de células bajo análisis) Gen GAPDH: expresión relativa = 2^[-(Ct_{muestra} - Ct_{GAPDH})]. Los valores medios mínimos del umbral del ciclo (Ct) se calcularon a partir de cuatro reacciones independientes. Las secuencias de cebadores se publican como información de apoyo (Tabla S1).

Modelo animal de infarto de miocardio. En una realización, se anestesiaron ratas sin pelo con ketamina (75 mg/kg, IP) y dexmedetomidina (0,375 mg/kg, IP). Se anestesiaron con isoflurano al 2-3% en equilibrio con oxígeno. El abdomen y el tórax anterior se frotaron con betadina y se enjuagaron con alcohol al 70% (con varios ciclos de frotamiento de betadina seguido por enjuague con alcohol y aplicación de solución de betadina). El corazón fue abordado por una incisión abdominal transversal (incisión diafragmática) con la espalda del animal extendida suavemente sobre una toalla suave o lateralmente a través del espacio intercostal 4-5. Los instrumentos fueron esterilizados por autoclave. Se realizó una pequeña incisión diafragmática para crear una ventana pericárdica. Se realizó una incisión de 5 mm en el pericardio con un bisturí 11-0. El infarto de miocardio fue inducido por la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda con una sutura de prolina 6-0, 2-3 mm por debajo del origen de la arteria. La palidez y la anomalía del movimiento de la pared regional del ventrículo izquierdo confirmaron la oclusión. El pericardio se dejó abierto o se retiró para evitar el taponamiento. El espacio pleural se evacuó con una aguja estéril de calibre 18 y una jeringa de 3 mL después del cierre de la cavidad pleural. La pared abdominal y el tejido subcutáneo se cerraron con Vicryl 4-0 seguido por el cierre subcuticular con Vicryl 4-0. El animal fue extubado y luego se le permitió recuperarse. Cada animal se mantuvo durante los procedimientos quirúrgicos y la recuperación bajo almohadillas de calentamiento hasta que estuvo despierto y capaz de caminar. Dos días después de la recuperación de este procedimiento, los animales se sometieron a evaluación ecocardiográfica bajo anestesia con ketamina/midazolam. Los animales que cumplían el criterio de inclusión ecocardiográfica (acortamiento fraccional por debajo del 50%) se estratificaron en uno de 4 grupos. Las ratas se sometieron luego a una segunda toracotomía seguida por inyección directa de 100 µL de agente terapéutico usando una jeringa Hamilton (preferiblemente Hamilton Company) y una aguja de calibre 30. Al día siguiente, los animales fueron monitoreados por ecocardiografía. Dos semanas después de la implantación, las ratas supervivientes se analizaron de nuevo mediante ecocardiografía. En la semana 3, los animales fueron sacrificados por eutanasia. Se recogieron el corazón y varios órganos, se fijaron en solución de metil Carnoy y se procesaron para análisis histológico.

LPA induce la supervivencia de células CD34+ en condiciones de hipoxia y privación de suero

En una realización preferida, para identificar moléculas que promueven la supervivencia de células CD34+ en condiciones de hipoxia y privación de suero, se desarrolló un ensayo que utiliza células CD34+ derivadas de sangre de cordón umbilical humano (2×10^5 células por pozo de una placa de 96 pozos) suspendidas en medio X-Vivo (utilizado en ensayos clínicos (Schachinger, V., et al., Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006. 355 (12): páginas 1210-21)) y se incubaron en una cámara de hipoxia con 0,5% de O₂, a 37°C, durante 24 h. Algunos de los medicamentos seleccionados han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, Nebivolol Lombardo, R.M., et al., Effects of nebivolol versus carvedilol on left ventricular function in patients with chronic heart failure and reduced left ventricular systolic function. *J Cardiovasc Drugs*, 2006. 6 (4): páginas 259-63; IbersatanMassie, B.M., et al., Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med*, 2008. 359 (23): páginas 2456-67), otros se están evaluando en ensayos preclínicos/clínicos para mejorar la función cardíaca en pacientes/modelos con insuficiencia cardíaca (por ejemplo, INO-1001 a novel poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor improves cardiac and pulmonary function after crystalloid cardioplegia and extracorporeal circulation. *Shock*, 2004. 21 (5): páginas 426-32); eritropoyetina (Belonje, A.M., et al., Effects of erythropoietin after an acute myocardial infarction: rationale and study design of a prospective, randomized, clinical trial (HEBE III). *Am Heart J*, 2008. 155(5): páginas 817-22); melatonina (Chen, Z., et al., Protective effect of melatonin on myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(5): páginas H1618-24); VX-702 (Ma, X.L., et al., Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 1999. 99(13): páginas 1685-91), otros son sustancias naturales que se encuentran en el cuerpo humano (LPA). La viabilidad celular se evaluó mediante citometría de flujo usando tinción con anexina V/yoduro de propidio (PI). La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos con especificidad por la fosfatidil serina, uno de los primeros marcadores de transición celular a un estado apoptótico. Este fosfolípido se transloca desde la valva interna a la externa de la membrana plasmática (Koopman, G., et al., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994. 84(5): páginas 1415-20). El PI entra en las células necróticas y se une a los ácidos nucleicos de doble cadena, pero se excluye de las células con integridad normal [20]. De acuerdo con la Figura 1, las células CD34+ no tratadas muestran una supervivencia muy pobre, con solo ~31% de células viables, ~31% de células apoptóticas (Annexin V +/PI-) estando la mayoría de las células ~39% en la etapa necrótica (PI+). De los diez fármacos analizados, el LPA, prostaglandina E2 (PGE2) y eritropoyetina mejoraron significativamente la supervivencia celular ($P < 0,001$). LPA (10 µM) fue el fármaco con el mayor efecto en favor de la supervivencia (~69% de las células viables) y, por lo tanto, se estudió adicionalmente (Figuras 1 y 2A). Sorprendentemente, LPA mejora la supervivencia celular al revertir la necrosis y la apoptosis de las células CD34+ especialmente en condiciones hipóxicas y privadas de suero.

