(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 741 599**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0786 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2016 E 16382443 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3299453**

(54) Título: **Terapia celular con macrófagos polarizados para la regeneración de tejidos**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2020

(73) Titular/es:

XCELL MEDICAL SOLUTIONS, S.L. (100.0%)
Fortuny 29 1
28010 Madrid, ES

(72) Inventor/es:

MARÍA GEORGINA, HOTTER CORRIPIO;
ANA MARÍA, SOLA MARTÍNEZ y
JORGE VICENTE, MARTÍN CORDERO

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Terapia celular con macrófagos polarizados para la regeneración de tejidos

La presente invención pertenece al campo técnico de las terapias celulares para la reparación de tejidos. Específicamente, se refiere a un método *in vitro* para la obtención de macrófagos polarizados a un fenotipo M2 que son adecuados para la regeneración de tejidos. También se refiere a las poblaciones de macrófagos M2 obtenidos por este método y a medicamentos y composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos para su uso en terapia celular para la regeneración de tejido dañado, lesionado o deteriorado.

ESTADO DEL ARTE

Los macrófagos se derivan de monocitos circulantes que salen de la vasculatura e invaden los tejidos circundantes donde se diferencian, bajo la influencia de las señales locales, en macrófagos tisulares residentes. Los macrófagos residentes tienen diferentes funciones; controlan los tejidos de células dañadas o apoptóticas, que eliminan por fagocitosis, identifican y eliminan patógenos invasores como bacterias, hongos y células infectadas por virus, eliminan las lipoproteínas, y también son responsables de regular la oxigenación tisular, influyendo en la formación de nuevos vasos sanguíneos y modulando de la permeabilidad vascular.

Los macrófagos son un tipo de células muy versátiles con un impresionante repertorio de funciones que depende de su localización y estado de activación. Esto incluye la presentación de antígenos, la actividad antibacteriana y antitumoral, y la secreción de una gran variedad de reguladores de factores peptídicos, prostanoides y enzimas.

Por lo tanto, los macrófagos son una población de células inmunes que controlan una gran variedad de funciones incluyendo la inflamación, la reparación de tejidos y la respuesta inmune. Esta diversidad funcional se consigue a través de la remarcable heterogeneidad de los macrófagos, los cuales tienen la capacidad de cambiar de forma dramática su fenotipo como resultado de su plasticidad diferencial, así como de las señales ambientales locales.

Como células efectoras inmunes, el papel de los macrófagos en la inflamación y la defensa del huésped está muy bien caracterizada. Además, los macrófagos son esenciales en la promoción de una adecuada cicatrización de las heridas, así como en la resolución de la inflamación en respuesta a un desafío patogénico o a un tejido dañado (Christopher J. Ferrante and Samuel Joseph Leibovich, 2012, Advances in wound care, 1: 1, 10-16). Esta diversidad de funciones fisiológicas surge de la elevada plasticidad de los macrófagos, que permite a estas células cambiar drásticamente su forma y función en repuesta a señales ambientales locales. Los macrófagos no estimulados son típicamente quiescentes, sin embargo la estimulación de estas células tiene como resultado el desarrollo de unos fenotipos marcadamente polarizados como respuesta a las señales moleculares presentes en el microambiente local.

La clasificación actual de los macrófagos reconoce una polarización hacia dos fenotipos distintos. Así, los macrófagos se clasifican generalmente como activados clásicamente (M1) o alternativamente (M2). Los macrófagos M1 tiene un fenotipo pro-inflamatorio exhibiendo una elevada actividad fagocítica y favoreciendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias que ayudan a la eliminación de los patógenos y de los tejidos anormales o dañados. Los macrófagos M2 tienen un fenotipo polar opuesto y exhiben altos niveles de citoquinas antinflamatorias, así como factores fibrogénicos y angiogénicos que sirven para resolver la inflamación y promover la cicatrización de las heridas (Martinez FO, Helming L, and Gordon S. 2009. Annu Rev Immunol; 27: 451–483). Tanto los macrófagos M1 como M2 expresan distintos marcadores moleculares.

Los macrófagos M1 son inducidos por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, como lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y peptidoglicanos, o patrones moleculares asociados a daños, como proteínas o ácidos nucleicos liberados intracelularmente, así como la estimulación por la citoquina interferón gama (IFN-□) secretada por las células-T. Los macrófagos M1 presentan un fenotipo proinflamatorio, exhibiendo una elevada actividad fagocítica y de procesamiento de antígenos, así como una elevada producción de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, la interleucina 1 [IL-1], IL-6, IL-12, y el factor de necrosis tumoral alfa [TNF-α]) y de metabolitos oxidativos (por ejemplo, óxido y superóxido nítrico) para promover la defensa del huésped y la eliminación del tejido dañado. Por el contrario, los macrófagos M2 son inducidos por una variedad de estímulos (p. e. Il-4/IL-13, glucocorticoides) y representan un fenotipo que es potencialmente importante en la promoción de la cicatrización de heridas y la remodelación de los tejidos, así como la resolución de la inflamación (Martinez FO, Sica A, Mantovani A, and Locati M. 2008. Front Biosci; 13: 453–461).

La remarcable plasticidad de los macrófagos tiene importantes implicaciones en la ciencia clínica. Una adecuada polarización de los macrófagos es necesaria en varios procesos fisiológicos importantes, incluyendo, pero sin limitar, a la cicatrización de heridas, la respuesta inmune y la regeneración del nervio/músculo (Kigerl KA, *et al.,* 2009, J Neurosci; 29: 13435–13444). Por tanto, no es sorprendente que aberraciones en la polarización de los macrófagos estén asociadas con algunas de las patologías observadas en la cicatrización defectuosa de heridas, la diabetes, la

distrofia muscular, las enfermedades fibroproliferativas como la artritis reumatoide y la fibrosis pulmonar y del hígado, así como la progresión de los tumores. La elucidación de los factores microambientales específicos que contribuyen a la polarización de los macrófagos permitiría desarrollar métodos para la manipulación farmacológica de los fenotipos de los macrófagos para promover procesos favorables (por ejemplo, cicatrización de heridas) o inhibir procesos patológicos (por ejemplo, enfermedades fibroproliferativas y crecimiento de los tumores).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la habilidad de los macrófagos para alterar su fenotipo en respuesta a diferentes estímulos ambientales ha permitido llevar a cabo una importante investigación dirigida a identificar la amplia variedad de señales que inducen estos fenotipos, así como caracterizar los perfiles moleculares de los macrófagos M1 y M2. De todos modos, la polarización de los macrófagos es un proceso muy complejo y se ha podido comprobar que existen una gran cantidad de señales que inducen los distintos fenotipos de macrófagos.

