



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 675**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05815640 .7**
96 Fecha de presentación : **14.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1820023**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **Citoblastos, procedimiento para su purificación, identificación y uso.**

30 Prioridad: **15.11.2004 IT FI04A0238**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2009

73 Titular/es:
Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi
Viale Pieraccini, 17
50139 Firenze, IT

72 Inventor/es: **Romagnani, Paola;**
Annunziato, Francesco;
Maggi, Enrico y
Romagnani, Sergio

74 Agente: **Álvarez López, Fernando**

ES 2 326 675 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Citoblastos, procedimiento para su purificación, identificación y uso.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a nuevas poblaciones de citoblastos, a su purificación y uso para el tratamiento de patologías vasculares y otro tipo de patologías humanas.

10 **Estado de la técnica**

Es ya bien conocido que la sangre periférica adulta contiene células en circulación derivadas de médula ósea capaces de diferenciarse en células endoteliales (CE) maduras, denominadas células endoteliales progenitoras (CEP); estas células son capaces de localizarse en los sitios de isquemia contribuyendo a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Debido a esta propiedad, estas células se han utilizado con éxito para reparar tejidos tanto en modelos animales *in vivo* como en pacientes afectados por infarto de miocardio agudo y cardiopatía isquémica crónica.

Por otro lado, también es bien conocido que la infusión postisquémica de células endoteliales maduras diferenciadas en grado terminal no da lugar a un aumento de la vascularización, por tanto, está claro que estas células pierden su potencia de diferenciación posterior.

Es bien conocido que pueden obtenerse CEP a partir de células CD133⁺, a partir de células CD34⁺CD14⁻ y a partir de células CD14⁺CD34⁻, incluso aunque sigue sin estar claro si estas últimas están realmente provistas de capacidad blástica. Además, el número real de progenitores endoteliales en sangre periférica y en médula ósea sigue siendo una cuestión de discusión. Las células CD14/CD34 doble positivas son conocidas en la técnica previa (Ferrero y col. 1998).

En este campo existe un interés claro en estudios profundos, a la vista de la posible importancia de estas células para la reconstrucción de tejidos dañados por isquemia y acontecimientos patológicos o traumáticos.

También es bien conocido que recientemente se ha descrito un gen, denominado NANOG, que tiene una función importante en la renovación y mantenimiento de la pluripotencia de citoblastos embrionarios. La expresión de NANOG no se ha estudiado aún en citoblastos adultos.

35 **Descripción de las figuras**

la fig. 1 muestra la expresión diferencial de NANOG en células adultas provistas de capacidad blástica y en células de otros tejidos.

40 la fig. 2 muestra la expresión de NANOG en CEP en cultivo.

la fig. 3 muestra la expresión de diversos marcadores por CEP en cultivo, a nivel del ARNm.

45 la fig. 4 muestra que las CEP en cultivo son CD14⁺CD34⁺.

la fig. 5 (A) muestra la separación de células CD14⁺CD34⁻ y de células CD14⁺CD34⁺ a partir de células CD14⁺ circulantes.

50 la fig. 5 (B) muestra la expresión de NANOG en las tres poblaciones diferentes CD14⁺CD34⁺, CD14⁺CD34⁻ y CD14⁺.

la fig. 6 muestra la diferente capacidad de las células CD14⁺CD34⁺, CD14⁺CD34⁻ y CD14⁻CD34⁻ para diferenciarse en células endoteliales y para expresar marcadores específicos endoteliales.

55 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención permite el uso de una nueva población de citoblastos que puede ser aplicada a la terapia de reconstrucción de tejidos y permite la identificación y recuperación de dichas células. Además, la descripción permite la realización de un kit de diagnóstico para evaluar el porcentaje (y el número absoluto) de células en circulación provistas de capacidad blástica y un kit para la purificación de dichas células con fines terapéuticos.

65 De hecho, se ha encontrado sorprendentemente que el gen NANOG es un marcador útil para la identificación de citoblastos adultos, puesto que se expresa en células CD133⁺ obtenidas a partir de cordón umbilical o de sangre periférica, o a partir de células CD34⁺. Estas son células adultas dotadas de una capacidad blástica notoria. Por el contrario, NANOG no se expresa en cultivos primarios de células endoteliales, epiteliales, células de músculo liso, en linfocitos u otros tipos celulares terminalmente diferenciados (fig. 1).

