

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 373**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2015 PCT/KR2015/006588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15199499**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2015 E 15812792 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 3162372**

54 Título: **Composición para uso en el tratamiento de enfermedades isquémicas que contienen células progenitoras neurales como ingrediente activo**

30 Prioridad:

27.06.2014 KR 20140080009

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2021

73 Titular/es:

**S-BIOMEDICS (100.0%)
(Uil Venture Bldg., Seongsu-dong 2-ga)4, 28,
Seongsui-ro 26-gil, Seongdong-gu
Seoul 04797, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, DONG WOOK y
KIM, HAN SOO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 865 373 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para uso en el tratamiento de enfermedades isquémicas que contienen células progenitoras neurales como ingrediente activo

Campo técnico

La presente invención se relaciona con una composición para uso en el tratamiento de la enfermedad isquémica que contiene células precursoras neurales positivas a la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM) como ingrediente activo.

Antecedentes de la técnica

Las células madre se consideran un material candidato terapéutico prometedor para diversas enfermedades debido a su multipotencia. Por ejemplo, las células madre mesenquimales (MSC) liberan muchos factores nutricionales que se pueden obtener y aislar fácilmente y lograr la promoción de la angiogénesis y la inhibición de la inflamación (Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). *Journal of Cellular Biochemistry*, 98, 1076-1084). Estas características de las MSC se han considerado en estudios para su aplicación al tratamiento de una serie de enfermedades humanas. Estudios recientes han encontrado que las MSC contribuyen a la reparación de tejidos en un gran número de modelos animales y tratamientos clínicos humanos (Chen, J., Li, Y., Katakowski, M., et al. (2003). *Journal of Neuroscience Research*, 73, 778-786; Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 10711-10716). Varios reportes establecieron la capacidad de diferenciación in vitro de MSC en el linaje neuronal (Bae, K. S., Park, J. B., Kim, H. S., Kim, D. S., Park, D. J., & Kang, S. J. (2011). *Yonsei Medical Journal*, 52, 401-412) y astrocitos (Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 10711-10716), pero no hay pruebas definitivas de las funciones que realizan in vivo las células diferenciadas. Parece que el efecto favorable de las MSC es inducido por mecanismos paracrinós más que por reemplazo celular y, por lo tanto, el trasplante de MSC tendría efectos temporales y limitados pero no el alivio mantenido durante un largo período de tiempo (Cho, S.R., Kim, Y.R., Kang, H.S., et al. (2009). *Cell Transplantation*, 18, 1359-1368).

Por el contrario, las células madre embrionarias (ESC) pueden diferenciarse en todos los tipos de células particulares derivadas de tres capas germinales embrionarias y tienen una fuerte capacidad de autorrenovación. Notablemente, las células precursoras neurales (NPC) derivadas de las ESC, en primer lugar, se diferencian en un tipo de célula particular de células de linaje neural, incluidas células neurales, astrocitos y oligodendrocitos, y por tanto se consideran una fuente celular para la reparación de tejidos cerebrales. Estas células secretan algunos factores para promover la supervivencia y proliferación de células precursoras neurales endógenas (Capone, C., Frigerio, S., Fumagalli, S., et al. (2007). *PLoSOne*, 7, e373). Sin embargo, aún no se sabe cómo las NPC se diferenciaron de las ESC o el líquido de cultivo de las NPC contribuyen a la mejora de las funciones después del trasplante en modelos de enfermedad.

KIM, DAE - SUNG ET AL., "Highly Pure and Expandable PSA-NCAM-Positive Neural", *PLOS ONE*, vol. 7, no. 7, Julio 2012, divulga células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM y sus efectos beneficiosos en la terapia celular para trastornos neurodegenerativos.

DIBAJNIA et al., "Role of neural precursor cells in promoting repair following stroke", *ACTA PHARMACOLOGICA SINICA*, vol. 34, no. 1, 2013, páginas 78-90, divulga el papel de las células precursoras neurales en la promoción de la reparación después de una apoplejía, por ejemplo, apoplejía isquémica.

MACAS JADRANKA et al., "Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain", *JOURNAL OF NEUROSCIENCE, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US*, vol. 26, no. 50, 30 de noviembre de 2006, páginas 13114-13119, divulga, por ejemplo, una generación aumentada de células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM después de una lesión isquémica en el prosencéfalo humano adulto envejecido.

FOX GERARD B ET AL: "The modulations of NCAM polysialylation state that follow transient global ischemia are brief on neurons but enduring on glia", *JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY*, LIPPINCOT WILLIAMS AND WILKINS, NEW YORK, vol. 60, no. 2, 31 de enero de 2001, páginas 132-140, divulga un proceso adaptativo después de un evento isquémico que consiste en la expresión de NCAM polisialilada en el hipocampo isquémico del jerbo como un modelo para la reparación/remodelación neurotrófica dependiente que sucede a la siguiente interrupción transitoria del flujo sanguíneo.

IWAI MASANORI et al., "Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia", *JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW & METABOLISM, NATURE PUBLISHING GROUP, US*, vol. 22, no. 4, 31 de marzo de 2002, páginas 411-419, divulga, por ejemplo, tres etapas del desarrollo de células madre neurales en la circunvolución dentada de jerbo después de isquemia transitoria, que reportan el aumento del desarrollo y migración de células positivas a PSA-NCAM en la zona subgranular después de isquemia como signo de neurogénesis persistente después de isquemia global transitoria.

DATABASE WPI, Semana 201410, Thomson Scientific, Londres, GB; AN 2012-R77360 & KR 2012 0136638, 20 de diciembre de 2012, divulga, por ejemplo, un método para separar células precursoras neurales de células madre pluripotentes mediante la obtención de la población celular, poniendo en contacto la población celular con el anticuerpo de la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM), separando la célula unida con el anticuerpo y diferenciando las células separadas en una roseta neural.

El documento WO 2008/070513 A1 divulga, por ejemplo, la modulación de PSA-NCAM como un regulador en el tratamiento de la enfermedad ocular.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

Los presentes inventores se esforzaron por desarrollar un método fundamental para tratar la enfermedad isquémica o la enfermedad neuroinflamatoria. Como resultado, los presentes inventores encontraron que, cuando se inyectan en el sitio de la lesión células progenitoras neurales que expresan PSA-NCAM, que es una molécula adhesiva nerviosa en la superficie celular, se potencia la neurorregeneración, se promueve la vascularización y se suprime la reacción inflamatoria, de modo que las enfermedades isquémicas causadas por daño vascular y daño del tejido nervioso por inflamación se traten de manera eficaz, completando así la presente invención. Además, como una metodología diferente del trasplante de células madre, es posible reducir el área de lesión isquémica y restaurar la función nerviosa mediante la administración en el sitio de la lesión de las proteínas secretoras de las células neuroepiteliales (secretoma), recuperando así la función perdida en enfermedades neuroinflamatorias o neurodegenerativas tales como enfermedades isquémicas e inflamación, lo que confirma que la enfermedad se puede tratar eficazmente, completando así la presente invención.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para uso en el tratamiento de la enfermedad isquémica, la composición que contiene células precursoras neurales positivas a la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM) como un ingrediente activo, en donde las células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM están separadas de las rosetas neurales diferenciadas de las células madre pluripotentes, en donde las células madre pluripotentes son células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC), en donde la enfermedad isquémica se selecciona del grupo que consiste en enfermedad cerebrovascular isquémica, enfermedad cardíaca isquémica, infarto de miocardio, angina de pecho, enfermedad isquémica de la arteria del miembro inferior y enfermedad isquémica del miembro distal.

Otros propósitos y ventajas de la presente invención resultarán más obvios con la siguiente descripción detallada de la invención, reivindicaciones y dibujos.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para uso en el tratamiento de la enfermedad isquémica, la composición que contiene células precursoras neurales positivas a la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM) como un ingrediente activo.

De acuerdo con la presente invención, la composición para uso de acuerdo con la presente invención restaura los vasos sanguíneos de tejidos isquémicos o inhibe respuestas inflamatorias en un sujeto con enfermedad isquémica y, por tanto, suprime el desarrollo de síntomas de las enfermedades, o elimina o alivia las enfermedades. Por tanto, la composición de la presente invención per se, puede ser una composición para uso en el tratamiento de la enfermedad isquémica. Como se usa aquí, el término "tratamiento" o "agente de tratamiento" incluye un significado de "auxiliar de tratamiento" o "adyuvante de tratamiento".

De acuerdo con la presente invención, la composición para uso de acuerdo con la presente invención aumenta significativamente un factor inductor de angiogénesis, angiopoyetina-1, y aumenta en gran medida el número de vasos sanguíneos y la concentración en microvasos en los sitios de administración (o trasplante). Por lo tanto, la composición para uso de acuerdo con la presente invención se puede usar como una composición para tratar eficazmente la enfermedad isquémica, en donde la composición restaura los tejidos de los vasos sanguíneos o aumenta el número de vasos sanguíneos en un sujeto que tiene una rata de flujo sanguíneo reducida causada por la pérdida de tejidos de los vasos sanguíneos, deficiencia de angiogénesis o formación de vasos sanguíneos anormales, restaurando así la rata de flujo sanguíneo.

De acuerdo con la presente invención, la composición para uso de acuerdo con la presente invención inhibe la activación de células microgliales reactivas y astrocitos en tejidos neurales administrados (o trasplantados). Las células microgliales realizan una función inmune primaria en el sistema nervioso central y las células microgliales activadas, a diferencia de las células microgliales en un estado normal, realizan fagocitosis activa y proliferación celular, y generan materiales mediados por inflamación a través de la expresión de genes, como citocinas (por ejemplo, TNF- α , IL-1 β e IL-6), quimiocinas, sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2). Los astrocitos activados también secretan citocinas inflamatorias, como IL-6, TGF- β , LIF o IL-1, y las citocinas secretadas activan nuevamente

células microgliales y astrocitos, lo que agrava los entornos en los tejidos. Por tanto, la composición para uso de acuerdo con la presente invención, que inhibe la activación de células microgliales y astrocitos, puede bloquear eficazmente el daño de los tejidos neurales debido a respuestas inflamatorias.

5 Como se divulga aquí, la composición para uso de acuerdo con la presente invención aumenta la expresión de angiopoyetina-1.

10 Como se usa aquí, el término "expresión creciente" se refiere a aumentar significativamente la expresión de un gen o una proteína para que sea medible, en comparación con personas normales, y más específicamente, el término se refiere a un nivel de expresión de 130 % o más en comparación con controles.

Como se divulga aquí, la composición para uso de acuerdo con la presente invención inhibe la activación de células gliales o astrocitos.

15 Como se usa aquí, el término "inhibición de la activación" se refiere a una transformación in vivo que causa deterioros en el número, funciones y activación de células gliales o astrocitos y, por ejemplo, se refiere a disminuir significativamente la expresión de un marcador específico (por ejemplo, CD68 o GFAP) de esas células, siendo imposible detectar la expresión, o haciendo que la expresión sea un nivel insignificante.

20 De acuerdo con una realización de la presente invención, las células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM se separan de rosetas neurales diferenciadas de células madre pluripotentes.

25 De acuerdo con la presente invención, las células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM se separan de las rosetas neurales, que se diferencian de las células madre pluripotentes mediante la estimulación de la diferenciación neural, utilizando anticuerpo anti-PSA-NCAM.

30 Como se divulga aquí, se proporciona una composición para tratar una enfermedad isquémica o una enfermedad neuroinflamatoria, la composición que contiene, como un ingrediente activo, un secretoma de células precursoras neurales.

30 Como se usa aquí, el término "secretoma de células precursoras neurales" se refiere a un agregado de proteínas secretadas desde células precursoras neurales al exterior (medio de cultivo) cuando se cultivan las células precursoras neurales.

35 Como se divulga aquí, las células precursoras neurales utilizadas en la preparación del secretoma de la presente divulgación se diferencian de las células madre pluripotentes.

40 Como se divulga aquí, las células precursoras neurales son células precursoras neurales en la etapa de rosetas neurales formadas por la diferenciación de células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas) en células de linaje neural.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células precursoras neurales son células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM.

45 Como se divulga aquí, las células precursoras neurales son células precursoras neurales negativas a PSA-NCAM.

50 Las células precursoras neurales positivas o negativas a PSA-NCAM pueden separarse de las rosetas neurales, que se diferencian de las células madre pluripotentes mediante la estimulación de diferenciación neural, usando anticuerpo anti-PSA-NCAM.

55 Como se divulga aquí, el secretoma está en una forma que se encuentra contenido en un líquido de cultivo celular obtenido cultivando células precursoras neurales en un medio de cultivo de células animales. Es decir, la composición para uso de acuerdo con la presente invención puede estar contenida en un líquido de cultivo de células precursoras neurales, que contiene un secretoma de células precursoras neurales.

60 Como se divulga aquí, el líquido de cultivo celular de las células precursoras neurales se puede obtener cultivando las células precursoras neurales en un medio de cultivo de células animales libre de suero que contiene insulina/transferrina/selenio (ITS) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGT) y luego eliminar las células. Para el cultivo, las células precursoras neurales que se obtienen subcultivando (por ejemplo, al menos cuatro pases) las células precursoras neurales en un medio de cultivo de células animales que contiene bFGF complementado con, por ejemplo, N2, B-27 y/o Gem21.

65 La eliminación de las células del medio de cultivo se puede realizar utilizando un método de separación celular ordinario, como centrifugación o filtración.

Para el medio de cultivo de células animales, se puede usar sin limitación un medio ordinario que se usa para cultivar células precursoras neurales. Por ejemplo, se pueden usar DMEM/F12, DMEM o RPMI-1640.

Como se divulga aquí, las células precursoras neurales se diferencian de las células madre humanas pluripotentes inducidas, y el secretoma de las células precursoras neurales incluye las siguientes proteínas:

Agrina, anexina A5, BSG (Basigin), biglicano, calponina-3, proteína tipo coactosina, cofilina-1, colágeno alfa-2, cullina-3, destrina, distroglicano, efrina-B2, exportina-2, ezrina, fibronectina, fibulina-1, proteína relacionada con Frizzled, proteína de enlace a gelatina-3, granulinas, factor de crecimiento/diferenciación 11, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, importina-9, proteína 2 de enlace al factor de crecimiento tipo insulina, proteína Lupus La, factor inhibidor de migración de macrófagos, midquina, moesina, neuropilina 2, pleiotrofina, profilin-1, proteína DJ-1, radixina, proteína 2 secretada relacionada con Frizzled, septina-11, talina-1, testican, timopoyetina, transgelina 3 y vimentina.

Como se divulga aquí, las células precursoras neurales se diferencian de las células madre embrionarias humanas, y el secretoma de las células precursoras neurales incluye las siguientes proteínas:

Agrina, anexina A2, atractina, biglicano, ceruloplasmina, cofilina-1, colágeno alfa-1, coronina-1X, dermicidina, DERP12, eprina-B3, exostosina-2, ezrina, proteína de enlace a gelatina-3, granulinas, factor de crecimiento/diferenciación 11, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, proteína 2 de enlace al factor de crecimiento tipo insulina, proteína Lupus La, midquina, moesina, proteína 8 de dominios múltiples tipo factor de crecimiento epidérmico, nidogeno-1, paratimosina, profilina-2, proteína DJ-1, proteína 2 secretada relacionada con Frizzled, secretogranina, talina-1, timosina beta-4, TGFBI (proteína ig-h3 transformante inducida por factor de crecimiento-beta), transgelina y vimentina.

Aquí a continuación, se describen los contenidos comunes de la composición para uso de acuerdo con la presente invención.