El efecto en favor de la supervivencia de LPA fue dependiente de la concentración (de 1-100 µM) siendo la supervivencia de las células CD34+ ya estadísticamente significativas ($P < 0,001$, $n = 6$) en comparación con el control (células no tratadas) a 1 µM de LPA (Fig. 2B). De manera importante, el porcentaje de células viables en CD34+ tratadas con 1 µM de LPA y cultivadas bajo condiciones de hipoxia es similar a las células no tratadas cultivadas en condiciones de normoxia. El efecto en favor de la supervivencia de LPA disminuye en función del

tiempo de hipoxia (Figura 2C). El porcentaje de células viables en células CD34+ tratadas con LPA disminuyó del 78% en el día 1 al 40% en el día 3. En conjunto, los resultados obtenidos indican sorprendentemente que LPA es una molécula en favor de la supervivencia de células CD34+ y su efecto es dependiente del tiempo y de la concentración.

5 El LPA induce la proliferación celular sin la expansión de células progenitoras multipotentes tempranas

El LPA es altamente mitogénico para las células quiescentes [21]. La acción mitogénica de LPA implica la activación de una proteína G insensible a la toxina pertussis con posterior movilización de Ca^{2+} y estimulación de la proteína quinasa C, liberación de ácido araquidónico de manera dependiente de GTP y activación de una proteína Gi sensible a la toxina pertussis que media la inhibición de adenilato ciclasa (van Corven, EJ, et al., Lysophosphatide-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. Cell, 1989. 59 (1): páginas 45-54). Para determinar si el LPA puede inducir la proliferación de células CD34+, se expuso una suspensión de células sin tratar o tratadas con LPA (2×10^5 células en 200 μl de medio X-vivo) a hipoxia durante 24 h y luego se cultivó en condiciones de normoxia durante 6 días adicionales. Las células tratadas con LPA aumentaron su número aproximadamente 3 veces durante el período de 7 días mientras que las células no tratadas disminuyeron a la mitad de su número inicial (Fig. 3A).

Para examinar el efecto del LPA en la autorrenovación/diferenciación de células CD34+, las células CD34+ no tratadas y tratadas con LPA se cultivaron en medio X-vivo en condiciones de hipoxia durante 1 día seguido o no por 6 días en normoxia y finalmente se caracterizaron por FACS. Después de 1 día de hipoxia, tanto las células CD34+ no tratadas como las tratadas con LPA comenzaron a diferenciarse en mastocitos (entre 14 y 17%) y neutrófilos (entre 5 y 8%) (Figura 3B). Solo el 78% y el 72% de las células CD34+ no tratadas o tratadas con LPA expresan el marcador CD34. La expresión de CD34 es mayor en las células que han estado expuestas a la hipoxia que en las condiciones de normoxia ya que solo el 6% de las células cultivadas en condiciones de normoxia durante 24 horas expresan el marcador CD34. Las células cultivadas durante 1 día en hipoxia y luego 6 días en normoxia se diferencian adicionalmente en varios linajes celulares que incluyen células dendríticas (CD), basófilos, monocitos, neutrófilos y mastocitos. Se observaron perfiles de diferenciación similares para las células no tratadas y tratadas con LPA.

El LPA induce la supervivencia de células CD34+ en células encapsuladas en geles de fibrina y se cultivan en condiciones de hipoxia y de privación de suero