ES 2 326 675 T3

Además, se ha encontrado que NANOG se expresa a niveles altos en células mononucleares en circulación (MNC) cultivadas para obtener CEP, mientras que la expresión de este gen desaparece cuando las células adquieren el fenotipo característico de células terminalmente diferenciadas y marcadores de células endoteliales maduras, tal como el factor Von Willebrand, KDR y Tie-2 (fig. 2). Las CEP expresan altos niveles de NANOG, CD14⁺, CD34⁺ y CD105⁺, como se muestra mediante el análisis por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (fig. 3).

El análisis citofluorimétrico de superficie muestra que dichas células también son CD14⁺, CD105⁺, CD11c⁺, CD31⁺, CD86⁺ y HLA-DR⁺, mientras que no era detectable la presencia de CD34⁺ sobre la superficie de las células de la presente invención mediante técnicas citofluorimétricas normales (Tabla 1).

TABLA 1

Marcadores de superficie	MNC	CEP
CD1a	0,05 ± 0,05	2,3 ± 0,7
CD1c	1,75 ± 0,2	0,5 ± 0,1
CD3	58,1 ± 0,1	7,9 ± 0,9
CD11c	32,9 ± 0,4	86,0 ± 1,9
CD14	18,7 ± 1,5	84,9 ± 2,0
CD16	17,4 ± 1,3	81,8 ± 2,8
CD19	6,8 ± 1,0	2,7 ± 0,6
CD31	60,5 ± 0,8	84,0 ± 4,8
CD34	0,15 ± 0,05	0,7 ± 0,2
CD45	95,4 ± 0,2	98,2 ± 0,4
CD80	0,7 ± 0,2	3,1 ± 0,1
CD86	19,2 ± 1,0	74,3 ± 6,6
CD105	8,2 ± 1,2	83,1 ± 1,8
CD133	0,2 ± 0,05	0,6 ± 0,3
HLA-DR	38,3 ± 0,2	86,5 ± 3,2

Se ha aplicado un procedimiento mucho más sensible para averiguar si también se expresa CD34 en la superficie de dichas células, como sugiere la presencia de niveles altos del correspondiente ARNm. En especial, se ha utilizado para este fin la técnica citofluorimétrica que emplea liposomas magnetofluorescentes conjugados con anticuerpos (Ac) (LMFC-Ac). Esta técnica, que puede aumentar la señal de fluorescencia aproximadamente 100-1.000 veces, muestra que prácticamente todas las células cultivadas son CD14⁺CD34⁺ (fig. 4).

Como se mencionó anteriormente, la población de células de la presente invención está compuesta de células que muestran la presencia simultánea de marcadores CD14 y CD34 sobre su superficie, lo que hace posible el aislamiento de esta población del resto de las células mononucleares de sangre periférica. Además de la sangre circulante, como se mencionó anteriormente, el aislamiento de células puede realizarse de forma similar a partir de sangre de cordón umbilical, médula ósea, placenta o tejidos adultos.

Para verificar si la población de CEP CD14⁺CD34⁺ cultivadas, procedentes de la selección de una población pre-existente en sangre periférica, se aislaron células mononucleares a partir de otros elementos celulares presentes en sangre mediante la separación en un gradiente de densidad (densidad = 1,077 gramos/litro). Las células CD14⁺ se purificaron a partir de la población de células mononucleares de sangre periférica mediante un procedimiento de separación positiva que implica el uso de una columna magnética. Una vez que se ha determinado la cantidad de células, estas se incubaron en un tampón que contenía anticuerpos anti-CD4 conjugados con microesferas superparamagnéticas y aplicada a una columna en un campo magnético. La fracción de células CD14⁺ se recuperaban mediante elución tras retirar la columna del campo magnético.

La fracción purificada de células CD14⁺ (>95% homogénea) se incubó a continuación secuencialmente con: anticuerpos anti-CD34 conjugados con fluoresceína, anticuerpos antifluoresceína conjugados con digoxigenina, anticuerpos antidigoxigenina conjuntado con biotina y, finalmente, con liposomas fluorescentes (LMFC-Ac) a los que se habían conjugados previamente anticuerpos antibiotina (fig. 5 (A)).