Dentro del elevado número de macrófagos presentes en los tejidos enfermos, se ha observado que una gran cantidad de estos se acumulan o son adyacentes a sitios hipóxicos y poco vascularizados, donde ha tenido lugar un daño tisular considerable. Se ha detectado un número elevado de macrófagos en sitios necróticos o avasculares de carcinomas de pecho y ovario, en las áreas hipóxicas de heridas dérmicas (Hunt, T. K., *et al.,* 1983, Surgery, 96, 48–54), en las localizaciones avasculares de placas ateroescleróticas, en la membrana sinovial de las articulaciones con artritis reumatoide, en los sitios isquémicos de la retinopatía proliferativa, y alrededor de las oclusiones vasculares de la malaria cerebral.

Los macrófagos son capaces de actuar bajo estas condiciones adversas a través de la alteración de la expresión genética y adaptando su actividad metabólica. La hipoxia puede inducir cambios significativos en la actividad secretoria de los macrófagos provocando la liberación por parte de estos tanto de citoquinas inflamatorias como pro-angiogénicas *in vitro* e *in vivo*. Algunos estudios han revisado los efectos de la hipoxia experimental en varias funciones de los macrófagos (Claire Lewis, *et al*., 1999, Journal of Leukocyte Biology, 66, 889- 900; María M Escribese, *et al*., 2012, Immunobiology, 217, 1233– 1240). Sin embargo, como la hipoxia es normalmente transitoria en los tejidos enfermos, y raramente actúa sobre células aisladas de otros estímulos patogénicos, estos estudios han puesto de manifiesto la necesidad de co-estímulos para que tenga efectos en los macrófagos.

Se ha descrito que cuando los macrófagos en el cultivo celular están sujetos a ciclos (30min/30min) de hipoxia/normoxia se observa una regulación a la baja (*down-regulation*) de los fabricantes de M1, pero no se observó ningún efecto en los fabricantes de M2 (Isaac Almendros 2014, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 189, nº 5,593-601). McCourtie A. S., *et al*., describió que cuando los macrófagos alveolares son sometidos a un ciclo de hipoxia/reoxigenación, se produce un aumento del marcador proinflamatorio MCP1, representativo de un fenotipo M1 (McCourtie A. S., et al., 2008, The Annals of Thoracic Surgery, vol. 86, nº 6, 1774-1779) y Rawan B., *et al*., revelaron que la anoxia/normoxia cambia los macrófagos en el fenotipo M2 en cultivo (Rawan B., et al., 2015, Fluids and Barriers of the CNS, vol. 12, nº1, 6), pero durante el proceso de recuperación (reoxigenación) la expresión de IL-10 tiende a disminuir a un valor similar al del experimento de control (no hay hipoxia).

En definitiva, son necesarios métodos que permitan obtener macrófagos polarizados a un fenotipo que promueva la cicatrización de heridas y, en general, la regeneración de tejidos. De forma específica, serian de especial interés métodos que permitieran, de forma artificial, la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2, el cual es importante en la promoción de la cicatrización de heridas y la remodelación de tejidos, así como en la resolución de la inflamación. El desarrollo de estos métodos permitiría, por lo tanto, la manipulación artificial de la polarización de los macrófagos para obtener fenotipos de estos que mejoraran los procesos fisiológicos normales, como la reparación de tejidos.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método *in vitro* para inducir la polarización de los macrófagos (diferenciación) hacia un fenotipo M2 útil para la reparación de tejidos. Los macrófagos activados M2 obtenidos mediante este método sobreexpresan moléculas importantes para la remodelación de tejidos y la mejora de la inflamación, como el NGAL y las citoquinas antinflamatorias (IL-10). Por lo tanto, los macrófagos M2 obtenidos a través de este método son útiles para la terapia celular en la regeneración de tejidos.

El método descrito en la presente invención comprende la exposición *in vitro* o *ex vivo* de macrófagos aislados, preferiblemente en cultivos, más preferiblemente macrófagos que han sido previamente aislados del paciente, a unas series repetidas y consecutivas de hipoxia/reoxigenación (consistiendo cada serie en una primera etapa bajo condiciones de hipoxia seguido de una segunda etapa bajo condiciones de reoxigenación). Este método consiste en 4 series de hipoxia/reoxigenación. Los macrófagos cultivados bajo estas condiciones adquieren, como consecuencia de los periodos de hipoxia/reoxigenación, un fenotipo activado M2. Por lo tanto, estos macrófagos resultantes son útiles para su posterior administración en el tejido dañado del paciente donde promueven su completa regeneración.

Los siguientes ejemplos muestran que los macrófagos polarizados M2, obtenidos por el método de la presente invención sobreexpresan, al menos, NGAL y preferiblemente también IL-10 (más preferiblemente a nivel de ARNm), comparados con los macrófagos cultivados que no han sido sometidos al protocolo de hipoxia/reoxigenación descrito en esta invención (control). Además, esta sobreexpresión de NGAL no se observa en macrófagos sujetos a un número diferente de series de hipoxia/reoxigenación que las propuestas en la presente invención. Por ejemplo, los siguientes ejemplos muestran que los macrófagos que ha sido sometidos a 5 series de hipoxia/reoxigenación no muestran un incremento de la expresión de NGAL, comparados con el control (macrófagos no sometidos a condiciones de hipoxia/reoxigenación). Estos resultados prueban que la exposición al número específico de series de hipoxia/reoxigenación indicado en el método descrito en esta invención es ventajoso frente a otro número diferente de series. Por lo tanto, el método descrito en la presente invención proporciona macrófagos activados M2 ventajosos que no pueden ser obtenidos por otros procesos de inducción, incluso aquellos que implican el cultivo en condiciones de hipoxia.

Los macrófagos M2 obtenidos por el método descrito en la presente invención pueden, por lo tanto, ser usados en métodos de terapia celular para la regeneración de tejidos a través de su administración en el área dañada del sujeto que lo necesite. Preferiblemente, estos macrófagos M2 pueden ser inyectados, más preferiblemente vía intramuscular, en el área dañada para la regeneración tisular, aun más preferiblemente para la reparación del músculo.

Una de las principales ventajas de la invención es que los macrófagos que se van a cultivar para su polarización, bajo las condiciones descritas en el método de la invención, pueden ser autólogos. Esto reduce o elimina los riesgos asociados a reacciones inmunológicas adversas en el paciente al que se le van a administrar las células polarizadas. Además, los macrófagos cultivados bajo las condiciones descritas en el método de la invención pueden ser fácilmente obtenidos y aislados del paciente, preferiblemente del torrente sanguíneo. Además, los macrófagos M2 resultantes son capaces de promover la regeneración de tejidos, reducir la inflamación y clarificar la cicatriz o la fibrosis (reducción de fibrosis).

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener macrófagos polarizados o diferenciados a un fenotipo M2, a partir de ahora “el método de la invención”, que comprende:

a. someter a macrófagos aislados a 4 series de hipoxia/reoxigenación, donde cada serie de hipoxia/reoxigenación comprende entre 2 y 5 minutos de hipoxia en una concentración de oxígeno entre 0 y 0,6% seguido de al menos 45 segundos de reoxigenación, y
b. recuperar los macrófagos obtenidos después de la etapa (a).