Las estructuras inyectables son vehículos muy prometedores para administrar células madre para la medicina regenerativa ya que proporcionan un soporte estructural favorable para la supervivencia y proliferación celular (Pedroso, D.C., et al., Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. PLoS One, 2011. 6(1): página e16114; Kraehenbuehl, T.P., R. Langer, y L.S. Ferreira, Three-dimensional biomaterials for the study of human pluripotent stem cells. Nat Methods, 2011. 8(9): páginas 731-6; Nakamuta, J.S., et al., Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. PLoS One, 2009. 4(6): página e6005). Varios estudios han demostrado que las células trasplantadas con estructuras en el contexto cardíaco mejoraron la supervivencia celular, indujeron la angiogénesis y preservaron la función cardíaca después del infarto (Nakamuta, J.S., et al., Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. PLoS One, 2009. 4(6): página e6005; Christman, K.L., et al., Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. Tissue Eng, 2004. 10(3-4): páginas 403-9; Kraehenbuehl, T.P., et al., Human embryonic stem cell-derived microvascular grafts for cardiac tissue preservation after myocardial infarction. Biomaterials, 2011. 32(4): páginas 1102-9; Kutschka, I., et al., Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. Circulation, 2006. 114(1 Suppl): páginas 1167-73). Recientemente, se demostró que las células CD34+ tienen una mayor adhesión inicial a geles de fibrina que a placas de poliestireno, colágeno y fibronectina (Pedroso, DC, et al., Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells cocultured with endothelial cells. PLoS One, 2011. 6 (1): página e16114). Además, se muestra que los geles de fibrina soportan la supervivencia de las células CD34+ durante al menos 10 días y los geles resisten a la degradación de las enzimas metaloproteasas (Pedroso, D.C., et al., Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells cocultured with endothelial cells. PLoS One, 2011. 6 (1): página e16114). En una realización preferida, para examinar si los geles de fibrina soportan la supervivencia de las células CD34+ en condiciones de hipoxia y de privación de suero se encapsularon células no tratadas o tratadas con LPA (2×10^5) en gel de fibrina (200 μL) y se incubaron en una cámara de hipoxia al 0,5% de O_2 , a 37°C , durante 1 y 3 días. La viabilidad celular se evaluó mediante citometría de flujo usando tinción con anexina V/ioduro de propidio (PI). Las células CD34+ no tratadas tienen poca supervivencia en geles de fibrina ($23,2 \pm 2,8\%$ de células viables, $n = 3$, en el día 1, $12,6 \pm 1,2\%$ de células viables, $n = 5$, en el día 3) que muestran que la matriz sola no tiene ningún en favor de la supervivencia (Fig. 4). Por el contrario, las células CD34+ tratadas con LPA encapsuladas en geles de fibrina presentan alta supervivencia, comparable a los valores observados en células tratadas con LPA no encapsuladas en geles de fibrina (día 1: $69,0 \pm 0,7\%$ frente a $76,7 \pm 1,5\%$ para encapsuladas y no encapsuladas; respectivamente, día 3: $51,1 \pm 0,8\%$ frente a $37,2 \pm 6,6\%$ para encapsuladas y no encapsuladas, respectivamente).

El LPA induce la supervivencia de células CD34+ principalmente a través del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR)

Los papeles biológicos de LPA son diversos e incluyen efectos de desarrollo, fisiológicos y fisiopatológicos (Lin, ME, DR Herr y J. Chun, Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2010. 91(3-4): páginas 130-8). Hasta la fecha se han identificado hasta cinco receptores de LPA (LPAR): LPA1-LPAS (Choi, J.W., et al., LPA receptors: subtypes and biological actions. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. 50: páginas 157-86). Los receptores son receptores acoplados a proteína G (GPCR) y su presencia puede encontrarse en múltiples tejidos. LPA1, LPA2 y LPA3 se expresan ampliamente en la mayoría de los tejidos (Ishii, I., et al., Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. Mol Pharmacol, 2000. 58(5): páginas 895-902). LP4 se expresa en órganos específicos, como el páncreas, los ovarios y el timo (Lee, CW, et al., LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. J Biol Chem, 2007. 282(7): páginas 4310-7). LPA5 se expresa en bajos niveles en múltiples tejidos (Lee, C.W., et al., GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. J Biol Chem, 2006. 281(33): páginas 23589-97). Para identificar el receptor que está mediando el efecto en favor de la supervivencia de LPA (100 µM), se utilizó Ki16425 (10 µM), un antagonista específico de LPA1 y LPA3, y GW9662 (50 µM), un antagonista del receptor y activado por el proliferador de peroxisoma (PPARγ). Los estudios indican que el LPA tiene una alta afinidad por este último receptor (McIntyre, T.M., et al., Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARγ agonist. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. 100(1): páginas 131-6; Gustin, C., M. Van Steenbrugge, y M. Raes, LPA modulates monocyte migration directly and via LPA-stimulated endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. 295(4): páginas C905-14). Este enfoque se complementó, inhibiendo los objetivos más adelante de los receptores, incluyendo la Rho quinasa y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) usando antagonistas de Y-2762 (50 µM) y PD98059 (60 µM), respectivamente. Se sabe que todas las LPAR se acoplan con y activan proteínas G, que a su vez activan MAPK (LPA1, LPA2, LPA3 y LPA4) y Rho quinasa (LPA1, LPA2, LPA4 y LPA5) (Choi, JW, et al., LPA receptors: subtypes and biological actions. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. 50: páginas 157-86). Las células se trataron durante 1 h en medio X-Vivo que contenía un antagonista específico seguido de cultivo en condiciones de hipoxia durante 24 h. La supervivencia celular se evaluó mediante análisis FACS después de la tinción con anexina V/PI. Los resultados indican que, bajo las condiciones analizadas, PPARγ media principalmente el efecto en favor de la supervivencia de LPA (Fig. 5B). El antagonista de PPARγ disminuyó significativamente (P < 0,001, n = 11) el número de células viables inducidas por LPA desde ~77% hasta ~ 53%; sin embargo, no bloqueó totalmente el efecto en favor de la supervivencia del LPA, ya que las células sin LPA tienen una supervivencia del 39% (P < 0,01). La inhibición de LPA1 y LPA3 por Ki16425 tuvo un efecto relativamente pequeño en la supervivencia de las células CD34+ (Fig. 5B). El número de células viables disminuyó desde 77% (+ LPA) hasta 67% (P < 0,01, n = 19). Es importante destacar que la inhibición de la ruta de señalización de MAPK suprimió a niveles más altos el efecto en favor de la supervivencia de LPA que la inhibición de la ruta de señalización de Rho quinasa. Debido a que las dos rutas de señalización son los objetivos posteriores de diferentes LPAR (véase más arriba), esto podría indicar diferentes contribuciones de LPAR en la supervivencia de células CD34+. Tomados en conjunto, los datos muestran que el LPA puede promover la supervivencia de células CD34+ en condiciones hipóxicas y privadas de suero principalmente a través de la activación de PPARγ.

