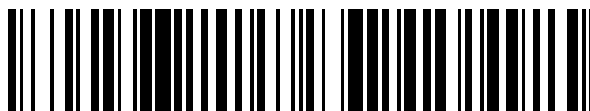


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 941 693**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2017 PCT/EP2017/060351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.11.2017 WO17191100**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2017 E 17723039 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2023 EP 3452512**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de lesiones tisulares**

30 Prioridad:

03.05.2016 EP 16305512

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

24.05.2023

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)**

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

UNIVERSITÉ PARIS CITÉ (25.0%);

**ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS
(AP-HP) (25.0%) y**

SORBONNE UNIVERSITÉ (25.0%)

72 Inventor/es:

ARACTINGI, SELIM;

CASTELA, MATHIEU;

NASSAR, DANY y

WANG, ZHE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 941 693 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

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de lesiones tisulares

5 **Campo**

La presente divulgación en el campo de la medicina.

10 **Antecedentes**

Las lesiones tisulares son una gran preocupación dado que pueden menoscabar una amplia diversidad de tejidos afectados, anatomías de lesión y etiologías. A pesar de los tratamientos existentes, sigue existiendo la necesidad de terapias mejoradas y enfoques más creativos para tratar las lesiones tisulares.

En particular, la cicatrización de heridas es un proceso implicado en muchas afecciones, tales como traumatismos o enfermedades, incluyendo trastornos vasculares, diabetes, cambios y anomalías genéticas inducidos por tratamientos con esteroides tales como, por ejemplo, anemia drepanocítica. La cicatrización de heridas es un proceso biológico intrincado e interactivo que incluye tres fases que se solapan en el tiempo: inflamación, proliferación y remodelación tisular (Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y y Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453 (7193):314-21). La interacción bien coordinada entre las estructuras tisulares, el número en masa de células residenciales (queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales) y los inmunocitos infiltrantes (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) es esencial para el proceso de cicatrización (Singer AJ y Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341 (10):738-46). Se ha notificado que las células microquímicas fetales (FMC) participan en la cicatrización de heridas maternas cuando las madres adultas han estado preñadas (Nassar D, Droitcourt C, Mathieu-d'Argent E, Kim MJ, Khosrotehrani K y Aractingi S. Fetal progenitor cells naturally transferred through pregnancy participate in inflammation and angiogenesis during wound healing. *FASEB J*. 2012;26(1):149-57) (Seppanen E, Roy E, Ellis R, Bou-Gharios G, Fisk NM y Khosrotehrani K. Distant mesenchymal progenitors contribute to skin wound healing and produce collagen: evidence from a murine fetal microchimerism model. *PLoS One*. 2013;8 (5):e62662).

De hecho, las FMC entran en la circulación materna durante todos los embarazos en seres humanos y roedores, y persisten en la médula materna durante el resto de la vida después del parto (O'Donoghue K, Chan J, de la Fuente J, Kennea N, Sandison A, Anderson JR, Roberts IA y Fisk NM. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet*. 2004;364 (9429):179-82). Se ha notificado que estas células incluyen una población heterogénea de células progenitoras, concretamente progenitores linfoides, hematopoyéticos y mesenquimatosos: estos pueden diferenciarse en diversos tejidos maternos en miocardiocitos, neuronas, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales, leucocitos, células epiteliales tiroideas, cervicouterinas e intestinales, etc. Estas células son capaces de sembrar en proporción variable diferentes órganos maternos (Fujiki Y, Johnson KL, Peter I, Tighiouart H y Bianchi DW. Fetal cells in the pregnant mouse are diverse and express a variety of progenitor and differentiated cell markers. *Biol Reprod*. 2009;81 (1):26-32). De hecho, células fetales se descubren con alta frecuencia en tejidos lesionados (Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN y Bianchi DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA*. 2004;292 (1):75-80). Por tanto, las FMC se han identificado en heridas agudas y crónicas, piel inflamada, tumores tales como melanoma y carcinoma, participando en el endotelio de vasos sanguíneos en tejidos afectados maternos. Estos datos indican la transferencia de células progenitoras endoteliales fetales durante el embarazo y su implicación en la posterior neovascularización materna y el proceso de cicatrización de heridas.

Las quimiocinas son pequeñas proteínas señal secretadas por células, que pueden dirigir el movimiento de quimiotaxis para las células sensibles cercanas y desempeñar un papel crucial en la homeostasis tisular. CCL2, también denominada proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), es un miembro de la familia de quimiocinas CC, secretada por monocitos y macrófagos, que ejerce su potente capacidad de quimiotaxis para monocitos, linfocitos T, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (células NK) y células endoteliales. El principal receptor para CCL2 es CCR2 y presenta una alta expresión en la superficie de diversas células, incluyendo monocitos, macrófagos, células endoteliales. CCL2 atrae a las células diana a través de su unión fuerte a CCR2 en su superficie y media en la función quimiotáctica (Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Jr., Broxmeyer HE y Charo SI. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest*. 1997;100(10):2552-61).

Debido a la presencia de sus receptores en diversos inmunocitos y células residenciales, las quimiocinas desempeñan papeles cruciales en las tres fases de cicatrización de heridas: no sólo para dirigir el reclutamiento de leucocitos durante la fase inflamatoria temprana sino también para contribuir a la angiogénesis, la reepitelización y la remodelación tisular durante las etapas posteriores (Gillitzer R y Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*. 2001;69(4):513-21). CCL2 participa en el proceso de cicatrización de heridas, especialmente durante la etapa temprana (Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB y Gillitzer R. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed

during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1849-60). La sobreexpresión de CCL2 se ha notificado en heridas por quemadura humanas (Gibran NS, Ferguson M, Heimbach DM e Isik FF. Monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in the human burn wound. *J Surg Res.* 1997;70(1):1-6). La deficiencia de CCL2, junto con otras quimiocinas, dio como resultado el reclutamiento de las células mieloides y la cicatrización cutánea alterados (Lin Q, Fang D, Fang J, Ren X, Yang X, Wen F y Su SB. Impaired wound healing with defective expression of chemokines and recruitment of myeloid cells in TLR3-deficient mice. *J Immunol.* 2011;186(6):3710-7), mientras que, de la misma manera, una completa deficiencia de CCL2 provoca una cicatrización retardada de infartos de miocardio (Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML y Frangogiannis NG. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res.* 2005;96(8):881-9). Estos datos indican que la presencia de CCL2 es obligatoria para una cicatrización normal. Sin embargo, la inyección de CCL2 a diversas dosis en receptores normales no modifica la cicatrización de heridas (Di Pietro, 2001). En cambio, la administración de CCL2 mejora la cicatrización de heridas cuando hay un defecto en la secreción de CCL2 tal como en heridas diabéticas (Wood S, Jayaraman V, Huelsmann EJ, Bonish B, Burgad D, Sivaramakrishnan G, Qin S, DiPietro LA, Zloza A, Zhang C, *et al.* Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in diabetic wounds by restoring the macrophage response. *PLoS One.* 2014;9(3):e91574). CCR2, el receptor de CCL2, media en la migración de monocitos, macrófagos Ly6C+ y células progenitoras hematopoyéticas desde la médula ósea hasta la sangre y luego hasta tejidos lesionados o inflamados. Además, se demostró que CCL2 puede ser adecuada para el tratamiento de una lesión vascular (Hoh, Brian L., *et al.* "Monocyte chemotactic protein-1 promotes inflammatory vascular repair of murine carotid aneurysms via a macrophage inflammatory protein-1 α and macrophage inflammatory protein-2-dependent pathway" *Circulation* 124.20 (2011): 2243-2252). Por tanto, la ruta de CCL2/CCR2 media en el reclutamiento de inmunocitos y células medulares bien establecidos.

Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un agonista de CCR2 para su uso en el tratamiento de una lesión tisular en una hembra que está preñada o que ha estado preñada al menos una vez que lo necesita, en el que la lesión tisular se selecciona del grupo que consiste en lesión cutánea, lesión hepática, lesión cardíaca, lesión pulmonar, lesión neurológica, lesión ocular, lesión estomacal, lesión pancreática, lesión esplénica, lesión intestinal, lesión tiroidea, lesión timpánica, lesión renal, lesión ósea, lesión de la médula ósea, lesión muscular, lesión de tendones, lesión de ligamentos, lesión de los órganos reproductores o lesión de las glándulas endocrinas y en el que el agonista de CCR2 es un polipéptido de CCL2 que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:3.

Descripción detallada

En este caso, los inventores notifican que CCL2 se expresa principalmente por leucocitos durante las etapas tempranas de la cicatrización de heridas cutáneas. Muestran que CCR2 se expresa en FMC, especialmente en una subpoblación de células progenitoras, que denominan "células progenitoras mieloides fetales" (FMPC), y media en el reclutamiento de estas células al tejido de herida materno. Además, los inventores notifican que las FMC/FMPC reclutadas mejoran la cicatrización de heridas cutáneas maternas organizando el endotelio de vasos sanguíneos y secretando péptidos proangiogénicos, particularmente quimiocina CXCL1, para potenciar la angiogénesis en la herida. Sus hallazgos sugieren el papel central de la señalización de CCL2/CCR2 en el reclutamiento de FMC/FMPC y su participación en la reparación tisular materna.

Un primer aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de una lesión tisular en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de CCR2.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero hembra, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate, que está preñada o que ha estado preñada al menos una vez. Por tanto, se entiende que el sujeto según la presente divulgación no es un macho. Preferiblemente, el sujeto es una mujer. Preferiblemente, el sujeto según la presente divulgación es una mujer que está preñada o que ha estado preñada al menos una vez. En el contexto de la presente divulgación, un "sujeto que lo necesita" indica un sujeto, preferiblemente una mujer, que padece cualquier lesión tisular.

Tal como se usa en el presente documento, el término "CCR2" para el "receptor de quimiocinas (motivo C-C) 2" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un receptor de quimiocinas. CCR2 es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y se une a las quimiocinas CCL2, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13 y CCL16. CCR2 transduce una señal aumentando los niveles intracelulares de iones de calcio.

Receptor de quimiocinas CCR2, a través de cualquiera de la isoforma A (SEQ ID NO:1) o la isoforma B (SEQ ID NO:2):

SEQ ID NO:1 (isoforma A):

10	20	30	40	50
MLSTSRSRFI	RNTNESGEEV	TTFDDYDYGA	PCHKFDVKQI	GAQLLPPLYS
60	70	80	90	100
LVFIFGFVGN	MLVVLILINC	KKLKCLTDIY	LLNLAISDLL	FLITLPLWAH
110	120	130	140	150
SAANEWVFGN	AMCKLFTGLY	HIGYFGGIF	IILLTIDRYL	AIVHAVFALK
160	170	180	190	200
ARTVTFGVVT	SVITWLVAVF	ASVPGIIFTK	CQKEDSVYVC	GPYFPRGWNN
210	220	230	240	250
FHTIMRNILG	LVLPLIMVI	CYSGILKTLL	RCRNEKKRHR	AVRVIFTIMI
260	270	280	290	300
VYFLFWTPYN	IVILLNTFQE	FFGLSNCEST	SQLDQATQVT	ETLGMTHCCI
310	320	330	340	350
NPIIYAFVGE	KFRSLFHIAL	GCRIAPLQKP	VCGGPGVRPG	KNVKVTTQGL
360	370			
LDGRGKGKSI	GRAPEASLQD	KEGA		

SEQ ID NO:2 (isoforma B):

5

10	20	30	40	50
MLSTSRSRFI	RNTNESGEEV	TTFDDYDYGA	PCHKFDVKQI	GAQLLPPLYS
60	70	80	90	100
LVFIFGFVGN	MLVVLILINC	KKLKCLTDIY	LLNLAISDLL	FLITLPLWAH
110	120	130	140	150
SAANEWVFGN	AMCKLFTGLY	HIGYFGGIF	IILLTIDRYL	AIVHAVFALK
160	170	180	190	200
ARTVTFGVVT	SVITWLVAVF	ASVPGIIFTK	CQKEDSVYVC	GPYFPRGWNN
210	220	230	240	250
FHTIMRNILG	LVLPLIMVI	CYSGILKTLL	RCRNEKKRHR	AVRVIFTIMI
260	270	280	290	300
VYFLFWTPYN	IVILLNTFQE	FFGLSNCEST	SQLDQATQVT	ETLGMTHCCI
310	320	330	340	350
NPIIYAFVGE	KFRRLSVFF	RKHITKRCK	QCPVFYRETV	DGVSTSTNPS
360				
TGEQEVSAGL				

Tal como se usa en el presente documento, el término “agonista de CCR2” se refiere a cualquier compuesto, natural o no, que puede unirse a CCR2 y fomenta la actividad de CCR2.

10

Tal como se usa en el presente documento, el término “lesión tisular” se refiere a un cambio anómalo en tejidos biológicos o daño en el tejido de un organismo, habitualmente provocado por una enfermedad o un traumatismo. Puede ser un corte, una quemadura, una herida, o también resultante de la acción de un patógeno, tal como un parásito o una infección, así como un trastorno metabólico, fisiológico, vascular, genético o inmunitario.

15

En particular, la lesión tisular se selecciona del grupo que consiste en lesión cutánea, lesión hepática, lesión cardíaca, lesión pulmonar, lesión neurológica, lesión ocular, lesión estomacal, lesión pancreática, lesión esplénica, lesión intestinal, lesión tiroidea, lesión timpica, lesión renal, lesión arterial, lesión venosa, lesión ósea, lesión de la médula ósea, lesión muscular, lesión de tendones, lesión de ligamentos, lesión de los órganos reproductores o lesión de las glándulas endocrinas.

20

En particular, la lesión tisular se selecciona del grupo que consiste en lesión cutánea, lesión hepática, lesión cardíaca, lesión pulmonar, lesión neurológica, lesión ocular, lesión estomacal, lesión pancreática, lesión esplénica, lesión intestinal, lesión tiroidea, lesión timpica, lesión renal, lesión arterial excepto aneurisma de la arteria carótida, lesión venosa, lesión ósea, lesión de la médula ósea, lesión muscular, lesión de tendones, lesión de ligamentos, lesión de los órganos reproductores o lesión de las glándulas endocrinas.

25

En particular, la lesión tisular es una úlcera diabética del pie resultante de diabetes.

30

En particular, la lesión tisular es una úlcera de la pierna resultante de anemia drepanocítica.

En particular, la lesión tisular es una úlcera de la pierna resultante de enfermedad microvascular o macrovascular.

- 5 En particular, la lesión tisular resulta de anemia drepanocítica.

Debe entenderse que el término “herida”, tal como se usa en el presente documento, incluye incisiones quirúrgicas así como heridas provocadas por patologías o traumatismos accidentales.

- 10 El término también incluye úlcera por estasis venosa, quemaduras, cicatrización de heridas retardada observada durante el tratamientos con corticoides, cicatrización de heridas retardada observada en ancianos (defecto de envejecimiento), estrés, cicatrización de heridas retardada observada en pacientes diabéticos, defectos de epitelización de cicatrices quirúrgicas o tras injertos de piel, grietas en los dedos que se producen después de la exposición al frío, patologías de las uñas asociadas con una cicatrización retardada, ampollas en los pies que se producen durante una carrera o caminata prolongada.

- 15 Las heridas corneales pueden resultar de diversas enfermedades observadas, tales como úlcera corneal, traumatismo o erosión corneal, queratitis y ojo seco. La herida también puede resultar de la administración tópica de fármacos y situaciones de cirugía, tales como queratoplastia y durante el transcurso temporal de recuperación de un injerto corneal.

- 20 En particular, el término “herida”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier herida resultante de diabetes, tal como úlcera diabética del pie, o a cualquier herida resultante de anemia drepanocítica, tal como úlcera de la pierna.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto a tratamiento profiláctico o preventivo, así como a tratamiento curativo o modificador de enfermedad, incluyendo el tratamiento de un sujeto en riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que ha contraído la enfermedad, así como un sujeto que está enfermo o que se le ha diagnosticado que padece una enfermedad o afección médica, e incluye supresión de la recidiva clínica. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que tiene un trastorno médico o que en última instancia puede adquirir el trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar la aparición de, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento. Por “régimen terapéutico” se entiende el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación usado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. La expresión “régimen de inducción” o “periodo de inducción” se refiere a un régimen terapéutico (o la porción de un régimen terapéutico) que se usa para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel de fármaco a un sujeto durante el periodo inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o en su totalidad) un “régimen de carga”, que puede incluir administrar una mayor dosis del fármaco que la que emplearía un médico durante un régimen de mantenimiento, administrar un fármaco con más frecuencia de la que un médico administraría el fármaco durante un régimen de mantenimiento, o ambos. La expresión “régimen de mantenimiento” o “periodo de mantenimiento” se refiere a un régimen terapéutico (o la porción de un régimen terapéutico) que se usa para el mantenimiento de un sujeto durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al sujeto en remisión durante largos periodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear terapia continua (por ejemplo, administrar un fármaco a intervalos regulares, por ejemplo, cada semana, cada mes, cada año, etc.) o terapia intermitente (por ejemplo, tratamiento interrumpido, tratamiento intermitente, tratamiento en la recidiva o tratamiento tras lograr unos criterios predeterminados particulares [por ejemplo, dolor, manifestación de enfermedad, etc.]).

- 50 En particular, el agonista de CCR2 es una molécula orgánica pequeña. El término “molécula orgánica pequeña” se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente usadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en cuanto a tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, más particularmente hasta 2000 Da, y los más particularmente hasta aproximadamente 1000 Da.

- 60 En particular, el agonista de CCR2 es un anticuerpo contra CCR2 o una porción del mismo. En particular, el agonista de CCR2 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos monoclonales humanos completos.

- 65 Tal como se usa en el presente documento, “anticuerpo” incluye tanto anticuerpos que se producen de manera natural como anticuerpos que no se producen de manera natural. Específicamente, “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, “anticuerpo” incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente sintéticos, anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo

no humano puede humanizarse mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en seres humanos.

En particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En particular, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
 5 En particular, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En particular, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En particular, la porción del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. En particular, la porción del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. En particular, la porción del anticuerpo comprende una porción Fab del anticuerpo. En particular, la porción del anticuerpo comprende una porción F(ab')₂ del anticuerpo. En particular, la porción del anticuerpo comprende una porción Fc del anticuerpo. En particular, la
 10 porción del anticuerpo comprende una porción Fv del anticuerpo. En particular, la porción del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. En particular, la porción del anticuerpo comprende uno o más dominios de CDR del anticuerpo.

Los anticuerpos se preparan según la metodología convencional. Pueden generarse anticuerpos monoclonales
 15 usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la presente divulgación, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado a intervalos adecuados (por ejemplo, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes o una vez al mes) con formas antigénicas de CCR2. Al animal puede administrársele un "refuerzo" final de antígeno en el plazo de una semana del sacrificio. A menudo, es deseable usar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes
 20 inmunológicos adecuados incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante de Ribí, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunostimuladores que contienen CpG. En el campo se conocen bien otros adyuvantes adecuados. Los animales pueden inmunizarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u por otras vías. Un animal dado puede inmunizarse con múltiples formas del antígeno por múltiples vías. Brevemente,
 25 el CCR2 recombinante puede proporcionarse mediante expresión con líneas celulares recombinantes. En particular, CCR2 puede proporcionarse en forma de células humanas que expresan CCR2 en su superficie. Tras el régimen de inmunización, se aíslan los linfocitos a partir del bazo, los ganglios linfáticos u otros órganos del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando un agente tal como polietilenglicol para formar un hibridoma. Tras la fusión, se colocan las células en medios que permiten el crecimiento de hibridomas
 30 pero no de las parejas de fusión usando métodos convencionales, tal como se describe (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3ª edición, Academic Press, Nueva York, 1996). Tras el cultivo de los hibridomas, se analizan los sobrenadantes celulares para determinar la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, que se unen selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA,
 35 citometría de flujo, inmunoprecipitación e inmunotransferencia de tipo Western. En el campo se conocen bien otras técnicas de selección. Las técnicas preferidas son aquellas que confirman la unión de los anticuerpos al antígeno conformacionalmente intacto y plegado de forma natural, tales como ELISA no desnaturalizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

Significativamente, tal como se conoce bien en la técnica, sólo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el parátipo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véanse, en general, Clark, W. R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7ª ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo a
 45 partir del cual se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')₂, conserva ambos de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo intacto. De manera similar, un anticuerpo a partir del cual se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, denominado fragmento Fab, conserva uno de los sitios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Prosiguiendo, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo
 50 covalentemente unida y una porción de la cadena pesada de anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son el principal determinante de la especificidad de anticuerpo (un único fragmento Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad de anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítipo de manera aislada.

Dentro de la porción de unión a antígeno de un anticuerpo, tal como se conoce bien en la técnica, hay regiones determinantes de complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones de entramado (FR), que mantienen la estructura terciaria del parátipo (véanse, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como en la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG, hay cuatro regiones de entramado (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de
 60 complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la CDR3 de cadena pesada, son en gran parte responsables de la especificidad de anticuerpo.

Ahora está bien establecido en la técnica que las regiones que no son de CDR de un anticuerpo de mamífero pueden reemplazarse por regiones similares de anticuerpos conoespecíficos o heteroespecíficos al tiempo que
 65 conservan la especificidad epítipo del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que las CDR no humanas se unen de manera covalente a regiones FR

y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

Esta presente divulgación proporciona composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Tal como se usa en el presente documento, "humanizado" describe anticuerpos en los que parte, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos fuera de las regiones CDR se reemplazan por aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205. Las patentes estadounidenses n.ºs 5.585.089 y 5.693.761 anteriores y el documento WO 90/07861 también proponen cuatro posibles criterios que pueden usarse en el diseño de los anticuerpos humanizados. La primera propuesta fue usar, para un aceptor, una región de entramado a partir de una inmunoglobulina humana particular que sea inusualmente homóloga a la inmunoglobulina donante que va a inmunizarse, o una región de entramado de consenso a partir de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta fue que, si un aminoácido en la región de entramado de la inmunoglobulina humana es inusual y el aminoácido donante en esa posición es típico para secuencias humanas, entonces puede seleccionarse el aminoácido donante en vez del aceptor. La tercera propuesta fue que, en las posiciones inmediatamente adyacentes a las 3 CDR en la cadena de inmunoglobulina humanizada, puede seleccionarse el aminoácido donante en vez del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta fue usar el aminoácido donante que reside en las posiciones de región de entramado en las que se predice que el aminoácido tiene un átomo de cadena lateral dentro de 3A de las CDR en un modelo tridimensional del anticuerpo y se predice que puede interactuar con las CDR. Los métodos anteriores son meramente ilustrativos de algunos de los métodos que un experto en la técnica podría emplear para preparar anticuerpos humanizados. Un experto habitual en la técnica estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

En las formas humanizadas de los anticuerpos, parte, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos fuera de las regiones CDR se han reemplazado por aminoácidos a partir de moléculas de inmunoglobulina humana pero donde no se cambian parte, la mayoría o la totalidad de los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR. Se permiten pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían las moléculas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA y IgM. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, usando determinados métodos de humanización, puede aumentarse la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo usando métodos de "evolución dirigida", tal como describen Wu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 294:151, 1999.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales completamente humanos inmunizando a los ratones transgénicos para grandes porciones de locus de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584 y las referencias citadas en las mismas. Estos animales se han modificado genéticamente de tal manera que hay una deleción funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican adicionalmente para contener la totalidad o una porción del locus de gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana de tal manera que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Tras la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), pueden prepararse anticuerpos monoclonales según la tecnología de hibridoma convencional. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por tanto, no provocarán respuestas a anticuerpos humanos anti-IgG de ratón (KAMA) cuando se administren a seres humanos.