El método de la invención puede ser también descrito como “un método para la polarización/diferenciación de macrófagos hacia un fenotipo M2”, o “un método para obtener macrófagos con un fenotipo M2”, o “un método para obtener macrófagos activados con un fenotipo que induce a la remodelación, regeneración o reparación de tejidos”.

Los macrófagos de la etapa (a) del método de la invención pueden estar en cultivo celular *in vitro* o, preferiblemente, se pueden aislar en cápsulas que comprendan un control externo de la presión de oxígeno.

En una realización preferida del método de la invención, los macrófagos de la etapa (a) son macrófagos mamíferos humanos o no-humanos, más preferiblemente son macrófagos humanos. En una realización aún más preferida, los macrófagos son autólogos. El término “autólogo” se refiere a macrófagos que se han obtenido del mismo individuo al que se la va a administrar los macrófagos M2 resultantes. Por lo tanto, el término “autólogo” implica un (el mismo) individuo tanto como donador como receptor.

"Los macrófagos" son un tipo de glóbulos blancos y están dentro de las células inmunes que orquestan una amplia gama de funciones, incluyendo la inflamación, la reparación de los tejidos, y la respuesta inmune. Por ejemplo, engullen y digieren restos celulares, sustancias extrañas, microbios, células cancerosas, y cualquier otra cosa que no tenga los tipos de proteínas específicas de las células sanas del cuerpo en su superficie en un proceso de fagocitosis. Los macrófagos se encuentran esencialmente en todos los tejidos, donde patrullan mediante el movimiento ameboide para buscar posibles patógenos. Se presentan en diferentes formas (con diferentes nombres) en todo el cuerpo (por ejemplo, histiocitos, células de Kupffer, macrófagos alveolares, microglia, y otros), pero todos son parte del sistema fagocítico mononuclear. Además de la fagocitosis, desempeñan un papel fundamental en la defensa no específica (inmunidad innata) y también ayudan iniciando mecanismos de defensa específicos (inmunidad adaptativa) reclutando otras células inmunes tales como los linfocitos. Por ejemplo, son importantes como presentadores de antígenos a las células T. Más allá de aumentar la inflamación y la estimulación del sistema inmune, los macrófagos también juegan un papel antiinflamatorio y pueden disminuir la respuesta inmune a través de la liberación de citoquinas. Los macrófagos se pueden identificar, por ejemplo, pero sin limitar, mediante citometría de flujo o tinción inmunohistoquímica, mediante la expresión específica de proteínas tales como, pero sin limitar, CD14, CD40, CD11b, CD64, F4/80 (ratones)/EMR1 (humana), lisozima M, MAC-1/MAC-3 y/o CD68.

Los macrófagos de la etapa (a) del método de la invención pueden ser también monocitos o macrófagos M1. Así, el término “macrófagos” usado en la etapa (a) del método de la invención incluye los macrófagos producidos por la diferenciación de monocitos, los macrófagos de cualquier fenotipo diferenciado o no diferenciado (incluyendo macrófagos M1) y cualquier célula englobada dentro del sistema fagocítica mononuclear, incluyendo los monocitos. Así, el termino macrófago tal y como se usa en la etapa (a) del método de la invención se refiere a “células del sistema fagocítico mononuclear”. Del mismo modo, el término “ macrófago” tal y como se usa en la etapa (a) del método de la invención incluye, pero sin limitarse, macrófagos del tejido adiposo, monocitos, células de Kupffer, histiocitos sinusoidales, macrófagos alveolares (células de polvo), macrófagos tisulares (histiocitos) que conducen a la formación de células gigantes, células de Langerhans, microglía, células de Hofbauer, células mesangiales intraglomerulares, osteoclastos, células epitelioides, macrófagos de la pulpa roja (células de revestimiento sinusoidal), macrófagos peritoneales, LysoMac y similares. En una realización preferida, los macrófagos de la etapa (a) son macrófagos peritoneales. En otra realización preferida, los macrófagos de la etapa (a) son monocitos, más preferiblemente aislados previamente del torrente sanguíneo del individuo a tratar.

Los macrófagos se pueden aislar de un individuo, preferiblemente del torrente sanguíneo, antes de la etapa (a) por cualquier medio conocido por los expertos en la materia para obtener muestras biológicas que comprendan las células deseadas, en este caso específico macrófagos o monocitos. Los macrófagos también se pueden aislar, no solo del torrente sanguíneo, sino también de cualquier tejido (macrófagos tisulares residentes). Los macrófagos se aíslan preferiblemente a través de una inyección intraperitoneal con tioglicolato. Igualmente, los macrófagos se pueden cultivar en la etapa (a) del método de la invención por cualquier medio y en la presencia de cualquier medio de cultivo y soporte dentro de los conocidos por los expertos en la materia que sean adecuados para el mantenimiento y crecimiento de las células *in vitro*, preferiblemente macrófagos, más preferiblemente monocitos, aún más preferiblemente monocitos humanos. En una realización preferida, los macrófagos se cultivan en la etapa (a) del método de la invención en presencia de un medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (FBS).

Los macrófagos se pueden polarizar fenotípicamente por el microambiente para montar programas funcionales específicos. Los macrófagos polarizados se pueden caracterizar ampliamente en dos grupos: macrófagos activados clásicamente (o M1) y macrófagos activados alternativamente (o M2).

Los macrófagos que promueven la inflamación son llamados “macrófagos M1” mientras que los que disminuyen la inflamación y promueven la reparación de los tejidos son llamados “macrófagos M2”. La diferencia se refleja en su metabolismo; los macrófagos M1 tienen la habilidad única de metabolizar la arginina a la molécula “asesina” óxido nítrico, mientras que los macrófagos M2 tienen la habilidad única de metabolizar la arginina transformándola en la molécula “reparadora” ornitina. Los macrófagos M1 (previamente referidos como “macrófagos activados clásicamente”) se activan por LPS y IFN-gamma, y secretan altos niveles de IL-2 y bajos niveles de IL-10. En contraste, la designación “reparadora” M2 (también referida como “macrófagos activados alternativamente”) se refiere ampliamente a macrófagos que funcionan en procesos constructivos como la cicatrización de heridas o la reparación de tejidos, y a aquellos que paran la activación del sistema inmune perjudicial produciendo citoquinas antinflamatorias como la IL-10. M2 es el fenotipo de los macrófagos del tejido residente, que se puede polarizar más hacia M2 por diferentes estímulos como el IL-4, IL-3, el complejo inmune en conjunción con más el receptor tipo toll (*Toll like receptor*, TLR) o los ligandos receptores IL-1, IL10 y glucocorticoides. Los macrófagos M2 producen elevados niveles de IL-10, TGF-beta y bajos niveles de IL-12. Los macrófagos asociados a tumores son mayoritariamente del fenotipo M2, y parece que promueven el crecimiento de los tumores. Los macrófagos M2 están relacionados con la respuesta inmune Th2. Estos macrófagos son importantes para la encapsulación de parásitos, pero también son responsables de la hipersensibilidad de tipo II. La presentación de antígenos esta aumentada (MHC II, CD86). También contribuyen a la producción de componentes de la matriz extracelular y a la remodelación de tejidos. Los glucocorticoides influyen en la adherencia, diseminación, apoptosis y fagocitosis de los macrófagos.