LPA modula la liberación de citoquinas de células CD34+

Para determinar el efecto de LPA en la liberación de citoquinas de señalización y factores de crecimiento por células CD34+, se usó una matriz de perlas de citoquina. Las células se incubaron en medio libre de suero X-Vivo durante 24 h en condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia o ausencia de LPA (100 µM). Las células CD34+ no tratadas en normoxia expresan altos niveles (> 100 pg/mL) de IL-8 y MIP-1 b, niveles medios (entre 100 y 1 pg/mL) de IL-6, TNF-α y GM-CSF, y niveles bajos (<1 pg/mL) de IL-1β, IL-4 e IL-17 (Fig. 5C). Las células CD34+ cultivadas en condiciones de hipoxia y privadas de suero expresan niveles significativamente más altos de IL-1β (~8 veces), IL-4 (~2 veces), IL-6 (~1,2 veces), IL-8 (~10 veces), IL-17 (~4 veces) y GM-CSF (~2 veces), que en condiciones de normoxia. Curiosamente, las células CD34+ cultivadas en condiciones hipoxia y de privación de suero pero en presencia de LPA aumentan la secreción de IL-4 (de ~0,9 a ~2,7 pg/mL), IL-8 (de ~10,000 a ~17,000 pg/mL) y TNF-α de ~3 a ~15 pg/mL) y disminuyen la secreción de IL-1β (de ~9 a ~2 pg/mL), IL-6 (de ~4 a ~2 pg/mL) y GM-CSF (de ~4 a ~1 pg/mL) en comparación con las células cultivadas en las mismas condiciones pero en ausencia de LPA.

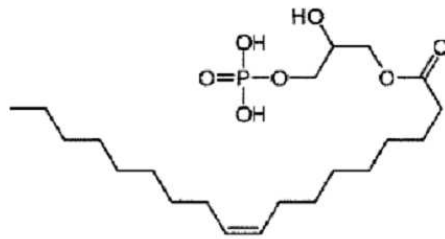
Las células CD34+ tratadas con LPA conservan la función cardíaca después de un infarto de miocardio

Se ha demostrado que el trasplante de células CD34+ humanas en el corazón después del infarto mejora la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y preserva el tejido cardíaco. Para evaluar el potencial terapéutico de células CD34+ tratadas con LPA, las células se administraron (1x10⁶ células) tratadas con LPA (100 µM) en una solución de precursor de gel de fibrina (100 µL) en el corazón infartado de ratas sin pelo. Infartos de miocardio fueron inducidos por la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). Los corazones infartados sin ningún tratamiento (simulado) o tratados con células CD34+ suspendidas en una solución de precursor de gel de fibrina se usaron como controles. Después de 2 semanas después de la implantación, las propiedades funcionales

del corazón se evaluaron mediante ecocardiografía. El ventrículo izquierdo de la rata de control tuvo un acortamiento fraccional medio de $42,7 \pm 1,6$ ($n = 10$) y $41,6 \pm 3,8$ ($n = 10$) a 1 día y 2 semanas, respectivamente; las ratas tratadas con células CD34+ encapsuladas en una solución de precursor de gel de fibrina tenían un acortamiento fraccional medio de $36,7 \pm 3,4$ ($n = 6$) y $44,5 \pm 3,0$ ($n = 6$) a 1 día y 2 semanas, respectivamente; y finalmente las ratas tratadas con células CD34+ tratadas con LPA y encapsuladas en una solución de precursor de gel de fibrina tuvieron un acortamiento de fraccional medio de $37,5 \pm 1,2$ ($n = 6$) y $47,0 \pm 2,0$ ($n = 6$) a 1 día y 2 semanas, respectivamente (Fig. 6A). Debido a que el acortamiento fraccional inicial es diferente entre los grupos experimentales, se utilizó la diferencia de los acortamientos fraccionales a las 2 semanas y el día 1 para comparar la efectividad terapéutica de los tratamientos (Fig. 6B). La mediana de las diferencias en los acortamientos fraccionales fue de 7,5 y 2,6 en las células tratadas con LPA + gel y los grupos simulados, respectivamente, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). No se observaron diferencias estadísticas entre corazones tratados con células CD34+ y simulaciones ($P > 0,05$). Tomados en conjunto, la administración de células CD34+ tratadas con LPA en el corazón infartado mejora el acortamiento fraccional cardíaco, y el efecto fue superior a las células CD34+ no tratadas.