También existen métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de presentación en fago (patentes estadounidenses n.ºs 5.565.332 y 5.573.905) y la estimulación *in vitro* de células B humanas (patentes estadounidenses n.ºs 5.229.275 y 5.567.610).

Por tanto, tal como resultará evidente para un experto habitual en la técnica, la presente divulgación también proporciona fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que se han reemplazado las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos en los que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos en los que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos en los que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 por secuencias homólogas humanas o no humanas. La presente divulgación también incluye los denominados anticuerpos de cadena sencilla.

Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpo pueden derivar de cualquiera de las clases de inmunoglobulinas habitualmente conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, IgA, IgA secretora, IgE, IgG e IgM. Los expertos en la técnica también conocen bien las subclases de IgG, e incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

En particular, el anticuerpo según la presente divulgación es un anticuerpo de dominio único. El término

“anticuerpo de dominio único” (sdAb) o “VHH” se refiere al único dominio variable de cadena pesada de anticuerpos del tipo que puede hallarse en mamíferos camélidos que están desprovistos de manera natural de cadenas ligeras. Tal VHH también se denomina “Nanobody[®]”.

- 5 En particular, el agonista de CCR2 es un polipéptido. Más particularmente, el polipéptido es un equivalente funcional de CCL2.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “CCL2” se refiere al ligando 2 de quimiocinas (motivo C-C), también denominado proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1) y citocina inducible pequeña A2. CCL2 es una citocina pequeña que pertenece a la familia de quimiocinas CC.

CCL2 (SEQ ID NO:3):

1 MKVSAALLCL LLIAATFIPQ GLAQPDAINA PVTCCYNFTN RKISVQRLAS

51 YRRITSSKCP KEAVIFKTIV AKEICADPKQ K WVQDSMDHL DKQTQTPKT

15 Tal como se usa en el presente documento, un “equivalente funcional de CCL2” es un polipéptido que puede unirse a CCR2, fomentando de ese modo una actividad de CCR2 según la presente divulgación. El término “equivalente funcional” incluye fragmentos, mutantes, y muteínas de CCL2. Por tanto, el término “funcionalmente equivalente” incluye cualquier equivalente de CCL2 obtenido alterando la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante una o más deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos de tal manera que el análogo de proteína conserva la capacidad para unirse a CCR2 y fomentar una actividad de CCR2 según la presente divulgación. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse, por ejemplo, mediante mutación puntual del ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos.

- 25 En particular, el equivalente funcional de un polipéptido es al menos el 80% homólogo a la proteína correspondiente.

30 En particular, el equivalente funcional de un polipéptido es al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% homólogo a la proteína correspondiente.

En particular, el agonista de CCR2 es un polipéptido que tiene al menos el 80% de identidad con SEQ ID NO:3.

- 35 En particular, el equivalente funcional de un polipéptido es al menos el 90% homólogo tal como se evalúa mediante cualquier algoritmo de análisis convencional tal como, por ejemplo, el software de análisis de secuencias Pileup (manual de programa para el paquete Wisconsin, 1996).

40 En particular, la presente divulgación proporciona un polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una porción de CCL2, porción que se une a CCR2 y fomenta la actividad de CCR2 según la presente divulgación.

45 Los polipéptidos de la presente divulgación pueden producirse mediante cualquier medio adecuado, tal como resultará evidente para los expertos en la técnica. Con el fin de producir cantidades suficientes de polipéptidos o equivalentes funcionales de los mismos para su uso según la presente divulgación, la expresión puede lograrse de manera conveniente cultivando, en condiciones apropiadas, células huésped recombinantes que contienen el polipéptido de la presente divulgación. En particular, el polipéptido se produce mediante medios recombinantes, mediante la expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificante. Se conocen bien los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes. Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido se genera, en particular, mediante expresión a partir de un ácido nucleico codificante en una célula huésped. Puede usarse cualquier célula huésped, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema particular. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster y muchas otras. Las bacterias también son huéspedes preferidos para la producción de proteína recombinante, debido a la facilidad con la que pueden manipularse y hacerse crecer las bacterias. Un huésped bacteriano preferido habitual es *E. coli*.

En particular, el polipéptido de la presente divulgación es una inmunoadhesina.

- 60 Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina” que puede unirse a CCR2) con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente,

las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada para CCR2 (es decir, es "heteróloga") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión para CCR2. En particular, la adhesina comprende los polipéptidos caracterizados por SEQ ID NO:3. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

La secuencia de inmunoglobulina es normalmente, pero no necesariamente, un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc). Las inmunoadhesinas pueden presentar muchas de las propiedades químicas y biológicas valiosas de los anticuerpos humanos. Dado que las inmunoadhesinas pueden construirse a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada unida a una secuencia de dominio constante (Fc) y bisagra de inmunoglobulina humana, la especificidad de unión de interés puede lograrse usando componentes completamente humanos. Tales inmunoadhesinas son mínimamente inmunogénicas para el paciente, y son seguras para uso prolongado o repetido.

Los polipéptidos de la presente divulgación, los fragmentos de los mismos y las proteínas de fusión (por ejemplo, inmunoadhesina) según la presente divulgación pueden presentar modificaciones posteriores a la traducción, incluyendo, pero sin limitarse a, glicosilaciones (por ejemplo, glicosilaciones unidas a N o unidas a O), miristilaciones, palmitilaciones, acetilaciones y fosforilaciones (por ejemplo, serina/treonina o tirosina).

En particular, se contempla que los polipéptidos usados en los métodos terapéuticos de la presente divulgación pueden modificarse con el fin de mejorar su eficacia terapéutica. Tal modificación de los compuestos terapéuticos puede usarse para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo en circulación o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes puede disminuirse significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. Como ejemplo, añadir dipéptidos puede mejorar la penetración de un agente en circulación en el ojo a través de la barrera hematorretiniana usando transportadores endógenos.

En particular, el agonista de CCR2 es un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en cuanto a reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con afinidad y especificidad altas. Tales ligandos pueden aislarse a través de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, químicamente modificado de manera eventual, de una secuencia única. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringida presentada por una proteína plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se selecciona a partir de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos.

En particular, el agonista de CCR2 es CCL2.

En particular, el agonista de CCR2 de la presente divulgación se administra al sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente de agonista de CCR2 para tratar lesiones tisulares a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente divulgación lo decidirá el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel específico de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el trastorno que esté tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la habilidad de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles menores que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta lograr el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse a lo largo de un amplio intervalo de desde 0,01 hasta 1.000 mg por adulto al día. En particular, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación para el sujeto que va a tratarse. Un medicamento contiene normalmente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del principio activo, en particular desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se administra habitualmente a un nivel de dosificación de desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal al día.

Las composiciones según la presente divulgación se formulan para administración parenteral, transdérmica, oral, rectal, subcutánea, sublingual, intrapulmonar, tópica o intranasal. La administración local puede incluir disoluciones simples, geles, emulsiones, liposomas; pero también dispositivos con parches o apósitos o inyecciones intradérmicas o subcutáneas.

Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

En particular, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración parenteral. Las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Estos pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

En particular, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración tópica.

En particular, las composiciones farmacéuticas se formulan para administrarse directamente en el sitio de lesión.

El agonista de CCR2 de la presente divulgación puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

“Farmacéuticamente” o “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica u otra no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, un diluyente, un material de encapsulación o un adyuvante de formulación de cualquier tipo.

En particular, el agonista de CCR2 de la presente divulgación puede administrarse en combinación con un tratamiento convencional habitualmente usado para tratar lesiones tisulares. Por ejemplo, el desbridamiento, la descarga y el control de infección son los tratamientos convencionales para el tratamiento de úlceras en diabetes.

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método de cribado de un fármaco para el tratamiento de lesiones tisulares que comprende las etapas de i) proporcionar una pluralidad de sustancias de prueba, ii) determinar si las sustancias de prueba son agonistas de CCR2 y iii) seleccionar positivamente las sustancias de prueba que son agonistas de CCR2.

Normalmente, el método de cribado de la presente divulgación implica proporcionar células apropiadas que expresan CCR2 en su superficie. Tales células incluyen células de mamíferos, levadura, *Drosophila* o *E. coli*. En particular, se usa un polinucleótido que codifica para CCR2 para transfectar células para expresar el receptor. Luego se pone el receptor expresado en contacto con una sustancia de prueba y un ligando de CCR2 (por ejemplo, CCL2), según sea apropiado, para observar la activación de una respuesta funcional. En particular, las etapas de comparación pueden implicar comparar la actividad inducida por la sustancia de prueba y la actividad inducida por una agonista de CCR2 bien conocido, tal como CCL2. En particular, se seleccionan positivamente las sustancias que pueden tener una actividad similar o incluso mejor que un agonista de CCR2 bien conocido.

Normalmente, el método de cribado de la presente divulgación también puede implicar el cribado de sustancias de prueba que pueden unirse a CCR2 presente en la superficie celular. Normalmente, la sustancia de prueba está marcada (por ejemplo, con un marcador radiactivo) y se compara la unión con un agonista de CCR2 bien conocido, tal como CCL2.

Normalmente, el compuesto candidato se selecciona del grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, polipéptidos u oligonucleótidos.

Las sustancias de prueba que se han seleccionado positivamente pueden someterse a etapas de selección adicionales en vista de someter a ensayo adicionalmente sus propiedades para el tratamiento de lesiones tisulares. Por ejemplo, los compuestos candidatos que se han seleccionado positivamente pueden someterse a etapas de selección adicionales en vista de someter a ensayo adicionalmente sus propiedades en modelos animales para lesiones tisulares.

Los ensayos anteriores pueden realizarse usando técnicas de cribado de alto rendimiento para identificar sustancias de prueba para desarrollar fármacos que pueden ser útiles para el tratamiento de lesiones tisulares.

Las técnicas de cribado de alto rendimiento pueden llevarse a cabo usando placas de múltiples pocillos (por ejemplo, placas de 96, 384 ó 1536 pocillos), con el fin de llevar a cabo múltiples ensayos usando un sistema robótico automático. Por tanto, pueden someterse a ensayo grandes bibliotecas de sustancias de prueba de una manera muy eficiente. Más particularmente, las células transfectadas de manera estable que crecen en pocillos de placas de microtitulación (96 pocillos o 384 pocillos) pueden adaptarse al cribado de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos. Los compuestos en la biblioteca se aplicarán uno a uno de manera automática a los pocillos de las placas de microtitulación que contienen las células transgénicas descritas anteriormente. Una vez que se identifican las sustancias de prueba que inducen la actividad de CCR2, pueden seleccionarse positivamente para su caracterización posterior. Estos ensayos ofrecen varias ventajas. La exposición de la sustancia de prueba a una célula completa permite la evaluación de su actividad en el contexto natural en el que la sustancia de prueba puede actuar. Dado que este ensayo puede realizarse fácilmente en un formato de placa de microtitulación, los ensayos descritos pueden realizarse mediante un sistema robótico automático, lo que permite someter a prueba grandes números de muestras de prueba dentro de un marco temporal razonablemente corto. Los ensayos de la presente divulgación pueden usarse como un cribado para evaluar la actividad de un compuesto o extracto no sometido a prueba previamente, en cuyo caso se somete a prueba una única concentración y se compara con controles. Estos ensayos también pueden usarse para evaluar la potencia relativa de un compuesto sometiendo a prueba un intervalo de concentraciones, en un intervalo de 100 μ M a 1 μ M, por ejemplo, y calculando la concentración más eficiente.

La presente divulgación se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la presente divulgación.

Figuras

Figura 1: procesos de cicatrización de heridas cutáneas en ratonas vírgenes y preñadas. (A) Planimetría del área de herida en cada punto de tiempo con respecto al área de herida original (n = 3). (B) Medición de lenguas neopidérmicas y huecos (n = 3). (C) Cuantificación de células Ki67+ en los bordes de lesiones epidérmicas (EpiD.) y los tejidos dérmicos de granulación (D.) (n = 3). (D) Cuantificación de la superficie relativa de vasos por campo 20x mediante densitometría de fluorescencia (n = 3). (E) Cuantificación del número de tipos de vasos por campo 20x (n = 3). (F) Análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión de ARNm de VEGF-A, VEGFR1, VEGFR2 normalizada con respecto al nivel de ARNm de GAPDH (n = 3), (G) Análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión de ARNm de VEGF-C, VEGFR3 normalizada con respecto al nivel de ARNm de GAPDH (n = 3). Prueba de la t de Student, * p < 0,05; media $\pm$ EEM.

Figura 2: la herida materna activa las FMC e induce CCR2. Cuantificación de células fetales en médula ósea (A), sangre (B) y piel/herida (C) después de lesión cutánea materna (n = 3). (D) Análisis por matriz de PCR de la expresión génica de quimiocinas y citocinas en FMC clasificadas a partir de médula ósea materna en ratonas con o sin herida en el día 3 (n = 6). Las columnas blancas representan los genes de ligando y las columnas negras representan los genes de receptor. Análisis por RT-PCR cuantitativa para la expresión de ARNm de CCR2 (E) y su ligando CCL2 (F) normalizada con respecto al nivel de ARNm de GAPDH en piel normal y herida (n = 3). (G) Análisis por RT-PCR cuantitativa para CCL2 en leucocitos clasificados a partir del día 1 de herida. Prueba de la t de Student, * p < 0,05; media $\pm$ EEM.

Figura 3: CCL2 recluta las FMC a la herida materna y mejora la cicatrización de heridas cutáneas en ratonas preñadas. Se realizó una herida de 8 mm en ratonas preñadas con fetos eGFP+ y se le inyectó a la lesión CCL2 o PBS inmediatamente después y 2 días después de la excisión cutánea. (A) El análisis por FACS demostró un número significativamente mayor de células eGFP+ en la herida de ratonas preñadas a las que se les inyectó CCL2 en comparación con las ratonas a las que se les inyectó PBS (n = 3). (B) Cuantificación de células eGFP+ en la herida en el día 7 de ratonas preñadas a las que se les inyectó PBS o CCL2 (n = 3). (C) Cuantificación de células eGFP+ en secciones de herida de ratonas preñadas con fetos eGFP+ después de la inyección de PBS o CCL2 (n = 5). (D) Planimetría de área de herida en cada punto de tiempo con respecto a la superficie de herida original (n = 5). (E) Medición de lenguas neopidérmicas y huecos en sitios de herida (n = 5). (F) Cuantificación de la superficie relativa de vasos por campo 20x mediante densitometría de fluorescencia (n = 4). (G) Cuantificación del número de tipos de vasos por campo 20x (n = 4). (H) Cuantificación de vasos doblemente positivos vWF+ eGFP+ por campo 4x (n = 4). Prueba de la t de Student, * p < 0,05; media $\pm$ EEM.

Figura 4: CCL2 recluta las FMPC a la herida. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de las ratonas preñadas con fetos eGFP+ o ratonas de control vírgenes con o sin herida los días 0, 1, 2, 3 y se sometieron a análisis por FACS. (A, B y C) Porcentaje de células CD11b+ CD34+ CD31+. Se realizaron heridas a las ratonas preñadas con fetos eGFP+ y se les inyectó PBS o CCL2 inmediatamente después y 2 días después de la lesión cutánea. Se recogieron las PBMC y las heridas 7 después para el análisis por FACS. Se analizaron (D) PBMC y (E) tejidos de herida para determinar células progenitoras mieloides CD11b+ CD34+ CD31+ maternas (control eGFP-) y células progenitoras mieloides CD11b+ CD34+ CD31+ fetales (control eGFP+) tras la administración de CCL2 o PBS. (D y E) Porcentaje de células CD11b+ CD34+ CD31+ en el control eGFP $\pm$ (n = 4). Prueba de la t de Student, * p < 0,05; media $\pm$ EEM.

Figura 5: las FMPC expresan un alto porcentaje de CCR2 después de la lesión cutánea materna. Se realizó una herida a una ratona preñada con fetos eGFP⁺ y se aislaron FMPC eGFP⁺ CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺ a partir de la sangre el día 1 de herida o se realizó una herida a una ratona CaG-eGFP y se aislaron MPC eGFP⁺ CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺ a partir de la sangre el día 1 de herida. La ratona receptora era una hembra virgen normal con el mismo acervo genético que las ratonas donantes. Se trasplantaron 1×10^5 FMPC o MPC en la herida de día 1 de la ratona receptora y se recogió la herida el día 7. (A) Cuantificación de células CCR2⁺/eGFP⁺ en el trasplante de FMPC o MPC adultas. (B) Cuantificación de CCR2⁺/eGFP⁺ en el trasplante de FMPC o MPC adultas. (C) Cuantificación de células CCR2⁺ en el control eGFP[±] CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺ ($n = 3$).

Figura 6: las FMPC sobreexpresan CXCL1 en la herida. Se realizó una herida a una ratona preñada con fetos eGFP⁺ y se aislaron FMPC eGFP⁺ CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺ y MPC maternas eGFP⁺ CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺ a partir del tejido de herida el día 3. Después de la extracción de ARNm, se realizó un análisis por matriz de PCR de alto rendimiento. (A) Análisis por matriz de PCR de la ratona de la expresión de genes asociados con la angiogénesis en FMPC (derecha) y MPC (izquierda) ($n = 3$). (B) Validación por RT-PCR cuantitativa de la expresión de ARNm de CXCL1 normalizada con respecto al nivel de ARNm de GAPDH ($n = 3$).

Figura 7: se creó una herida de 8 mm en ratonas preñadas que portaban fetos eGFP⁺. Se inyectó Ccl2 o PBS en la herida inmediatamente y dos días después de la excisión cutánea. (a) Planimetría del área de herida con respecto al área de herida inicial, en diversos puntos de tiempo a partir de ratonas vírgenes *Ccr2*^{KO/KO} ($n = 5$). (b) Planimetría del área de herida con respecto al área de herida inicial, en diversos puntos de tiempo a partir de ratonas *Ccr2*^{KO/KO} emparejadas con ratones macho eGFP^{KI} *Ccr2*^{KO} ($n = 5$). (c) Planimetría del área de herida con respecto al área de herida inicial, en diversos puntos de tiempo ($n = 5$) a partir de ratonas *Ccr2*^{KO/KO} emparejadas con ratones macho eGFP. (d) Cuantificaciones de células eGFP⁺ en secciones de heridas a partir de ratonas preñadas a las que se les realizaron inyecciones de PBS o Ccl2 ($n = 3$). Prueba de la Z de Student, * $p < 0,05$; media $\pm$ EEM.

Figura 8: se creó una herida de 8 mm en ratonas SAD de 8 meses de edad posparto que habían tenido fetos eGFP⁺ o ratonas WT de 8 meses de edad vírgenes. Se les inyectó Ccl2 o PBS en la herida inmediatamente y dos días después de la excisión cutánea. (a) Planimetría del área de herida con respecto al área de herida inicial, en diversos puntos de tiempo a partir de ratonas SAD de 8 meses de edad posparto ($n = 3$). (b) Planimetría del área de herida con respecto al área de herida inicial, en diversos puntos de tiempo a partir de ratonas WT de 8 meses de edad vírgenes ($n = 3$). Prueba de la t de Student, * $p < 0,05$; media $\pm$ EEM.

Figura 9: ratonas posparto que habían tenido fetos eGFP⁺ recibieron una hepatectomía. Se les inyectó Ccl2 o PBS en el lóbulo hepático dañado. Se analizaron las ratonas 7 días después de la cirugía. (a) Cuantificaciones de células eGFP⁺ en cortes de hígado a partir de ratonas posparto que recibieron las inyecciones de PBS o Ccl2 ($n = 3$). Prueba de la t de Student, * $p < 0,05$; media $\pm$ EEM.

Figura 10: se creó una herida de 8 mm en ratonas vírgenes, ratonas preñadas o ratonas posparto tratadas con clobetasol. Se les inyectó Ccl2 o PBS en la lesión inmediatamente y dos días después de la excisión cutánea. Tinción con rojo sirio y cuantificación de la densidad de colágeno en (a) ratonas vírgenes ($n = 3$), (b) ratonas preñadas ($n = 3$) y (c) ratonas posparto tratadas con clobetasol ($n = 3$). Barras de escala: 50 μ m. Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de Col1a, Col3a y TGF β normalizados con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH en la herida el día 7 en (d) ratonas vírgenes ($n = 3$), (e) ratonas preñadas ($n = 3$) y (f) ratonas posparto tratadas con clobetasol ($n = 3$).

EJEMPLO 1

Material y métodos

Ratones: se obtuvieron ratones macho transgénicos para proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) de Riken Laboratories (CD57BL/6-Tg (CAG-EGFP)1Obs/J) y se emparejaron con hembras de tipo natural (WT) con acervo C57BL/6 de 6-8 semanas de edad obtenidas de Harlan (Harlan). Todos los cuidados de los ratones cumplieron con las normas éticas de las regulaciones para el cuidado de animales de la Universidad Pierre et Marie Curie (UPMC).

Citometría de flujo: se afeitó la piel del lomo y se recogieron heridas, se incubaron durante la noche a 4°C en tripsina al 0,05%-EDTA (Invitrogen) para la separación mecánica de la epidermis. Se digirió el tejido en colagenasa IV durante 60 min a 37°C, se agitaron en vórtex cada 10 min y se filtraron usando un filtro celular de 100 μ m, seguido de un filtro celular de 40 μ m (BD Pharmingen) para obtener una suspensión celular única. Se extrajo sangre del corazón de los ratones y se separaron las células mononucleares de sangre periférica a partir de los eritrocitos y las plaquetas usando el método de Ficoll 1.088 (Health Care). Después de recoger el anillo, se lavó la suspensión celular con PBS (Life Technologies) y luego se filtró usando un filtro celular de 40 μ m (BD Pharmingen). Los anticuerpos usados para la citometría fueron CD34-eFluor660 (1:100; eBioscience), CD11b-PERCP-Cy5.5 (1:100; eBioscience), CD31-PE-Cy7 (1:100; eBioscience), CCR2 (1:100; Santa Cruz) cruzados

con un anticuerpo anti-IgG de cabra marcado con Alexa 555 (1:1.1000 Invitrogen). Se adquirieron datos de citometría de flujo usando un dispositivo BD LSRII (BD Pharmingen) y se realizó la clasificación en un clasificador celular MoFlo (Beckman Coulter), y posteriormente se analizaron con el software FlowJo (Treestar, San Carlos, CA).