La “polarización de los macrófagos” es el proceso por el cual el macrófago expresa diferentes programas funcionales en respuesta a las señales microambientales. Hay una gran cantidad de estados funcionales de polarización de los macrófagos y estos pueden estar totalmente funcionalizados adquiriendo fenotipos específicos como M1 o M2. Estos fenotipos específicos dependen del tejido y del microambiente específico donde estén los macrófagos. Por un lado, la polarización de los macrófagos es muy importante en la defensa del huésped frente a patógenos, pero por otro lado es esencial para el mantenimiento de la homeostasis. La presencia prolongada de macrófagos con fenotipo M1 es dañina para el organismo y esta es la razón por la cual la reparación y restauración del tejido es necesaria. Los macrófagos M2 son responsables de dicha reparación tisular, aunque estos están también relacionados con enfermedades infecciosas crónicas.

La regulación de la polarización de los macrófagos implica la acción coordinada de diferentes moduladores inflamatorios, moléculas señalizadoras, y factores de transcripción. A nivel celular, aunque la actividad de los macrófagos M1 y M2 existe sin la influencia de las células T o B, las células T especializadas o polarizadas (Th1, Th2, Tregs) juegan un papel importante en la activación de la polarización de los macrófagos. La señalización canónica IRF/STAT es una vía esencial para modular la polarización de los macrófagos. La activación de las vías de señalización IRF/STAT por parte de IFNs y TLR dirigirá la función de los macrófagos hacia el fenotipo M1 (vía

STAT1), mientras que la activación de las vías de señalización IRF/STAT (vía STAT6) por parte de IL-4 y IL-13 dirigirá la función de los macrófagos hacia el fenotipo M2. Las señales iniciadas por IL-10, hormonas glucocorticoides, moléculas liberadas por células apoptóticas, y complejos inmunes también pueden afectar profundamente el estado funcional de los macrófagos. Las condiciones microambientales como la hipoxia también modulan la polarización de los macrófagos. Más importante aún, la polarización M1-M2 de los macrófagos es un proceso muy dinámico y el fenotipo de los macrófagos polarizados se puede revertir bajo condiciones fisiológicas o patológicas.

En la etapa (a) del método de la invención, los macrófagos aislados se someten a 4 series consecutivas de hipoxia/reoxigenación. Así, 5 o más series de hipoxia/reoxigenación se excluyen del alcance de la invención. Tal y como se muestra en los siguientes ejemplos, cuando los macrófagos son sometidos a 4 series de hipoxia/reoxigenación, se consigue una sobreexpresión de NGAL significativamente más alta que en comparación con los macrófagos control que no han sido sometidos a hipoxia/reoxigenación o con los que han sido sometidos a un número diferente (inferior o superior) de series de hipoxia/reoxigenación. Así, cuando los macrófagos son sometidos en la etapa (a) a 4 series de hipoxia/reoxigenación permite obtener macrófagos mejores y con un mejor fenotipo M2.

La sobreexpresión de IL-10 y de NGAL es importante para la reparación de los tejidos y la actividad inflamatoria de los macrófagos resultantes. La “Interleuquina 10 (IL10)” es una citoquina antiinflamatoria con efectos múltiples y pleiotrópicos en la inmunorregulación y la inflamación. Esta reduce la expresión de citoquinas Th1, antígenos MHC de clase II, y moléculas co-estimuladoras de macrófagos. También incrementa la supervivencia, proliferación y producción de anticuerpos de las células B. El IL-10 es capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias como IFN-γ, IL-2, IL-3, TNFα y GM-CSF generadas por células como macrófagos o células T Th1. Por otro lado, la “NGAL” o “lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos” es una proteína 25-kDa de la superfamilia de la lipocalinas y ejerce efectos bacteriostáticos capturando y eliminando sideróforos. El NGAL actúa como un factor de crecimiento y diferenciación de diferentes tipos de células. Se ha observado que el NGAL exógeno provoca la expresión de marcadores genéticos propios de células progenitoras epiteliales y además induce la proliferación de células epiteliales. EL NGAL también induce la muerte celular en neutrófilos y linfocitos para limitar la inflamación, mientras que las células no-hematopoyéticas y los macrófagos son resistentes. En un modelo de lesión de isquemia renal/reperfusión, el bloqueo de la producción de NGAL en macrófagos reduce los efectos de protección obtenidos con los macrófagos que sobreexpresan IL-10, acreditando las propiedades antiinflamatorias y proproliferativas asociadas al NGAL. La sobreexpresión de NGAL en macrófagos induce la regeneración de los tejidos antes de la inflamación y reduce la posterior inflamación (bajan los niveles de citoquinas inflamatorias y se incrementan los de citoquinas antiinflamatorias). Por lo tanto, el NGAL presenta propiedades proproliferativas, prorregenerativas, y antiinflamatorias, lo que hace que los macrófagos obtenidos por el método de la invención sean adecuados para la regeneración/ reparación de tejidos.

En la presente invención, cada “serie de hipoxia/reoxigenación” comprende una primera etapa en la cual los macrófagos aislados se someten a condiciones de hipoxia. Esta primera etapa es seguida inmediatamente por una segunda etapa en la cual los macrófagos se someten a condiciones estándar de oxígeno, por ejemplo, en esta segunda etapa se restauran las concentraciones de oxígeno en el ambiente celular. En una realización preferida, cada serie de hipoxia/reoxigenación comprende entre 2 y 5 minutos, más preferiblemente 3 minutos, de hipoxia seguido de al menos 45 segundos de reoxigenación. Mas preferiblemente, la etapa de reoxigenación se realiza durante un periodo de tiempo no superior de un minuto.

“Condiciones hipóxicas” o “condiciones de hipoxia” son las condiciones en las cuales las células se someten a concentraciones de oxígeno entre 0 y 0,6%, preferiblemente O_2 0%. Mas preferiblemente, la hipoxia es inducida en una cámara hipóxica bajo las siguientes condiciones: nitrógeno 95%; CO_2 5%; O_2 0%.

“Condiciones estándar de oxígeno” o “condiciones de reoxigenación” son las condiciones en las cuales las células se someten al aire atmosférico. Preferiblemente, las condiciones de reoxigenación son CO_2 5% más aire atmosférico.