REIVINDICACIONES

1. Método para mejorar la supervivencia de células madre hematopoyéticas en condiciones hipóxicas y privadas de suero cultivando las células en un medio que contiene ácido lisofosfatídico.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células madre hematopoyéticas son células CD34⁺.
- 5 3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de ácido lisofosfatídico varía entre 1 y 1.000 μM .
4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la concentración de ácido lisofosfatídico es 100 μM .
5. Composición que comprende células madre hematopoyéticas y ácido lisofosfatídico en la que la concentración de ácido lisofosfatídico es 100 μM .
- 10 6. Composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que las células madre hematopoyéticas son células CD34⁺.
7. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, que comprende además un gel, en particular un gel biomimético.
8. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que comprende 1×10^5 - 1×10^6 células CD34⁺; y 100 μM de ácido lisofosfatídico; y 100 - 200 mL de gel biomimético.
- 15 9. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en la que dicho gel es al menos uno de los siguientes: fibrina, ácido hialurónico, alginato, agarosa, colágeno o derivados de PEG.
10. Composición como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en la que dicha composición es una composición farmacéutica, médica o cosmética.
- 20 11. Composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que los componentes están en una cantidad terapéuticamente efectiva.
12. Composición como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5-11 para uso en medicina o cosméticos.
13. Composición de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en terapia celular, concretamente terapia celular de tejido cardíaco.
- 25 14. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13 para uso en el tratamiento de enfermedades cardíacas o en el tratamiento de cicatrización de heridas.
15. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicha cicatrización de heridas es cicatrización de heridas diabéticas.
16. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-11 o composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, que comprende además cantidades adecuadas de excipiente.
- 30 17. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-11 o composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en la que la composición es una formulación inyectable.