Inmunotinción: se realizaron cortes criogénicos de 5 μm a partir del tejido congelado. Después de la permeabilización con acetona fría, se bloquearon los cortes con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos primarios usados incluyeron: anticuerpo de rata anti-CD31 de ratón (1:40; BD Biosciences), anticuerpo de conejo anti-Lyve-1 de ratón (1:200; Abcam), anticuerpo de rata anti-F4/80 de ratón (1:250; Abcam), anticuerpo de rata anti-GR-1 de ratón (1:250; eBiosciences), anticuerpo de conejo anti-Ki67 de ratón (1:200; Abcam), anticuerpo de cabra anti-CCR2 de ratón (1:200; Santa Cruz biotechnology), anticuerpo de cabra anti-CCL2 de ratón (1:200; Santa Cruz), anticuerpo de conejo anti-factor de Von Willebrand de ratón (1:800; Abcam). Para la inmunofluorescencia, se usaron los anticuerpos secundarios, es decir, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con Cy3 o Alexa 488, anticuerpo de burro anti-IgG de rata marcado con Alexa 488 o Cy3 y anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra marcado con Alexa 555 (1:1000; Invitrogen). Se contratiñeron los portaobjetos con DAPI 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich).

Microscopía, puntuación y mediciones: se usó el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i equipado con una cámara digital Nikon DS-Fi1C (Nikon, Tokio, Japón). Para la puntuación de célula, se tomaron fotografías de 3 campos diferentes, y se contaron las células marcadas mediante densitometría de fluorescencia y se notificaron como porcentaje de núcleos totales. Se calculó el porcentaje medio de células marcadas para cada muestra. Las mediciones se realizaron usando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

Extracción de ARN y PCR cuantitativa: se extrajo el ARN total a partir de células o tejidos usando el reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y luego se sometió a transcripción inversa con el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). Se usó el ADNc resultante para la PCR con la mezcla maestra SYBR-Green para PCR (Roche). La PCR y la recopilación de datos se realizaron en un instrumento LightCycler 480 (Roche). Los niveles de expresión de las muestras se normalizaron con respecto al gen de mantenimiento β -actina.

Heridas quirúrgicas: se anestesiaron los ratones mediante inhalación de isoflurano al 4,9% con un flujo de aire ambiental de 300 ml/min. Después del afeitado, se generaron cuatro heridas quirúrgicas de 6 mm o una de 8 mm usando dispositivos de biopsia por punción. Se realizó excisión de todos los tejidos por encima del panículo carnoso. Se dejaron las heridas sin cubrir hasta que se recogieron. Se tomaron imágenes normalizadas de las heridas en diferentes puntos de tiempo usando una cámara digital Sony Cybershot DSC-W180 de 10,1 megapíxeles (Sony, Tokio, Japón). Se recogieron los tejidos de herida o bien ultracongelados en nitrógeno líquido o bien almacenados a -80°C .

Tratamiento con corticoides: 4 días después del parto, se trataron los ratones con aplicación tópica en la piel dorsal afeitada de 200 μl de clobetasol (Dermoval) durante 12 días.

Inyección de quimiocinas/células: después de generar la herida de 8 mm, se inyectaron 100 μl de CCL2 (Clinisciences, Nanterre, Francia) el día 0 y el día 2 en los cuatro puntos cardinales del lecho de herida a una concentración de 0,5 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. O se inyectaron 10.000 células después de la clasificación por FACS resuspendidas en PBS usando el mismo procedimiento el día 1.

Matriz de PCR para citocinas y quimiocinas

Se midió el cambio en la expresión de citocinas y quimiocinas usando la matriz de PCR RT² Profiler para el sistema de citocinas y quimiocinas (Qiagen, Hilden, Alemania). Se extrajo el ARN total de células eGFP+ aisladas mediante FACS a partir de la médula ósea. Se realizó el análisis de la expresión de 86 genes de citocinas y quimiocinas con el sistema LightCycler 1536 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El análisis de datos se realizó usando la plantilla de análisis de datos de la matriz de PCR RT² Profiler (Qiagen, Hilden, Alemania). Se realizó la normalización de datos usando cinco genes de mantenimiento (Actb, B2m, Gapdh, Gusb, Hsp90ab1) y se calcularon los niveles relativos de expresión con $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Las matrices de PCR se realizaron en AP-HP Hopital La pitié Salpêtrière ICM, usando un dispositivo LightCycler 1536 (Roche) con matrices de PCR RT² Profiler.

Análisis estadístico: el análisis estadístico se realizó con el software estadístico Graphpad Prism. Los resultados se notificaron como media $\pm$ EEM. Se realizó una única comparación entre dos grupos con una prueba de la t de Student bilateral para datos independientes. Se definió una significación estadística de la diferencia cuando el valor de p era $<0,05$.

Resultados

El embarazo mejoró la cicatrización de heridas cutáneas al potenciar la angiogénesis vascular

Para evaluar si el embarazo afecta a la cicatrización de heridas cutáneas, se realizaron heridas por excisión en la piel dorsal de ratonas preñadas en el día 15,5 de gestación y de sus hermanas de camada vírgenes respectivas de la misma edad. El cierre de la herida se aceleró significativamente en ratonas preñadas (superficie media de herida el día 5: preñada frente a virgen = 8,39% frente a 13,67%; $p = 0,025$) (figura 1A). La reepitelización, tal como se mide por la longitud de la neoepidermis que cubre el tejido de granulación, fue más rápida en ratonas preñadas (figura 1B). Sistemáticamente, también se descubrió un mayor número de células proliferantes Ki67⁺ tanto en la zona de la epidermis como en la zona de la dermis de ratonas preñadas (figura 1C).

La inflamación y la neovascularización son dos factores cruciales del proceso de cicatrización de heridas. En este caso se halló que la densidad de vasos sanguíneos CD31⁺ dentro del lecho de herida aumentó en ratonas preñadas en comparación con las vírgenes, al tiempo que no hubo ninguna diferencia de densidad de vasos linfáticos LYVE1⁺ entre ambos grupos (figuras 1D y 1E). VEGF-A se une a los receptores de superficie celular VEGFR1 y VEGFR2 y media en la angiogénesis vascular, mientras que VEGF-C actúa sobre el receptor VEGFR3 y fomenta la angiogénesis linfática. Se descubrió que la expresión génica de VEGF-A, VEGFR1 y VEGFR2 se elevaba significativamente en los sitios de herida de ratonas preñadas (figura 1F), sin embargo, los niveles de VEGF-C y VEGFR3 no se vieron alterados (figura 1G). Estos resultados sugieren que la angiogénesis vascular, pero no la linfática, aumentó en la herida de las preñadas.

El análisis por inmunofluorescencia no reveló ninguna diferencia entre ratonas preñadas y vírgenes en los sitios de herida para neutrófilos GR-1⁺ infiltrantes, y macrófagos F4/80⁺, lo que se sugiere que parece que la inflamación no cambia en la herida de las preñadas (datos no mostrados).

En conjunto, estos resultados proporcionaron una indicación inicial de que el embarazo mejora la cicatrización de heridas cutáneas maternas al potenciar la angiogénesis vascular.

La herida cutánea materna activa las FMC al inducir CCR2

El laboratorio de los presentes inventores notificó previamente que las FMC participan activamente en la cicatrización de heridas maternas y que VEGF-A desempeña un papel crucial en el reclutamiento de estas células. Para investigar adicionalmente el papel de las células fetales en la cicatrización de heridas maternas, se emparejaron hembras C57BL/6 vírgenes con machos heterocigóticos para proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), y se realizaron heridas por excisión en la piel dorsal el día 15,5 de embarazo (datos no mostrados). Se identificaron las FMC por su expresión de eGFP y se cuantificaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) a partir de órganos maternos. Se halló que las células fetales aumentaron drásticamente 1 día después de la herida en la médula ósea (figura 2A), la sangre (figura 2B) y la herida (figura 2C), y se restablecieron a niveles normales el día 3, lo que indica que la activación de células fetales es un proceso temprano y transitorio.

Con el fin de identificar dianas novedosas, especialmente quimiocinas, que se activan por la herida cutánea materna en FMC, se realizó un análisis por matriz de PCR en células fetales clasificadas a partir de médula ósea con o sin lesión cutánea. CCR2 fue el receptor de quimiocinas regulado por incremento más significativamente después de la lesión (figura 2D), lo que indica que la herida materna puede inducir CCR2 en las FMC.

Además, se detectaron FMC eGFP⁺ en el tejido de herida y una porción considerable de estas células expresaron CCR2 (datos no mostrados). Además, en sangre periférica, sólo el 1,5% de las FMC eGFP⁺ expresaron CCR2 funcional en ratonas sin heridas. Sin embargo, el 90% de estas células expresaron CCR2 un día después de la lesión cutánea, mientras que el 20% de ellas todavía expresaron CCR2 el día 3 (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación temprana posterior a la herida de la señalización de CCR2 en células fetales puede servir para activar las FMC a partir de la sangre en circulación al sitio de herida.

La sobreexpresión de CCL2/CCR2 durante la cicatrización de heridas cutáneas temprana no se ve afectada por el embarazo

Para determinar adicionalmente indicios quimiotácticos de CCR2 en la herida y qué ligando de CCR2 está desencadenando el movimiento de las FMC a la piel lesionada, se midió la expresión de CCR2 y sus dos ligandos principales, CCL2 y CCL8, en el lecho de herida cutánea de ratonas preñadas y vírgenes. El ARNm de CCR2 aumentó drásticamente un día después de la lesión y disminuyó significativamente el día 3 con respecto al nivel del día 1 (figura 2E), lo que sugiere que la sobreexpresión de CCR2 en piel lesionada es un acontecimiento temprano y transitorio. De manera correspondiente, el nivel de proteína de CCR2 sigue el mismo patrón que su ARNm (datos no mostrados). Curiosamente, el nivel de CCL2, uno de los ligandos de CCR2, está en paralelo a la expresión de CCR2, con un fuerte aumento el día 1 y una disminución el día 3 (figura 2F). Mientras tanto, la expresión de CCL8, el otro ligando de CCR2, sólo presentó un ligero aumento el día 1 y aumentó

significativamente el día 3 (datos no mostrados). Estos datos indican que la señalización de CCL2/CCR2 se sobreexpresa específicamente de manera temprana durante la cicatrización de heridas. Además, el nivel de ARNm de CCR2, CCL2 y CCL8 en el tejido de herida no presenta ninguna diferencia entre ratonas vírgenes y preñadas (figuras 2E, 2F y figura complementaria no mostrada), lo que indica que el embarazo no afecta a esta ruta de señalización.

Para identificar adicionalmente los tipos celulares específicos que secretan CCL2, se clasificaron leucocitos CD45⁺ a partir de piel normal y de la herida del día 1, y se descubrió una sobreexpresión robusta de CCL2 en la herida, lo que sugiere la secreción de CCL2 de los inmunocitos durante el proceso de cicatrización de heridas temprana (figura 2G y figura complementaria no mostrada). El análisis por coinmunofluorescencia demostró que los monocitos F4/80⁺, y no los neutrófilos GR-1⁺, expresaron CCL2 (datos no mostrados), lo que sugiere que los monocitos residentes secretan inicialmente CCL2. Además, también se detectó CCL2 en células endoteliales CD31⁺ (datos no mostrados). Además, el embarazo no afecta a la inflamación temprana (datos no mostrados) ni a la secreción de CCL2 (figura 2G).

En conjunto, estos datos sugieren que los monocitos y las células endoteliales secretan CCL2 durante la fase inicial de cicatrización de heridas cutáneas, y no se ve afectado por el embarazo.

CCL2 recluta las FMC a la herida materna

Las FMC pueden infiltrarse en la herida materna y participar en el proceso de cicatrización. Debido al alto porcentaje de FMC que expresan CCR2 en su superficie y a la sobreexpresión de CCL2 en el tejido de herida durante la fase temprana de cicatrización, se especuló que CCL2 puede mediar en el reclutamiento temprano de las FMC a la herida. Para confirmar esta hipótesis, se inyectó proteína CCL2 de ratón recombinante o PBS como control en el lecho de herida el día 0 y el día 2 después de las heridas por excisión. Se cuantificó inicialmente el número de células eGFP⁺ en sangre y herida cutánea de ratonas preñadas a las que se les inyectó CCL2 o PBS usando análisis por FACS el día 7. En sangre, el número de células eGFP⁺ no fue diferente entre las ratonas a las que se les inyectó CCL2 y PBS (datos no mostrados). Curiosamente, el tejido de herida cutánea al que se le inyectó CCL2 contenía más del doble del número de células eGFP⁺ que al que se les inyectó PBS (figuras 3A y B). Con el fin de confirmar este hallazgo, se realizó análisis por inmunofluorescencia en el tejido de granulación de herida cutánea el día 7. Según los resultados obtenidos por FACS, el número de células eGFP⁺ fue casi tres veces más en los cortes a partir de ratonas a las que se les inyectó CCL2 en comparación con las ratonas a las que se les inyectó PBS (figura 3C). En conjunto, los resultados sugieren que las señales mediadas por la ruta de CCL2-CCR2 median en el reclutamiento de las FMC a los sitios de herida.

La administración de CCL2 mejora la cicatrización de heridas al potenciar la neovascularización en ratonas preñadas, pero no en ratonas vírgenes

Las FMC participan en la inflamación y la angiogénesis durante la cicatrización de heridas maternas. En este caso, también se demostró que CCL2 recluta las FMC a la herida (figuras 3A-C). Por tanto, se analizó adicionalmente el proceso de cicatrización de heridas maternas tras CCL2. Para las ratonas a las que se les inyectó CCL2, las superficies lesionadas se redujeron hasta menos del 16,8% (figura 3D), mientras que para las ratonas a las que se les inyectó PBS, las áreas de herida permanecieron por encima del 28,4% de la lesión original el día 7 después de la excisión cutánea ($p = 0,024$) (figura 3D). Simultáneamente, las mediciones de lengua neoepidérmica en los cortes tisulares mostraron una reepitelización aumentada después de las inyecciones de CCL2 (figura 3E). Además, la proliferación tal como se mide por el número de células Ki67⁺ se elevó tanto en la zona de epidermis como en la zona de dermis de ratonas a las que se les inyectó CCL2 (datos no mostrados). La neovascularización tal como se mide por la densidad de vasos sanguíneos CD31⁺ así como la expresión génica de VEGF-A, VEGFR1 y VEGFR2 se elevaron significativamente en el sitio de herida de ratonas a las que se les inyectó CCL2 (figuras 3F y 3G y datos no mostrados). Por el contrario, la angiogénesis linfática no se vio alterada tras la administración de CCL2 (figuras 3F y 3G y datos no mostrados). Además, la inflamación en la herida tal como se mide por el número de células GR-1⁺ y F4/80⁺ en tejido de granulación no demostró ninguna diferencia entre ratonas a las que se les inyectó CCL2 y PBS (datos no mostrados). Nassar *et al.* notificaron que las FMC forman vasos sanguíneos en la herida materna. Sistemáticamente, también se identificaron en gran medida vasos sanguíneos positivos para el factor de Von Willebrand (vWF) al menos parcialmente compuestos por FMC eGFP⁺, y el número de estos vasos microquímicos fetales fue significativamente mayor en ratonas a las que se les inyectó CCL2 en comparación con ratonas a las que se les inyectó PBS (figura 3H). A partir de estos datos se concluyó que CCL2 mejoró la cicatrización al fomentar la neovascularización materna y que se formaron vasos de origen fetal.

Para determinar adicionalmente si CCL2 mejora la cicatrización cutánea a través del efecto de las FMC o si afecta directamente al cierre de la herida, se analizó la cicatrización de heridas tras la administración de CCL2 en ratonas vírgenes. Sorprendentemente, para las ratonas vírgenes, la inyección de CCL2 no cambió la cicatrización para todos los paradigmas en comparación con la inyección de PBS: superficie de herida, lengua neoepidérmica, proliferación, inflamación, angiogénesis y linfangiogénesis (datos no mostrados). Por tanto, el efecto de CCL2 sobre la mejora de la cicatrización de heridas se limita a las ratonas preñadas, no vírgenes, por

tanto amplía el argumento de que las FMC reclutadas por CCL2 contribuyó a fomentar la neovascularización materna y a mejorar la cicatrización de heridas.

En conjunto, estos datos sugieren que el efecto de CCL2 sobre la cicatrización es a través de las células fetales.

5

Una subpoblación específica de FMC responde a CCL2 en la cicatrización de heridas maternas

La herida materna recluta progenitores mieloides fetales (FMPC) y progenitores endoteliales fetales (FEPC). En este caso, se investigó adicionalmente la dinámica de MPC y EPC en sangre periférica durante la cicatrización de heridas. En el control virgen, el número de MPC, definidas como CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺, se mantuvo al mismo nivel que en la condición sin herida durante los primeros dos días, y disminuyó significativamente el día 3 después de la herida (figura 4A). En las ratonas preñadas, el número de MPC maternas, definidas como eGFP⁺ CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺, mostraron el mismo patrón que las MPC vírgenes (figura 4B). Por el contrario, el número de FMPC, definidas como eGFP⁺ CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺, se elevó notablemente el día 1 tras la herida en comparación con la condición sin herida. Para el día 2 y el día 3, aunque se redujo a partir del día 1, el número de FMPC todavía mantuvo el mismo nivel que sin herida (figura 4C). Se reconoce ampliamente que las EPC son un factor crucial para la neovascularización en el proceso de cicatrización de heridas. En este caso, también se estudió el patrón de EPC maternas (eGFP⁺) y fetales (eGFP⁺) definidas como CD11b⁺ CD34⁺ CD31⁺. Ambas poblaciones mostraron un aumento retardado y abrupto el día 3 después de la lesión cutánea (datos no mostrados). En conjunto, estas observaciones demostraron que: a diferencia de las MPC maternas, las FMPC se elevaron durante el proceso de cicatrización temprana, mientras que las EPC maternas y fetales comparten un patrón paralelo. Por tanto, las FMPC se activan específicamente después de la herida.

10

15

20

Se investigó adicionalmente la respuesta de esta población específica fetal de MPC a la administración de CCL2. El número de FMPC disminuyó significativamente en sangre periférica (figura 4D) y aumentó notablemente en el tejido de herida de ratonas a las que se les inyectó CCL2 (figura 4E). Mientras tanto, el número de MPC maternas no cambió tras la inyección de CCL2 ni en sangre ni en tejido de herida (figuras 4D y 4E). Además, los números de EPC tanto maternas como fetales detectados en sangre y herida fueron los mismos entre la inyección de CCL2 y PBS (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados sugieren que CCL2 recluta específicamente FMPC desde la sangre hasta la herida durante el proceso de cicatrización.

25

30

Las FMPC organizan el endotelio de vasos sanguíneos en la herida

Para evaluar el linaje celular de las FMPC *in vivo*, se aisló esta población a partir de la sangre periférica de ratonas preñadas con fetos eGFP⁺ el día 1 de herida. Como control, se aislaron MPC adultas eGFP⁺ a partir de la sangre periférica de ratonas heterocigóticas vírgenes eGFP⁺. Las células se inyectaron en el sitio de herida de día 1 de una ratona virgen BL/6 de tipo natural eGFP⁻. Se utilizó un análisis por inmunofluorescencia para observar el corte de tejido de herida de las ratonas receptoras el día 7 de herida. Las FMPC eGFP⁺ mostraron un fenotipo endotelial vWF⁺. Incluso se descubrió que los vasos sanguíneos se componían en gran medida de FMPC eGFP⁺ vWF⁺, confirmando la posición íntima de las células eGFP⁺ en el vaso mediante la microscopía confocal (datos no mostrados). Las FMPC eGFP⁺ también expresaron un marcador de células de músculo liso (α -SMA), pero ningún marcador de macrófagos (F4/80) (datos no mostrados). Por el contrario, las MPC adultas eGFP⁺ no expresaron el marcador endotelial vWF ni el marcador de miofibroblastos α -SMA (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las FMPC se diferencian en el linaje endotelial y de miofibroblastos en la herida.

35

40

45

Las FMPC forman una agrupación proliferativa y expresan un alto porcentaje de CCR2

A diferencia de las MPC adultas, que mantienen una forma de célula única aislada, las FMPC formaron una agrupación proliferativa y se tiñeron positivamente para Ki67 (datos no mostrados). Curiosamente, el análisis por inmunofluorescencia demostró que las FMPC detectadas en el sitio de herida cutánea expresaron un alto porcentaje de CCR2 (datos no mostrados), lo que condujo a especular que las interacciones CCL2/CCR2 guían el reclutamiento de las FMPC al tejido de herida. De hecho, *in situ*, casi todas las FMPC, pero ninguna de las MPC adultas, expresaron CCR2 (figura 5A). Mientras tanto, el porcentaje de CCR2 que expresa células no de eGFP fue casi idéntico entre muestras a las que se les inyectó FMPC y MPC adultas (figura 5B). Además, se realizó análisis por FACS en sangre de ratonas preñadas con fetos eGFP⁺ el día 1 de herida. Aproximadamente el 90% de las FMPC y tan sólo el 0,3% de las MPC maternas (figura 5C) expresaron CCR2. En conjunto, estos resultados sugieren que CCR2 media en el reclutamiento de las FMPC desde la sangre hasta el sitio de herida.

50

55

Las FMPC sobreexpresaron CXCL1 en la herida

Para investigar los posibles efectos paracrinicos de las FMPC sobre la angiogénesis, se clasificaron FMPC eGFP⁺ y MPC maternas eGFP⁺ a partir del tejido cutáneo lesionado de ratonas preñadas con fetos eGFP⁺ el día 3. La fase de angiogénesis de la cicatrización de heridas cutáneas se produce el día 2-3, la secreción de factores angiogénéticos así como el reclutamiento de EPC alcanzan su máximo el día 3-4. En este caso, se estudió el perfil de expresión génica de los factores de angiogénesis el día 3 usando análisis por matriz de PCR de la

60

65

angiogénesis de ratón, y se representaron gráficamente los transcritos prevalentes en la figura 6A. Los genes más regulados por incremento incluyen CXCL1, Sphk y TGF- β 2, siendo la quimiocina CXCL1 el transcrito más aumentado. Por otro lado, determinados genes inhibidores de la angiogénesis se regularon por disminución, concretamente Thbs2 y Bai1. La figura 6B muestra la validación mediante análisis por RT-PCR cuantitativa de la expresión de CXCL1, que de nuevo demostró un nivel de ARNm de CXCL1 casi seis veces mayor en FMPC que en MPC maternas. Finalmente, se realizó un análisis por inmunofluorescencia en cortes de heridas a las que se les inyectó FMPC eGFP+ o MPC adultas eGFP+, y se descubrió que sólo las FMPC sobreexpresaron CXCL1 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las FMPC secretan factores proangiogénesis, especialmente CXCL1, para potenciar la angiogénesis materna.