Como se usa aquí, el término "células madre" es un término genérico para células indiferenciadas antes de la diferenciación en células respectivas que constituyen tejidos, y las células madre tienen la capacidad de diferenciarse en células particulares mediante estímulos de diferenciación particulares (entorno). A diferencia de las células indiferenciadas que cesaron la división celular, las células madre son capaces de producir las mismas células que las suyas a través de división celular (autorrenovación) y tienen plasticidad en la diferenciación, en la que las células madre se diferencian en células particulares mediante la aplicación de la estimulación de diferenciación y puede diferenciarse en diversas células por diferentes entornos o por diferenciación diferente.

Las células madre utilizadas en la presente invención son células madre pluripotentes que se proliferan indefinidamente in vitro y pueden diferenciarse en diversas células derivadas de todas las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Más específicamente, las células madre pluripotentes son células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células germinales embrionarias o células de carcinoma embrionario.

Aunque no forman parte de la presente invención, las células madre embrionarias se derivan de la masa celular interna (ICM) del blastocisto, y las células germinales embrionarias se derivan de las células germinales primordiales presentes en las crestas gonadales de 5-10 semanas de edad.

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) son un tipo de células madre pluripotentes derivadas artificialmente de células no pluripotentes (por ejemplo, células somáticas) insertando un gen particular que les imparte pluripotencia. Las células madre pluripotentes inducidas se consideran lo mismo que las células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias) ya que las células madre pluripotentes inducidas tienen genes de células madre y expresión de proteínas muy similares, patrón de metilación cromosómica, tiempo de duplicación, capacidad de formación de cuerpos embrioides, capacidad de formación de teratoma, capacidad de formación de quimeras viables, capacidad de hibridación y capacidad de diferenciación como células madre embrionarias.

El término "rosetas neurales" se refiere a células madre neurales en la etapa inicial del procedimiento de diferenciación neural de células madre embrionarias humanas, y la roseta neural tiene una forma radial cilíndrica. Las rosetas neurales están compuestas por células que expresan marcadores neuroectodérmicos iniciales, como Pax6 y Sox1, y pueden diferenciarse en diversas células neurales y células neurogliales. La estimulación de la diferenciación neural puede diferenciarse mediante un método que se lleva a cabo habitualmente en la técnica, por ejemplo, medios libres de suero (Tropepe V et al., Neuron. 30:6578(2001)), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), y tratamiento con morfógenos, tales como Wnt y ácido retinoico (RA) (Ying QL et al. Nat Biotechnol. 21:183186(2003)).

Se pueden usar anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales como el anticuerpo. Los anticuerpos contra PSA-NCAM pueden producirse mediante los métodos que se llevan a cabo convencionalmente en la técnica, por ejemplo, un método de fusión (Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519 (1976)), un método de ADN recombinante (documento USP 4,816,56), o un método de biblioteca de anticuerpos de fagos (Clackson et al, Nature,

352:624-628 (1991) y Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597 (1991)). Un procedimiento general para la producción de anticuerpos se describe en detalle en Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; y Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991. Por ejemplo, células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales pueden obtenerse fusionando líneas celulares inmortales con linfocitos productores de anticuerpos, cuya tecnología ha sido bien conocida por las personas experimentadas en la técnica, y se puede realizar fácilmente. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener inyectando antígenos de PSA-NCAM en un animal apropiado, recolectando antisueros del animal y luego aislando anticuerpos de los antisueros usando la técnica de afinidad conocida.

Como se usa aquí para citar el PSA-NCAM, el término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo específico para PSA-NCAM, y el anticuerpo se enlaza específicamente a la proteína PSA-NCAM, e incluye una forma completa de un anticuerpo y un fragmento enlazador de antígeno de la molécula de anticuerpo. El anticuerpo completo tiene una estructura que tiene dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, y las cadenas ligeras están unidas a las cadenas pesadas mediante un enlace disulfuro, respectivamente. El fragmento enlazador de antígeno de la molécula de anticuerpo es un fragmento que tiene una función de enlace al antígeno e incluye Fab, F(ab'), F(ab')₂ y Fv.

Para la separación de células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM usando un anticuerpo, se pueden usar clasificadores de células activadores de fluorescencia (FACS), clasificadores de células activados magnéticamente (MACS), adherencia plástica recubierta de anticuerpos y lisis mediada por complemento.

Como se usa aquí, el término "tratamiento" se refiere a: (a) suprimir el desarrollo de una enfermedad, trastorno o síntoma; (b) reducir una enfermedad, trastorno o síntoma; o (c) eliminar los síntomas de enfermedad, trastorno o síntoma. La composición para uso de acuerdo con la presente invención suprime el desarrollo de síntomas de enfermedad isquémica o elimina o reduce los síntomas de enfermedad isquémica. Por tanto, la composición de la presente invención per se puede ser una composición para uso en el tratamiento de enfermedad isquémica. Como se usa aquí, el término "tratamiento" o "agente de tratamiento" incluye un significado de "auxiliar de tratamiento" o "adyuvante terapéutico".

Como se usa aquí, el término "enfermedad isquémica" se refiere a una enfermedad de necrosis tisular a través de una reducción en la rata de flujo sanguíneo y un bloqueo del suministro de sangre, causado por fuga de sangre, embolia o infarto debido a lesiones de los vasos sanguíneos.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la enfermedad isquémica que puede tratarse mediante la composición de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, angina de pecho, enfermedad isquémica de la arteria de extremidades inferiores, enfermedad isquémica de extremidades distales y enfermedad isquémica cerebrovascular.

Como se usa aquí, el término "enfermedad cardíaca isquémica" se refiere a una enfermedad causada por la reducción en el flujo sanguíneo al músculo cardíaco debido al daño, estrechez y oclusión de las arterias coronarias para suministrar sangre al corazón. Más específicamente, la cardiopatía isquémica que puede tratarse con la composición de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en angina, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca.

Como se usa aquí, el término "enfermedad cerebrovascular isquémica" se refiere a una enfermedad del daño de los tejidos cerebrales causada por la falta de suministro de flujo sanguíneo debido al daño, estrechez u oclusión de los vasos sanguíneos del cerebro. Más específicamente, la enfermedad cerebrovascular isquémica es la apoplejía isquémica.

Como se usa aquí, el término "enfermedad neuroinflamatoria" se refiere a una enfermedad causada por el daño de los tejidos neurales debido a respuestas inflamatorias.

Como se divulga aquí, la enfermedad neuroinflamatoria que puede tratarse mediante la composición de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad difusa por cuerpos de Lewy, leucoencefalitis, epilepsia del lóbulo temporal y lesión inflamatoria de la médula espinal.

Como se usa aquí, el término "administración" o "administrar" se refiere a un método en donde una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención se administra directamente a un sujeto para formar la misma cantidad en el cuerpo del sujeto. Por lo tanto, el término "administrar" incluye la inyección de un ingrediente activo (un secretoma de células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM o células precursoras neurales) alrededor de un sitio de lesión y, por lo tanto, el término "administrar" se usa con el mismo significado. como el término "inyectar".

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" de la composición se refiere al contenido de un extracto, que es suficiente para proporcionar un efecto terapéutico o profiláctico a un sujeto que se va a administrar y, por lo tanto, el término tiene un significado que incluye "cantidad profilácticamente eficaz". Como se usa aquí, el término "sujeto" incluye, humano, ratón, rata, cobayo, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, mono, chimpancé, castor o mono rhesus. Específicamente, el objeto de la presente invención es humano.

En los casos donde la composición para uso de acuerdo con la presente invención se prepara como una composición farmacéutica, la composición farmacéutica de la presente divulgación contiene un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente divulgación es uno que se usa convencionalmente en la formulación, y ejemplos del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, solución salina, solución salina regulada con fosfato (PBS) y medios.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede contener también, además de los ingredientes anteriores, un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante y similares. Los portadores y preparaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse por vía oral o parenteral, y los ejemplos de administración parenteral pueden incluir administración intramuscular, administración intracerebroventricular, administración intratecal o administración intravascular.

Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente divulgación puede variar dependiendo de diversos factores, tales como el método de formulación, la forma de administración, la edad, peso corporal, sexo, morbilidad y dieta del paciente, tiempo de administración, vía de administración, rata de excreción y sensibilidad de respuesta. La dosis general de la composición farmacéutica de la presente divulgación es de 10^2 - 10^{10} células por día en base a un adulto.

La composición farmacéutica de la presente divulgación se puede formular en una forma de dosificación unitaria o se puede preparar en un recipiente multidosis utilizando un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con el método fácilmente realizado por una persona que tiene una habilidad en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aquí, la forma de dosificación puede ser una solución en un medio aceitoso o acuoso, una suspensión, un jarabe o una emulsión, un extracto, un pulvis, un polvo, un gránulo, un comprimido o una cápsula, y puede incluir además un dispersante o un estabilizador.

Efectos ventajosos

Las características y ventajas de la presente invención se resumen a continuación:

(a) La presente invención proporciona una composición para uso en el tratamiento de la enfermedad isquémica.

(b) Las células progenitoras neurales positivas a PSA-NCAM utilizadas en la presente invención promueven la angiogénesis en el tejido inyectado e inhiben una respuesta inflamatoria. Las células progenitoras neurales positivas a PSA-NCAM pueden aislarse simplemente usando un anticuerpo anti-PSA-NCAM y exhiben excelentes actividades angiogénicas y antiinflamatorias en comparación con las células madre mesenquimales, y por lo tanto pueden ser útiles como composición para tratar eficazmente enfermedades isquémicas causadas por una lesión vascular y enfermedades por daño nervioso causadas por inflamación.

(c) Aunque no forma parte de la presente invención, un secretoma de las células progenitoras neurales de la presente divulgación reduce el sitio de la lesión isquémica y permite que se recupere una función neurológica y, por lo tanto, puede usarse como un agente para tratar enfermedades isquémicas y trastornos del sistema nervioso degenerativos tales como enfermedades que dañan los nervios causadas por inflamación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la contracción del área de infracción en cerebro isquémico de rata trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+} y MSC.

La figura 1a es una vista esquemática que muestra el diseño experimental. Un día después de pMCAo, los animales se asignaron aleatoriamente para recibir NPC^{PSA-NCAM+}, MSC o PBS (n = 10 cada uno). El día 26 después del trasplante, los animales se sacrificaron y los cerebros se procesaron para inmunohistoquímica. La figura 1b muestra el efecto de las MSC y el trasplante de NPC^{PSA-NCAM+} sobre el tamaño del infarto en un modelo de rata con pMCAo el día 26 posttrasplante. *P < 0.05 y **P < 0.01 en comparación con el grupo PBS. La figura 1c muestra imágenes representativas obtenidas el día 26 después del trasplante celular en ratas tratadas con PBS, NPC^{PSA-NCAM+} o MSC.

La figura 2 ilustra la potenciación del rendimiento conductual en el modelo de apoplejía de rata trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+}. Las imágenes respectivas muestran los resultados del cambio de peso corporal (figura 2a), prueba de falla del pie (figura 2b), prueba asimétrica (figura 2c), prueba de equilibrio en barra (figura 2d), prueba de tracción prensil (figura 2e) y mNSS (figura 2f). Los valores de medición son la media $\pm$ S.E.M. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 en comparación con el grupo PBS.

La figura 3 ilustra la integración y diferenciación de NPC^{PSA-NCAM+} viable en tejido cerebral de rata. La figura 3a muestra un sitio de infracción. La supervivencia y proliferación de NPC^{PSA-NCAM+} trasplantada se probaron el día 26. Se observaron células positivas para Ki67 (verde) o DCX (rojo) en cerebro isquémico de rata. Barra de escala: 500 μ m. Figura 3b muestra grandes aumentos del recuadro de la figura 3a. Barras de escala: 200 μ m. Figura 3c muestra ejemplos de células NPC^{PSA-NCAM+} que coexpresan hNu (verde) y DCX (rojo). Muchas células NPC^{PSA-NCAM+} injertadas demostraron positividad de hNu, lo que indica una buena supervivencia e integración en el cerebro dañado. Barras de escala: 200 μ m. Figura 3d muestra que se observaron pocas células Ki67+ hNu- proliferantes en y alrededor del tracto de la aguja en la mayoría de los casos de grupos injertados con MSC. Barras de escala: 200 μ m. Figura 3b proporciona imágenes con respecto a DCX/DAPI, Ki67/DAPI, DCX/Ki67/DAPI, Tuj1/DAPI, y Nestina/Ki67/DAPI, desde el lado izquierdo. Figura 3c proporciona imágenes con respecto a DAPI, hNu, hNu/DCX y DCX en el sentido de las agujas del reloj desde la izquierda. Figura 3d proporciona imágenes con respecto a hNU/DAPI, Ki37/DAPI y hNU/Ki67 desde el lado izquierdo.

La figura 4 ilustra el compromiso neuronal de NPC^{PSA-NCAM+} y la reducción de la activación glial en tejido cerebral de rata. La figura 4a muestra que se observaron células con hMito+ (rojo) y MAP2+ (verde) en cerebro de rata trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+}. Barra de escala: 20 μ m. Figura 4b muestra imágenes confocales de células injertadas el día 26 después del trasplante. Las células derivadas del donante (verde, hNu+) co-localizadas con MAP2 (rojo) dentro de los injertos generados por el trasplante NPC^{PSA-NCAM+}. DAPI, azul. La figura 4c muestra que las neuronas del huésped en el cuerpo estriado contralateral carecían de hMito colocalizado con MAP2. Tener en cuenta las prominentes células MAP2+ en el cuerpo estriado. Barra de escala: 20 μ m. Figura 4d muestra que las células hMito+GFAP+ no fueron detectables en el cerebro de rata trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+}. Barra de escala: 20 μ m. Figura 4e muestra que la positividad para ED-1 en el cuerpo estriado ipsilateral se redujo significativamente en el grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+}, y en menor grado en el grupo trasplantado con MSC. Tanto los grupos trasplantados con NPC^{PSA-NCAM+}, como los MSC fueron significativamente diferentes del grupo de PBS. La expresión de GFAP fue notablemente menor en el grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+} que en los grupos con MSC o PBS. Barra de escala: 200 μ m. Figura 4f muestra el número de células positivas para ED1 o GFAP contadas en al menos cinco campos microscópicos separados. Los valores de medición son la media $\pm$ S.E.M. *P<0.05 y ***P<0.001 cuando se realizaron comparaciones múltiples entre los grupos.

La figura 5 ilustra la estimulación de la angiogénesis en cerebro isquémico de rata trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+}. La figura 5a muestra los resultados de inmunotinción del cerebro isquémico del grupo trasplantado con PBS, NPC^{PSA-NCAM+} o MSC, respectivamente. Barra de escala: 200 μ m. La figura 5b muestra imágenes representativas de células endoteliales vasculares positivas a α -SMA de origen de huésped (rojo) en la región injertada con NPC^{PSA-NCAM+}. Barra de escala: 20 μ m. La figura 5c muestra los resultados del análisis cuantitativo de microvasos positivos para α -SMA en ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} o MSC. Los valores de medición son la media $\pm$ S.E.M. *P<0.05 y P<0.01 en el grupo NPC^{PSA-NCAM+} en comparación con el grupo MSC o PBS, respectivamente. La figura 5d muestra los resultados de los niveles de expresión de angiopoyetina-1 de rata en cerebro isquémico evaluados usando RT-PCR en el día 7 y 26 después del trasplante con NPC^{PSA-NCAM+} (NPC) o MSC. Se muestran la amplificación por RT-PCR de angiopoyetina-1 (arriba) y la cuantificación de los niveles de ARNm normalizados con GAPDH al control simulado (línea base) (abajo) (n = 3 por grupo). Los valores de medición son media $\pm$ S.E.M. P<0.05 en comparación con el grupo PBS.