Supervivencia, apoptosis y necrosis de células CD34+ derivadas de UCB

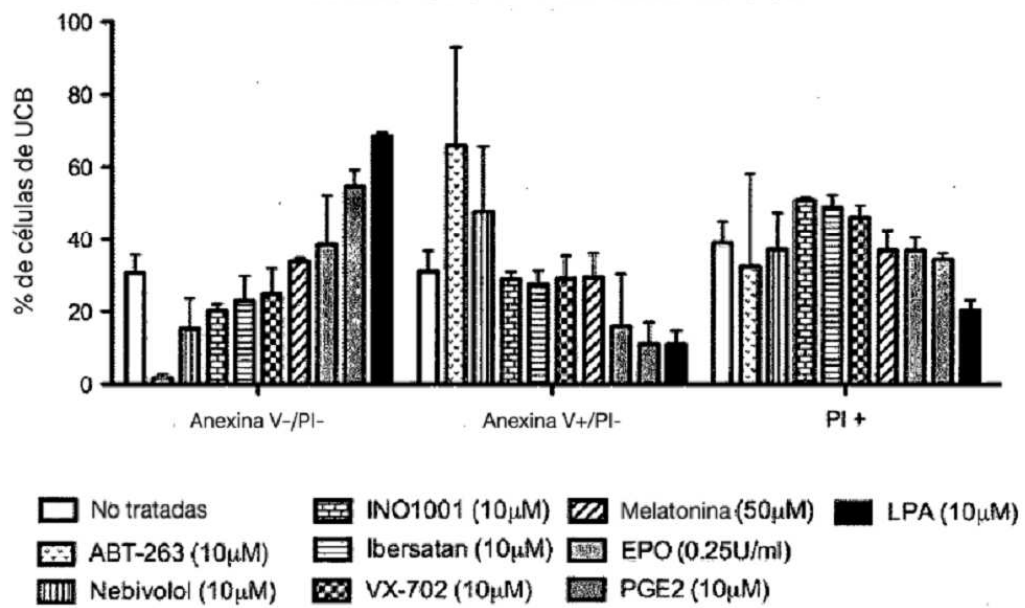


Figura 1