CCL2 mejora la cicatrización de heridas retardada en ratonas posparto (datos no mostrados)

Se ha notificado que las células fetales se transfieren a la circulación materna durante el embarazo y se injertan en la médula ósea materna posparto, incluso durante la vida. Los corticoides pueden retrasar la reparación cutánea, por tanto se ha reconocido la administración de clobetasol como un modelo de cicatrización de heridas crónica en ratones. En este caso, para evaluar el efecto de CCL2 en un modelo de cicatrización de heridas retardada para una situación posparto, se emparejaron hembras vírgenes con machos transgénicos para eGFP heterocigóticos. 2 semanas después del parto, las ratonas que dieron a luz a crías eGFP+ recibieron una aplicación tópica diaria de Dermoval (crema de clobetasol) sobre la zona lumbar durante 14 días para inducir atrofia cutánea. Luego se realizó una lesión cutánea por excisión en la zona tratada con Dermoval, y se inyectó CCL2 o PBS el día 0 y el día 2 tras la herida. La aplicación de clobetasol antes de la herida prolonga eficazmente el proceso de cicatrización normal, manteniendo la superficie de herida el día 7 el 100% de la lesión original en comparación con el proceso de cicatrización normal para el 30% de la herida original. Mientras tanto, la inyección de CCL2 mejoró el cierre de la herida con el 40% de un área sin cicatrizar en comparación con la inyección de PBS que todavía era el 100% de la superficie inicial. Las lenguas neoepidérmicas de heridas a las que se les inyectó CCL2 fueron significativamente más largas que las de las heridas a las que se les inyectó PBS. CCL2 también reclutó más del doble de células fetales al lecho de herida en comparación con PBS, tal como se demuestra mediante análisis por FACS. También hubo un aumento significativo en la proliferación de células epidérmicas y dérmicas, la angiogénesis de vasos sanguíneos y la expresión génica de VEGF-A, VEGFR1 y VEGFR2 en heridas a las que se les inyectó CCL2 en comparación con PBS. Mientras tanto, la linfogénesis tal como se mide por la densidad de vasos linfáticos LYVE1+ así como por la expresión génica de VEGF-C, VEGFR3, y la inflamación, tal como se mide por el número de células GR1+ y F4/80+ en tejido de granulación, no demostraron ninguna diferencia. Por tanto, CCL2 recluta las FMC y mejora la cicatrización de heridas retardada en ratonas posparto.

EJEMPLO 2

Resultados

La movilización de FMC a los tejidos maternos a través de Ccl2 está mediada por el receptor Ccr2 en células fetales

Una vez que se demostró que Ccl2 podía reclutar las FMC al tejido materno inyectado, fue importante demostrar si la señalización de células fetales dependía de Ccr2. Para responder a esta cuestión, se analizaron ratonas vírgenes *Ccr2*^{KO/KO}, ratonas *Ccr2*^{KO/KO} emparejadas con ratones macho *eGFP*⁺ y ratonas *Ccr2*^{KO/KO} emparejadas con ratones macho *eGFP*^{KI} *Ccr2*^{KO} (figuras 7 a, b). Cuando las ratonas *Ccr2*^{KO/KO} tienen fetos *Ccr2*^{KO/KO}, las inyecciones de Ccl2 no modifican la cicatrización de heridas en ningún día (figura 7b). En cambio, cuando las ratonas *Ccr2*^{KO/KO} tienen fetos *Ccr2*^{WT/KO}, Ccl2 disminuye el área con herida en el 49,08, el 28,96 y el 57,58% los días 2, 5 y 7 respectivamente (figura 7c). Curiosamente, esta razón es similar a la razón que se encontró con Ccl2 en ratonas WT. Además, sólo las ratonas *Ccr2*^{KO/KO} que tienen fetos *Ccr2*^{WT/KO} mostraron un aumento en el infiltrado de células fetales en tejido de granulación tras las inyecciones locales de Ccl2 (figura 7d). Finalmente, las ratonas *Ccr2*^{KO/KO} vírgenes no mostraron ningún cambio cuando se trataron con Ccl2 (figura 7a). Por tanto, todos estos datos demuestran que Ccl2 potencia la cicatrización de heridas a través del reclutamiento de células fetales dependiente de Ccr2 al lecho de herida.

Bajas dosis ("fisiológicas") de Ccl2 mejoran la cicatrización de heridas retardada en ratonas SAD ancianas posparto con "células falciformes"

La anemia drepanocítica puede complicarse por úlceras prolongadas. Nguyen VT *et al.*, han desarrollado recientemente un modelo murino de tales heridas crónicas, realizando heridas en ratonas SAD ancianas (Nguyen VT *et al.*, J Invest Dermatol, 2016, 136(2):497-506). Por tanto, se han emparejado ratonas SAD jóvenes con ratones macho WT *eGFP*⁺. Luego, se permitió que las ratonas SAD posparto llegaran a los 8 meses de edad, momento en el que estas ratonas tienen una cicatrización retardada. Después de eso se han realizado heridas de 8 mm en tales ratonas SAD ancianas posparto (n=3) o en las ratonas SAD ancianas vírgenes de la misma edad. Los días 0 y 2, se inyectaron 50 ng de Ccl2 en las heridas de estas ratonas tal como se realizó previamente. El análisis del cierre de la herida mostró que Ccl2 indujo una mejora significativa de la cinética de

cicatrización en ratonas tratadas posparto los días 2, 5 y 7 (figura 8a). Curiosamente, y tal como se observó previamente para los otros dos modelos, en heridas de ratonas SAD vírgenes; Ccl2 no modificó la cinética de cicatrización (figura 8b). Estos resultados indican que, en un modelo murino de anemia drepanocítica, el tratamiento con Ccl2 de ratonas posparto induce una intensa movilización de las FMC que da como resultado una reducción del 73% en el área de herida.

Ccl2 mejora el reclutamiento de FMC después de la lesión hepática

Con el fin de determinar si la "terapia con células madre natural" con reclutamiento de células fetales puede permitir la mejora de otros tejidos maternos distintos de la piel, se estudió el destino hepático después de la hepatectomía. Se realizó hepatectomía del lóbulo medio en ratonas C57/Bl6 posparto previamente emparejadas con ratones macho eGFP C57/Bl6. Se inyectaron 50 ng de Ccl2 en el sitio de hepatectomía en 3 animales, mientras que se inyectó PBS en otros 3. Las ratonas se sacrificaron 7 días más tarde. Se recogieron los hígados. Los cortes criogénicos permitieron el análisis de células fetales eGFP. El porcentaje de tales células fue del 3,1% con la inyección de PBS, mientras que alcanzó el 8,5% en hígados tratados con Ccl2 ($p < 0,018$) (figura 9a). Este resultado muestra que, en la reparación hepática, Ccl2 también conduce al reclutamiento de células fetales.

Bajas dosis de Ccl2 en ratonas preñadas y posparto mejoran la cicatrización de heridas sin fibrosis

Finalmente, una cuestión importante sigue siendo la diferencia en los mecanismos observados con las bajas dosis de Ccl2 usadas. De hecho, cuando se administra Ccl2 a dosificaciones más altas en animales vírgenes en escenarios distintos de la cicatrización de heridas, se observó el reclutamiento de monocitos con riesgo de fibrosis. Por tanto, se han estudiado la piel y el hígado tras las inyecciones de Ccl2 en las heridas. En ratonas tratadas previamente con clobetasol preñadas y posparto, las inyecciones de Ccl2 en la herida conducen a una fibrosis dérmica reducida el día 7 tras las heridas tal como se evalúa a través de tinción con rojo sirio (figuras 10a-c). Los niveles de ARNm de colágeno 1 y 3 analizados a través de RT-PCR en las heridas dérmicas del día 7 mostraron que Ccl2 condujo a una reducción de estos mensajeros. En cambio, Ccl2 en heridas de ratonas vírgenes indujo un aumento de la fibrosis dérmica (figuras 10d-f), así como un aumento en los niveles de ARNm de colágeno 1 y 3. Estos resultados muestran claramente que bajas dosis fisiológicas de Ccl2 inyectadas en las heridas no inducen el reclutamiento de monomacrófagos adultos con fibrosis, sino más bien la infiltración de FMPC.

En resumen, los presentes resultados indican que, en ausencia de cualquier deficiencia en el eje CCR2/CCL2, CCL2 administrado de manera temprana, a bajas dosis, en las heridas puede mejorar la angiogénesis a través de la movilización de una determinada población de células fetales CD34+CD11b+CD31+ (FMPC). En las manos de los presentes inventores, estas células (o células fetales) expresan CCR2 en su superficie con niveles 100 veces mayores que sus equivalentes adultos.

El presente resultado concuerda con (a) la ausencia de un aumento de macrófagos F480 en diversos puntos de tiempo en ratonas posparto tratadas con CCL2, y la ausencia del efecto profibrótico notificado con CCL2 alto, (b) estudios previos que no muestran ninguna mejora de una reparación normal de heridas cutáneas cuando se inyectan altas dosis de CCL2 en ratonas vírgenes (Dipietro *et al.*, Wound Repair and Regeneration, 2001).

Referencias

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente divulgación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agonista de CCR2 para su uso en el tratamiento de una lesión tisular en una hembra que está preñada o que ha estado preñada al menos una vez que lo necesita, en el que la lesión tisular se selecciona del grupo que consiste en lesión cutánea, lesión hepática, lesión cardíaca, lesión pulmonar, lesión neurológica, lesión ocular, lesión estomacal, lesión pancreática, lesión esplénica, lesión intestinal, lesión tiroidea, lesión timpica, lesión renal, lesión ósea, lesión de la médula ósea, lesión muscular, lesión de tendones, lesión de ligamentos, lesión de los órganos reproductores o lesión de las glándulas endocrinas y en el que el agonista de CCR2 es un polipéptido de CCL2 que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:3.
- 10 2. Agonista de CCR2 para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la lesión tisular es una úlcera diabética del pie resultante de diabetes.
- 15 3. Agonista de CCR2 para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la lesión tisular es una úlcera de la pierna resultante de anemia drepanocítica.
4. Agonista de CCR2 para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la lesión tisular es una úlcera de la pierna resultante de enfermedad microvascular o macrovascular.