La figura 6 ilustra los niveles de expresión de factores neurotróficos humanos y de rata en cerebro isquémico, evaluados usando RT-PCR el día 26 después del trasplante con NPC^{PSA-NCAM+}, MSC o PBS. Se muestran la amplificación por RT-PCR de factores neurotróficos y la cuantificación de los niveles de ARNm normalizados por GAPDH a los de los controles simulados (línea base) (n = 3 por grupo). Los valores de medición son la media $\pm$ S.E.M. *P<0.05 en comparación con el grupo PBS.

La figura 7 muestra los tamaños del sitio de la lesión isquémica en el grupo de control de PBS, grupo de control medio y grupo tratado con secretoma.

La figura 8 ilustra el cambio en el peso corporal en el grupo de control de PBS, grupo de control medio y grupo tratado con secretoma.

La figura 9 ilustra los resultados del análisis de comportamiento en el grupo de control de PBS, grupo de control medio y grupo tratado con secretoma. La figura 9a muestra el resultado de la prueba de equilibrio en barra; La figura 9b muestra los resultados de la prueba de tracción prensil; La figura 9c muestra los resultados de la prueba de falla del pie; Figura 9d muestra los resultados del cruce de líneas que indican la actividad del comportamiento por unidad de tiempo.

La figura 10 muestra los resultados del análisis integral del efecto de mejora de las neuronas del comportamiento (mNSS) en el grupo de control con PBS, grupo de control medio y el grupo tratado con secretoma.

5 valor *P< 0.05, valor **P< 0.01 en figuras 7 a 10.

Modo para llevar a cabo la invención

A continuación, la presente invención se describirá en detalle con referencia a ejemplos.

10

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto del tratamiento de células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM sobre enfermedad isquémica y enfermedad neuroinflamatoria

15

Métodos

Cultivo y diferenciación de MSC humanas y NPC^{PSA-NCAM+} derivadas de ESC humano

20

El uso de células humanas fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB No. 4-2008-0643). La médula ósea humana se obtuvo por aspiración de la cresta ilíaca posterior de voluntarios adultos sanos que dieron su consentimiento informado. Brevemente, se aislaron células mononucleares de médula ósea mediante centrifugación en gradiente de densidad (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se sembraron en placas a una densidad de 1×10^6 células/cm² en DMEM suplementado con FBS al 10 % (Gibco, Grand Island, NY), y cultivado a 37 ° C en una atmósfera humidificada que contiene CO₂ al 5 %. Después de 24 horas, se lavaron y eliminaron las células no adherentes. El medio se cambió cada 3 días y las células se subcultivaron usando tripsina/EDTA al 0.05 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) cuando alcanzaron el 90 % de confluencia.

25

30

Para este estudio se utilizaron MSC adherentes en los pases 3-5. Para la inducción neural, cuerpos embrioides (EB) derivados de las hESC se cultivaron durante 4 días en suspensión con dorsomorfina (DM) 5 μ M (Sigma, St. Louis, MO) y SB431542 (SB) 5-10 μ M (Calbiochem, San Diego, CA) en medio hESC carente de bFGF (Invitrogen), y luego unido a placas recubiertas con Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) en medio 1 $\times$ N2 (Invitrogen) suplementado con 20 ng/ml de bFGF durante los 5 días adicionales (Kim, D. S., Lee, D. R., Kim, H. S., et al. (2012). *PLoSOne*, 7, e39715). Las rosetas neurales que aparecieron en el centro de las colonias de EB unidas se aislaron cuidadosamente utilizando pipetas de vidrio extraídas de las células planas circundantes. Luego se sembraron pequeños grupos de rosetas en placas recubiertas con Matrigel después de una trituración suave y se cultivaron en DMEM/F12 suplementado con 1 $\times$ N2, 1 $\times$ B27 (todos de Invitrogen) (denominado como medio N2B27) más 20 ng/ml de bFGF (Kim, D. S., Lee, J. S., Leem, J. W., et al. (2010). *Stem Cell Reviews and Reports*, 6, 270-281).

35

40

Aislamiento de NPC positivos a PSA-NCAM por MACS

Se expusieron células en roseta neural expandidas al 80-90 % de confluencia a Y27632 (Sigma) 10 μ M durante 1 hora para evitar la muerte celular antes de someterlas al procedimiento MACS. Después de la disociación usando Accutase (Invitrogen), las células ($\sim 1 \times 10^8$ células) se bloquearon brevemente en PBS con BSA al 2 % y luego se incubaron con anticuerpo anti-PSANCAM conjugado con microperlas (Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a 4 ° C. Después de un lavado extenso, la suspensión celular se sometió al procedimiento MACS y las células marcadas positivamente que quedaron en la columna se eluyeron a un tubo con medio de cultivo. NPC^{PSA-NCAM+} aislado se volvió a sembrar en la placa de cultivo a una densidad de $4-5 \times 10^5$ células/cm² en medio N2B27 o medio NBG más 20 ng/ml de bFGF (suplemento 1 $\times$ N2, 0.5 $\times$ B27 y 0.5 $\times$ G21 (Gemini BioProducts, West Sacramento, CA)). El medio de cultivo se cambió todos los días y las células se pasaron cada 2-3 días.

45

50

Establecimiento del modelo de apoplejía e inyección estereotóxica de NPC^{PSA-NCAM+}

Las ratas macho Sprague-Dawley de 2 meses de edad (aproximadamente 250-300 g de peso corporal) se anestesiaron con isoflurano al 3 % (Hana Pharm, Seúl, Corea) en una mezcla al 70-30 % de N₂O a O₂. La arteria carótida común izquierda y la arteria carótida externa se aislaron y se ligaron con una sutura quirúrgica 4-0. Se insertó un hilo de nailon en la arteria carótida interna izquierda y se avanzó hasta el Círculo de Willis (oclusión permanente de la arteria cerebral media: pMCAo). El hilo se dejó en su lugar hasta que se sacrificaron las ratas.

55

60

La inyección estereotóxica de NPC^{PSA-NCAM+}, MSC o PBS se realizó 2 días después de pMCAo. Las ratas se anestesiaron con zoletil (Virbac S.A., Francia, 25 mg/kg) y luego se colocaron en un aparato quirúrgico estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Se insertó una aguja de calibre 26 (jeringa Hamilton, Hamilton, Reno, NV) en el cuerpo estriado izquierdo (coordenadas del bregma: anteroposterior +0.7 mm, mediolateral -2 mm y dorsoventral -5.5 mm, -2.5 mm desde las meninges); se inyectaron 5 μ l de NPC^{PSA-NCAM+} o MSC (1×10^5 células/ μ l cada una) o PBS en los sitios de 5.5 mm y -2.5 mm. Todas las células se infundieron constantemente en el cuerpo estriado izquierdo a

65

una rata de 1 µl/minuto con agitación continua para evitar la agregación celular. Nueve animales murieron mientras se realizaba la cirugía de pMCAo y el trasplante de células.

- 5 Todos los animales se alojaron en la instalación aprobada por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC), utilizando un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. El experimento fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB No. 4-2011-0087).

Pruebas de comportamiento

- 10 Prueba de falla de pie: La prueba de falla de pie mide la precisión de la colocación de la pata delantera en una rejilla equidistante (60×60 cm, 6 cm de distancia) durante un período de prueba de 2 minutos. Esta prueba fue un procedimiento modificado que se basa en el estudio anterior [12, 13].

- 15 Prueba de comportamiento asimétrico: la prueba de balanceo corporal elevado modificado se adaptó del reporte anterior. Se examinó a las ratas en busca de movimientos laterales después de la elevación por sus colas hasta 10 cm por encima de la superficie del área de prueba. La frecuencia del balanceo a la izquierda o a la derecha se calificó durante 1 minuto. El valor de la puntuación asimétrica se calculó mediante las siguientes puntuaciones; puntuación 0: torsión del torso, balanceo de izquierda y derecha, puntuación 1: torsión asimétrica <30 °, puntuación 2: torsión asimétrica >30 °. De acuerdo con la dirección de la torsión del torso, la puntuación se contó como torsión ipsilateral (igual que el sitio del infarto) o torsión contralateral (opuesta al sitio del infarto).

- 25 Ensayo de equilibrio en barra: el aparato para caminar sobre una barra está compuesto por una barra (100x5x2 cm). El rendimiento motor se calificó en una escala de 6 puntos adaptada de una descripción anterior; puntuación 1: equilibrio con una postura estable y patas en la parte superior de la barra, puntuación 2: agarra el lado de la barra y tiene movimiento inestable, puntuación 3: una o más patas se deslizan fuera de la barra, puntuación 4: intenta mantener el equilibrio en la barra pero se cae, puntuación 5: cae sobre la barra pero se cae, puntuación 6: se cae de la barra sin intentar equilibrarse.

- 30 Prueba de tracción prensil: la porción prensil de la prueba implica la capacidad de la rata para colgarse de la cuerda horizontal por sus patas delanteras. La prueba de tracción prensil se utilizó para medir la fuerza muscular de la rata. Esta prueba fue adaptada de pruebas similares descritas anteriormente. La barra de acero (2 cm de diámetro, 100 cm de longitud) se colocó horizontalmente a 70 cm por encima de la almohadilla de goma esponjosa (7.5 cm de espesor). Se colocaron las patas delanteras de la rata sobre la barra de acero y se soltó al animal. Se dejó que la rata colgara de la barra de acero durante hasta 5 segundos. Se anotó el tiempo de caída y si la rata llevó o no la extremidad trasera a la barra con las siguientes puntuaciones; puntuación 0: la rata se agarra durante 5 segundos y levanta la extremidad trasera, puntuación 1: la rata se agarra durante 5 segundos y no levanta la pata trasera, puntuación 2: la rata se agarra durante 3-4 segundos, puntuación 3: la rata se agarra durante 0-2 segundos.

- 40 Puntuación de gravedad neurológica modificada (mNSS): la puntuación de gravedad neurológica es una combinación de pruebas motoras, sensoriales y reflejas como se describió anteriormente. Las cuantificaciones objetivas se basaron en la prueba de comportamiento asimétrico, prueba de equilibrio en barra, prueba de tracción prensil, prueba de campo abierto (frecuencia de rotación) y la prueba de falla de pie con las siguientes puntuaciones; puntuación 0: sin déficits, puntuación 2: dificultad para extender completamente la extremidad anterior contralateral (3≤ falla del pie delantero <10), puntuación 4: incapaz de extender la extremidad anterior contralateral (falla del pie delantero ≥10), puntuación 6: círculos suaves hacia el lado contralateral (1≤ rotación o torsión asimétrica <5), puntuación 8: círculos severos (rotación o torsión asimétrica ≥ 5), puntuación 10: caída hacia el lado contralateral (tracción prensil ≤2).

Análisis y cuantificación inmunohistoquímica

- 50 El cerebro se fijó durante 24 horas en paraformaldehído al 4 % y se lavó con PBS. Para las secciones de parafina, los tejidos se deshidrataron en una serie de etanol graduado y luego se incrustaron en parafina. El cerebro incrustado en parafina se seccionó en capas de 5 µm de espesor en un micrótom, se desparafinó en xileno durante 10 minutos y se rehidrató en una serie de alcohol graduado. Las secciones se trataron con ácido cítrico 10 mM durante 1 hora seguido de la adición de una solución de BSA al 5 % que contenía PBS y Triton X-100 al 0.5 %. Posteriormente, las secciones de cerebro se incubaron con anticuerpos primarios contra DCX (Abcam), Tuj1 (Covance), hNu (Millipore, clon 235-1), GFAP (Millipore), Ki67 (Leica Microsystems), hMito (Millipore), MAP2 (Millipore), Nestina humana (Millipore, clon 10C2) o ED-1 (Abcam) (1:100) durante 10-12 horas a 4 °C. Después de la incubación durante la noche con los anticuerpos primarios, las secciones se lavaron con PBS antes de incubarlas con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, IgG anticonejo, durante 31 horas. A continuación, las secciones se lavaron una vez más con PBS antes de montarlas con 1 µg/ml de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se utilizó un microscopio fluorescente (Olympus IX71) para producir imágenes fluorescentes de las secciones. Para determinar con precisión la cantidad de células neuronales en el cerebro que reaccionaron con anticuerpos específicos, se utilizó una prueba a ciegas. Se pidió a tres individuos, todos los cuales no tenían conocimiento previo del experimento, que contaran el número de células ED-1⁺ y vasos α-SMA⁺ (con un diámetro de 50 µm o menos) en cinco de los cuadrados con 50 mm² en una lámina. Luego, un investigador tomó los resultados de los tres individuos para determinar con precisión el número de neuronas detectadas.

Veintiséis días después del trasplante, las ratas ($n = 10$ por grupo) se anestesiaron con zoletil (Virbac S.A., Francia, 25 mg/kg) y se perfundieron con PBS y paraformaldehído al 4 % en PBS (pH 7.5).

Para la medición del área de infarto, las secciones de cerebro se tiñeron con hematoxilina y se fotografiaron con un microscopio (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se calculó el área de la lesión indirecta, en la que se restó el área intacta del hemisferio ipsilateral del área del hemisferio contralateral. El área de infarto relativo se analizó con el programa NIH Image J (versión 1.47). Se presentó como un porcentaje promedio de la lesión indirecta en comparación con el hemisferio contralateral.

Reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

El ARN total se aisló usando reactivo Trizol (Invitrogen). La transcripción inversa (RT) estándar se realizó primero utilizando Transcriptasa II (Invitrogen) y luego, la RT-PCR se realizó con un conjunto de cebadores de PCR específicos: cebador de avance: TGTGTCCATCAGCTCCAGTTGC, cebador reverso: CGGCTACCATGCTCGAGATAGG para angiopoyetina 1 (Bioneer, Daejeon, Corea). Los productos de PCR se ejecutaron en gel de agarosa al 1.2 % y luego se tiñeron con bromuro de etidio para detectar bandas (tamaño aproximado: 400 pares de bases) bajo luz ultravioleta. Finalmente, las bandas detectadas se cuantificaron mediante el uso del programa NIH Image J (versión 1.47).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media $\pm$ S.E.M. Los datos de la prueba de comportamiento y área de infarto fueron analizados por ANOVA y prueba t independiente usando el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS) versión 20.0. Las diferencias con valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Resultados

Trasplante de NPC^{PSA-NCAM+} Área de infarto reducida en cerebro huésped

El diseño general de este experimento se muestra en la figura 1a. La gravedad del daño del tejido neural se determinó como el área del cerebro que normalmente no se tiñe con hematoxilina el día 26 después del trasplante. Las lesiones por infarto aparecieron principalmente en la corteza y el cuerpo estriado. El área de infarto fue obviamente mayor en los cerebros isquémicos tratados con PBS que en los trasplantados con MSC o NPC^{PSA-NCAM+} (Figura 1b). El porcentaje de área de infarto en relación con el lado contralateral se redujo significativamente en ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} (7.1 ± 2.5 %) o MSC (14.9 ± 1.9 %) en comparación con el del grupo de PBS (25.1 ± 2.4 %) ($F = 13.64$, $P < 0.01$). Aunque las áreas de infarto de los grupos trasplantados con NPC^{PSA-NCAM+} y MSC no fueron estadísticamente diferentes, las ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} obviamente mostraron un área de infarto más pequeña que la de las ratas trasplantadas con MSC (Figura 1c).