En el método descrito en la presente invención, las series de hipoxia/re- oxigenación se realizan en la etapa (a) de forma continua y consecutiva, esto significa que no hay ningún periodo de tiempo entre una serie y la siguiente, sino que la etapa de reoxigenación de una serie previa es inmediatamente seguida por una etapa de hipoxia en la serie siguiente.

En otra realización preferida, el método de la invención comprende una etapa adicional (a’), entre las etapas (a) y (b), que comprende someter a los macrófagos obtenidos después de la etapa (a) a una etapa final de reoxigenación. Esto significa que, después de la última serie de hipoxia/reoxigenación se puede realizar de forma opcional una etapa adicional consistente en una etapa final de reoxigenación. Esta etapa final de reoxigenación se lleva a cabo bajo condiciones estándar de oxígeno. En una realización más preferida, esta reoxigenación final se realiza durante un periodo de tiempo no superior a 1 hora 30 minutos. En una realización aún más preferida, esta etapa final de reoxigenación se realiza durante 1 hora y 30 minutos.

El método de la invención puede, de forma adicional, comprender otras etapas como, pero sin limitarse a, el mantenimiento y crecimiento de los macrófagos bajo condiciones de cultivo estándar antes de la etapa (a), preferiblemente durante como mínimo 24 horas, y/o el mantenimiento y crecimiento de los macrófagos resultantes bajo condiciones estándar después de la etapa (b), preferiblemente durante al menos 1h 30 min.

Lo macrófagos resultantes obtenidos al final del método de la invención tienen un fenotipo típico M2, sin embargo, es conocido en el estado de la técnica que los perfiles de expresión genética y consecuentemente las funciones de los macrófagos pueden diferenciarse en base a la naturaleza de los estímulos inductores. Así, dado que el método de la invención comprende condiciones específicas de hipoxia/reoxigenación que afectan a la polarización de los macrófagos mediante la alteración y la activación de vías específicas de señalización, es evidente que estos macrófagos M2 específicos obtenidos a través del método de la invención son diferentes en términos de perfiles de expresión genética, y por lo tanto en términos de funcionalidad, respecto a otros macrófagos polarizados M2 o activados por otros estímulos u otras condiciones hipóxicas diferentes respecto a las descritas específicamente aquí.

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a un macrófago M2 o a una población de macrófagos M2 obtenidos u obtenibles por el método de la invención, donde dicho macrófago M2 (y los macrófagos M2 comprendidos en la población) sobreexpresa al menos NGAL. A partir de ahora, estos se denominarán “macrófago M2 de la invención” y “población de macrófagos de la invención”. En una realización preferida, el macrófago M2 de la invención o la población de macrófagos de la invención también sobreexpresan IL-10.

El término "sobreexpresión" tal como se utiliza aquí se refiere a un nivel de expresión de genes, específicamente a un nivel de expresión de los genes de NGAL y IL-10, que es mayor, preferiblemente significativamente mayor, que el nivel de expresión génica de el/los mismo/s gen/es en los macrófagos control no sometidos a la hipoxia-reoxigenación (pero que se cultivaron en condiciones estándar) o no sometidos a las mismas condiciones de hipoxia-reoxigenación como las utilizadas para los macrófagos en estudio o para ser evaluados.

La "sobreexpresión" referida en la presente invención puede ser a nivel de proteína o de ARNm, preferiblemente a nivel de ARNm. Por lo tanto, el "nivel de expresión génica" puede entenderse aquí como "nivel de expresión de la proteína" o "nivel de expresión de ARNm".

El nivel de expresión génica se puede medir o determinar en las células mediante, por ejemplo, pero sin limitarse, PCR, RT-LCR, RT-PCR, qRT-PCR o cualquier otro método para la amplificación de ácidos nucleicos, microarrays de ADN hechos con oligonucleótidos depositados por cualquier método, microarrays de ADN preparado con oligonucleótidos sintetizados *in situ*, hibridación *in situ* usando sondas marcadas específicamente, geles de electroforesis, transferencia de membrana e hibridación con una sonda específica, RMN, incubación con un anticuerpo específico en ensayos tales como *Western blot*, inmunoprecipitación, arrays de proteínas, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA o cualquier otro método enzimático, por incubación con un ligando específico, cromatografía, espectrometría de masas, y similares.

Una vez los macrófagos M2 resultantes se recuperan en la etapa (b) del método de la invención, estos pueden ser administrados al individuo, preferiblemente en el área dañada, para la reparación del tejido o pueden ser adicionados a una composición médica o farmacológica para ser usados como medicamentos en terapia celular para la regeneración de tejidos dañados. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, a partir de ahora “la composición de la invención” o “la composición farmacéutica de la invención”, que comprende los macrófagos M2 de la invención o la población de macrófagos M2 de la invención.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender adicionalmente un vehículo, excipiente, adyuvante y/u otros ingredientes activos farmacéuticamente aceptables.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos y activa o ayuda a preparar la composición en el sentido de darle la consistencia. Por lo tanto, los excipientes pueden tener una función de unión para mantener los ingredientes unidos entre sí, como por ejemplo, en el caso de almidones, azúcares o celulosas, una función de edulcorante, una función de teñido, una función de protección para proteger de la composición, como por ejemplo, para aislarlo del aire y/o humedad, una función de llenado para llenar una píldora, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, en el caso de fosfato de calcio dibásico, una función de desintegración para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir cualquier otro tipo de excipientes que no son mencionados en este párrafo.

El "vehículo farmacéuticamente aceptable", como el excipiente, es una sustancia o combinación de sustancias utilizadas en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en el mismo hasta un cierto volumen o peso. El término "vehículo" se refiere a un disolvente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se debe administrar la composición de la invención. Obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dicha

composición y con las células comprendidas en él. Vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Ejemplos de vehículos pueden ser, pero sin limitarse, agua, aceites o agentes tensioactivos, incluyendo los derivados de petróleo, animales, vegetales o sintéticos, tales como, por ejemplo, en un sentido no limitativo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de semilla de sésamo, aceite de ricino, polisorbatos, ésteres de sorbitán, sulfatos de éter, sulfatos, betainas, glucósidos, maltósidos, alcoholes grasos, nonoxinoles, poloxámeros, polioxietilenos, polietilenglicoles, dextrosa, glicerol, digitonina y similares. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o un vehículo que tiene una acción similar a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y formato a la composición. Cuando el formato de la presentación es líquido, el vehículo farmacológicamente aceptable es el disolvente.