20

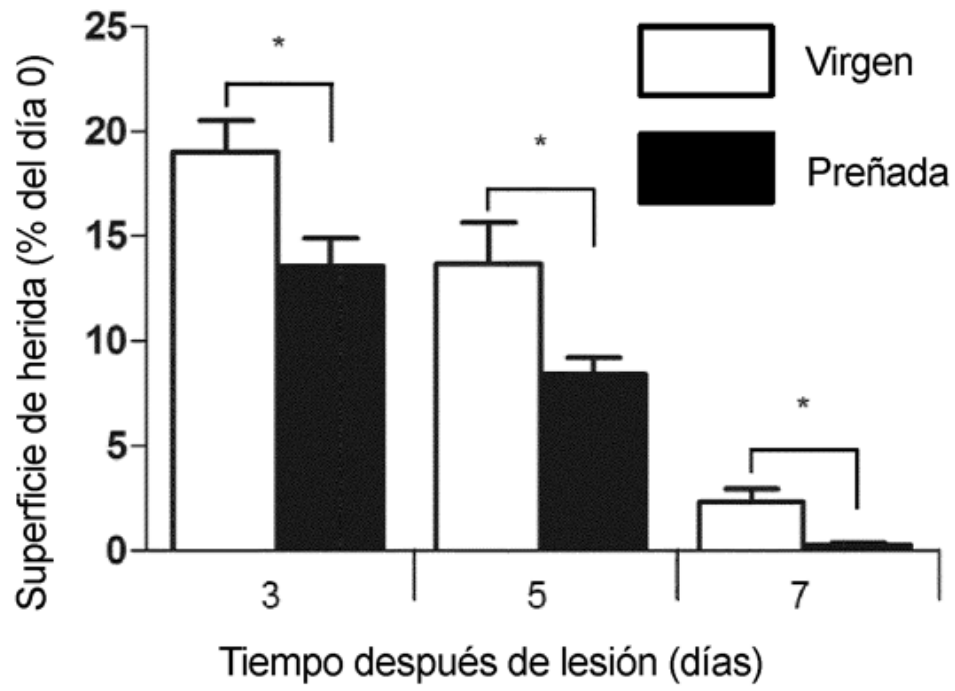


Figura 1A

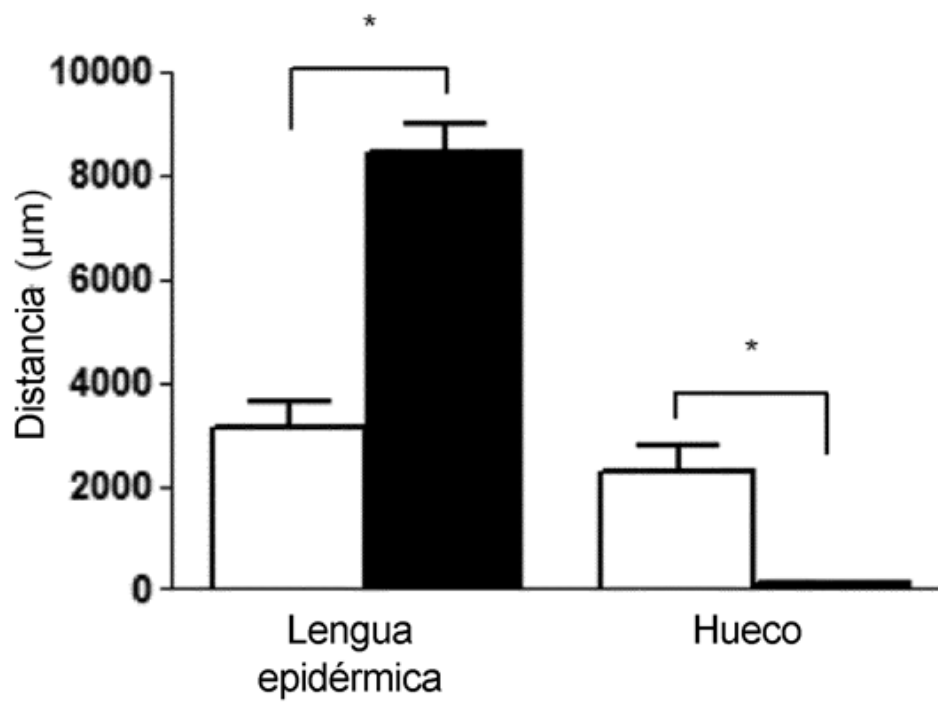


Figura 1B

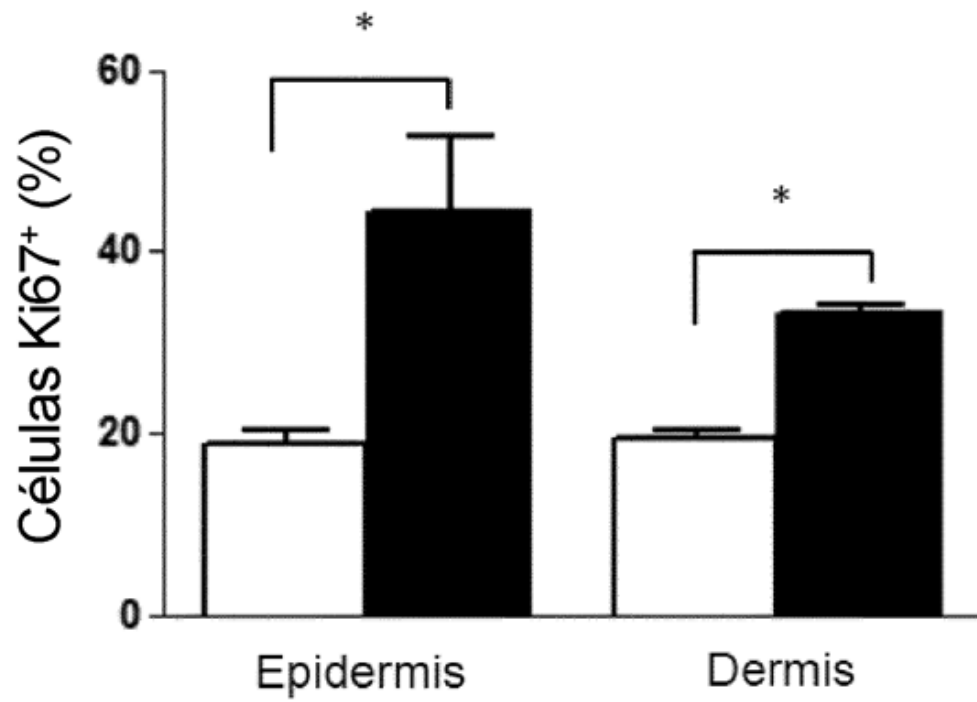


Figura 1C

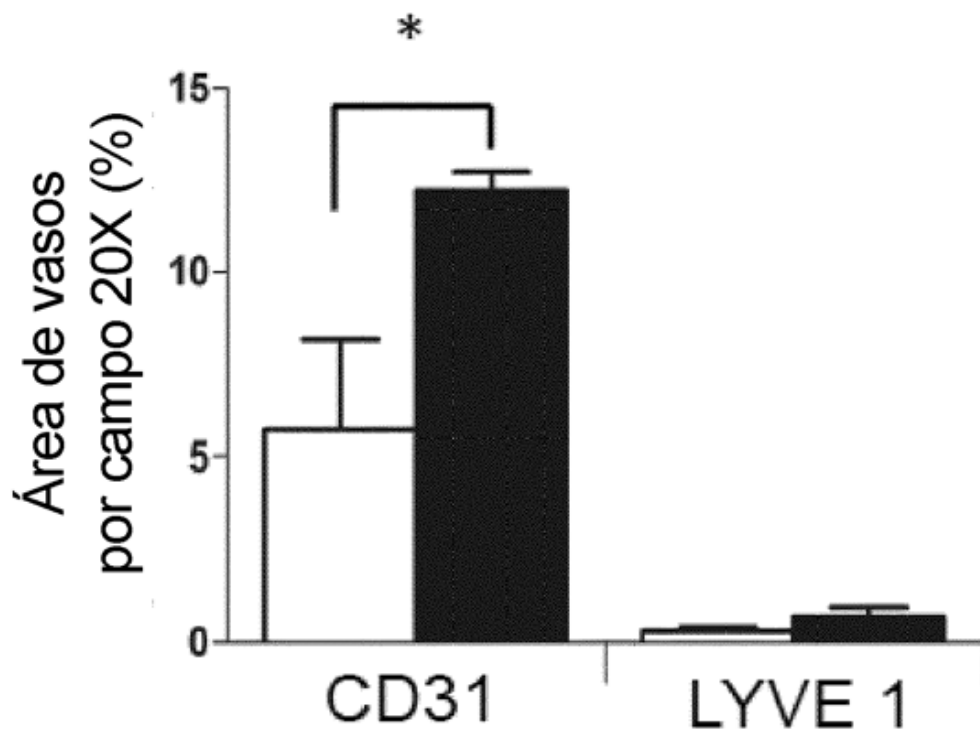


Figura 1D

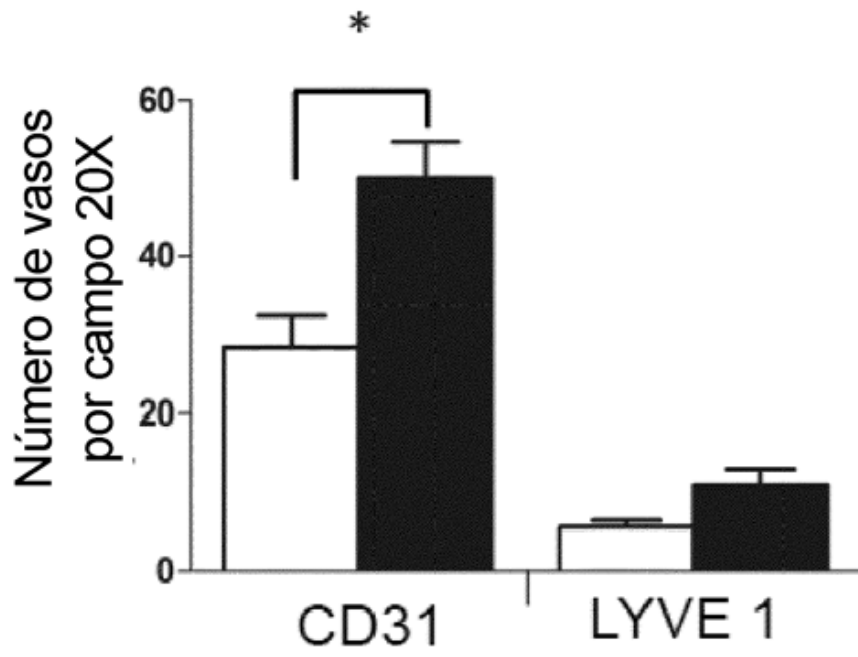


Figura 1E

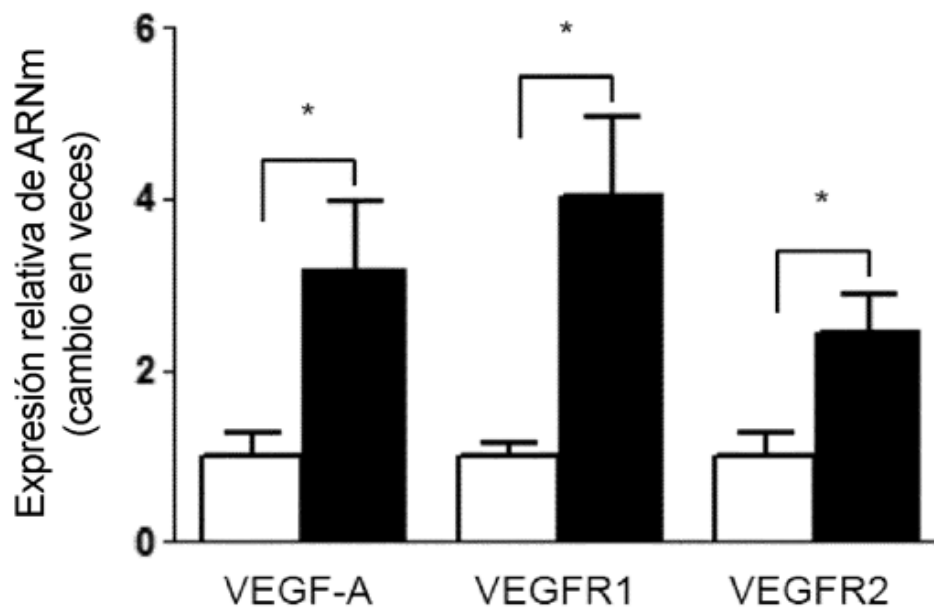


Figura 1F

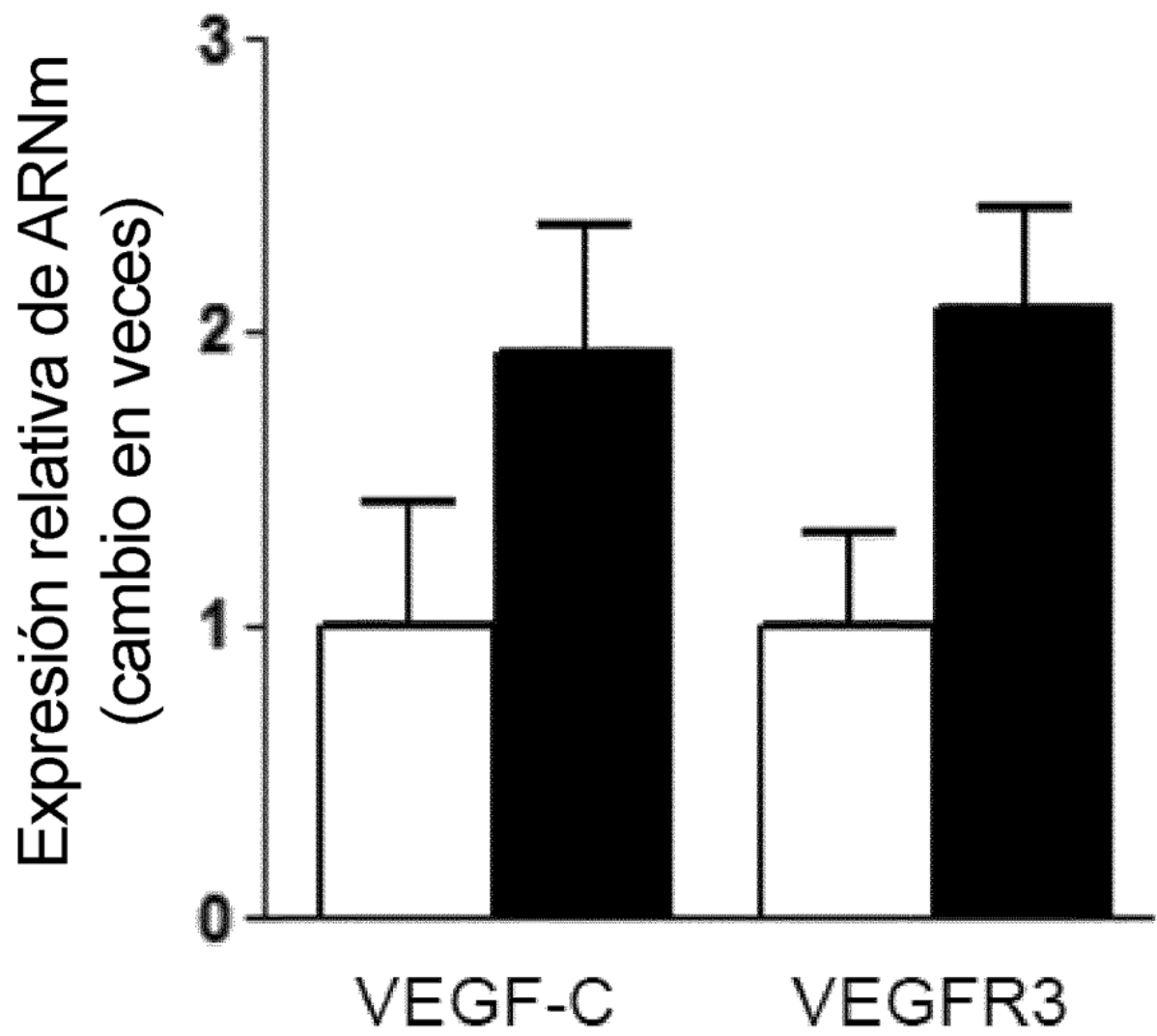


Figura 1G

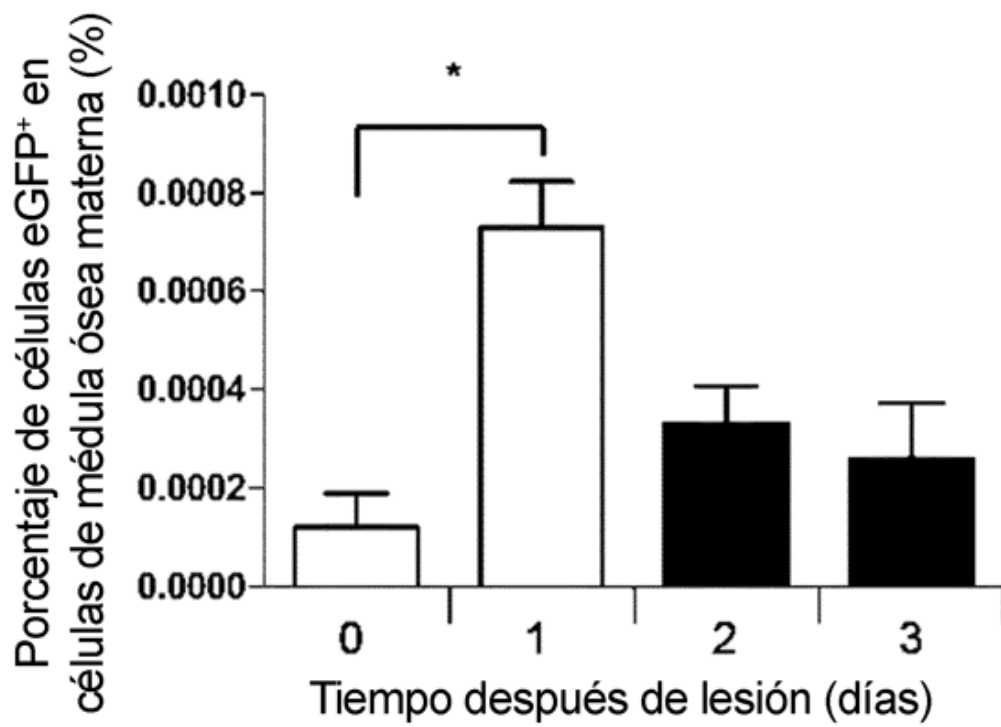


Figura 2A

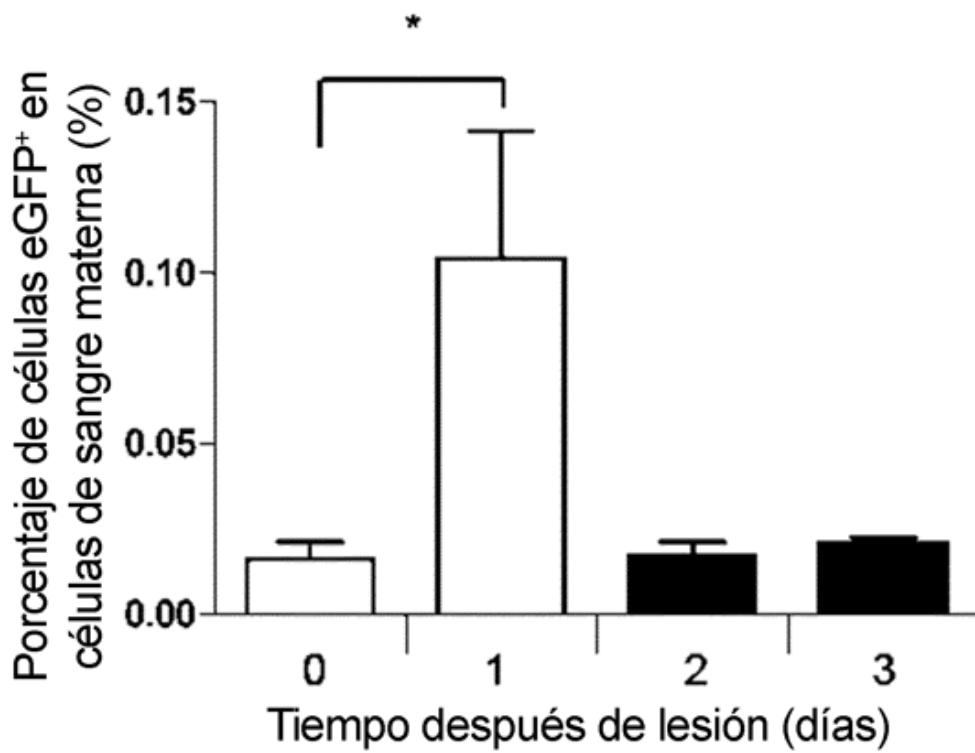


Figura 2B

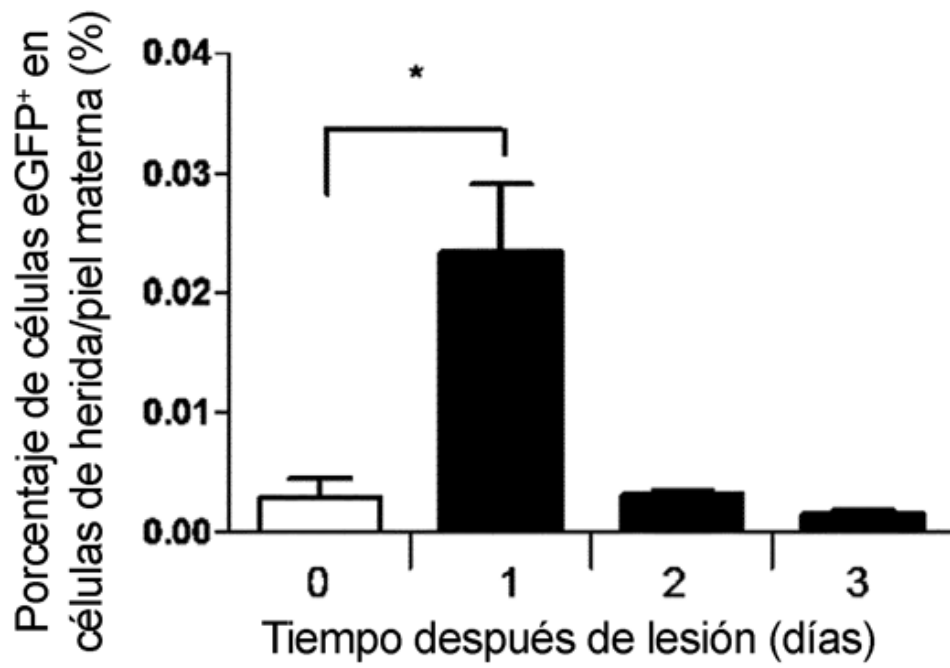


Figura 2C

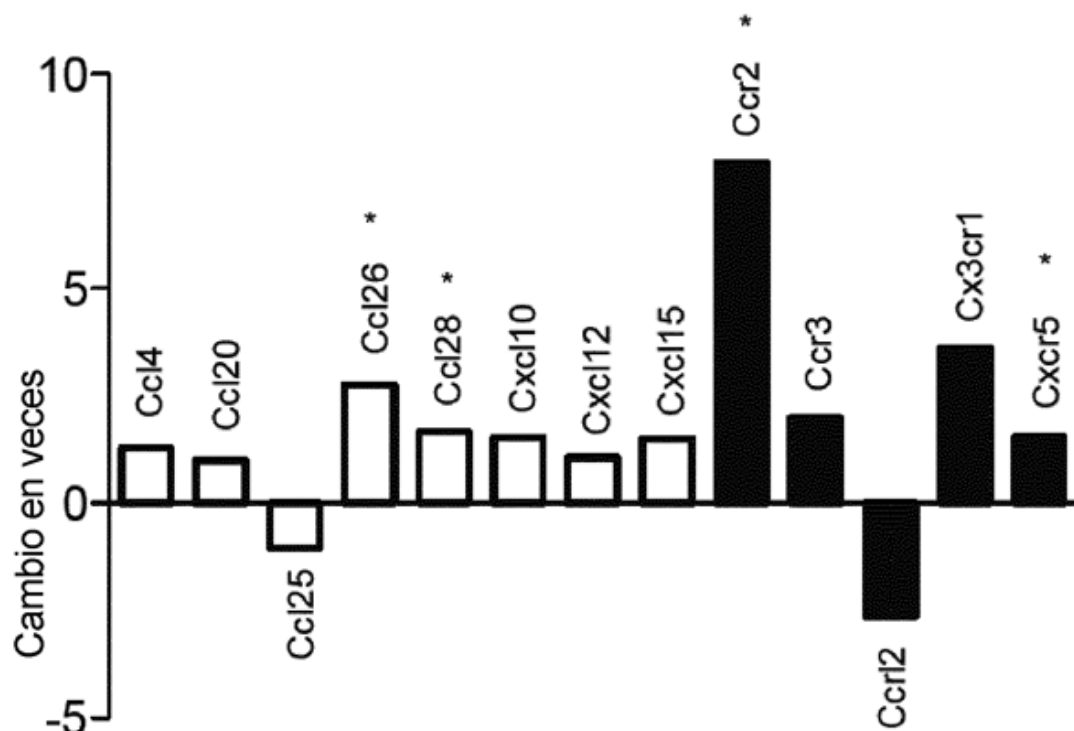


Figura 2D