Trasplante de NPC^{PSA-NCAM+} Rendimiento conductual mejorado de un modelo de apoplejía de rata

Las ratas perdieron 40 g de su peso corporal en comparación con una línea base medida el primer día después de pMCAo. La pérdida de peso alcanzó el máximo el día 7 después del tratamiento en ratas tratadas con PBS. En el grupo trasplantado con MSC, el peso corporal se recuperó al estado de línea base el día 17 después del trasplante. Sin embargo, la recuperación significativa del peso corporal comenzó a aparecer desde el día 3 después del trasplante en el grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+} en comparación con los controles PBS ($P < 0.05$) (Figura 2a). Después de pMCAo, las fallas de pie disminuyeron significativamente en ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} y MSC en comparación con controles PBS, desde el día 3 ($P < 0.05$) hasta el día 13 ($P < 0.01$) (Figura 2b). Además, el grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+} mostró una reducción significativa en las fallas del pie/cruce de líneas en comparación con el grupo trasplantado con MSC el día 13. Sin embargo, esto fue menos evidente en los días posteriores (días 17 y 24 después del trasplante) cuando la actividad de los animales disminuyó debido al aumento de peso.

Si bien todas las ratas mostraron relativamente poca asimetría en EBTS antes de pMCAo, la asimetría fue evidente en todos los animales después de pMCAo. El día 3 posttrasplante, los grupos trasplantados con NPC^{PSA-NCAM+} y MSC comenzaron a mostrar un comportamiento de torsión ipsilateral. Mientras que el grupo trasplantado con MSC mostró una mejora modesta hasta el día 13 después del trasplante ($P < 0.05$), la puntuación de comportamiento asimétrico disminuyó significativamente en el grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+} el día 7 y se prolongó hasta el día 24 después del trasplante ($P < 0.01$) (Figura 2c).

El trasplante NPC^{PSA-NCAM+} también mejoró la recuperación funcional en la prueba de equilibrio en barra desde el día 3 al 24, en comparación con el grupo trasplantado con MSC y los controles PBS ($P < 0.01$) (Figura 2d). El trasplante de NPC^{PSA-NCAM+} aumentó significativamente el tiempo de retención en la barra, que está bien correlacionado con la coordinación motora, mientras que no se mostró ninguna diferencia estadística entre los grupos tratados con MSC y PBS.

La puntuación de tracción prensil, relacionada negativamente con la fuerza muscular de la pata delantera, disminuyó gradualmente en el grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+} desde el día 3 hasta el 24 ($P < 0.01$) (Figura 2e). El grupo trasplantado con MSC también mostró un patrón similar de mejora desde el día 7 hasta el 24 después del trasplante.

5 Para normalizar las cuantificaciones del resultado neurológico, los presentes inventores finalmente evaluaron los criterios de mNSS con base en una puntuación de comportamiento asimétrico, prueba de equilibrio de barra, prueba de tracción prensil, prueba de campo abierto (frecuencia de rotación, datos no mostrados) y prueba de falla en el pie. El mNSS mostró que la recuperación progresiva en la función neurológica se vuelve significativa después del día 3 en los grupos trasplantados tanto con NPC^{PSA-NCAM+} como con MSC en comparación con los grupos tratados con PBS ($P < 0.05$) (Figura 2f). Además, el grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+} mostró una mejora sustancial en comparación con el grupo trasplantado con MSC desde el día 7 hasta el 24 ($P < 0.01$). El efecto del grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+} fue especialmente evidente desde el día 3 hasta el 7, lo que sugiere un fuerte efecto paracrino en el punto de tiempo temprano después del trasplante.

15 NPC^{PSA-NCAM+} trasplantado sobrevivió y fue diferenciado con compromiso neuronal en cerebro huésped

Para rastrear el destino de las células trasplantadas, los presentes inventores realizaron análisis histológicos con anticuerpos hNu (núcleos específicos de humanos), Ki67 (marcador de células proliferantes), DCX (marcador de neuroblastos), nestina (marcador de células madre neurales) y Tuj1 (marcador neuronal) en el día 26. Después del trasplante de NPC^{PSA-NCAM+}, la mayoría de las células se encontraron en el sitio de trasplante original (es decir, el cuerpo estriado). La supervivencia, proliferación y diferenciación de NPC^{PSA-NCAM+} trasplantadas fueron confirmadas por las células Ki67+, DCX+, Tuj1+ y nestina+ en el cerebro dañado (Figuras 3a y 3b). La mayoría de NPC^{PSA-NCAM+} trasplantados expresaron DCX o Tuj1, mientras que una porción de ellos fue positiva para nestina. El estado mitótico de las células trasplantadas fue revelado por la inmunorreactividad de Ki67. Un subconjunto de células hNu+ (9184 recuentos) fue positivo para Ki67 (432 células) el día 26 después del trasplante (4.7 %). La inmunorreactividad de Tuj-1 se solapaba en gran medida con la de DCX en NPC^{PSA-NCAM+} (Figura 3b). Estas células inmunorreactivas a DCX no eran de origen de rata sino de origen humano (Figura 3c), lo que implica que el área de infarto cerebral reducida observada con NPC^{PSA-NCAM+} se debió en parte a la integración de células trasplantadas.

30 Mientras que muchos NPC^{PSA-NCAM+} trasplantados demostraron una buena supervivencia e integración en el tejido dañado, sólo se detectaron unas pocas MSC con expresión de hNu el día 26 después del trasplante (Figura 3d). La mayoría de las NPC^{PSA-NCAM+} injertadas eran células neuronales inmaduras (es decir, células positivas a DCX con una fracción de células positivas a Ki67) (Figura 3b). Por el contrario, las MSC trasplantadas (células hNu+) no exhibieron positividad para DCX en las lesiones, y un pequeño número de células hNu-Ki67+ en proliferación estaban dentro y alrededor del tracto de la aguja en la mayoría de los casos de grupos injertados con MSC (Figura 3d).

Mientras que las células hMito+MAP2+ y hNu+MAP2+ doblemente marcadas se detectaron en ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} (Figuras 4a y 4b), hMito+GFAP+ (Figura 4d) o hMito+GalC+ (datos no mostrados) las células coteñidas eran apenas detectables, lo que indica que NPC^{PSA-NCAM+} son células progenitoras con compromiso principalmente neuronal. No se observaron células hMito+ en el cuerpo estriado contralateral (Figura 4c).

Trasplante de NPC^{PSA-NCAM+} Activación glial reactiva suprimida en el cerebro huésped

45 La expresión de GFAP (marcador de astrocitos) fue notablemente baja en el grupo trasplantado con NPC^{PSA-NCAM+}, aunque se encontraron algunas células positivas para GFAP a lo largo de las huellas de las agujas (Figura 4e). De hecho, el número de células positivas para GFAP se redujo en gran medida en el grupo NPC^{PSA-NCAM+} ($P < 0.001$), y en menor grado en el grupo trasplantado con MSC ($P < 0.05$) en comparación con el del grupo PBS (Figura 4e, f). Estos hallazgos sugieren que el trasplante con NPC^{PSA-NCAM+} suprimió intensamente la activación de astrocitos reactivos, promoviendo así un entorno favorable para la reparación de tejidos (González, F.F., McQuillen, P., Mu, D., et al. (2007). Developmental Neuroscience, 29, 321-330).

La apoplejía isquémica induce una respuesta microglial adversa acompañada de daño tisular. Por tanto, los presentes inventores examinaron la activación microglial en tejidos cerebrales isquémicos el día 26 después del trasplante usando un anticuerpo ED1 que reconoce CD68 (marcador microglial activo) (Figura 4e). Es de importancia que el número de células positivas para ED1 disminuyó significativamente en el grupo NPC^{PSA-NCAM+} ($P < 0.001$), y en menor grado en el grupo trasplantado con MSC ($P < 0.05$) (Figura 4f). Aunque se detectaron células hNu+ en el cuerpo estriado después de 6 meses, no hubo signos de teratoma en ninguno de los injertos u otras regiones de los cerebros trasplantados con NPC^{PSA-NCAM+}.

60 Trasplante de NPC^{PSA-NCAM+} Angiogénesis potenciada en el cerebro huésped

Se examinó la angiogénesis endógena en tejidos cerebrales isquémicos usando anticuerpo α -SMA, un marcador de actina del músculo liso. Como resultado, se observó que el número de vasos reactivos con α -SMA en ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} aumentó alrededor del sitio del injerto, en comparación con los de los grupos tratados con MSC y PBS (Figura 5a, b). El análisis cuantitativo de microvasos demostró claramente que los vasos de α -SMA+

en ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} aumentaron en el área de infarto, en comparación con los de los grupos tratados con MSC y PBS (Figura 5c).

Cuando se investigaron los niveles de expresión del marcador proangiogénico, angiopoyetina-1, en los tejidos cerebrales usando RT-PCR el día 7 y 26 después del trasplante, los niveles fueron sustancialmente más altos en ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} el día 26 que otros grupos ($P < 0.05$) (Figura 5d), lo que sugiere la inducción de angiogénesis por NPC^{PSA-NCAM+} superviviente a largo plazo. Las ratas trasplantadas con NPC^{PSA-NCAM+} en el día 26 también demostraron un patrón creciente de angiopoyetina-1 en comparación con su nivel en el día 7, mientras que la angiopoyetina-1 en ratas tratadas con MSC en el día 26 no cambió o disminuyó ligeramente en comparación con el nivel en el día 7. Sin embargo, las ratas tratadas con MSC mostraron un patrón creciente el día 7 en comparación con el del grupo tratado con PBS ($P < 0.05$).

Ejemplo 2: Efecto del tratamiento del secretoma de células precursoras neurales sobre enfermedad isquémica y enfermedad neuroinflamatoria

Materiales y métodos

Células NPC^{PSA-NCAM+} derivadas de ESC humano

El uso de células humanas fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB No. 4-2008-0643). Para la inducción neural, se cultivaron cuerpos embrioides (EB) derivados de hESC y iPSC durante 4 días en suspensión con dorsomorfina (DM) 5 μ M (Sigma, St. Louis, MO) y SB431542 (SB) 5-10 μ M (Calbiochem, San Diego, CA) en medio hESC privado de bFGF (Invitrogen), y luego adherido a placas recubiertas con Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) en medio 1×N2 (Invitrogen) suplementado con 20 ng/ml de bFGF durante los 5 días adicionales (Kim, D.S., Lee, D.R., Kim, H.S., et al. (2012). Precursores neurales positivos para PSA-NCAM altamente puros y expandibles de ESC humana y rosetas neurales derivadas de iPSC. PLoSOne, 7, e39715). Las rosetas neurales que aparecieron en el centro de las colonias de EB unidas se aislaron cuidadosamente utilizando pipetas de vidrio extraídas de las células planas circundantes. Luego se sembraron pequeños grupos de rosetas en placas recubiertas de Matrigel y se cultivaron en DMEM/F12 suplementado con 1×N2, 1×B27 (Invitrogen) (Kim, D.S., Lee, J.S., Leem, J.W., et al. (2010). Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. Stem Cell Reviews and Reports, 6, 270-281).

Se expusieron células en roseta neural expandidas al 80-90 % de confluencia a Y27632 (Sigma) 10 μ M durante 1 hora para evitar la muerte celular antes de someterlas al procedimiento MACS. Después de la disociación usando Accutase (Invitrogen), las células (1×10^8 células o menos) se bloquearon brevemente en PBS con BSA al 1 % y luego se incubaron con anticuerpo anti-PSA-NCAM conjugado con micropérlas (Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a 4 ° C. Después de un lavado extenso, la suspensión celular se sometió al procedimiento MACS y las células marcadas positivamente que quedaron en la columna se eluyeron a un tubo con medio de cultivo. NPC^{PSA-NCAM+} aislado se volvió a sembrar en la placa de cultivo a una densidad de 4 a 5×10^5 células/cm² en medio N2B27 o medio NBG más 20 ng/ml de bFGF (suplemento 1×N2, 0.5×B27 y 0.5×G21 (Gemini BioProducts, West Sacramento, CA)). El medio de cultivo se cambió todos los días y las células se pasaron cada 2-3 días.

Aislamiento de secretoma en células precursoras neurales (NPS) derivadas de células madre pluripotentes humanas

Las células precursoras neurales de células madre pluripotentes humanas obtenidas (células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM) se cultivaron y amplificaron repetidamente durante 4 pases o más en una placa de 60 mm recubierta con Matrigel con suplementos de eliminación de suero de N2 (100X concentración final 1X), B-27 (50X concentración final 0.5X) y Gem21 (50X concentración final 0.5X) y bFGF (20 ng/ml) en un cultivo base (DMEM/F-12), y luego cultivado en 8-10 placas hasta que las células alcanzaron un 90 % de confluencia. Después de la eliminación del líquido de cultivo, las células se lavaron tres veces con solución salina regulada con fosfato y se cultivaron durante 24 horas en un líquido de cultivo base libre de suero (DMEM/F12) suplementado solo con ITS (100X concentración final 1X) y bFGF (20 ng/ml). Para un control, se colocó la misma cantidad de líquido de cultivo base con la misma composición (líquido de cultivo base suplementado con la misma cantidad de ITS y bFGF) en una placa sin células, se cultivó en una incubadora durante 24 horas y luego se recolectó. Todo el líquido de cultivo se recolectó y se centrifugó (800 g a 30 min) para eliminar los restos celulares y luego se congeló directamente en un congelador a -70 ° C y, cuando fue necesario, se descongeló antes de su uso.

Establecimiento del modelo de apoplejía

Para medir los efectos protectores neurales frente al daño neural debido a la apoplejía isquémica local, se utilizó un método de sutura intraluminal aplicada. Este método es un modelo de apoplejía isquémica local desarrollado por Zia Longa (Zea Longa, et al, Stroke., 1989, 20, 84-91), y una ventaja de similitud clínica, a diferencia de otros modelos. Por esta razón, este modelo es adecuado para buscar el mecanismo de isquemia-reperusión o el cribado de los efectos de varios fármacos.