Después de este tratamiento, las células se analizaron con un citofluorímetro separador y se aisló la población de células CD14⁺CD34⁺ (pureza >98%). Usando la técnica de LMFC-Ac, se midió el porcentaje de células CD14⁺ que también expresaban CD34 en 10 sujetos sanos con edades que oscilaban entre 24 y 40 años. Los porcentajes de células CD14⁺CD34⁺ estaban comprendidos entre el 1,2 y el 7,5% de los leucocitos totales.

Para confirmar que las células CD14⁺CD34⁺ en circulación son la fuente principal de CEP, se purificaron células CD14⁺ a partir de la población de células mononucleares y se subdividieron en células CD34⁺ y CD34⁻, usando la técnica de LMFC-Ac. También se evaluó la población residual de células CD14⁻CD34⁻ como control adicional. A continuación, se comprobó la expresión de NANOG en las tres poblaciones aisladas por estos medios usando RT-PCR cuantitativa. La expresión de NANOG resultó ser significativamente mayor en células CD14⁺CD34⁺ y significativamente menor en células CD14⁺CD34⁻, en comparación con las células CD14⁺ no separadas (fig. 5 (B)).

Las subpoblaciones CD14⁺CD34⁺, CD14⁺CD34⁻ y CD14⁻CD34⁻ se cultivaron en presencia de VEGF en las condiciones mencionadas anteriormente y se examinó la expresión a día 12 de marcadores típicos de células endoteliales, como KDR y vWf. Estos resultados han mostrado que, en ambas poblaciones, a día 0 no se observaba expresión de los ARNm de KDR y vWf o ésta era extremadamente baja. Sin embargo, la expresión de estos marcadores aumentaba progresivamente en el subgrupo CD14⁺CD34⁺, alcanzando su máximo a día 12, mientras que permanecía prácticamente sin cambios durante todos el periodo de cultivo en la población CD14⁺CD34⁻ y en la población CD14⁻CD34⁻.

Las pruebas de citometría de flujo para la expresión superficial de KDR y Tie-2 confirmaban que básicamente todas las células de la población CD14⁺CD34⁺ expresaban tanto KDR como Tie-2, mientras que estos mismos marcadores estaban prácticamente ausentes en las células derivadas de las poblaciones celulares CD14⁺CD34⁻ y CD14⁻CD34⁻ (fig. 6).

Las células CEP que expresaban NANOG eran CD14⁺CD34⁺ positivas. Estas células proceden de la selección en cultivo de células CD14⁺CD34⁺ en circulación que expresan NANOG, que existen previamente en sangre periférica.

Por tanto, es evidente que la población CD14⁺CD34⁺, que se caracteriza por la expresión de NANOG, es la fuente principal de CEP.

En consecuencia, la recuperación a partir de la sangre y el uso de células CD14⁺CD34⁺ que expresan NANOG puede ser importante para el tratamiento del daño vascular. Adicionalmente, la comprobación de la expresión de NANOG puede representar una forma útil de identificar células humanas adultas con capacidad blástica. La expresión de NANOG, una característica de los citoblastos pluripotentes, sugiere que esta población de citoblastos puede ser terapéuticamente útil también en otros tipos de patologías caracterizadas por un daño orgánico o tisular.

Por tanto, la invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que pueden ser útiles en terapia celular para el tratamiento de la isquemia, de enfermedades neurodegenerativas o cerebrovasculares y para el tratamiento de daño orgánico (insuficiencia cardíaca, renal, pulmonar, hepática o pancreática y reconstrucción de órganos y tejidos urogenitales, visuales, auditivos, olfativos, cutáneos y/o mucosos, óseos y/o cartilagosos), tratamiento de enfermedades hematológicas e inmunodeficiencias.

Además, la capacidad para determinar el número de células presentes en la sangre representa un procedimiento diagnóstico interesante para evaluar la idoneidad de adoptar la terapia celular para el tratamiento de las patologías mencionadas anteriormente, en función de la presencia o ausencia de un número suficiente de células en el paciente.

Parte experimental

Células CD14⁺ o HMVEC (8x10⁶ células/ml, densidad celular: 2,5x10⁶ células/cm²) se dispusieron en placas de cultivo recubiertas de fibronectina humana y se mantuvieron en medio endotelial enriquecido con EGM Single Quotes, VEGF (100 nm/ml) y FCS al 20%.