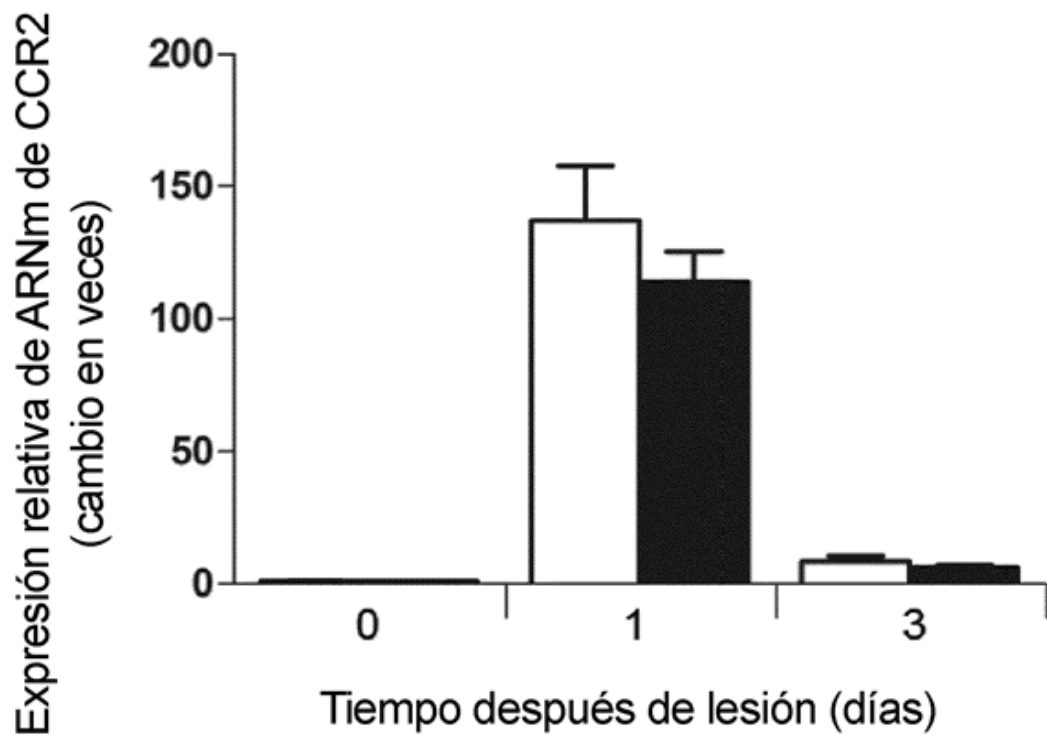


Figura 2E

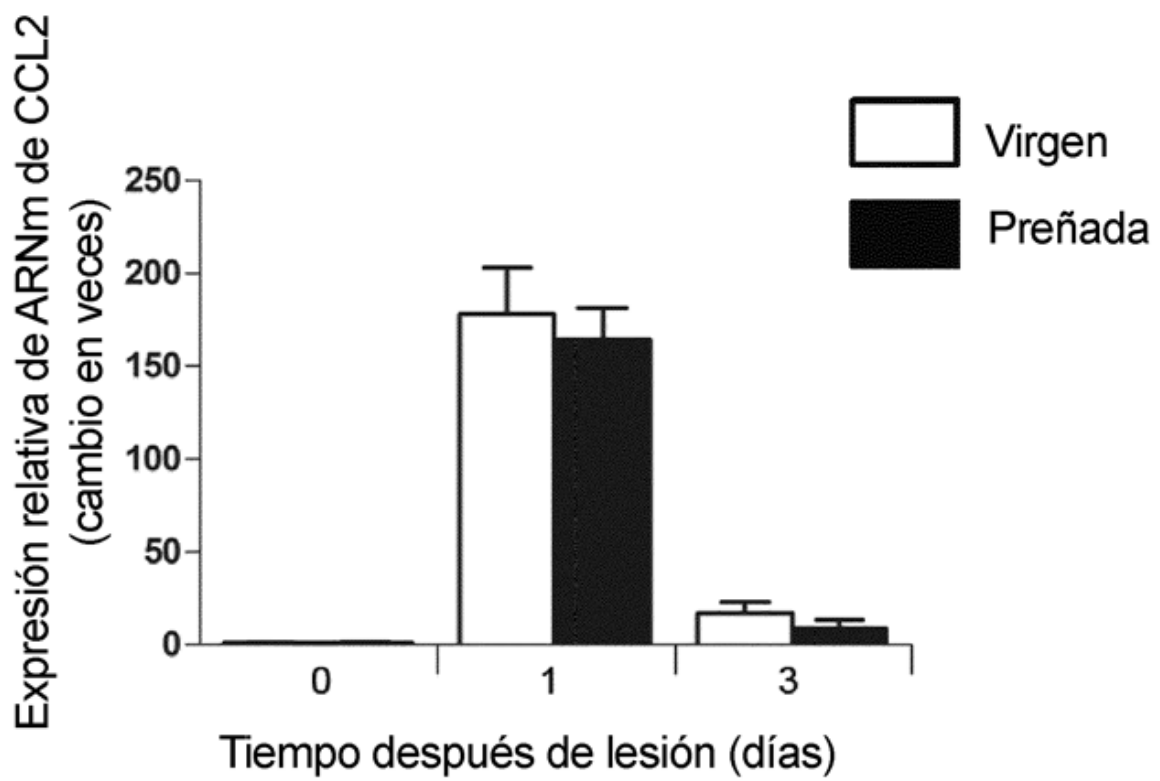


Figura 2F

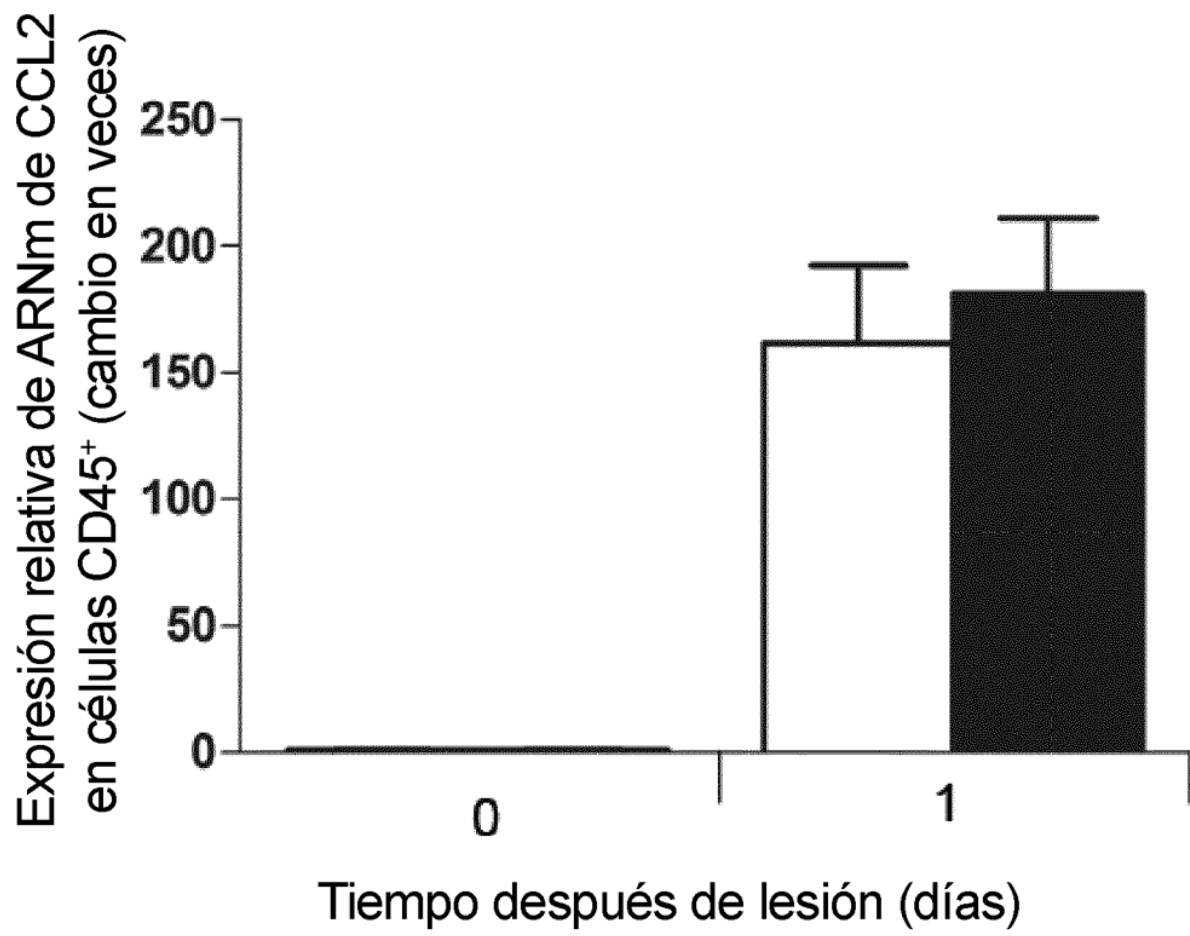


Figura 2G

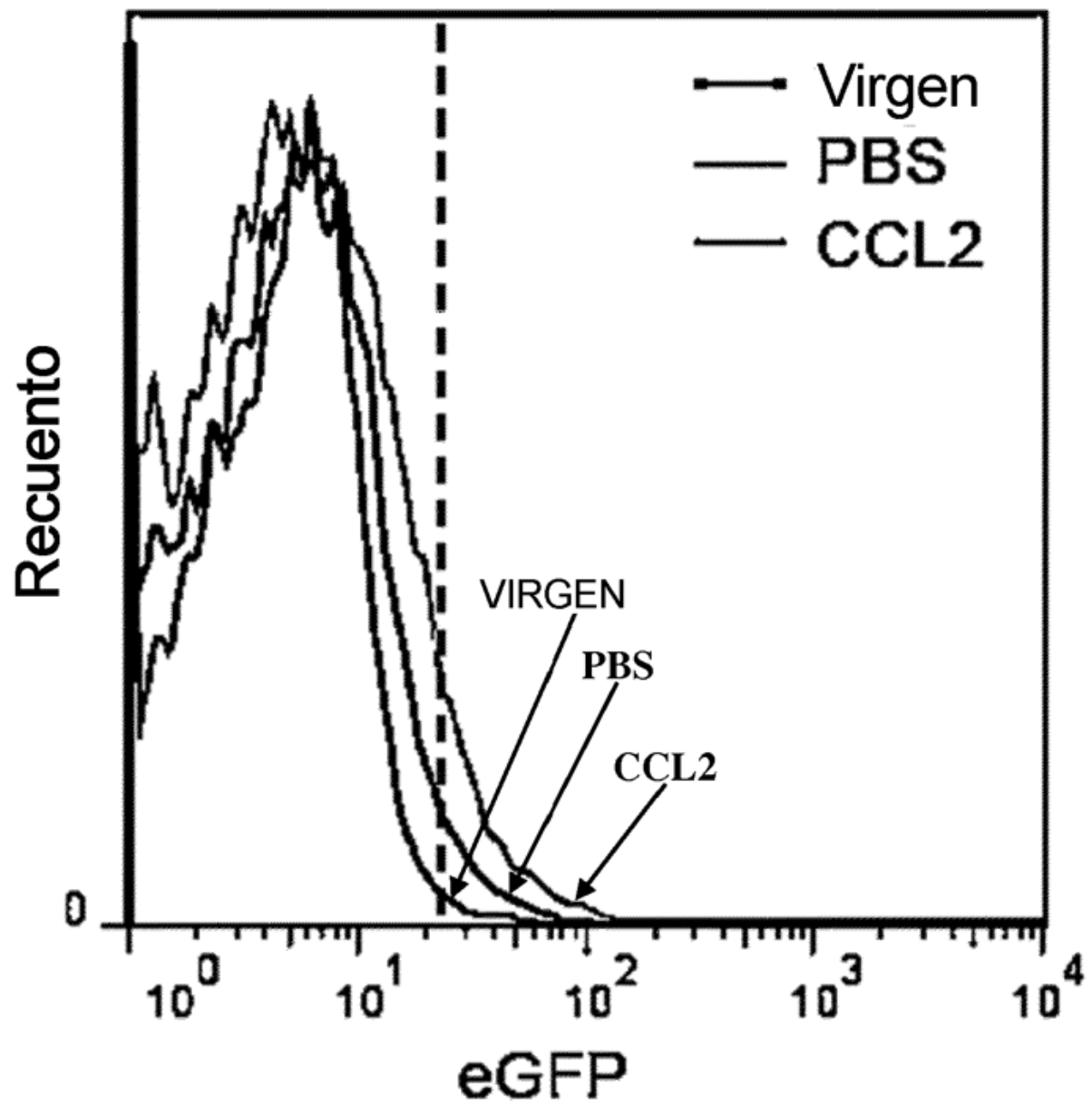


Figura 3A

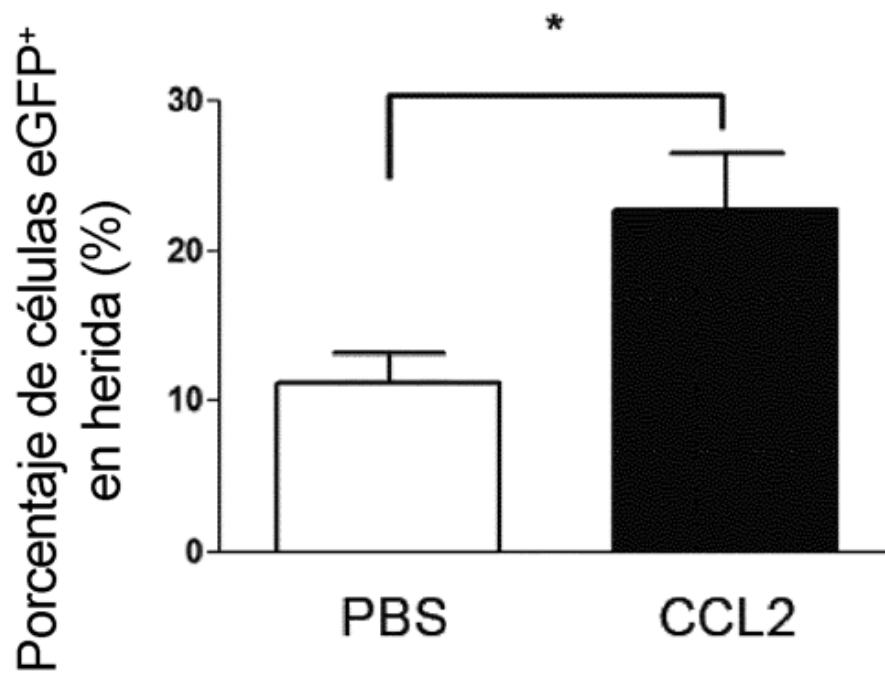


Figura 3B

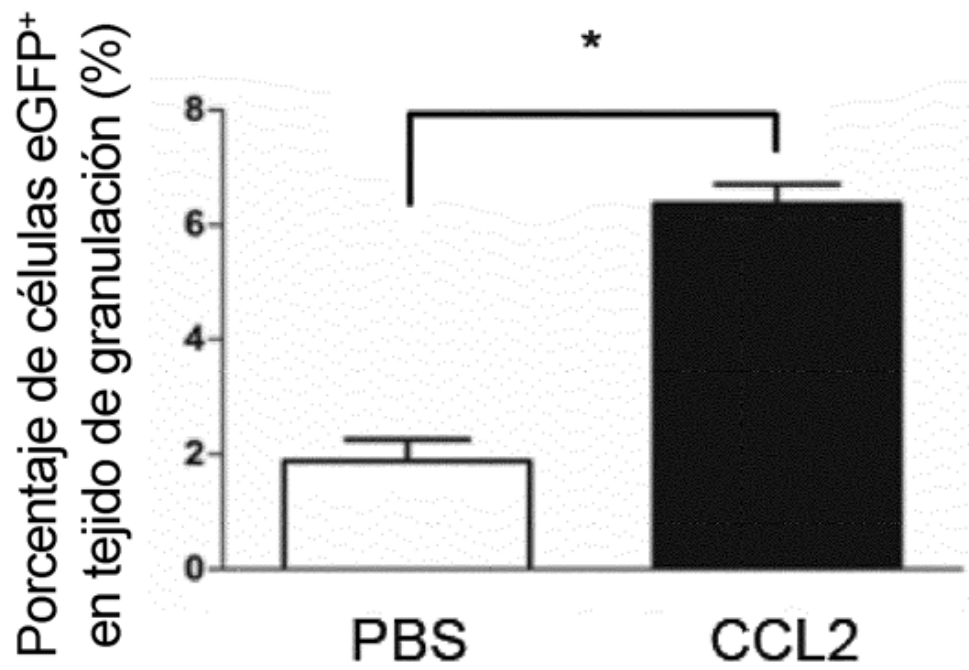


Figura 3C

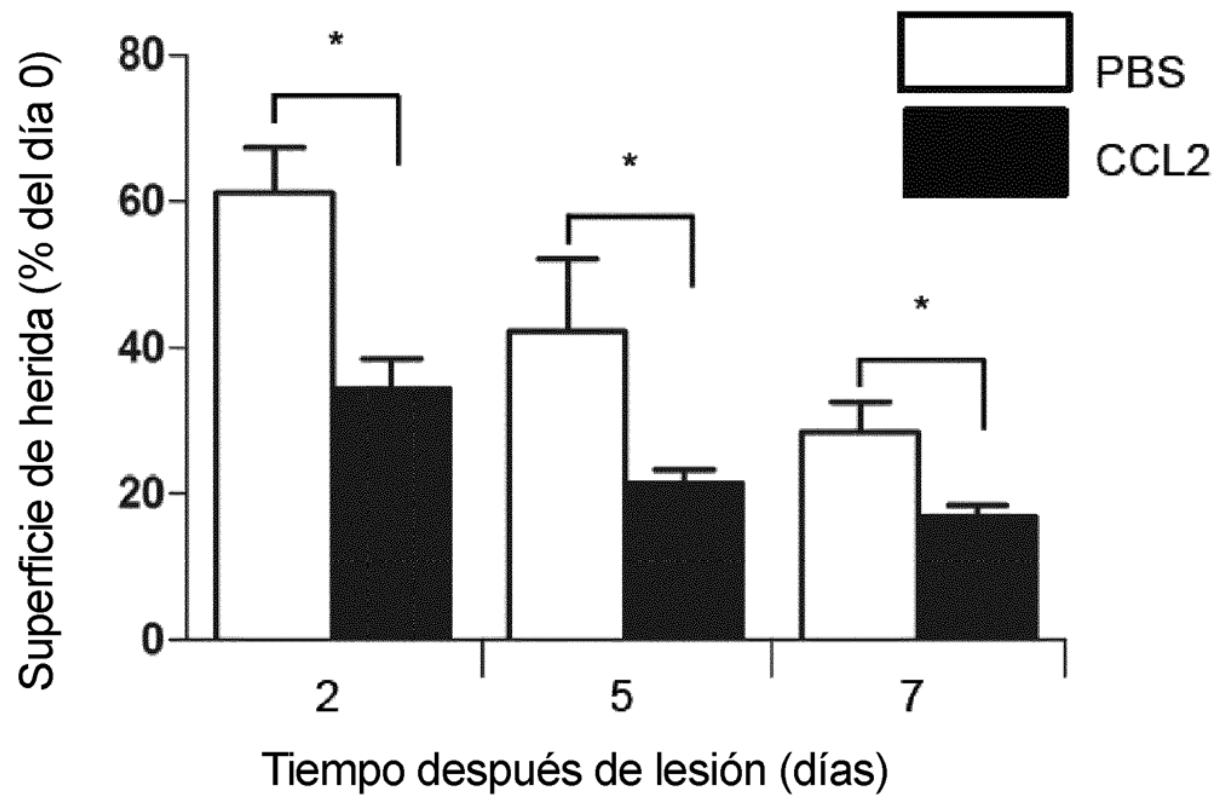


Figura 3D

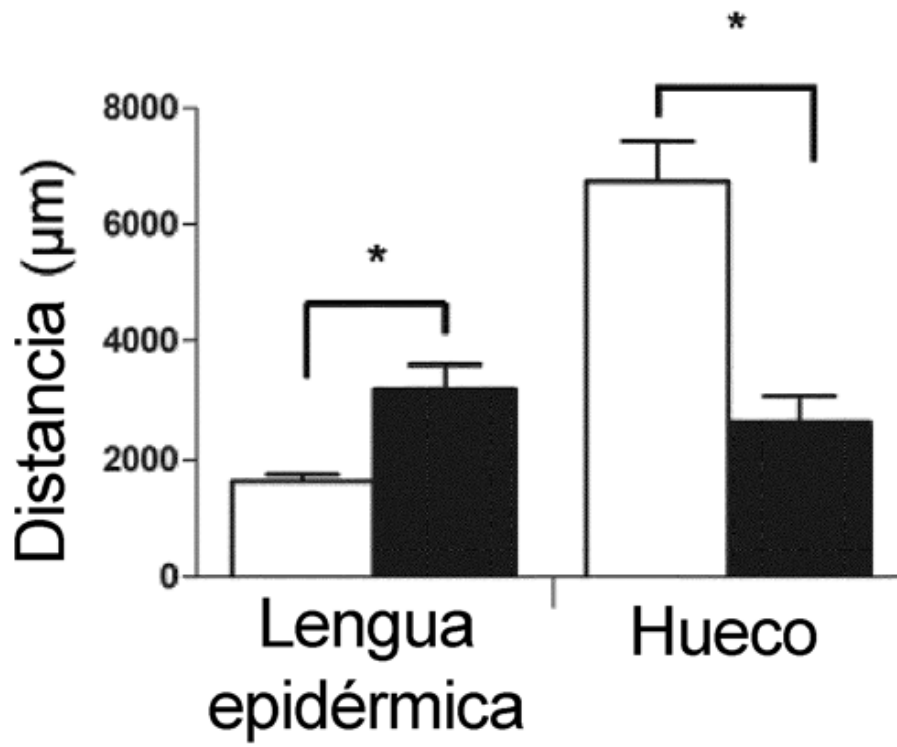


Figura 3E

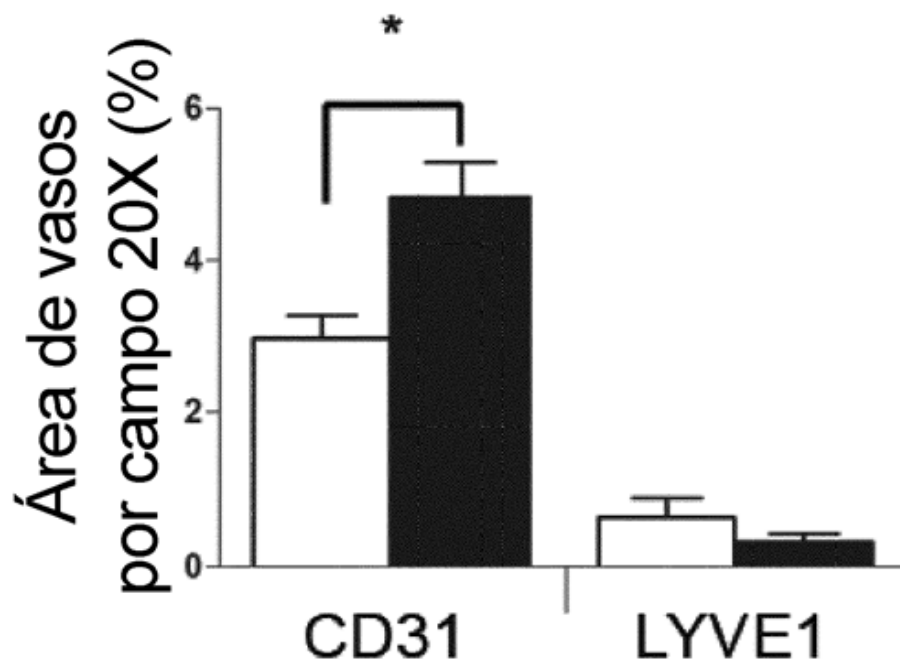


Figura 3F

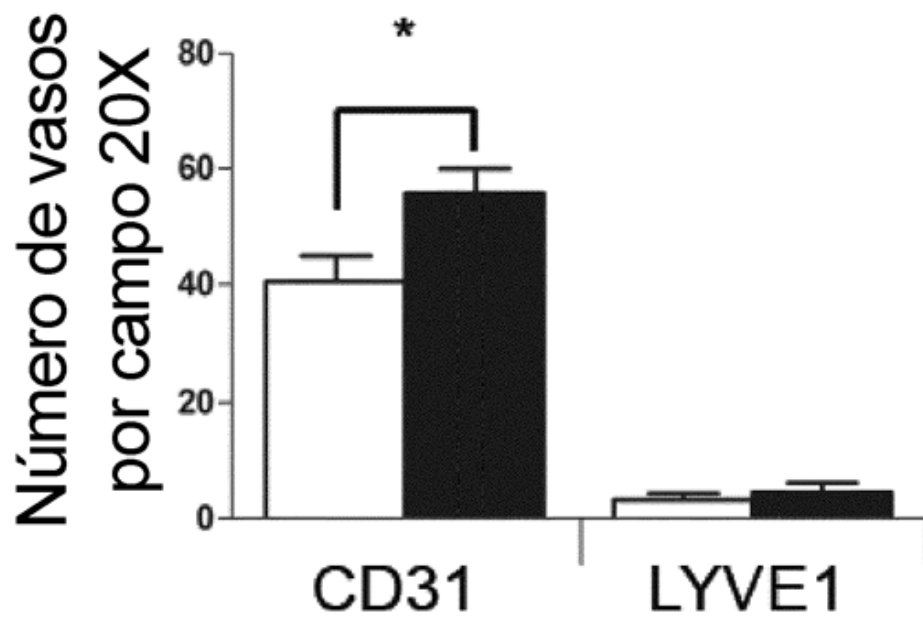


Figura 3G

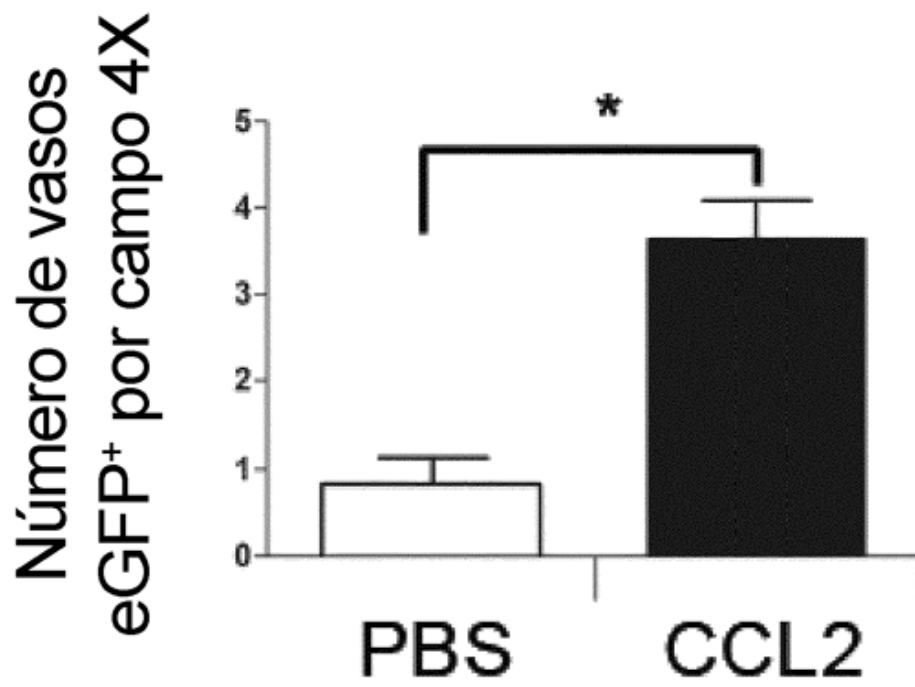


Figura 3H

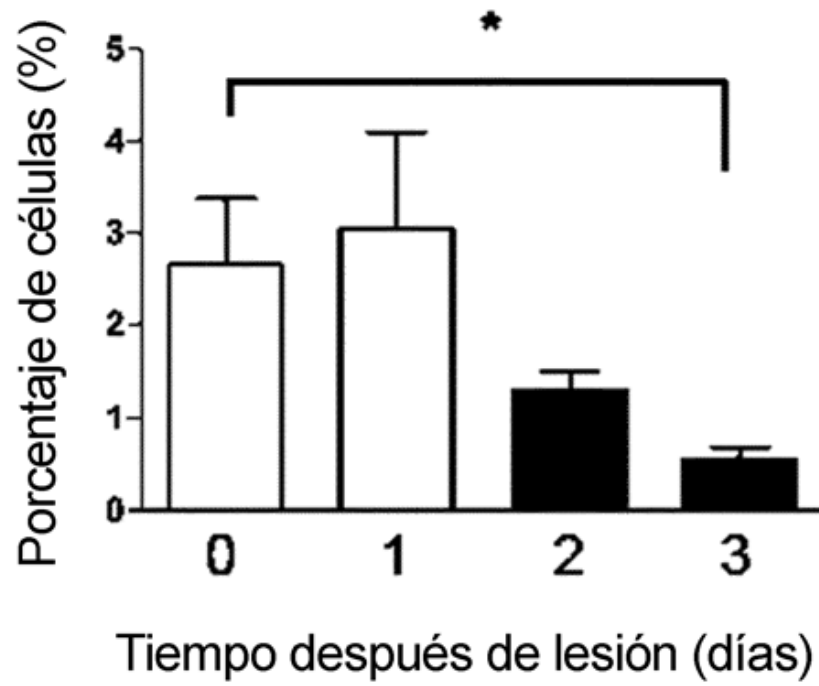