- Después de la aclimatación durante una semana, los animales (rata macho Sprague-Dawley, peso corporal 250-300 g) se anestesiaron usando una máquina de anestesia respiratoria y se usó isoflurano como fármaco anestésico. Las ratas blancas se sometieron primero a anestesia general usando una mezcla de gas de N₂O al 80 % y O₂ al 20 %, e isoflurano al 5 %, que luego se mantuvo al 2-2.5 % para la anestesia. Para el establecimiento del modelo de apoplejía, se hizo una incisión en la piel del cuello izquierdo de las ratas blancas, y luego se aislaron la arteria carótida común, arteria carótida externa y arteria carótida interna, y las arterias respectivas se ataron ligeramente con un hilo de seda negro para bloquear el flujo de sangre. La arteria carótida común se cortó por la mitad y la sonda de nailon 4-0 de 25 mm con un extremo de 0.40 mm, obtenida redondeando el extremo de la sutura de nailon con cauterio, se insertó a través de la sección cortada. La sonda de nailon insertada en la arteria carótida externa se insertó y se fijó en la arteria cerebral media a través de la arteria carótida interna. Después de insertar la sonda a aproximadamente 18-20 mm del sitio de la ramificación de la arteria carótida común, se bloqueó el origen de la arteria cerebral media y luego se fijó con un hilo para ocluir permanentemente la arteria cerebral media. A continuación, se suturó de nuevo el sitio de la incisión en la piel y, a continuación, las ratas se recuperaron naturalmente de la anestesia.
- 15 Inyección de Secretoma en el modelo de apoplejía a través de la arteria cerebral y prueba de comportamiento
- Una vez establecida la línea base para la prueba de comportamiento un día después de la inducción de la apoplejía, se inserta una aguja de jeringa de insulina en la arteria carótida interna a través de la arteria carótida externa derecha de la misma manera que se estableció el modelo de apoplejía, y a través de la aguja, se inyectó intraarterialmente 0.2 mg/kg (volumen 50 µl) del secretoma, y se administró el mismo volumen del líquido de cultivo o solución salina regulada con fosfato (PBS) como control. Después de la inyección del líquido del secretoma, se observó el estado de los animales durante 14 días. La medición del peso se realizó una vez antes de la inyección y cuatro veces después de la inyección, y se realizó el análisis de comportamiento.
- 25 1) Prueba de torsión del torso: Para probar la postura de la parte superior del cuerpo considerada como el sentido de la corteza cerebral y el cuerpo estriado de los animales, se midió el comportamiento asimétrico.
- 2) Prueba de equilibrio en barra: se evaluó la función vestibulomotora general mediante la postura estable de los animales en la barra estrecha.
- 30 3) Prueba de falla del pie: esta prueba se utiliza cuando se prueban el ajuste (cooperación) y unificación (integración) del movimiento motor. La falla del pie se define porque la pata cae entre las barras de la rejilla o la rata coloca en lugar equivocado una extremidad anterior o posterior. La falla del pie es simétrica en animales normales.
- 35 4) Prueba de tracción prensil: La porción prensil de la prueba implica la capacidad de la rata para colgarse de la cuerda horizontal por sus patas delanteras. La prueba de tracción prensil se utilizó para medir la fuerza muscular de la rata. Esta prueba fue adaptada de pruebas similares descritas anteriormente. La barra de acero (2 cm de diámetro, 100 cm de longitud) se colocó horizontalmente a 70 cm por encima de la almohadilla de caucho esponjosa (7.5 cm de espesor). Se colocaron las patas delanteras de la rata sobre la barra de acero y se soltó al animal. Se dejó que los animales se colgaran de la barra de acero durante hasta 5 segundos. Se anotó el tiempo de caída y si los animales llevaron o no la extremidad trasera a la barra con las siguientes puntuaciones; puntuación 0: la rata se agarra durante 5 segundos y levanta la extremidad trasera, puntuación 1: la rata se agarra durante 5 segundos y no levanta la pata trasera, puntuación 2: la rata se agarra durante 3-4 segundos, puntuación 3: la rata se agarra durante 0-2 segundos.
- 40 5) Prueba de campo abierto: esta prueba se utiliza para conocer los niveles generales de actividad de caminar. Los patrones de actividad, emoción y comportamiento de los animales se midieron midiendo directamente los aspectos y características del comportamiento.
- 45 6) Puntuación de gravedad neuronal modificada (mNSS): la puntuación es una puntuación total de los valores de las pruebas motoras, sensoriales, equilibrio, reacción y emoción obtenidas a través de las diversas pruebas anteriores, y la puntuación se calcula mediante los siguientes criterios (mNSS se mide sumando puntajes para cada materia).
- 50 -Prueba de campo abierto (midiendo emoción, actividad y patrones de comportamiento de los animales).
- 55 Sin movimiento: 3
- 1-20: 2
- 21-30: 1
- 60 30 o más: 0
- Prueba de tracción prensil (medida muscular)
- 65 0-5 segundos: 3

- 6-10 segundos: 2
- 11-20 segundos: 1
- 5 21 segundos o más: 0
- Prueba de equilibrio en barra (medición del sentido del equilibrio)
- Puntuación 0: 1 = postura estable
- 10 2 = agarra el lado de la barra y tiene un movimiento inestable
- Puntuación 1: 3 = una o más patas se deslizan de la barra.
- 15 4 = intenta mantener el equilibrio en la barra pero se cae
- Puntuación 2: 5 = cubre la barra pero se cae.
- 6 = se cae de la barra sin intentar equilibrarse
- 20 -Prueba de falla del pie (capacidad de cooperación motora)
- 0-5 segundos: 0
- 25 6-10 segundos: 1
- 11-20 segundos: 2
- 21 segundos o más: 3
- 30 -Prueba de postura de la parte superior del cuerpo (prueba de comportamiento asimétrico)
- 0: 2
- 35 1-4: 1
- 5 o más: 0
- 40 Las ratas blancas se anestesiaron con zoletil 14 días después de la inducción isquémica y se sometieron a un pulmón abierto y una incisión en la aurícula derecha. Se inyectó una aguja en el ventrículo izquierdo, y luego, se perfundió el corazón con PBS usando una bomba para eliminar el flujo sanguíneo, y luego se extrajo el tejido cerebral. Las secciones de tejido para la construcción de la muestra se incrustaron en parafina sobre la base de bregma. Para verificar el tejido cerebral dañado, las secciones de tejido cerebral se tiñeron con hematoxilina y se deshidrataron, y la lámina se fotografió con una cámara digital y luego se transfirió a una computadora. El porcentaje de área de infarto se calculó mediante la ecuación 1 utilizando un programa de análisis de imágenes (imagen J).
- 45 Ecuación 1
- 50
$$\text{Porcentaje de infarto (\%)} = (\text{el área del hemisferio contralateral} - \text{el área intacta del hemisferio ipsilateral}) / \text{el área del hemisferio contralateral} \times 100$$
- Secretómicos
- 55 El secretoma de las células precursoras neurales derivadas de hESC y el secretoma de las células precursoras neurales derivadas de iPSC humana se separaron en SDS-PAGE usando gel Novex Bis-Tris de gradiente 4-12 % (Invitrogen), y luego los geles se tiñeron con Gel Code Blue reactivo de tinción (Pierce) para mostrar bandas de proteínas. Los geles teñidos se cortaron en 10 bandas del mismo tamaño, que luego se sometieron a digestión triptica en gel mediante un método conocido.
- 60 Los péptidos preparados por digestión triptica en gel se analizaron mediante el espectrómetro de masas LinearTrap Quadrupole (LTQ) (Thermo Finnigan) acoplado con cromatografía líquida Nano Ultra Performance (Eksigent Technologies). Específicamente, se aplicaron péptidos tripsinizados a una columna analítica (75 μm x11 cm) empaquetada con resina C18 regular de 5 μm de tamaño. Se logró un gradiente lineal de 45 minutos desde el 97 % de disolvente A (ácido fórmico al 0.1 % en agua destilada) hasta el 60 % de disolvente B (ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo) a una tasa de flujo de 0,3 $\mu\text{l/min}$ uto. Los iones de péptidos separados se sometieron a electroaspersión en la fuente de ionización por nanoelectroaspersión (ESI). Todos los espectros de MS/MS se adquirieron mediante
- 65

barridos dependientes de datos en los que se seleccionaron los cinco espectros más abundantes del barrido de MS completo para su fragmentación. El recuento de repeticiones para la exclusión dinámica se estableció en 1, la duración de la repetición fue de 30 segundos, la duración de la exclusión dinámica se estableció en 180 segundos, el ancho de la masa de exclusión fue de 1.5 Da y la lista de exclusión dinámica fue de 50.

La identificación de péptidos y proteínas se investigó a partir de la base de datos ipi.HUMAN v3.76 (89 378 entradas) usando el algoritmo Turbo-SEQUEST (Thermo Finnigan). Tras la investigación de la base de datos, los péptidos y proteínas identificados se confirmaron utilizando el almacén 2 (Proteome Software). Entre los péptidos obtenidos de la búsqueda SEQUEST, se seleccionó un conjunto de péptidos con una probabilidad de PeptideProphet superior a 0.95. Además, una lista de proteínas que tenían una probabilidad de ProteinProphet superior a 0.99 y también tenían más de dos péptidos únicos obtenidos.

Análisis estadístico

La significancia estadística entre los grupos se obtuvo mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con corrección de Tukey, y se determinó que un valor de $p < 0.05$ era estadísticamente significativo.

Resultados

Para investigar el alivio de la enfermedad por el secretoma de las células precursoras neurales en un modelo de apoplejía, se probaron los siguientes tres grupos durante 2 semanas. A las 24 horas después de la inducción de la apoplejía, las ratas blancas con la enfermedad inducida confirmada por la prueba de comportamiento se distribuyeron arbitrariamente en tres grupos y un volumen igual (50 μl) del secretoma (0.2 mg/kg, volumen 50 μl), medio o PBS se inyectó en la arteria carótida externa derecha. Se monitorizó la condición y el peso de los animales a los 3, 7, 10 y 14 después de la inyección de cada material, y se realizó un análisis de comportamiento.

[Tabla 1]

Grupo	Descripción
Control con PBS	Grupo tratado con PBS después de la inducción de una apoplejía
Control con medio	Animal con apoplejía tratado con medio basal no condicionado
Grupo tratado con secretoma	Animal con apoplejía tratado con medio condicionado (secretoma) derivado de cultivo de células precursoras neurales

Resultados del análisis de lesiones isquémicas

La inducción de apoplejía a través de MCAO permanente en ratas blancas indujo una lesión cerebral extensa. El cerebro se extrajo 14 días después de la inducción de la apoplejía, y luego se confirmaron el daño y los sitios dañados del cerebro mediante tinción con TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio). La tinción de TTC se produce por una reacción con el sistema enzimático oxidativo mitocondrial normal en células, y las mitocondrias dañadas por daño isquémico no se tiñen debido a la alteración del sistema oxidativo, mostrándose de color blanco, que puede diferenciar los sitios dañados del cerebro.

Como se muestra en la figura 7, el daño inducido por la oclusión de la arteria cerebral media apareció principalmente en la corteza y el cuerpo estriado (figura 7). La inyección del secretoma de células precursoras neurales redujo el área de la lesión isquémica (tamaño del infarto). El control con PBS mostró aproximadamente el daño del 60 % del cerebro derecho y el control con medio mostró aproximadamente el 46 %, pero el grupo tratado con secretoma mostró un sitio dañado de aproximadamente el 29 %, que fue reducido significativamente en comparación con los controles.

Resultados del análisis de peso corporal

La inducción de la apoplejía reduce el rendimiento motor de ratas blancas, la pérdida de peso inmediata avanzó en 7 días y diversos agentes de tratamiento indujeron el aumento de peso corporal a través de la recuperación del rendimiento motor. La inyección del secretoma también indujo el aumento de peso corporal similar al trasplante celular (Figura 8). La recuperación del peso corporal fue notable en la recuperación del daño neural. El grupo tratado con secretoma mostró una mejora significativa en comparación con el control con PBS.

Resultados del análisis de comportamiento

El grupo tratado con secretoma mostró un efecto de mejora del comportamiento estadísticamente significativo en comparación con los dos controles en la prueba de equilibrio en barra, y hubo un efecto inmediato, por ejemplo, el efecto se mostró desde el día 3 posttratamiento (figura 9).

Además, el grupo tratado con secretoma mostró un efecto estadísticamente significativo en comparación con los dos controles el día 7 posttratamiento (inyección) en la prueba de tracción prensil.

Además, la inyección del secretoma mostró el efecto de reducción en la frecuencia de fallas del pie en una red (figura 9c). La inyección del secretoma también mostró una mejora en la línea cruzada para medir la actividad del comportamiento por unidad de tiempo.

Resultados del análisis de la puntuación de gravedad neurológica modificada (mNSS)

La prueba de puntuación de gravedad neurológica modificada (mNSS) es una tabla compuesta para medir las funciones neurológicas. Se evaluaron elementos motores (estado muscular) y sensoriales (visión, tacto y propioceptivo). La puntuación normal es 0 y cuanto más alta es, más graves son las disfunciones. Como se muestra en la figura 10, el grupo tratado con secretoma mostró un efecto de tratamiento significativamente mayor (mejora del comportamiento) desde el tratamiento temprano en el análisis de mNSS, en comparación con el control con PBS y el control con medio (figura 10).

En la prueba mNSS, el control con PBS mostró que la puntuación promedio fue 5.4 el día 1 y 5.5 el día 14 después de la inducción isquémica, lo que indica que se mantenían los trastornos neuroconductuales provocados por la apoplejía. El control con medio mostró un efecto de mejora temporal del comportamiento en el día 3 de tratamiento, pero no ejerció un efecto de mejora adicional. Mientras que, el grupo tratado con secretoma mostró un efecto de mejora continua del comportamiento desde el día 3 de tratamiento (puntuación mNSS: 4.5) hasta el día 10 de tratamiento (puntuación mNSS: 3).

Resultados del análisis de secretoma

El secretoma obtenido a partir de células precursoras neurales derivadas de iPSCs incluye las siguientes proteínas: Agrina, anexina A5, BSG (Basigin), biglicano, calponina-3, proteína tipo coactosina, cofilina-1, colágeno alfa-2, culina-3, destrina, distroglicano, efrina-B2, exportina-2, ezrina, fibronectina, fibulina-1, proteína relacionada con Frizzled, proteína de enlace a gelatina-3, granulinas, factor 11 de crecimiento/diferenciación, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, importina-9, proteína 2 de enlace al factor de crecimiento tipo insulina, proteína Lupus La, factor inhibidor de la migración de macrófagos, midquina, moesina, neuropilina 2, pleiotrofina, profilina-1, proteína DJ-1, radixina, proteína 2 secretada relacionada con Frizzled, septina-11, talina-1, testicano, timopoyetina, transgelina-3 y vimentina.

El secretoma obtenido a partir de células precursoras neurales derivadas de células madre embrionarias humanas incluye las siguientes proteínas: agrina, anexina A2, atractina, biglicano, ceruloplasmina, cofilina-1, colágeno alfa-1, coronina-1X, dermicidina, DERP12, eprina-B3, exostosina-2, ezrina, proteína de enlace a gelatina-3, granulinas, factor 11 de crecimiento/diferenciación, haptoglobina, hemopexina, proteína B2 del grupo de alta movilidad, hornerina, proteína 2 de enlace al factor de crecimiento tipo insulina, proteína Lupus La, midquina, moesina, múltiples dominios tipo factor de crecimiento epidérmico proteína 8, nidogen-1, paratimosina, profilina-2, proteína DJ-1, proteína 2 relacionada con Frizzled secretado, secretogranina, talina-1, timosina beta-4, TGFBI (proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento beta transformante), transgelina y vimentina.

Listado de secuencias

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, Yonsei University

<120> Una composición para el tratamiento de enfermedades isquémicas o neuroinflamatorias que comprende células precursoras neurales o Secretoma Therir

<130> PP150076

<140> 15812792.8

<141> 2015-06-26

<150> KR 10-2014-0080009

<151> 2014-06-27

<160> 2

<170> Kopatente In 2.0

<210> 1

<211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador de avance para angiopoyetina-1
 10 <400> 1
 tgtgtccatc agctccagtt gc 22
 15 <210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador inverso para angiopoyetina-1
 <400> 2
 30 cggctaccat gctcgagata gg 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para uso en el tratamiento de enfermedad isquémica, conteniendo la composición células precursoras neurales positivas a la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM) como ingrediente activo
- en donde las células precursoras neurales positivas a PSA-NCAM se separan de rosetas neurales diferenciadas de las células madre pluripotentes
- 10 en donde las células madre pluripotentes son células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC),
- 15 en donde la enfermedad isquémica se selecciona del grupo que consiste en enfermedad cerebrovascular isquémica, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, angina de pecho, enfermedad isquémica de la arteria del miembro inferior y enfermedad isquémica del miembro distal.
2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad isquémica es enfermedad cerebrovascular isquémica, cardiopatía isquémica o infarto de miocardio.
- 20 3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad cerebrovascular isquémica es una apoplejía isquémica.