La composición de la invención comprende macrófagos M2 de la invención o una población de macrófagos M2 de la invención en una cantidad o densidad terapéuticamente efectiva. Se entiende “cantidad terapéuticamente efectiva” por la cantidad o densidad de macrófagos M2 de la invención o la población de macrófagos M2 de la invención que, cuando se administran al paciente a tratar, produce el efecto deseado, por lo tanto, promueven la reparación del tejido y reducen la inflamación. La cantidad terapéuticamente efectiva puede cambiar dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, pero sin limitarse, el tipo, gravedad y extensión del daño tisular, así como la edad, condición física, respuesta o tolerancia a la terapia celular, etc., del individuo al cual se le va a administrar la composición de la invención.

La composición de la invención y/o sus formulaciones se pueden administrar en un variedad de formas que incluyen, pero sin limitarse a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, cutánea o subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, oftalmológica u ocular, por medio de implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

La composición de la presente invención se puede formular para la administración a un animal, preferiblemente un mamífero, incluyendo seres humanos, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparación se podría incluir cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, bolsas, botellas, polvos, gránulos, barras, lápices, vaporizadores, aerosoles, etc.), semi-sólida (pomada, crema, bálsamo, gel, hidrogel, espuma , loción, jabón, gelatina, etc.) o líquida (soluciones acuosas o no acuosas, soluciones hidroalcohólicas o hidroglicólicas, suspensiones, emulsiones, jarabes, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, linimentos, sueros, etc.) para la administración tópica o parenteral, preferiblemente administración parenteral. La composición de la presente invención también puede estar en la forma de formulaciones de liberación sostenida o cualquier otro sistema de liberación convencional. El término "liberación sostenida" se utiliza de forma convencional en referencia a un compuesto o sistema de vehiculización celular que permita la liberación gradual de dichas células durante un período de tiempo y, preferiblemente, aunque no necesariamente, con una liberación de células relativamente constante durante un período de tiempo. Ejemplos ilustrativos de vehículos o sistemas de liberación sostenida incluyen, pero no están limitados a liposomas, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, ciclodextrinas, ampollas, micelas, micelas de tensioactivos mixtos, micelas de fosfolípidos tensioactivos mixtos, miliesferas, microesferas, nanoesferas, lipoesferas, microemulsiones, nanoemulsiones, minipartículas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas, nanopartículas sólidas de lípidos, medios de lípidos nanoestructurados, materiales poliméricos, parches o implantes biodegradables o no biodegradables, o micropartículas biodegradables, tales como por ejemplo microesferas biodegradables.

La composición de la presente invención también es útil para ser aplicada a través de dispositivos médicos que hagan posible la liberación de los macrófagos M2 de la invención o de la población de macrófagos M2 de la invención en el área deseada y en la concentración adecuada para la regeneración de tejidos y/o la reducción de la inflamación tisular. Estos dispositivos deben ser, preferiblemente, apropiados para la administración local de las células, permitiendo que el tratamiento actúe en la región afectada y que no se disperse. Los dispositivos por ejemplo pueden, pero no están limitados a incluir las células en su interior o estar recubiertas por ellas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un implante (sólido, líquido o semisólido como un gel) o un dispositivo médico que comprenda los macrófagos M2 de la invención o la población de macrófagos M2 de la invención. Este implante o dispositivo médico pude comprender los macrófagos en su interior o puede estar recubierto por ellos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo médico o un instrumento médico capaz de aislar los macrófagos, preferiblemente monocitos, del individuo, más preferiblemente del torrente sanguíneo, a través por ejemplo de un gradiente biocompatible, donde dicho dispositivo médico o instrumento también comprende una cámara capaz de inducir las condiciones de hipoxia en las células aisladas. Es decir, la cámara (la cámara hipóxica) de dicho dispositivo médico es capaz de someter a los macrófagos a hipoxia. Después, los macrófagos sometidos a

hipoxia pueden ser reintroducidos en el cuerpo del individuo, preferiblemente en el tejido dañado, para la reparación o regeneración tisular. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de este dispositivo médico o instrumento para el tratamiento del tejido dañado, para la reparación de tejidos, la regeneración de tejidos, la remodelación de tejidos, la cicatrización de heridas, la resolución de la inflamación, el tratamiento y/o reparación de heridas, el tratamiento de la inflamación (de tejido), tratamiento de tejido dañado, lesionado o deteriorado y similares.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los macrófagos M2 de la invención o de la población de macrófagos M2 de la invención como medicamento, preferiblemente un medicamento para terapia celular, más preferiblemente en reparación de tejidos, regeneración de tejidos, remodelación de tejidos, cicatrización de heridas, resolución de la inflamación, tratamiento y/o reparación de heridas, tratamiento de la inflamación (de tejido), tratamiento de tejido dañado, lesionado o deteriorado y similares.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los macrófagos M2 de la invención o de la población de macrófagos M2 de la invención para la fabricación de un medicamento, preferiblemente cuando el medicamento es un medicamento para terapia celular, más preferiblemente para reparación de tejidos, regeneración de tejidos, remodelación de tejidos, cicatrización de heridas, resolución de la inflamación, tratamiento y/o reparación de heridas, tratamiento de la inflamación (de tejido), tratamiento de tejido dañado, lesionado o deteriorado y similares.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para reparación de tejidos, regeneración de tejidos, remodelación de tejidos, cicatrización de heridas, resolución de la inflamación, tratamiento y/o reparación de heridas, tratamiento de la inflamación (de tejido), tratamiento de tejido dañado, lesionado o deteriorado y similares, en un sujeto que lo necesite que comprenda administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de los macrófagos M2 de la invención o de la población de macrófagos M2 de la invención o de la composición farmacéutica de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los macrófagos M2 de la invención o de la población de macrófagos M2 de la invención como medicamento. En una realización preferida, el medicamento es un medicamento para terapia celular.

Tal y como se usa en el presente documento, “terapia con células” (también definida como “terapia celular” o “citoterapia”) se refiere a una terapia donde se inyecta material celular o células en un paciente; en el contexto de esta invención esto significa células intactas y vivas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los macrófagos M2 de la invención o de la población de macrófagos M2 de la invención para el tratamiento del tejido dañado o a su uso para reparación de tejidos, regeneración de tejidos, remodelación de tejidos, cicatrización de heridas, resolución de la inflamación, tratamiento y/o reparación de heridas, tratamiento de la inflamación (de tejido), tratamiento de tejido dañado, lesionado o deteriorado y similares.

Preferiblemente, el tejido a reparar según la presente invención es músculo esquelético, piel, tejido nervioso, riñón, hígado, cerebro, pulmón o en general cualquier tejido hinchado del cuerpo. Más preferiblemente, el tejido a reparar es músculo esquelético, aún más preferiblemente músculo esquelético dañado por sobreuso o trauma.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, a partir de ahora kit de la invención, que comprenda los macrófagos M2 de la invención, la población de macrófagos M2 de la invención o la composición farmacéutica de la invención, preferiblemente en una cantidad terapéuticamente efectiva, y un instrumento médico adecuado para la inyección de los macrófagos en el tejido.