Figura 4A

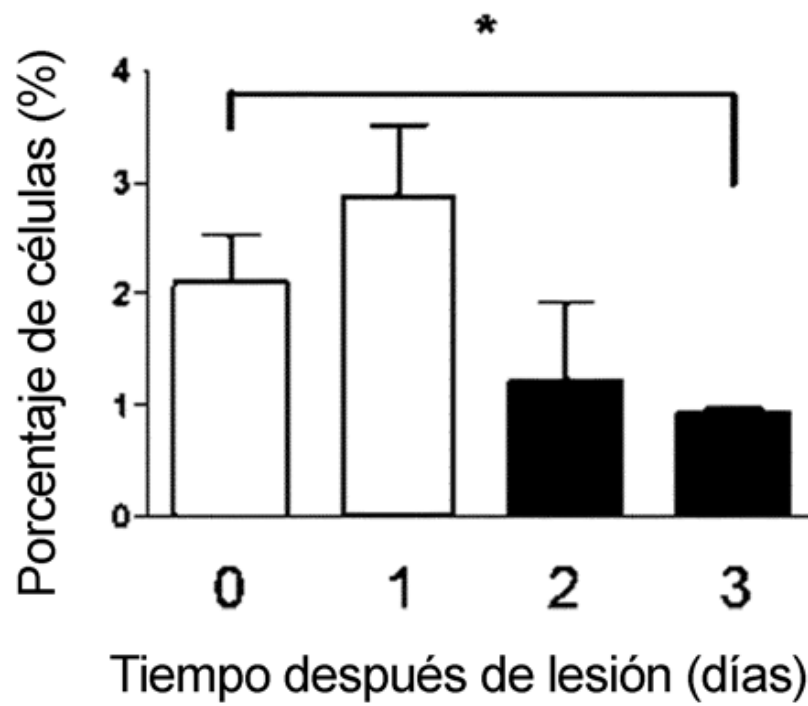


Figura 4B

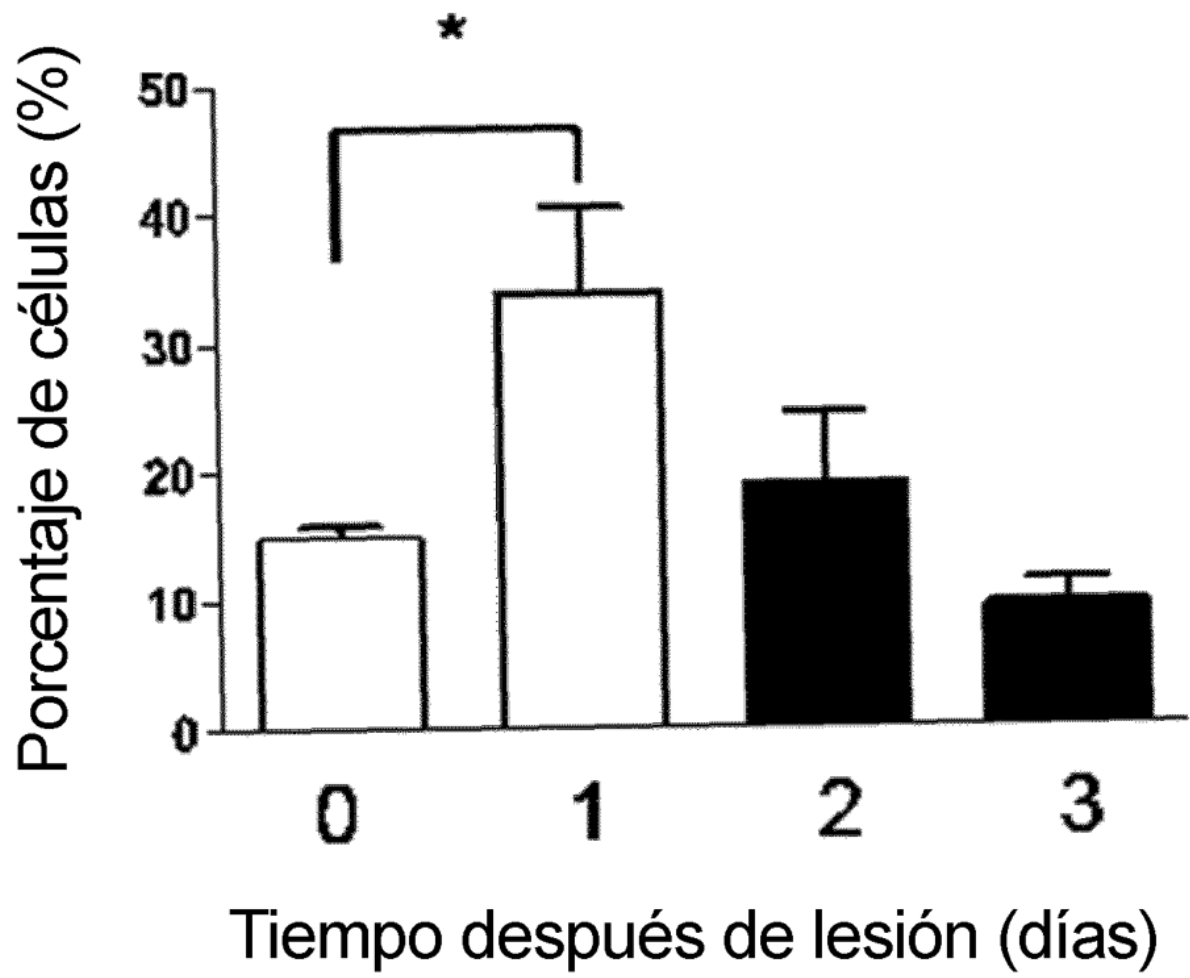


Figura 4C

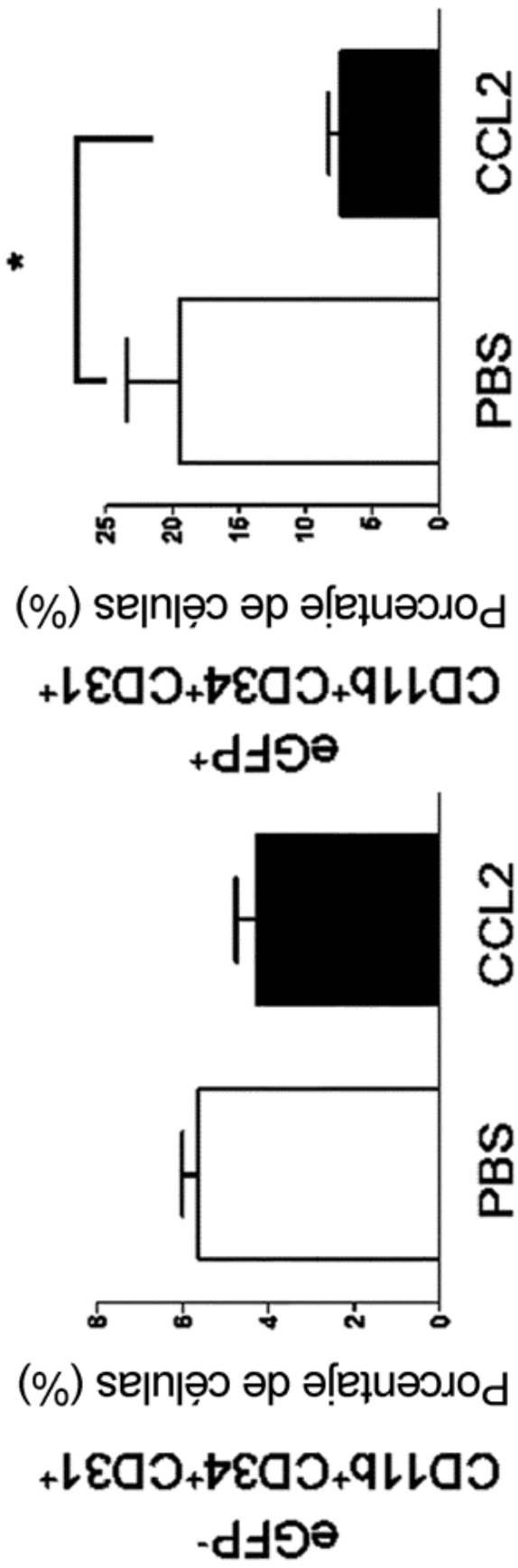


Figura 4D

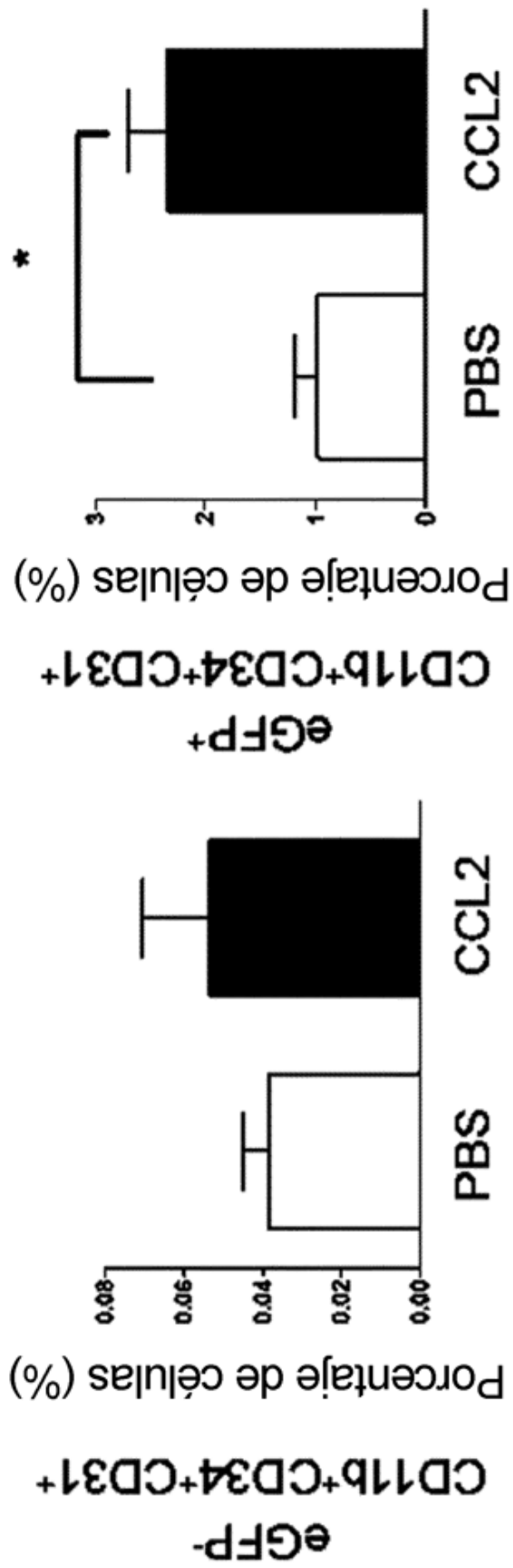


Figura 4E

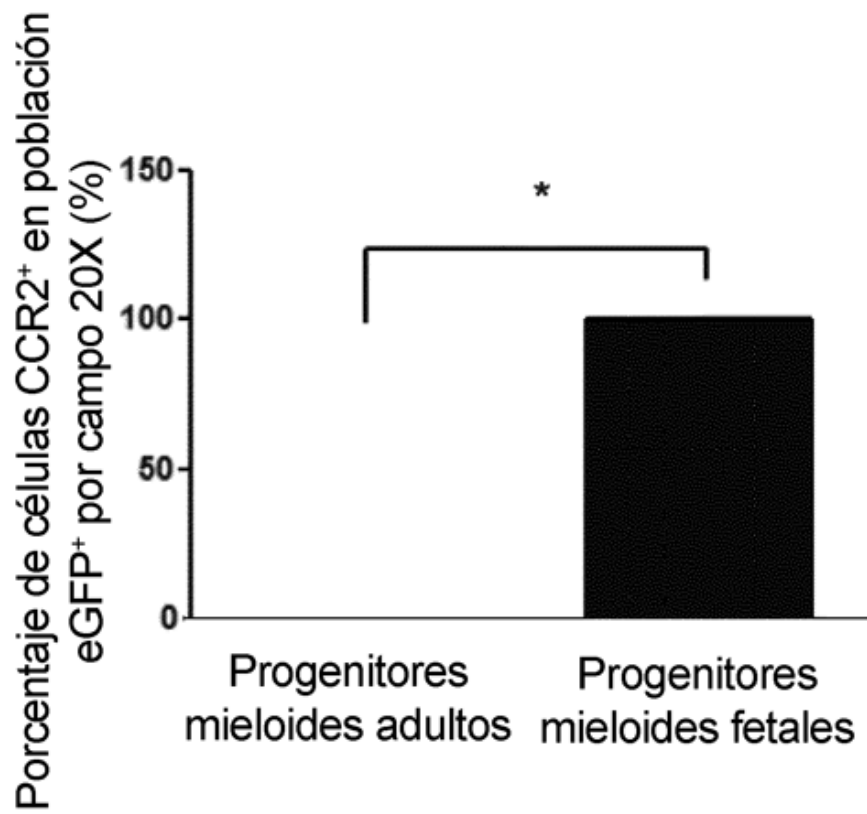


Figura 5A

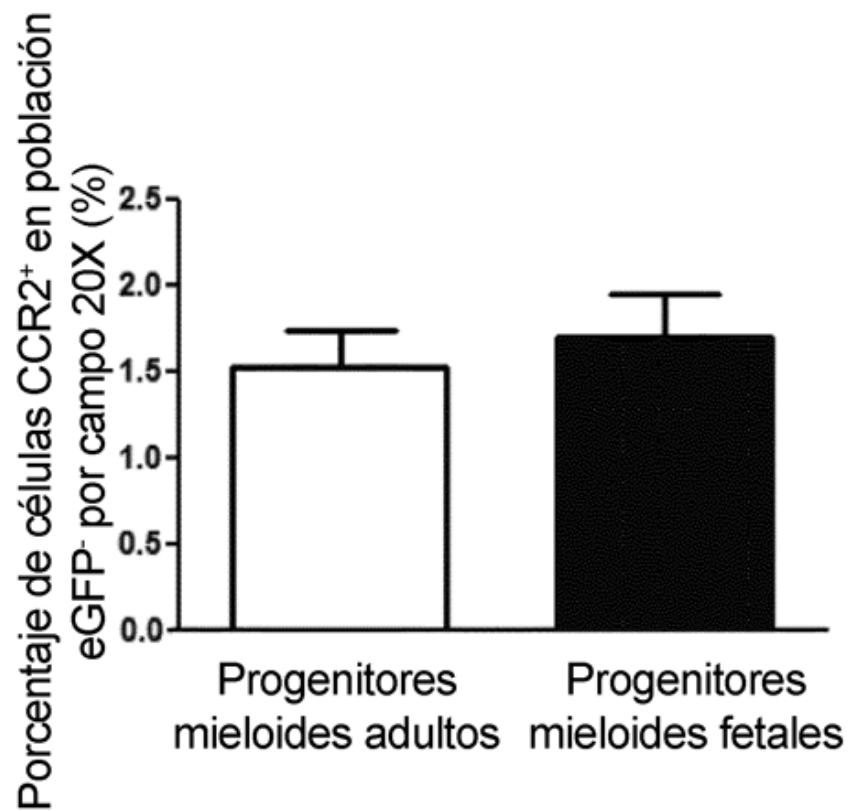


Figura 5B

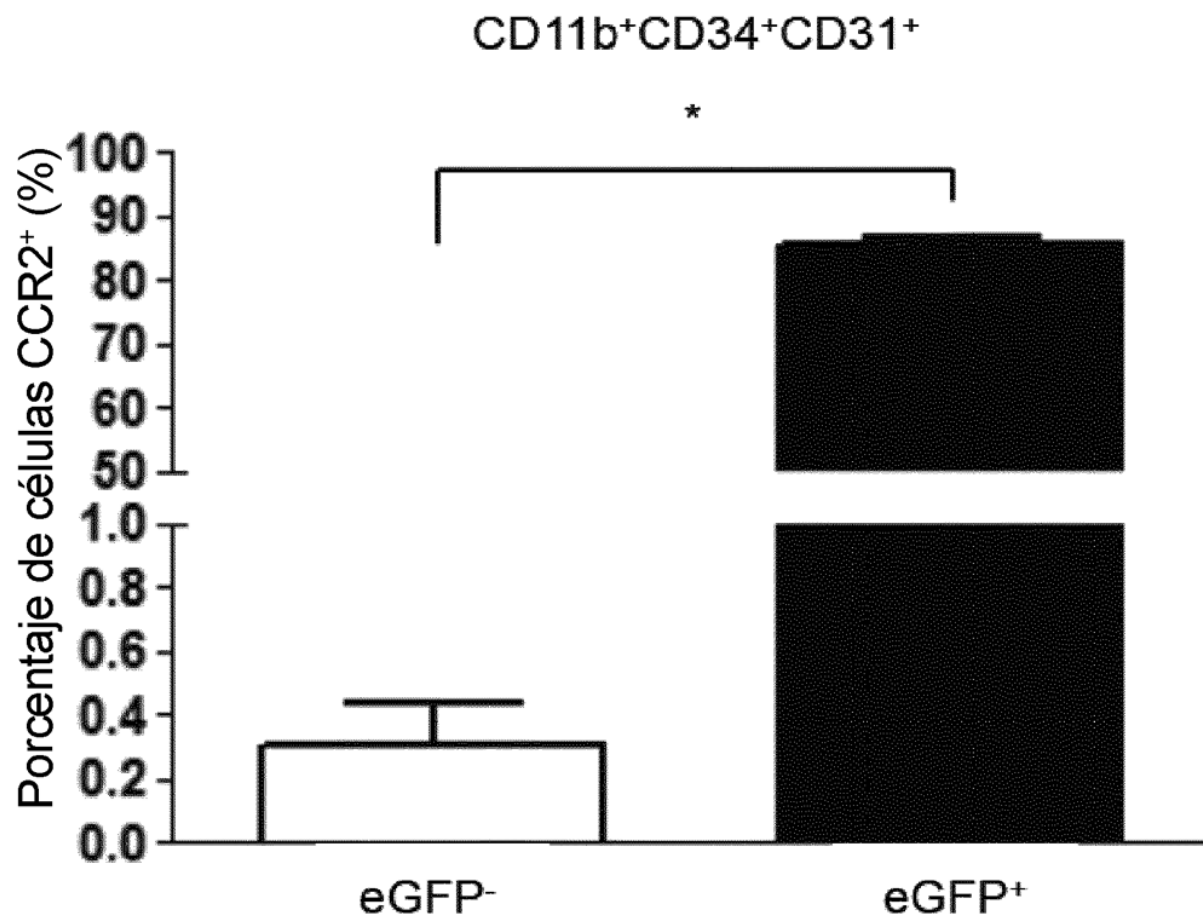


Figura 5C

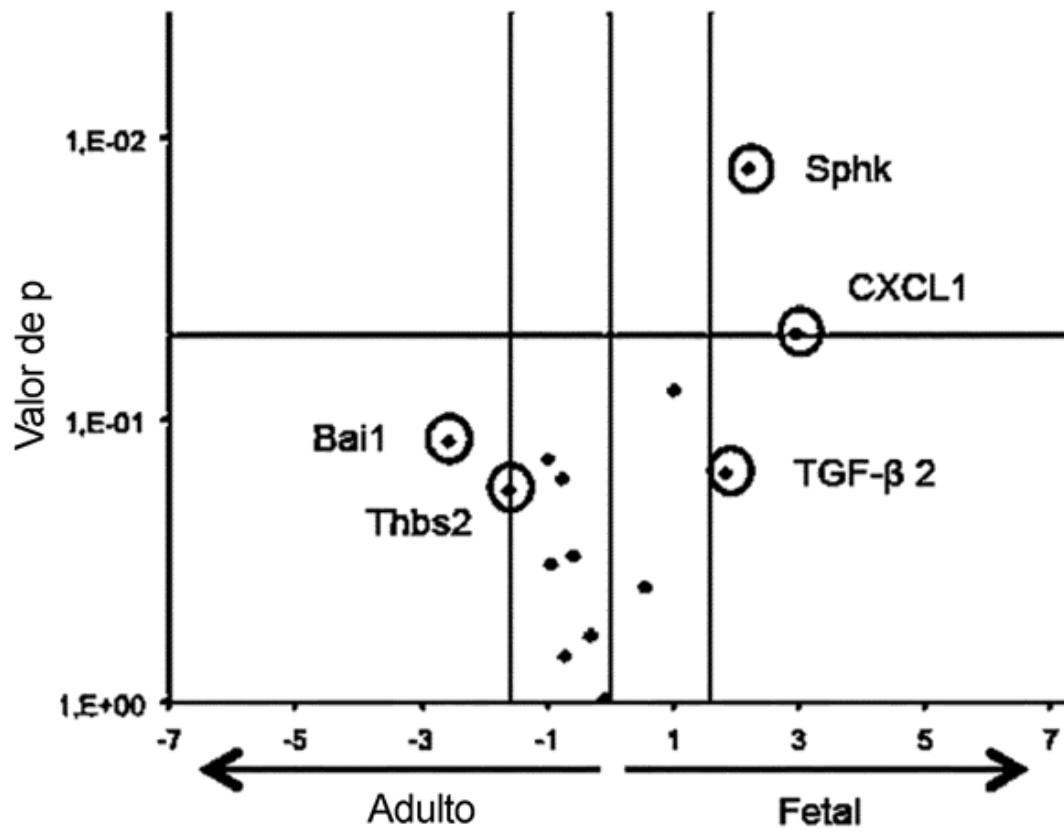


Figura 6A

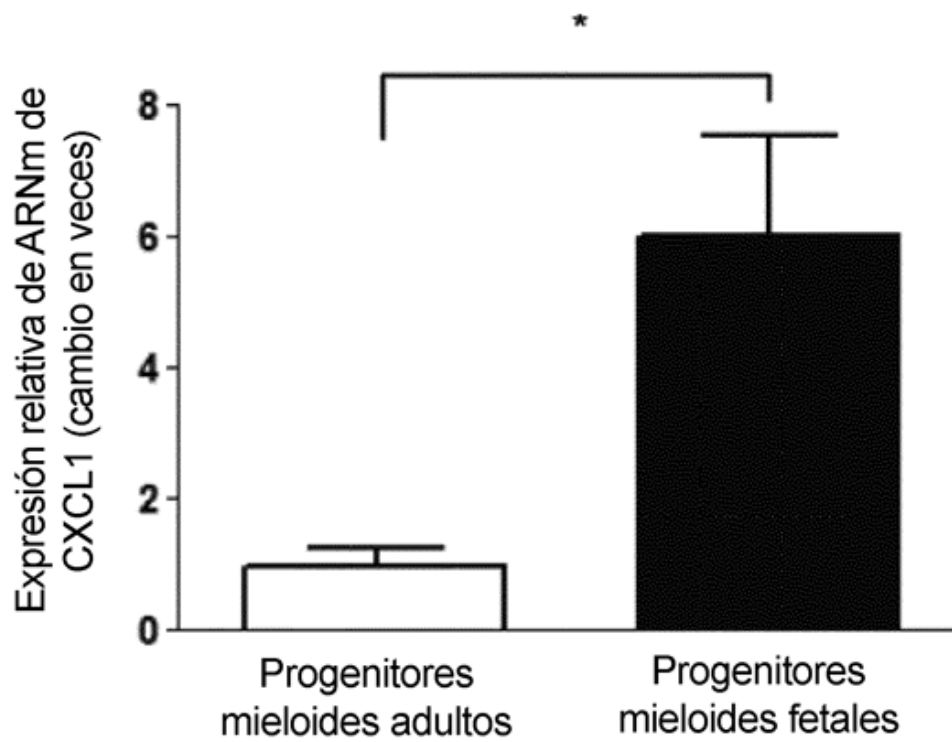


Figura 6B

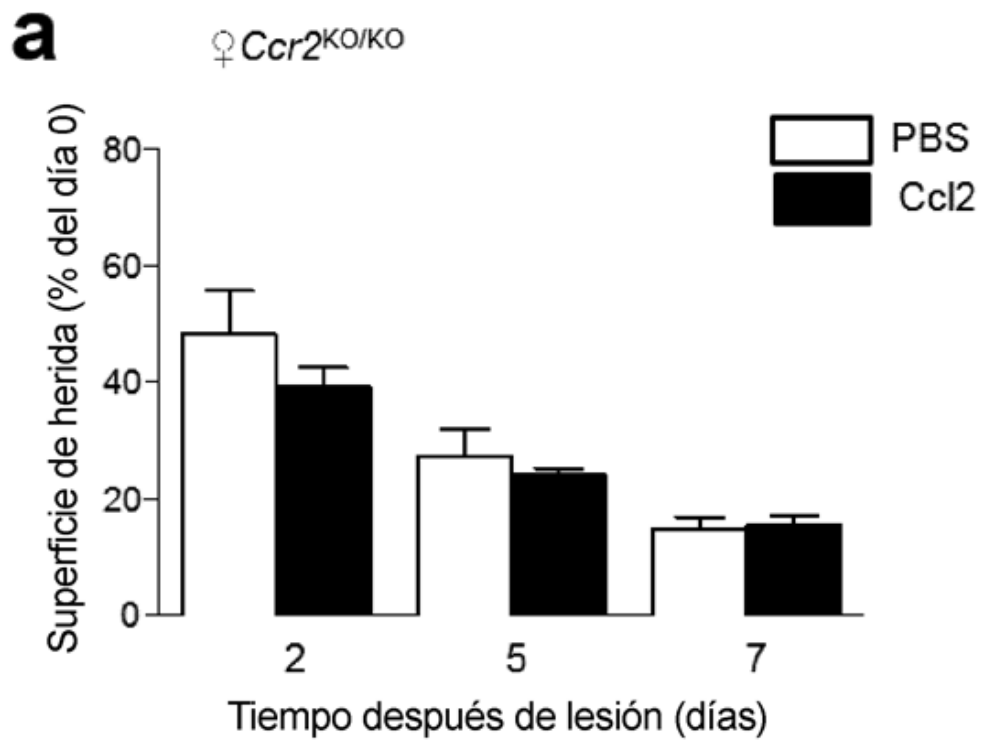


Figura 7A

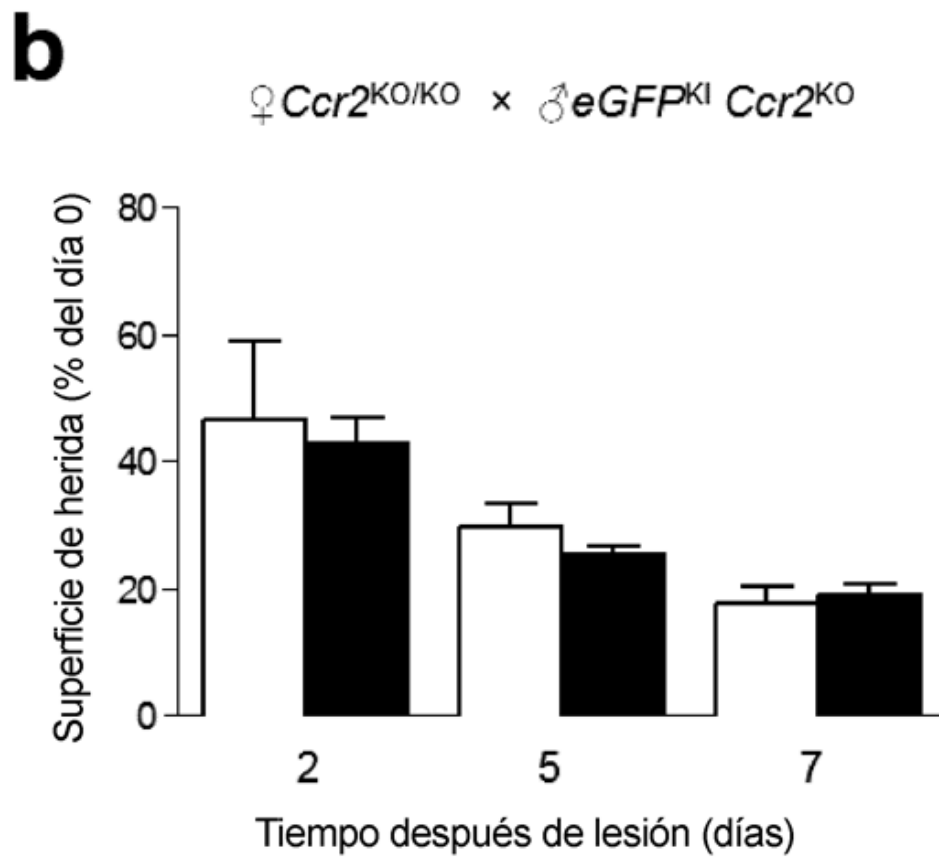