Fig. 1a

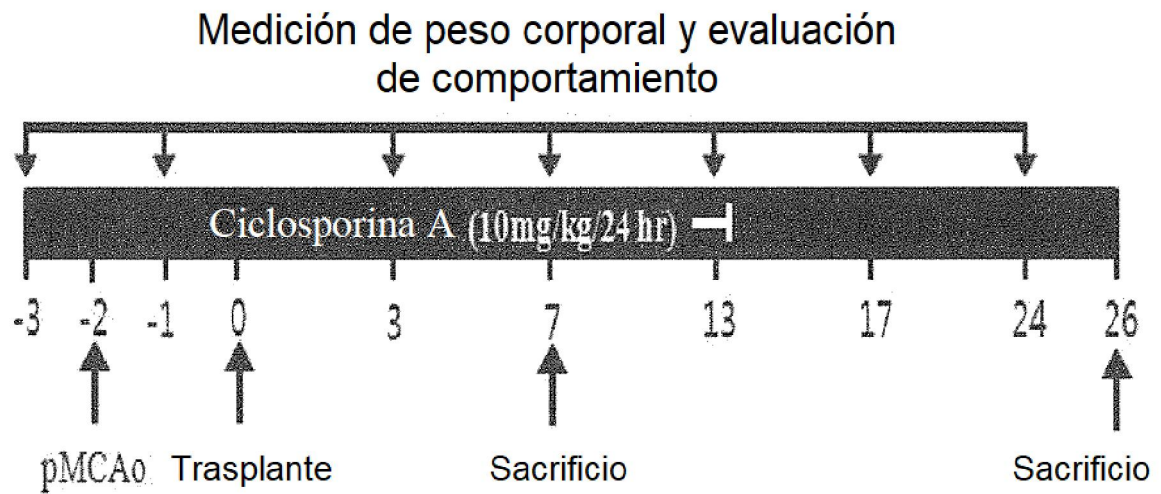


Fig. 1b

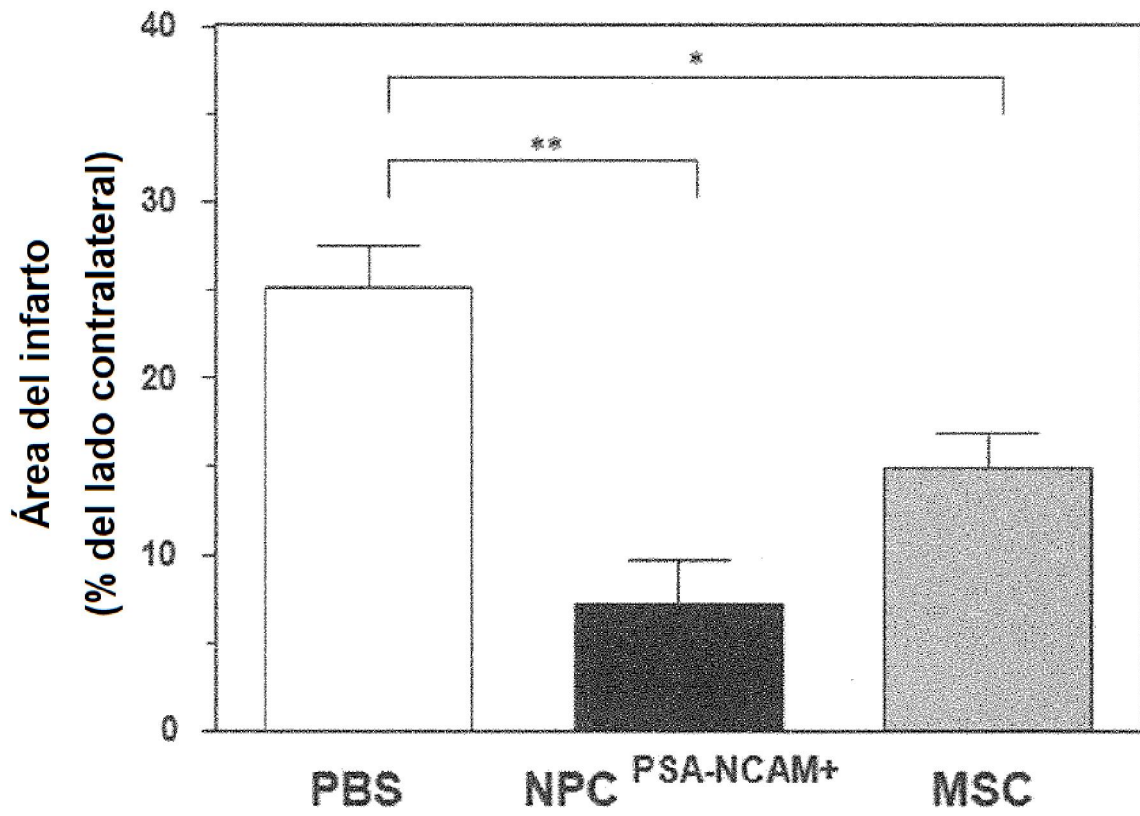


Fig. 1c

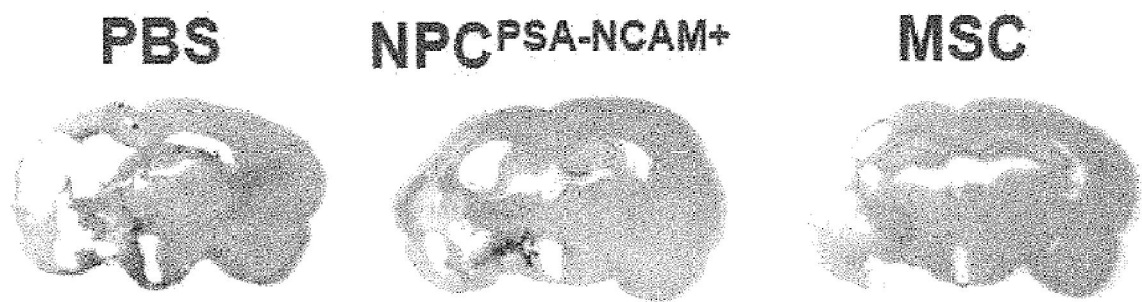


Fig. 2a

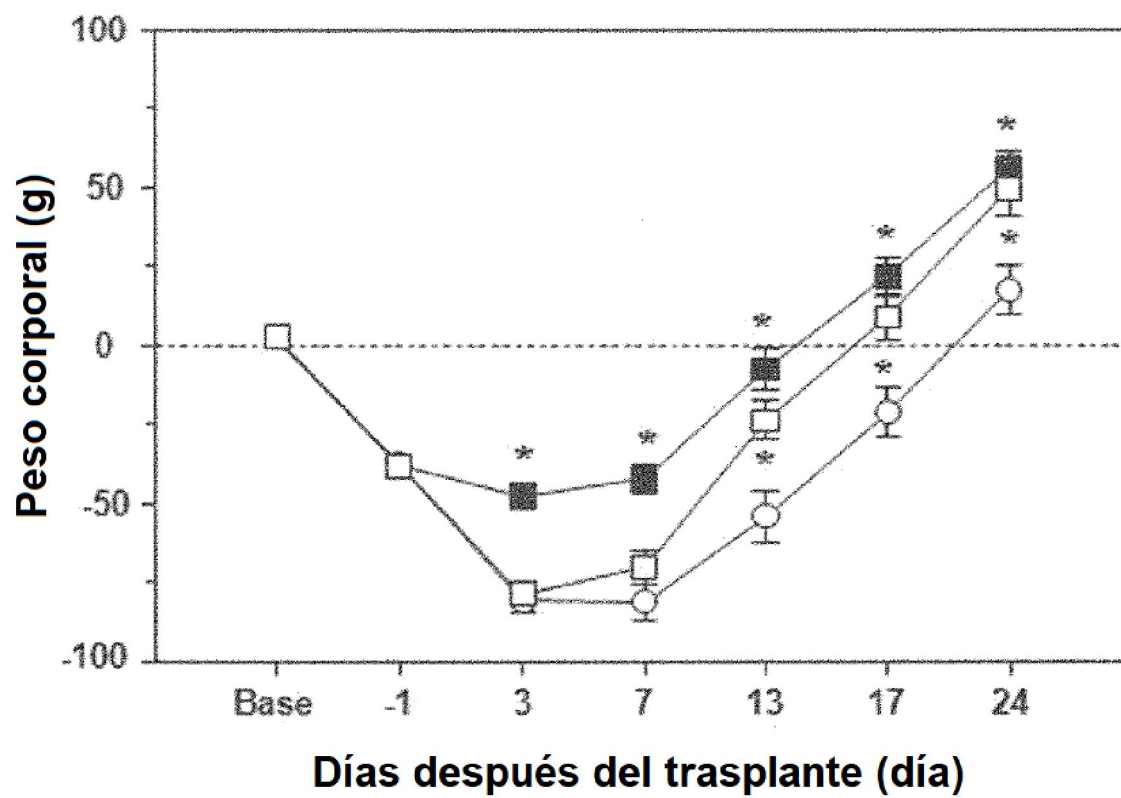


Fig. 2b

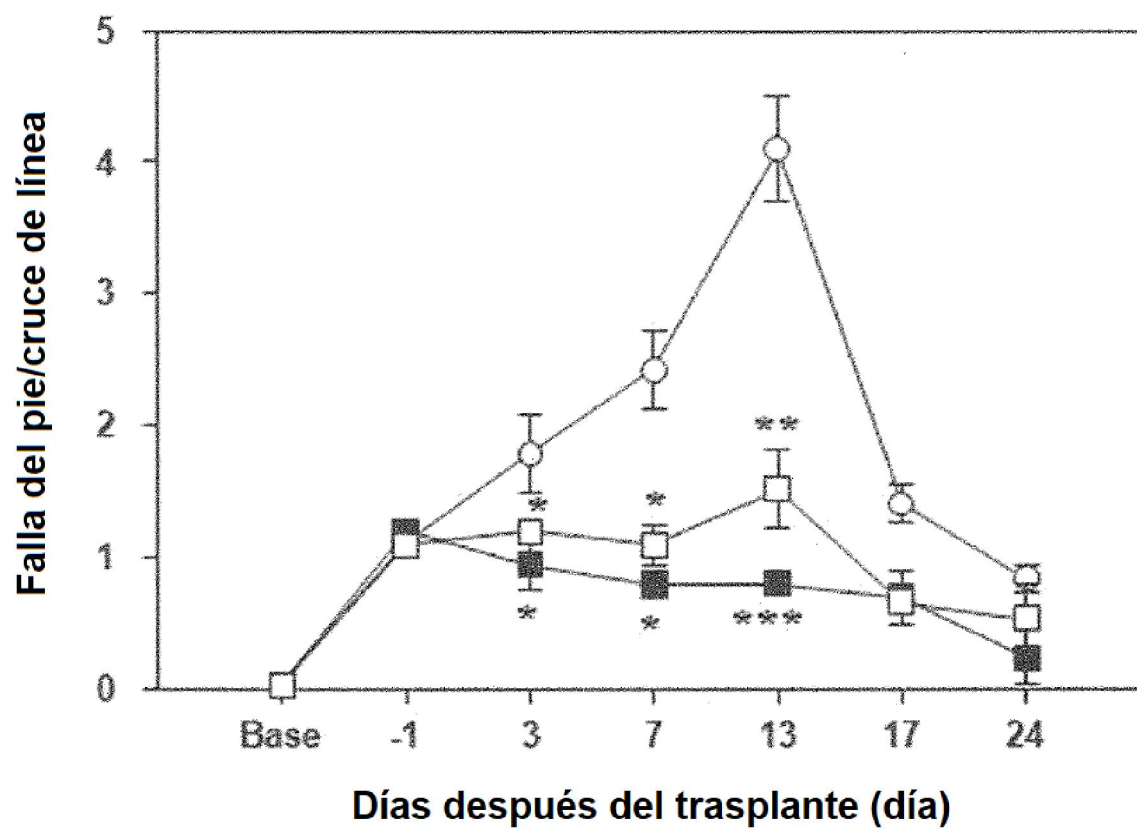


Fig. 2c