Se extrajo el ARN total de dichas células y se trató con ADNasa I para eliminar cualquier posible ADN genómico contaminante. Se realizó una RT-PCR Taq-Man como se describe en Lasagni L. y col. "An alternative spliced variant of CXCR3 mediates IP-10, Mig e I-TAC induced-inhibition of endothelial cell growth and acts as functional receptor for PF-4" J. Exp. Med, 2003; 197: 1537-1549.

A continuación se realizaron la determinación de Tie-2 y KDR y la cuantificación de CD1a mediante un ensayo Taq-Man usando un kit comercial (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido).

Se generaron curvas patrón usando una serie de diluciones del ARNm preparado a partir de HMVEC. Para una determinación específica y cuantitativa de la expresión del ARNm de NANOG en diferentes tejidos y cultivos humanos,

ES 2 326 675 T3

se prepararon diferentes pares de oligonucleótidos capaces de detectar el ortólogo humano del gen Nanog murino, que mapea en 12p 13.31.

5 Para asegurar la especificidad, se usó la secuencia completa amplificada mediante dichos oligonucleótidos para las búsquedas tBLASTn del genoma humano completo, en el NCBI.

10 El par de oligonucleótidos seleccionados en función de su especificidad se usó para una prueba de RT-PCR Taq-Man cuantitativa, junto con una sonda fluorescente marcada con VIC. La especificidad y el rendimiento de la amplificación óptima de dichos oligonucleótidos se probaron en un plásmido que llevaba la secuencia del ADNc de NANOG.

Los cebadores y las sondas son:

15 Nanog: sonda VIC, 5'-TCCATCCTTGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT-3'; sentido 5' GAT TTGTGGGCCTGAA GAAAAC-3'; COMPLEMENTARIA 5'-AGGAGAGACAGTCTCCGTGTGAG-3'.

Los niveles de ARNm se cuantificaron mediante comparación de los datos experimentales con curvas patrón generadas a partir de una serie de diluciones usando cantidad idénticas de ADN plasmídico.

20 El análisis por citometría de flujo de las moléculas de la superficie celular se realizó como se describe en el artículo mencionado anteriormente, seguido de la técnica LMFC-Ac (véase también Scheffold A. y col. "*High sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells*" Nat. Med. 2000; 6: 107-110).

25 Este procedimiento permite el aumento de la intensidad de la señal de fluorescencia 100-1.000 veces en comparación con los procedimientos convencionales.

30 Las células adherentes se incubaron sobre sustratos recubiertos de poli-L-lisina durante 30 min a 37°C en presencia de sondas acLDL con doble marcaje durante una hora; después de la fijación, las muestras se incubaron en presencia de aglutinina I de *Ulex europaeus* marcada con FITC. Las muestras se montaron en medios para protección de la fluorescencia y se examinaron mediante microscopia confocal convencional.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Células humanas adultas provistas de capacidad blástica y potencial de regeneración de células endoteliales **caracterizadas** por la presencia simultánea de marcadores CD14 y CD34 en su superficie, así como del marcador de citoblastos NANOG y por el hecho de que expresan niveles de CD34 detectables sólo mediante liposomas magnetofluorescentes conjugados con Ac u otros reactivos secundarios capaces de detectar incluso niveles bajos de CD14+ y CD34+ expresados en la superficie celular.

10 2. Procedimiento para la identificación de células según la reivindicación 1 en el que se detecta la presencia simultánea de CD14, CD34 y Nanog en el que los niveles de CD34 se detectan mediante liposomas magnetofluorescentes conjugados con Ac u otros reactivos secundarios capaces de detectar incluso niveles bajos de CD14+ y CD34+ expresados en la superficie celular.

15 3. Uso de células según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para terapia celular útil para el tratamiento de isquemia, enfermedades neurodegenerativas o cerebrovascular y para el tratamiento de daño cardíaco, insuficiencia renal, pulmonar, hepática o pancreática y reconstrucción de órganos y tejidos urogenitales, visuales, auditivos, olfativos, cutáneos y mucosos, óseos y cartilagosos, tratamiento de enfermedades hematológicas e inmunodeficiencias.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