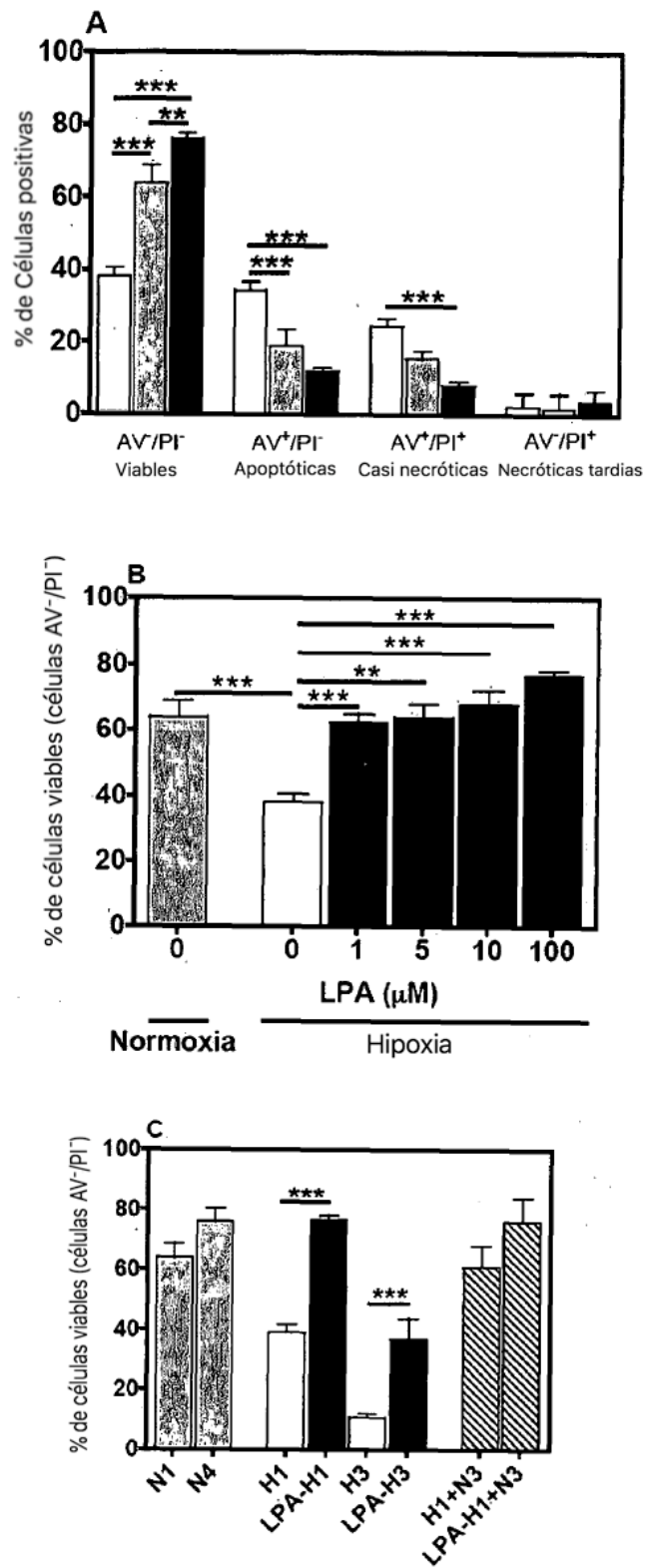


Figura 2

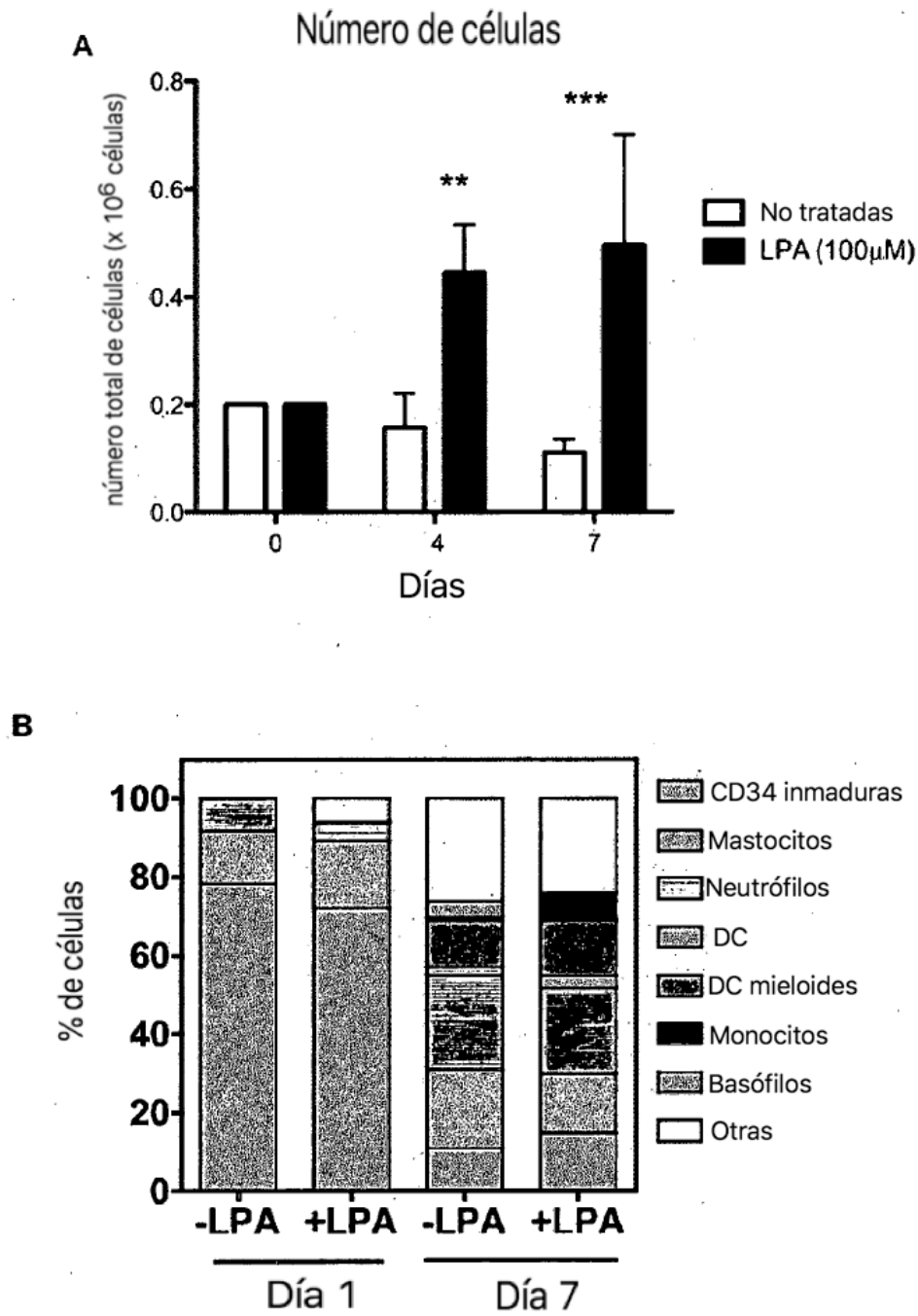


Figura 3

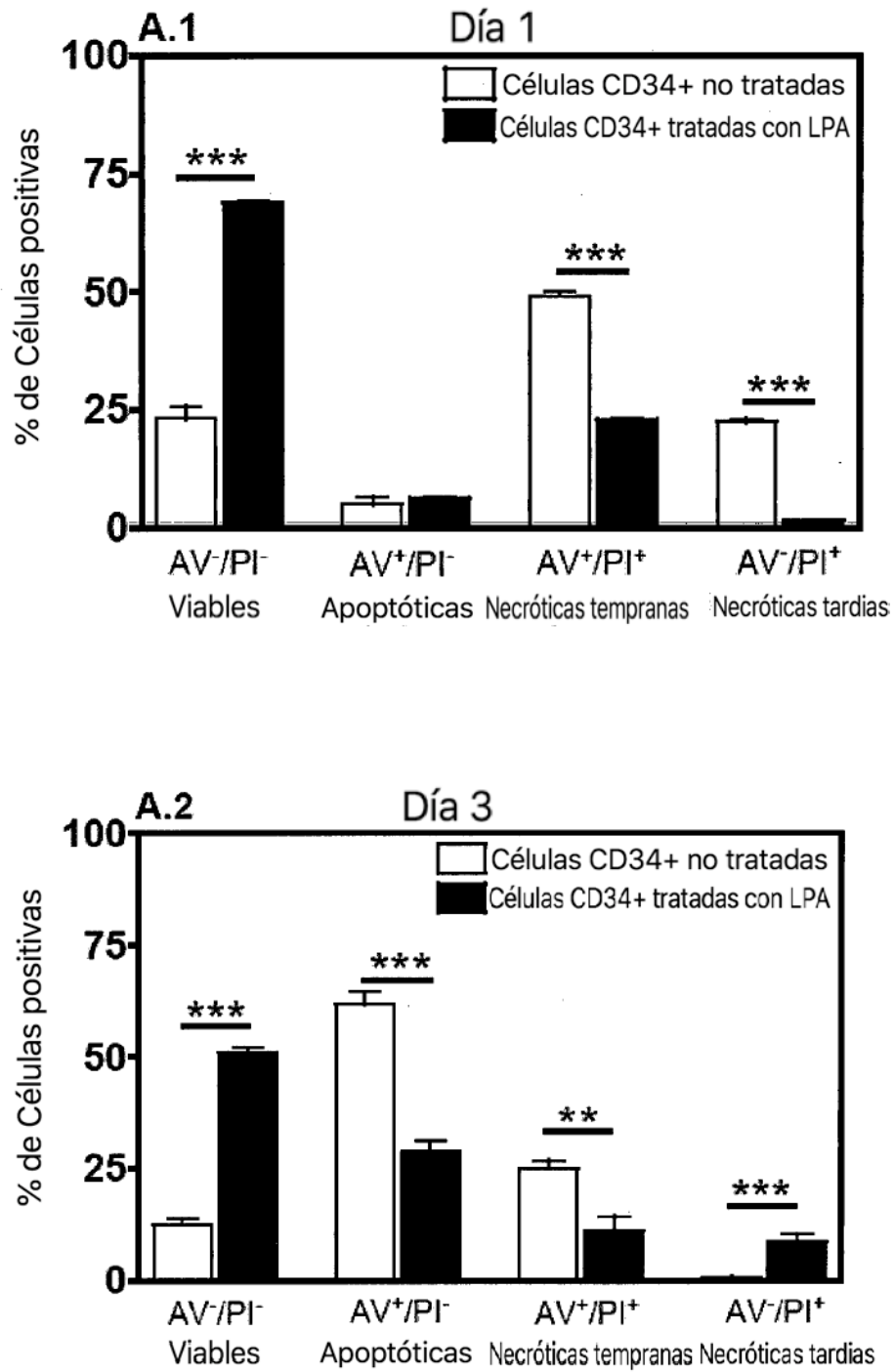