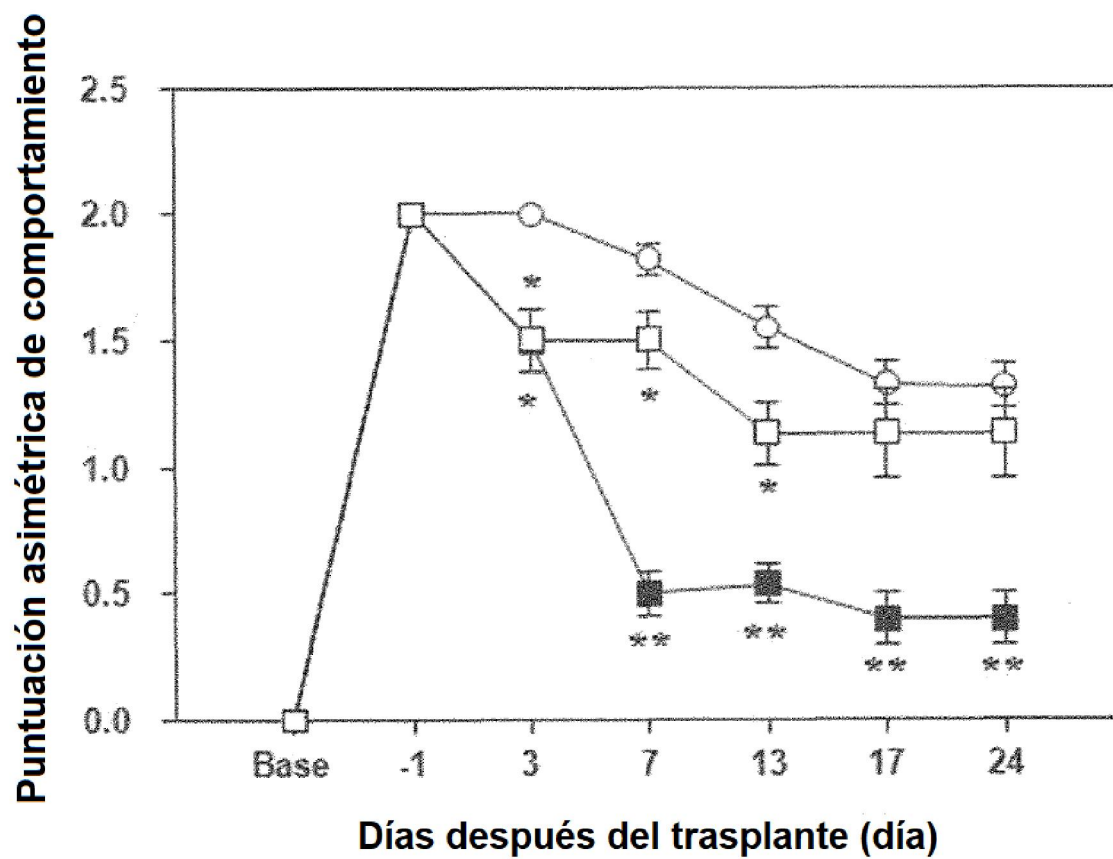


Fig. 2d

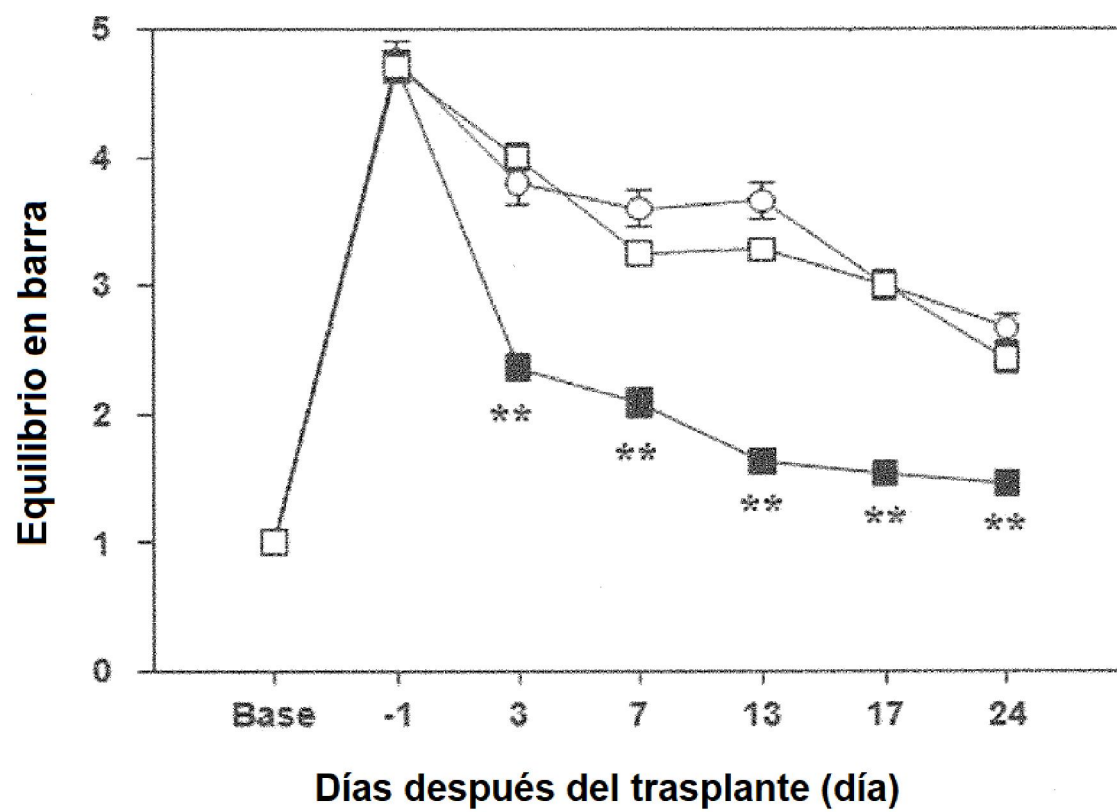


Fig. 2e

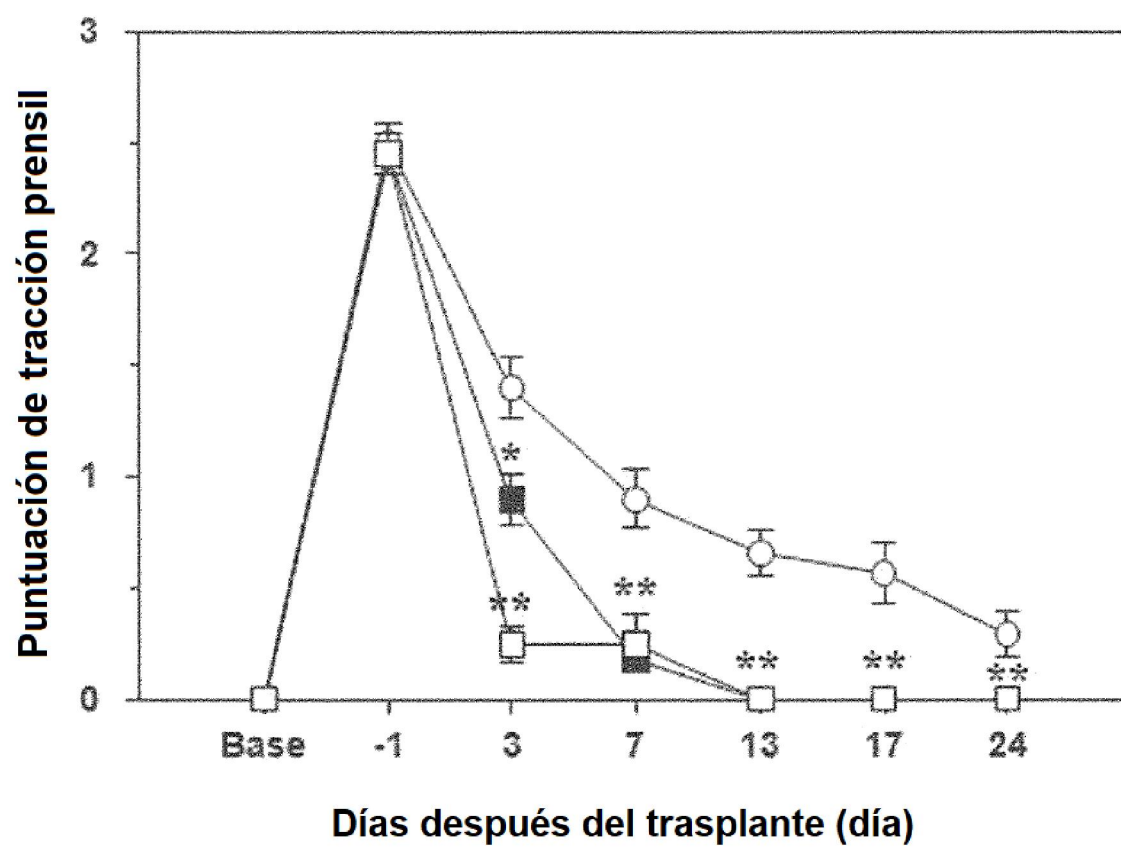


Fig. 2f

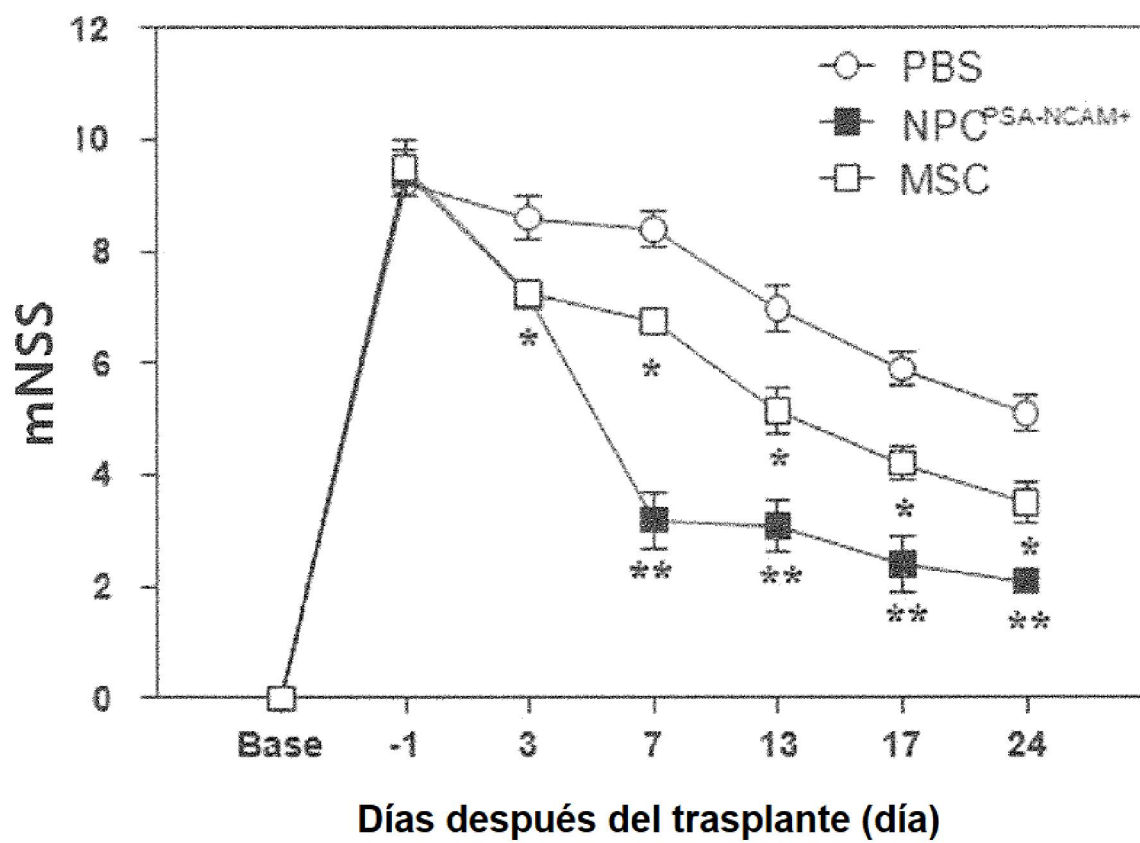


Fig. 3a

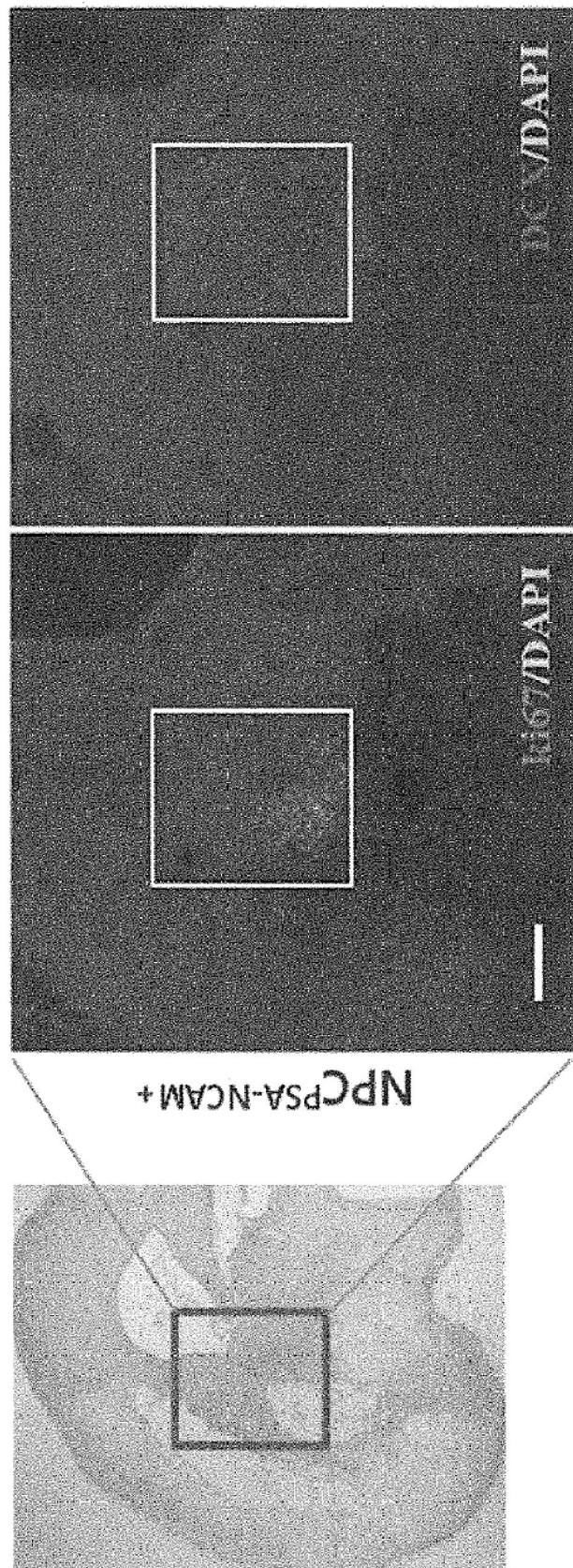


Fig. 3b

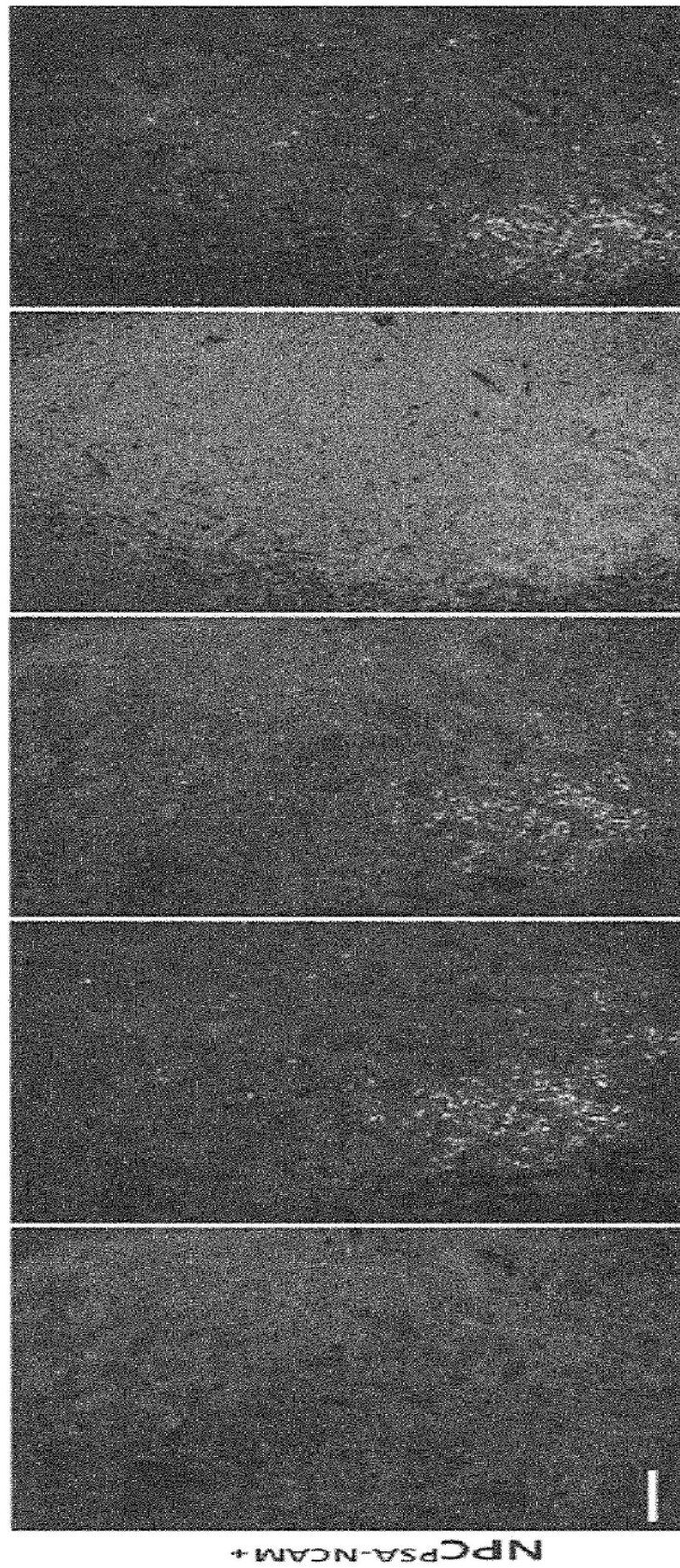