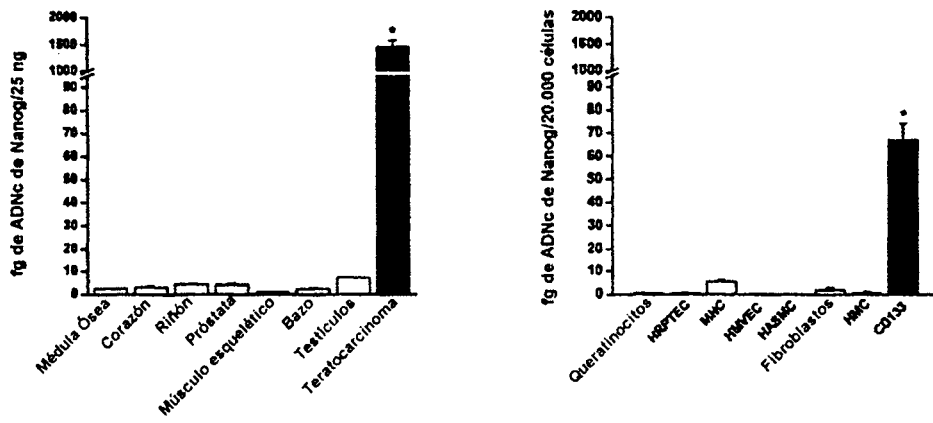


Fig 1

CEP derivadas de MNC

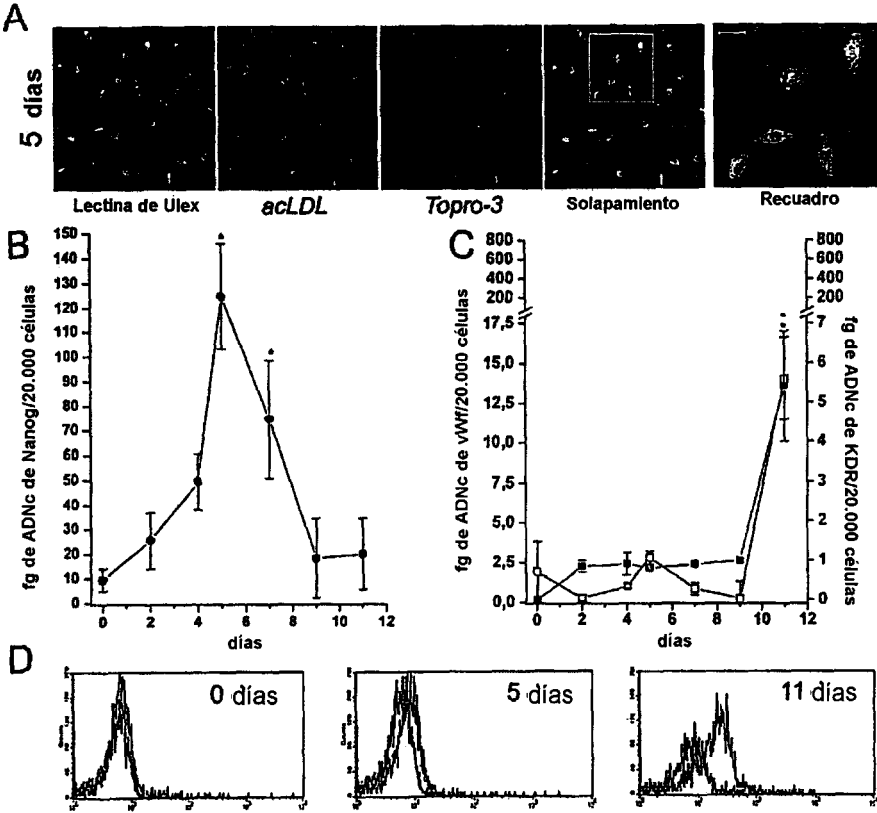


Fig 2

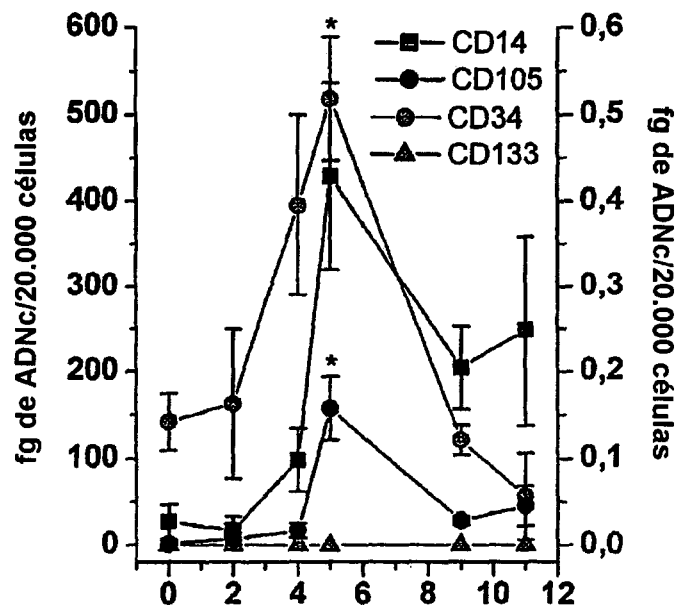


Fig 3

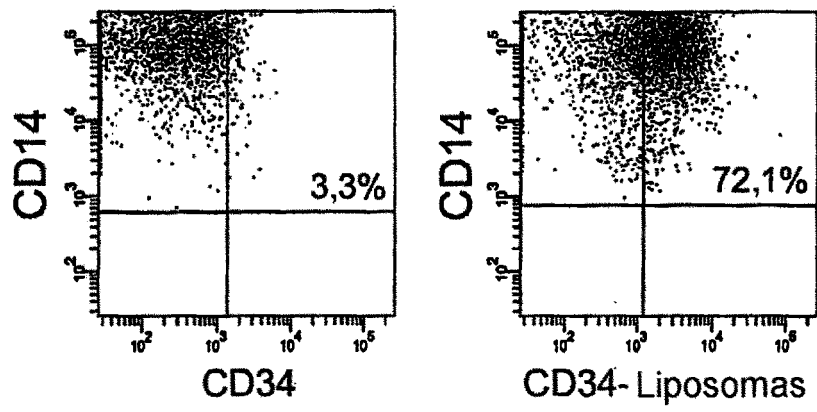


Fig 4

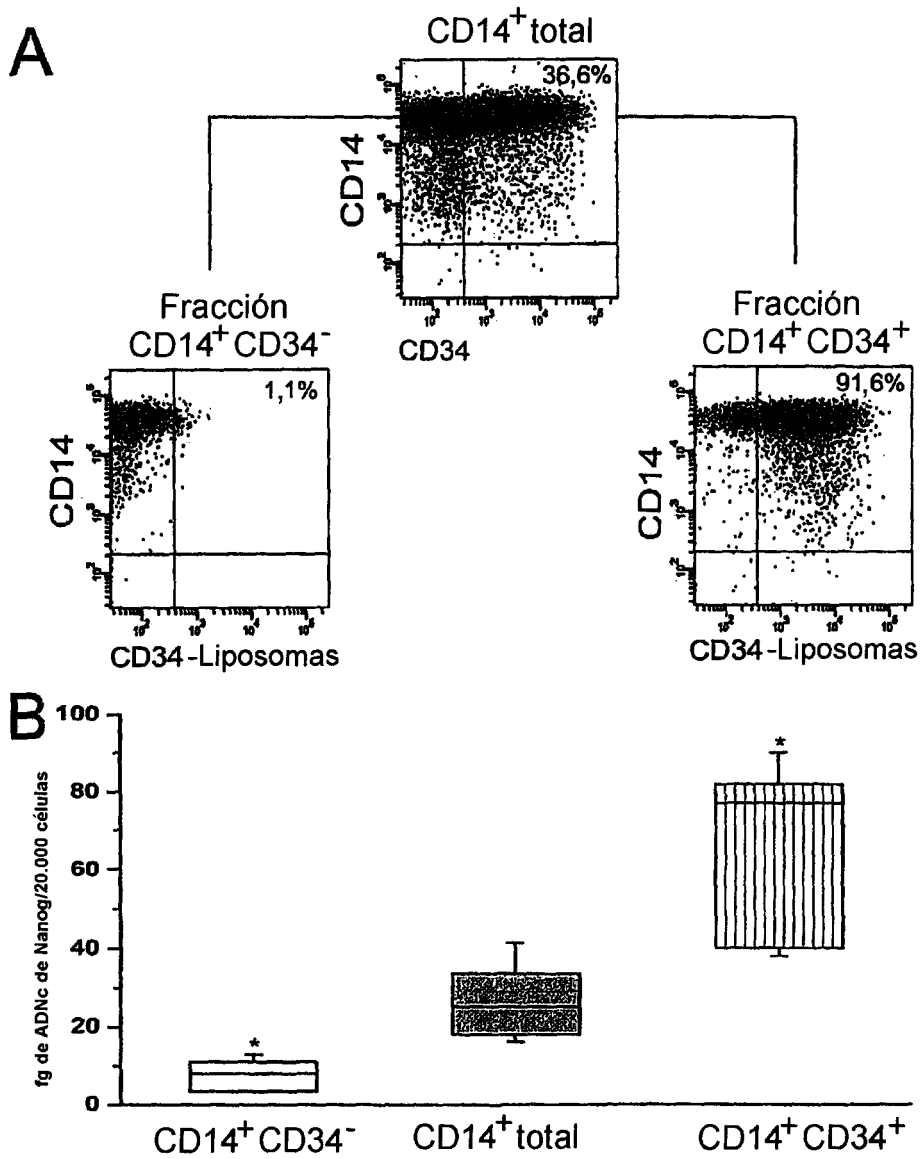


Fig 5

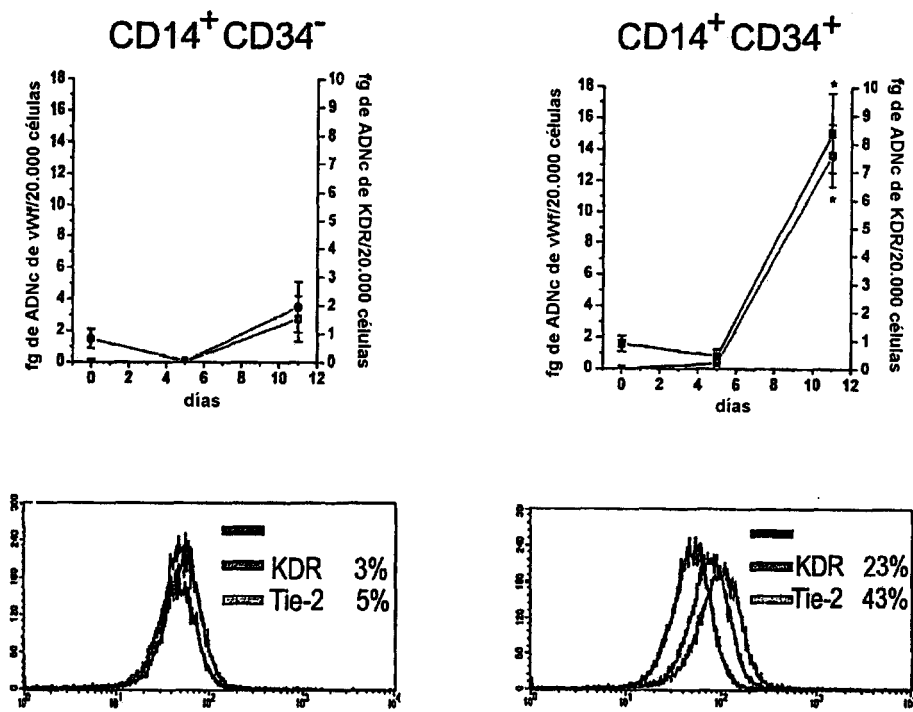


Fig 6

ES 2 326 675 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Azienda Ospedaliera Careggi
- 5 <120> Citoblastos, procedimiento para su purificación, identificación y su uso.
- <130> FI 2004A000238
- <150> FI 2004A000238
- <151> 15-11-2004
- 10 <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 15 <211> 30
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 20 <220>
- <223> sonda para el ortólogo humano del gen NANOG murino mapeado en 12p 13.31
- <400> 1
- 25 tccatccttg caaatgtctt ctgctgagat 30
- <210> 2
- 30 <211> 23
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 35 <223> Cebador complementario de la sonda marcada con VIC para el ortólogo humano del gen NANOG murino mapeado en 12p 13.31
- <400> 2
- 40 aggagagaca gtctccgtgt gag 23
- <210> 3
- 45 <211> 23
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 50 <223> Cebador sentido de la sonda marcada con VIC para el ortólogo humano del gen NANOG murino mapeado en 12p 13.31
- <400> 3
- 55 gatttggtggg cctgaagaaa act 23
- 60
- 65