Figura 7B

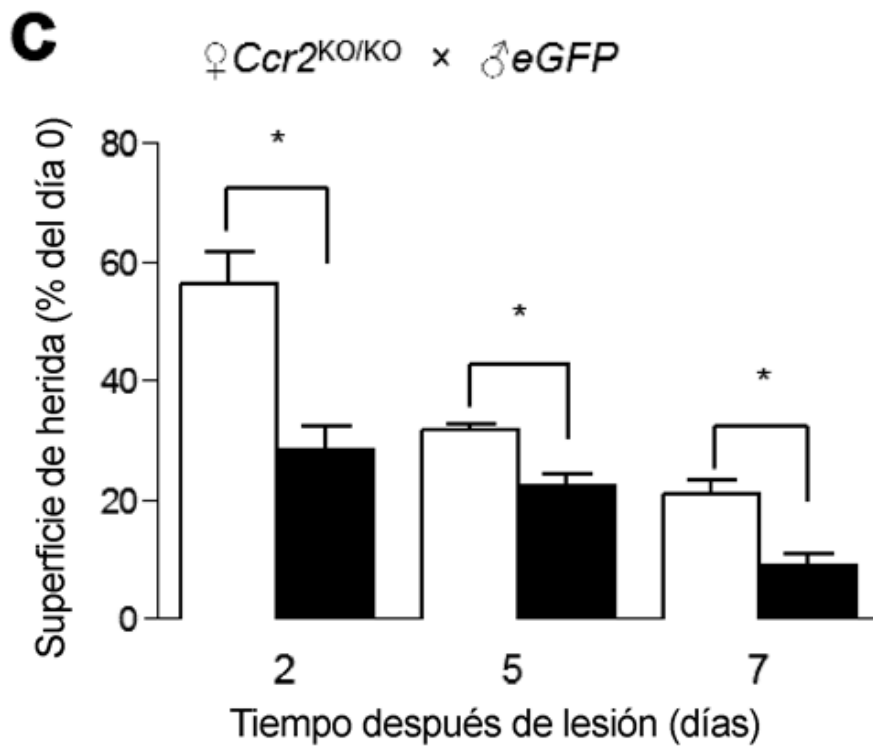


Figura 7C

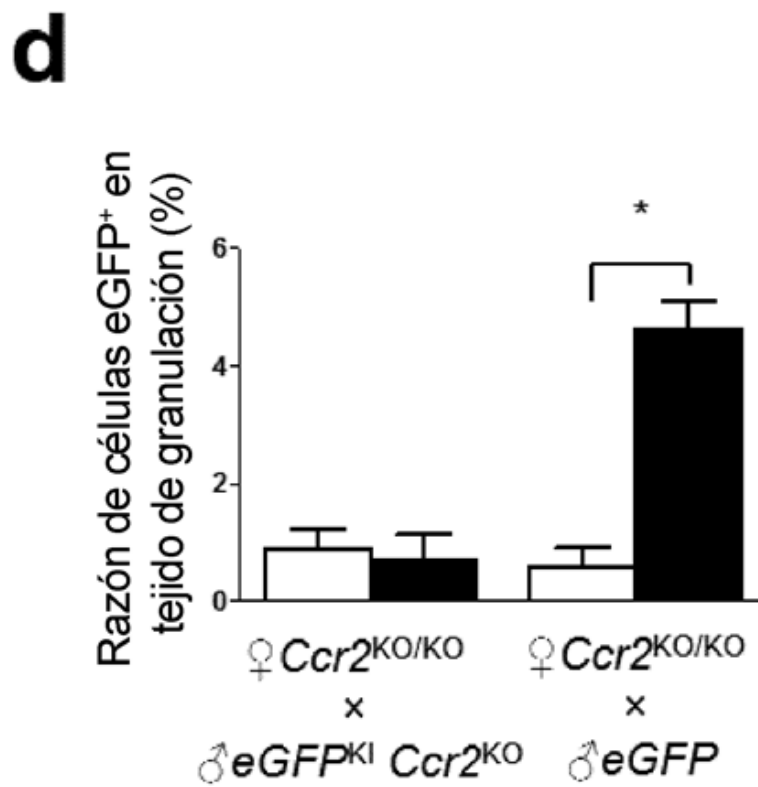


Figura 7D

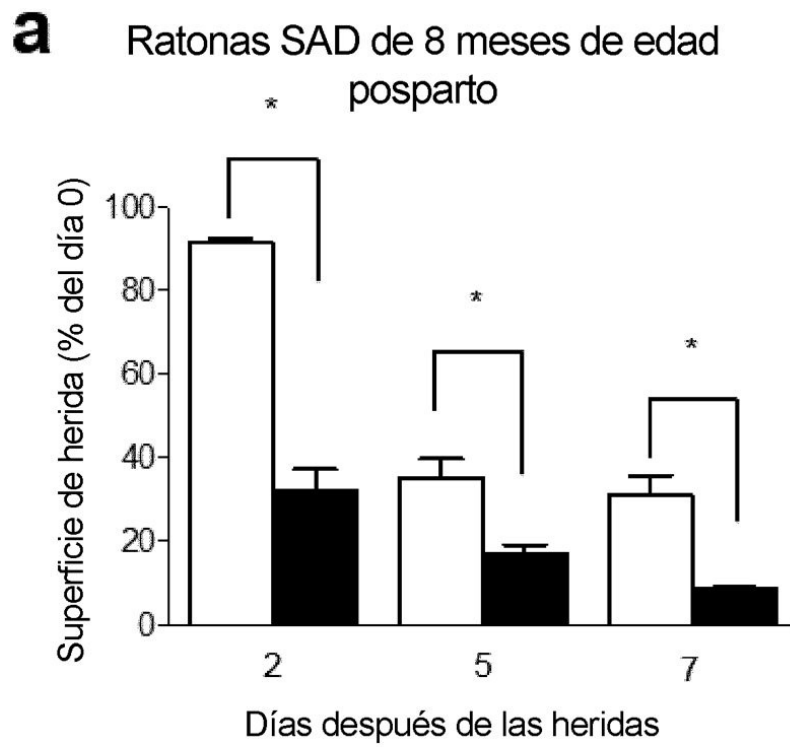


Figura 8A

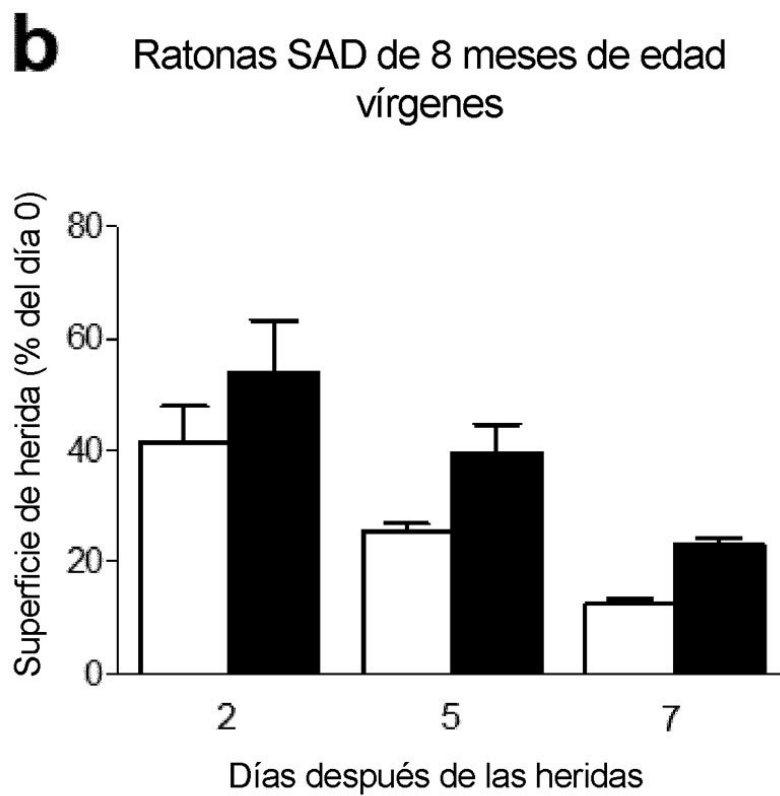


Figura 8B

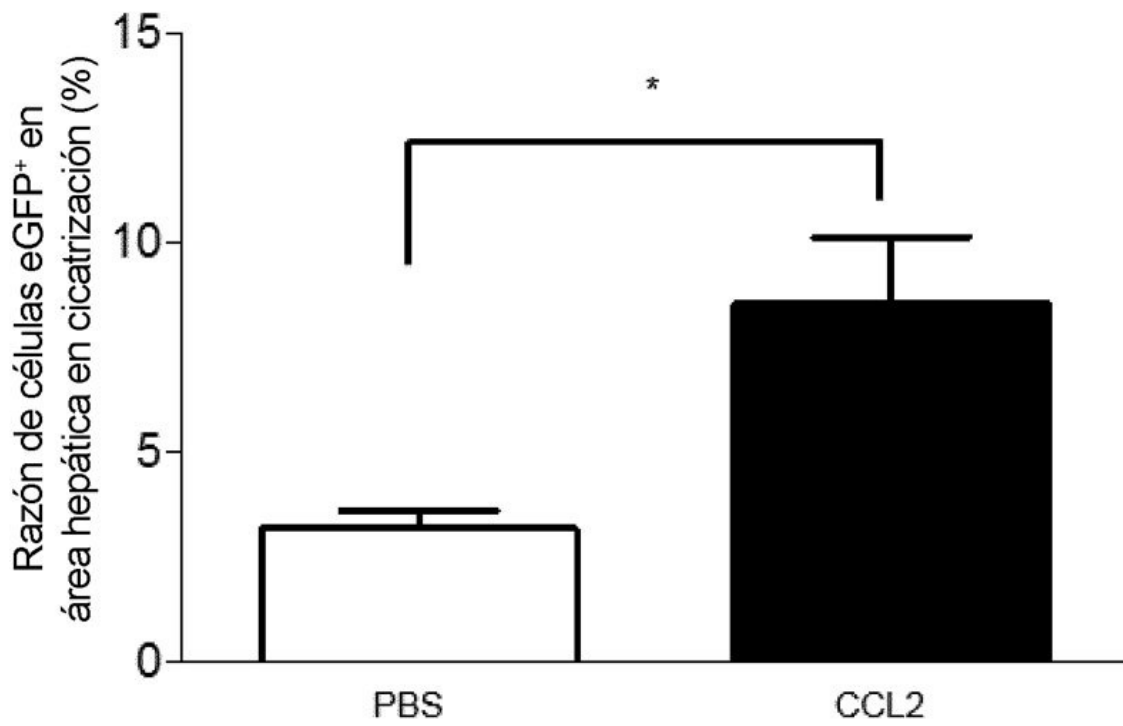


Figura 9

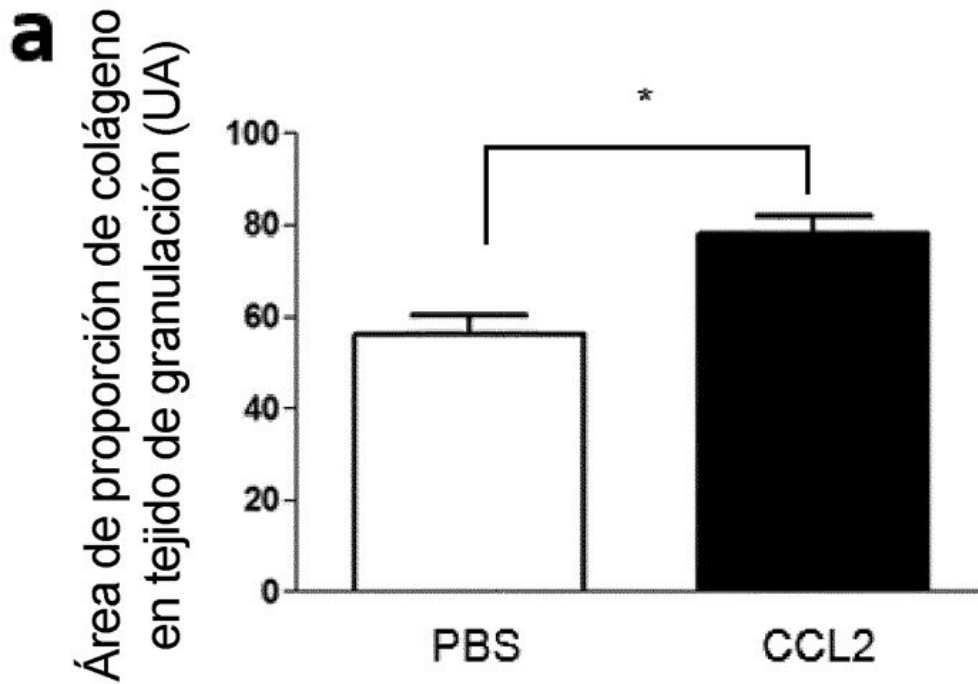


Figura 10A

b

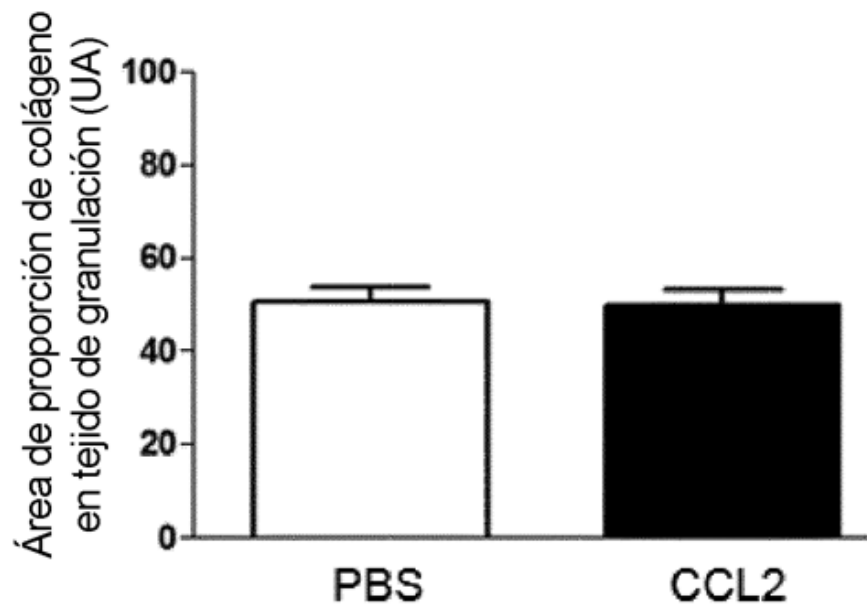


Figura 10B

c

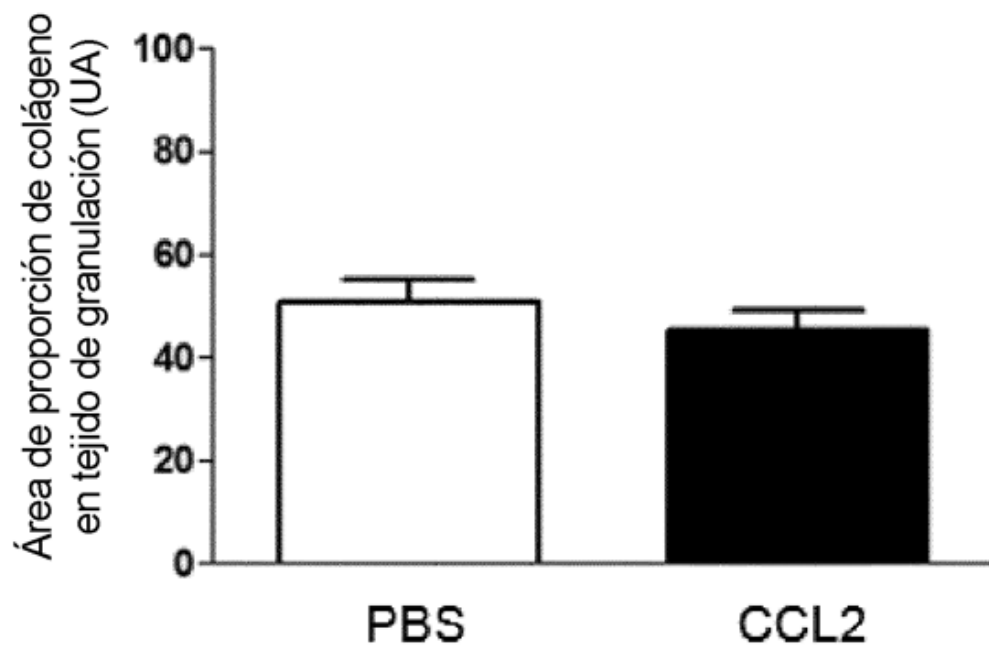
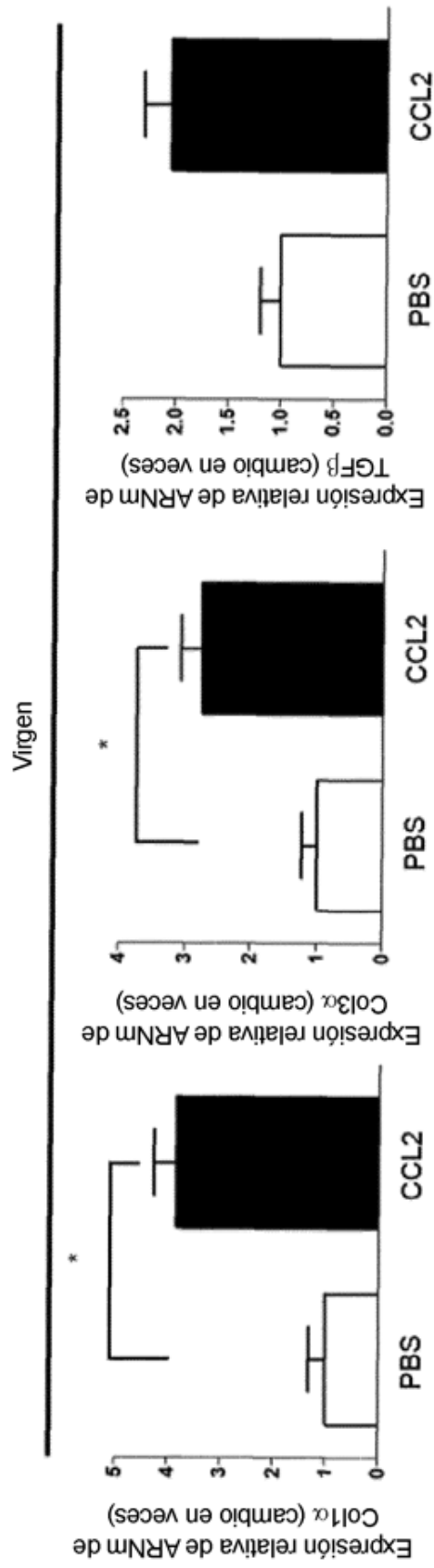


Figura 10C



d

Figura 10D

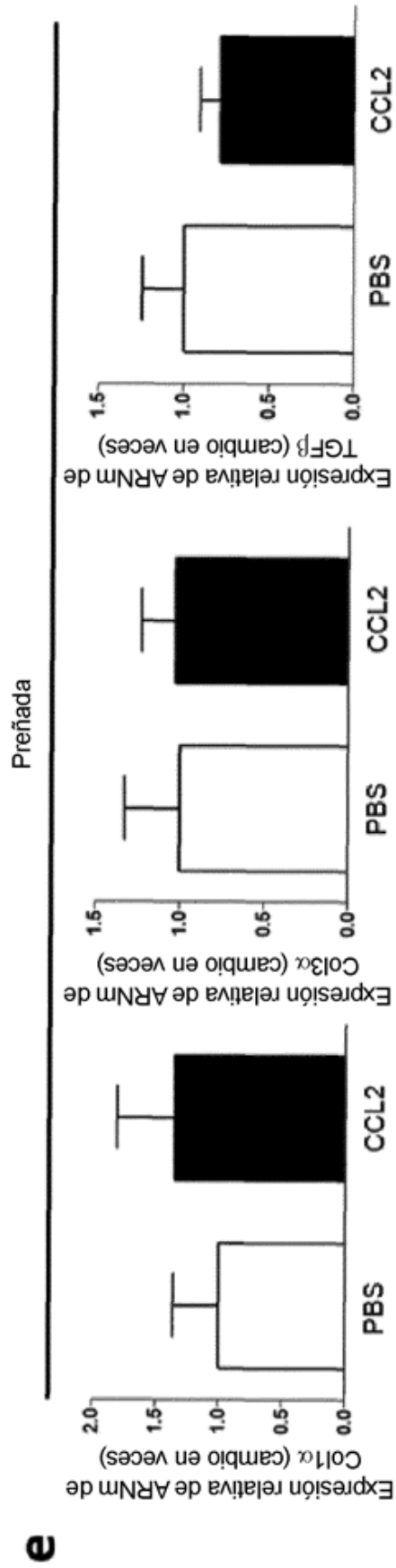


Figura 10E

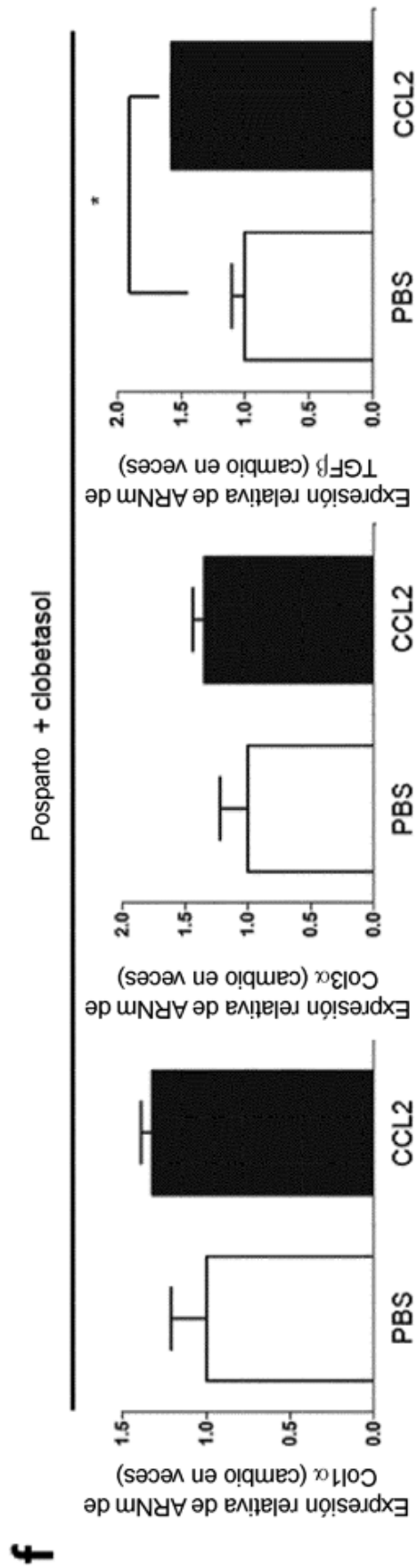


Figura 10F