Un “instrumento médico adecuado para la inyección de los macrófagos en el tejido” es cualquier dispositivo o instrumento médico que pueda utilizarse para la inclusión (preferiblemente inyección) de células en un cuerpo o tejido.

Ejemplos de estos dispositivos o instrumentos son, pero sin limitaciones, jeringas, viales, catéteres, agujas, cánulas, o en general cualquier instrumento utilizado en terapias celulares dentro de los conocidos en la técnica.

Los macrófagos M2 de la invención, la población de macrófagos M2 de la invención o la composición farmacéutica de la invención pueden ser encapsulados, por ejemplo, en viales, etiquetados y/o inmovilizados en un soporte en el kit de la invención.

Adicionalmente, el kit de la invención puede comprender otros elementos útiles para el mantenimiento, *in vitro* o *ex vivo*, de los macrófagos M2 de la invención, la población de macrófagos M2 de la invención o la composición farmacéutica de la invención en el kit.

El kit de la invención puede también comprender elementos que prevengan la contaminación de los macrófagos M2 incluidos en el mismo, como antibióticos, compuestos bacteriostáticos, bactericidas y/o fungicidas, y similares.

El kit de la invención puede también comprender otros compuestos, composiciones farmacéuticas o medicamentos útiles para el tratamiento de tejidos dañados, para reparación de tejidos, regeneración de tejidos, remodelación de tejidos, cicatrización de heridas, resolución de la inflamación, tratamiento y/o reparación de heridas, tratamiento de la inflamación (de tejido), tratamiento de tejido dañado, lesionado o deteriorado y similares. Estos compuestos adicionales actuarían como adyuvantes (en combinación) en la terapia celular con los macrófagos M2 de la invención, la población de macrófagos M2 de la invención o la composición farmacéutica de la invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que los que son entendidos comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Se pueden utilizar materiales y métodos similares a los descritos en el presente documento para poner en práctica la presente invención. La palabra “comprende” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas en toda la descripción y las reivindicaciones. Tras el examen de la descripción, los objetos, ventajas, y características adicionales de la invención serán aparentes para los expertos en la técnica o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos, dibujos y listados de secuencias se proporcionan a modo de ejemplo y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Expresión génica de NGAL (ARNm) normalizado por GAPDH en macrófagos en cultivo sometidos a 1, 2, 3, 4 o 5 series de hipoxia/re- oxigenación o cultivados en condiciones estándar (control). *P<0,005.

Figura 2. Expresión génica de IL10 (ARNm) normalizado por GAPDH en macrófagos en cultivos sometidos a 1, 2, 3, 4 o 5 series de hipoxia/re- oxigenación o cultivados en condiciones estándar (control). *P<0,005. **P<0,001.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. EFECTO DE PERIODOS CORTOS DE ANOXIA/RE- OXIGENACIÓN EN LA POLARIZACION DE MACRÓFAGOS PERITONEALES

1.1. Objetivo.

El objetivo es comprobar si la exposición de los macrófagos a 1, 2, 3, 4 o 5 series de anoxia/reoxigenación (3’ anoxia – 45’’ reoxigenación) promueve la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2, con un incremento en la expresión de NGAL y IL10 comparado con un control sujeto a condiciones estándar de incubación.

1.2. Diseño del experimento.

a. Grupo control bajo condiciones estándar de oxigeno (CO_2 5% más aire atmosférico).

Se extrajeron y aislaron macrófagos peritoneales de seis ratones y se cultivaron durante 24h en condiciones estándar.

b. Grupos sometidos a 1, 2, 3, 4 o 5 series de anoxia (nitrógeno 95%; CO_2 5%; O_2 0%) / reoxigenación más 1h y 30 min de reoxigenación.

Los macrófagos peritoneales se extrajeron y aislaron de seis ratones y se cultivaron durante 24h bajo condiciones estándar. Después, los macrófagos se sometieron a 1, 2 ,3, 4 o 5 series de anoxia/reoxigenación (3’ anoxia – 45’’ re-oxigenación). Finalmente, los macrófagos se sometieron a 1h 30 min de re- oxigenación.

1.3. Métodos y materiales.

Para la extracción de los macrófagos peritoneales, se inyectaron 2,5 ml de tioglicolato intraperitonealmente en 6 ratones.

Este proceso se realizó 6 veces, una para cada ratón:
1. Los macrófagos peritoneales se extrajeron en 20 ml de PBS.
2. Las células se suspendieron en 1ml de medio RPMI 10% PBS 1%P/S (penicilina/estreptomicina).
3. Las células se contaron y se sembraron 3,5 millones de células vivas por pocillo (Tabla 1).

Ratón	Millones	%células vivas	Millones de células vivas	□l de células por pocillo	Millones/pocillo
1	64	60	38,4	91,14583333	3,5
2	39	55	21,45	163,1701632	3,5
3	72	66	47,52	73,65319865	3,5
4	30	66	19,8	176,7676768	3,5
5	31	60	18,6	188,172043	3,5
6	33	60	19,8	176,7676768	3,5

Tabla 1

Las células se incubaron bajo condiciones estándar durante 24h.

Después, se realizó el protocolo intermitente de anoxia en una cámara hipóxica bajo las siguientes condiciones: nitrógeno 95% y CO_2 5%, 0% O_2. Los grupos a evaluar fueron los siguientes:

1. Control bajo condiciones estándar de oxigeno (aire atmosférico más 5% CO_2). Macrófagos peritoneales en un pocillo que contiene 2 ml de RPMI 10% FBS 1% P/S durante 24h.

2. 1 serie de anoxia/reoxigenación. Macrófagos peritoneales en un pocillo que contiene 2 ml de RPMI 10% FBS 1% P/S. 1 serie que consiste en 3' anoxia/45'' reoxigenación + 1h y 30min de reoxigenación.

3. 2 series de anoxia/reoxigenación. Macrófagos peritoneales en un pocillo que contiene 2 ml de RPMI 10% FBS 1% P/S. 2 series que consisten en 3' anoxia/45'' reoxigenación + 1h y 30min de reoxigenación.

4. 3 series de anoxia/reoxigenación. Macrófagos peritoneales en un pocillo que contiene 2 ml de RPMI 10% FBS 1% P/S. 3 series que consisten en 3' anoxia/45'' reoxigenación + 1h y 30min de reoxigenación.

5. 4 series de anoxia/reoxigenación. Macrófagos peritoneales en un pocillo que contiene 2 ml de RPMI 10% FBS 1% P/S. 4 series que consisten en 3' anoxia/45'' reoxigenación + 1h y 30min de reoxigenación.

6. 5 series de anoxia/reoxigenación. Macrófagos peritoneales en un pocillo que contiene 2 ml de RPMI 10% FBS 1% P/S. 5 series que consisten en 3' anoxia/45'' reoxigenación + 1h y 30min de reoxigenación.