Figura 4

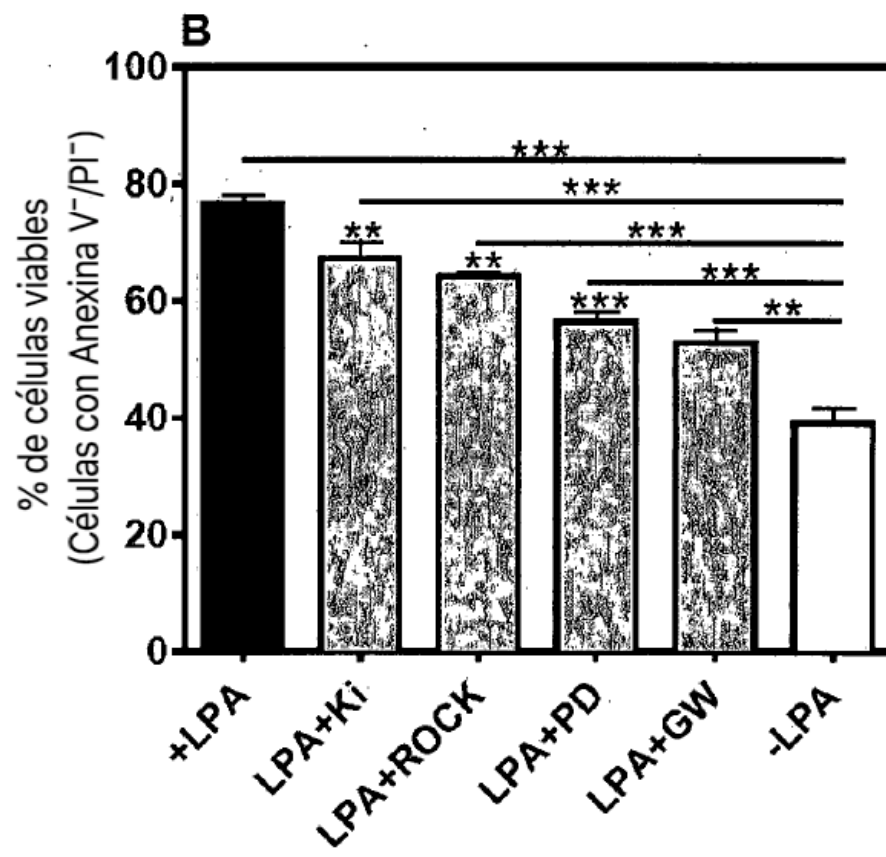


Figura 5

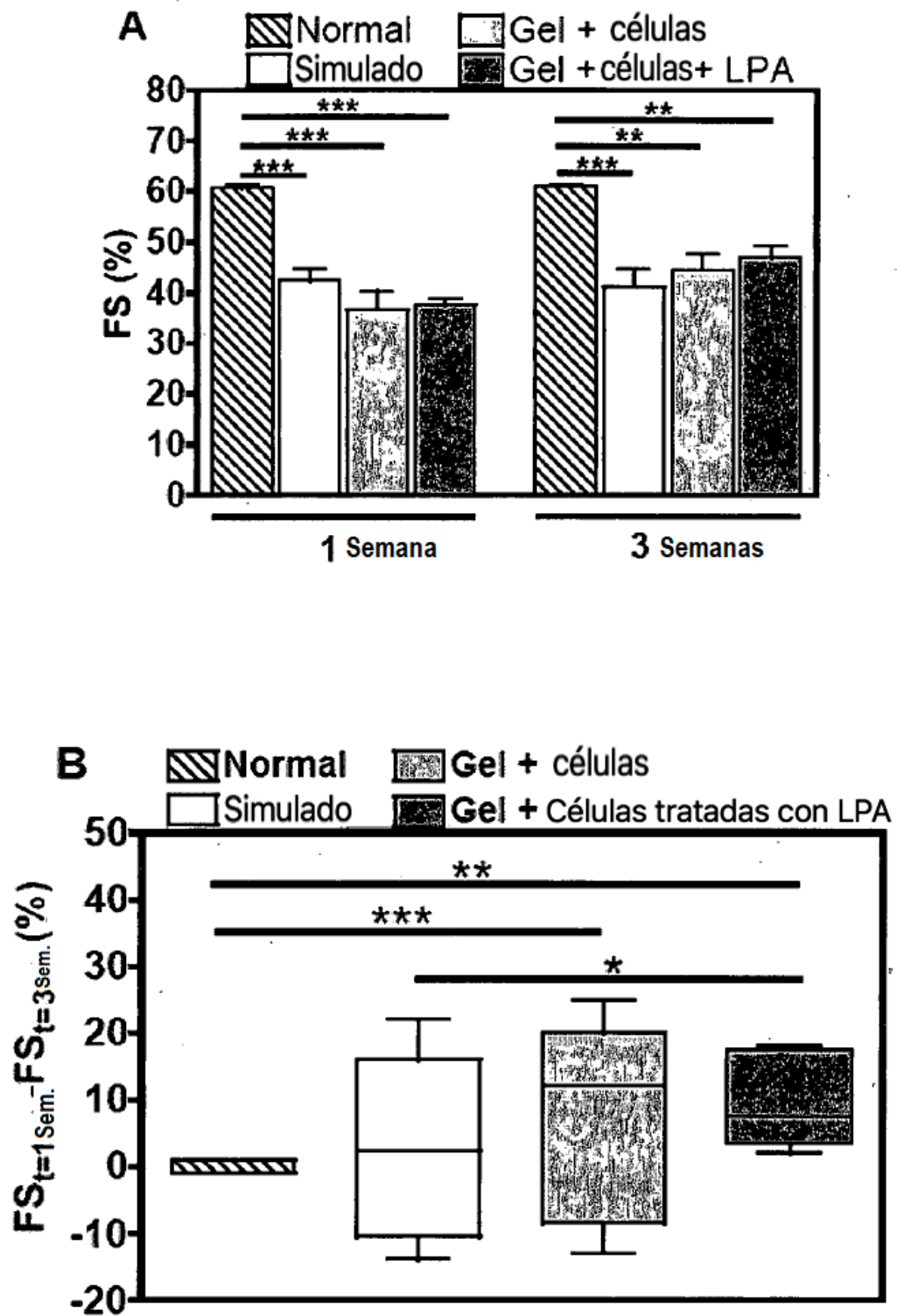


Figura 6