Una vez finalizado el protocolo en cada grupo, las células se incubaron bajo condiciones estándar durante 1h 30 min. Pasado este tiempo, las células de recogieron y congelaron en gránulos secos para el posterior protocolo de extracción de ARN.

El ARN se extrajo de las muestras congeladas y se llevó a cabo una transcripción inversa a ADNc. El ARN total de las células fue aislado utilizando el kit RNeasy mini siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen, Barcelona, España). Las concentraciones de ARN se calcularon a partir de las determinaciones de A_{260} utilizando un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). Se sintetizó ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript de Bio-Rad de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los análisis cuantitativos de RT-PCR se realizaron en un sistema de detección de Bio-Rad iCycler iQ Real-Time-PCR utilizando el Kit de detección SYBR Green RT-PCR (Bio-Rad, Madrid, España) según las instrucciones del fabricante. los resultados en tiempo real de PCR se cuantificaron utilizando el *Gene Expression Macro* (versión 1.1) de Bio-Rad, con gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno para la expresión estable (gen de mantenimiento).

Se llevaron a cabo varios RT-PCR a fin de evaluar la expresión NGAL y IL10 en cada grupo.

1.4. Resultados.

Aunque se consiguió un aumento en la expresión de NGAL con 1, 2 y 3 series de hipoxia/reoxigenación, sólo se consiguieron resultados significativos en la medida de ambos parámetros (NGAL y IL-10) en el grupo de 4 series, mientras que con 5 series los niveles de NGAL disminuyeron (Fig. 1 y 2).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de macrófagos polarizados a un fenotipo M2 que comprende:
   a. someter a macrófagos aislados a 4 series de hipoxia/reoxigenación, donde cada serie de hipoxia/reoxigenación comprende entre 2 y 5 minutos de hipoxia en una concentración de oxígeno entre 0 y 0,6% seguido de al menos 45 segundos de reoxigenación, y
   b. recuperar los macrófagos obtenidos después de la etapa (a).

2. El método según la reivindicación 1, que comprende una etapa adicional (a'), entre las etapas (a) y (b), que comprende someter a los macrófagos obtenidos después de la etapa (a) a una etapa final de reoxigenación.

3. El método según la reivindicación 2, donde la etapa final de reoxigenación se realiza durante no más de 1 hora y 30 minutos.

4. El método según la reivindicación 3, donde la etapa final de reoxigenación se realiza durante 1 hora y 30 minutos.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde los macrófagos de la etapa (a) son monocitos.

FIG. 1

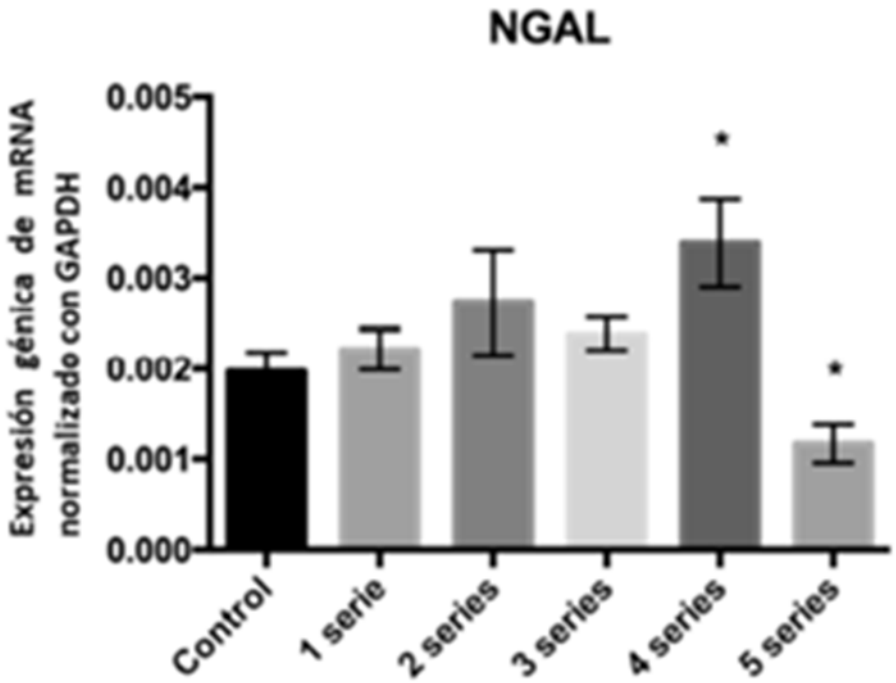
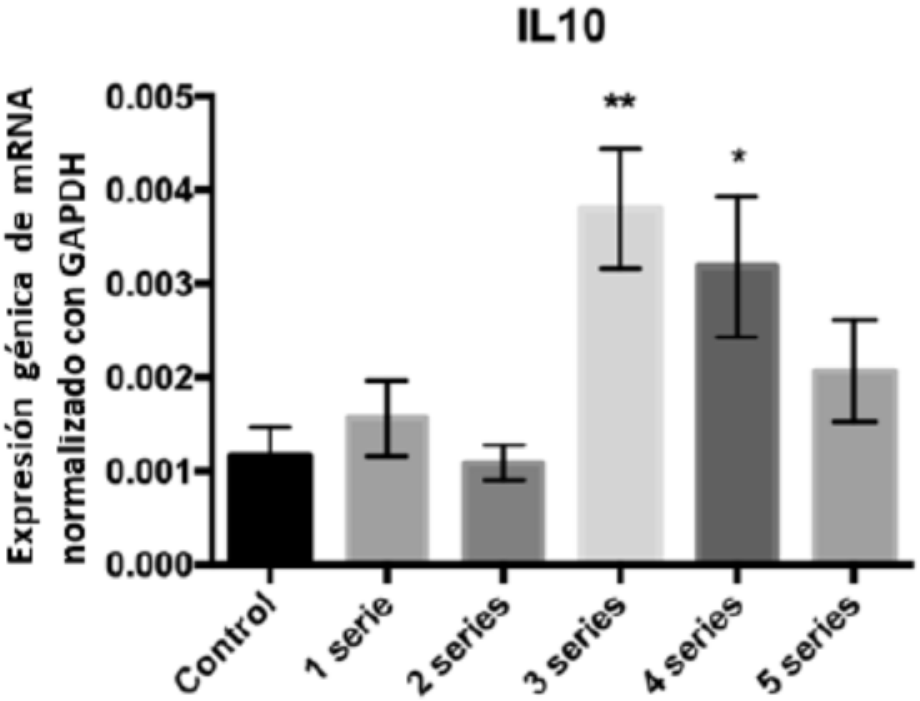

NGAL
Expresión génica de mRNA normalizado con GAPDH
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
*
*
Control
1 serie
2 series
3 series
4 series
5 series

FIG. 2


IL10
Expresión génica de mRNA normalizado con GAPDH
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
**
*
Control
1 serie
2 series
3 series
4 series
5 series