Fig. 3c

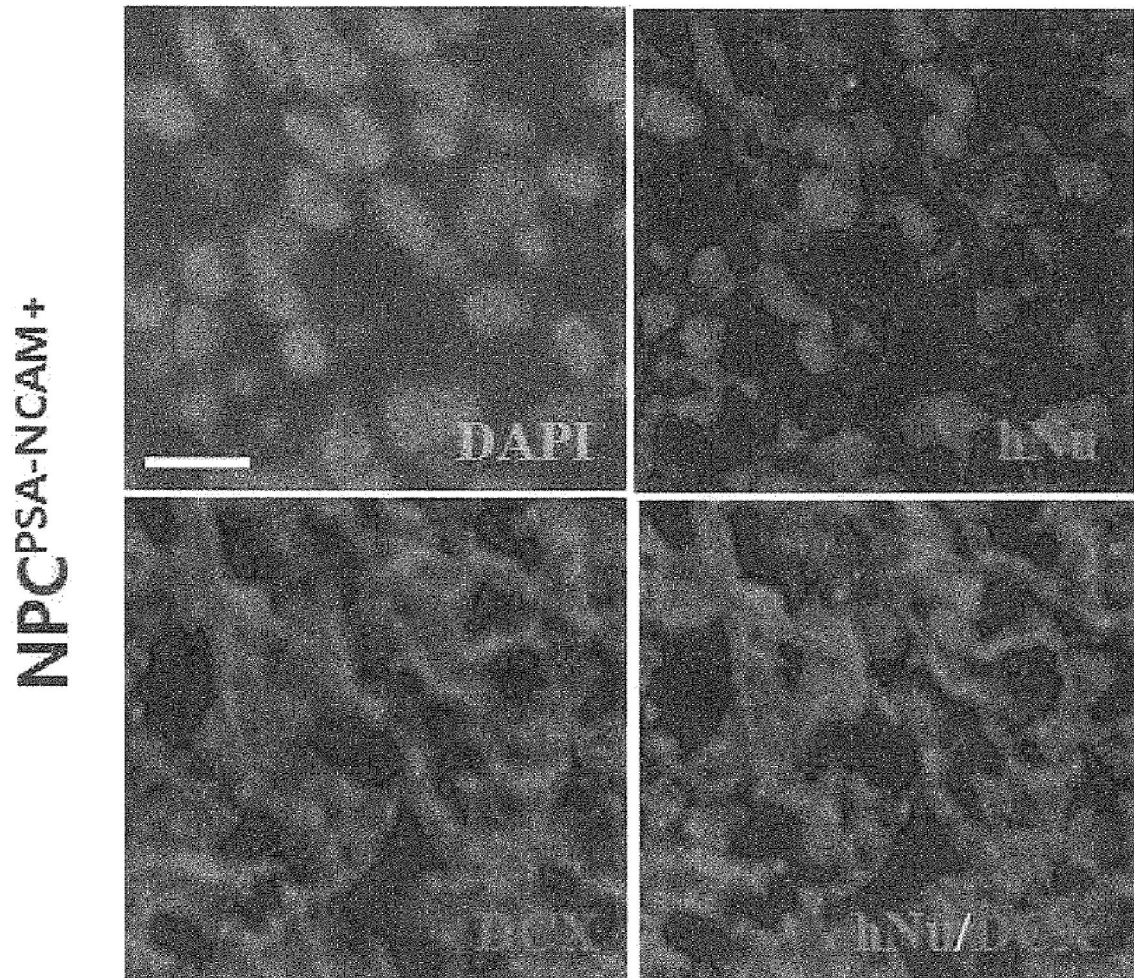


Fig. 3d

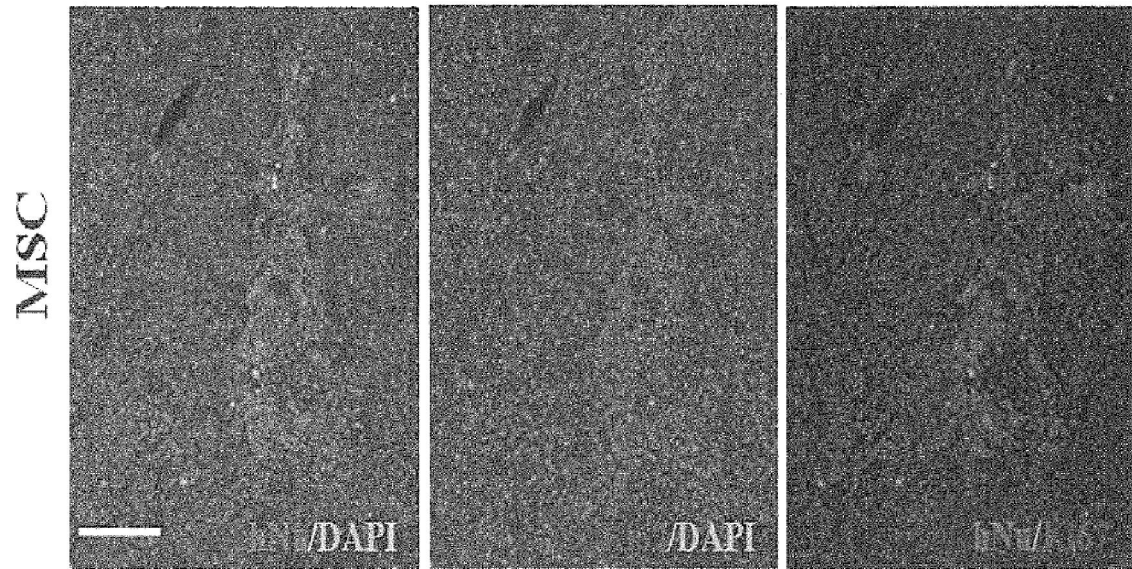


Fig. 4a

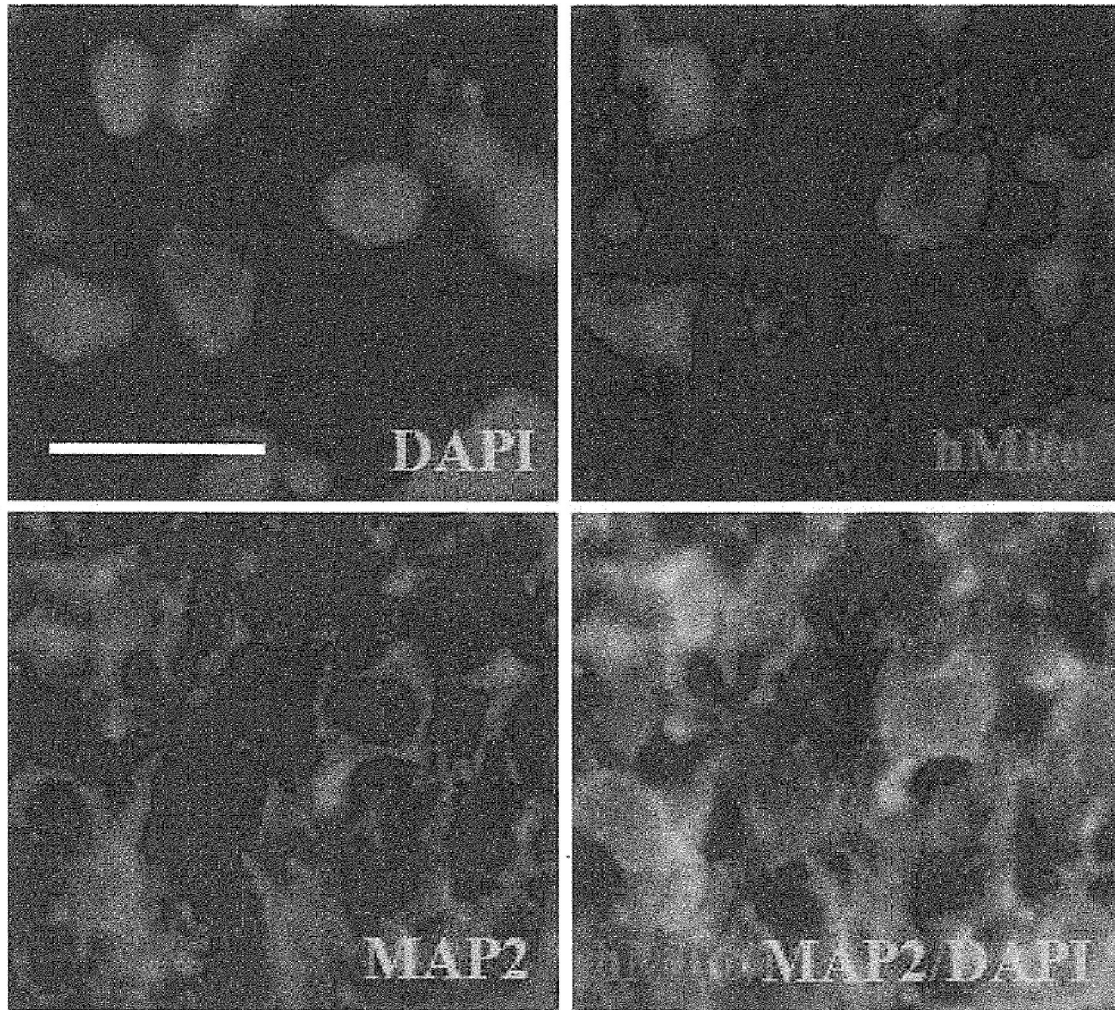


Fig. 4b

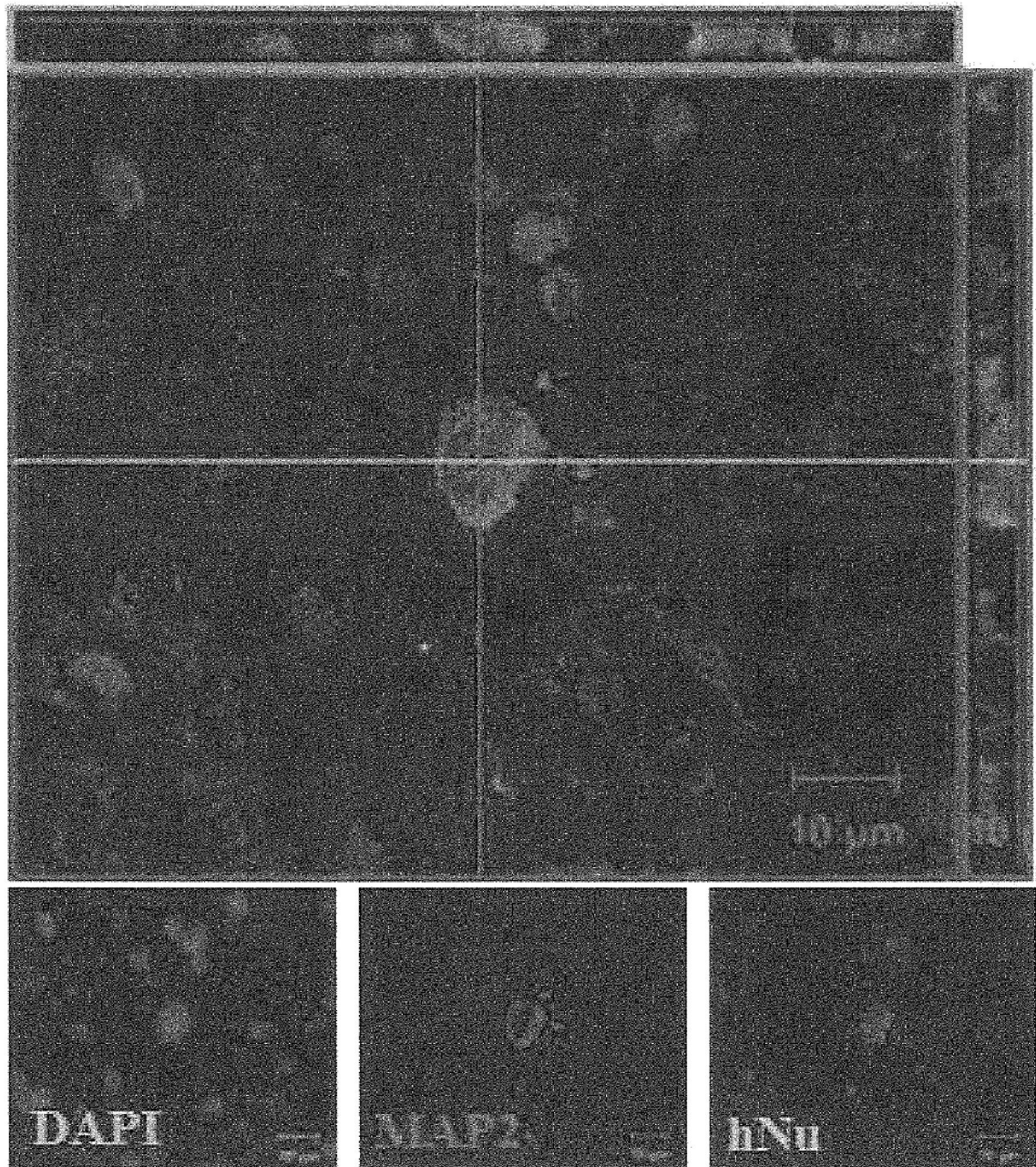


Fig. 4c

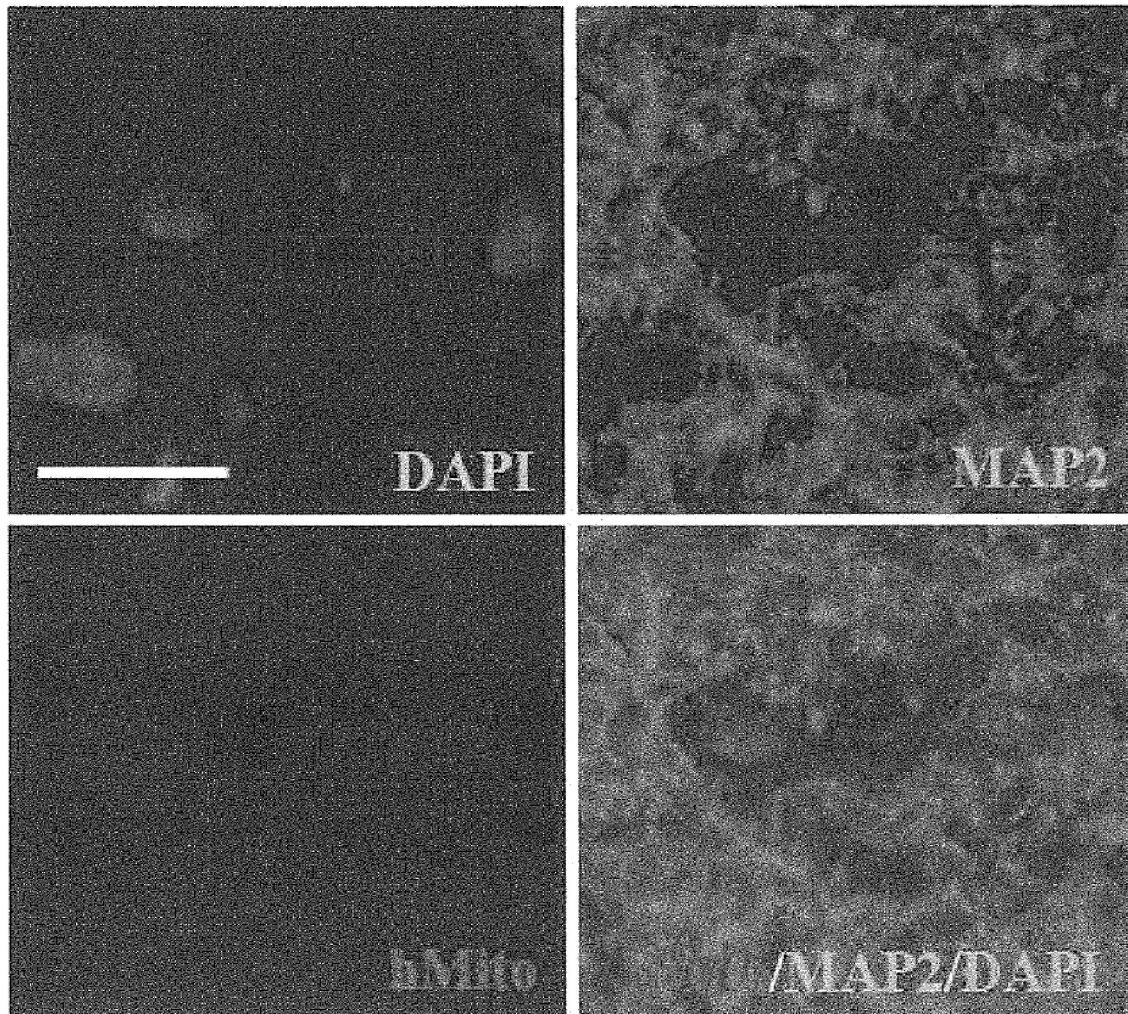


Fig. 4d

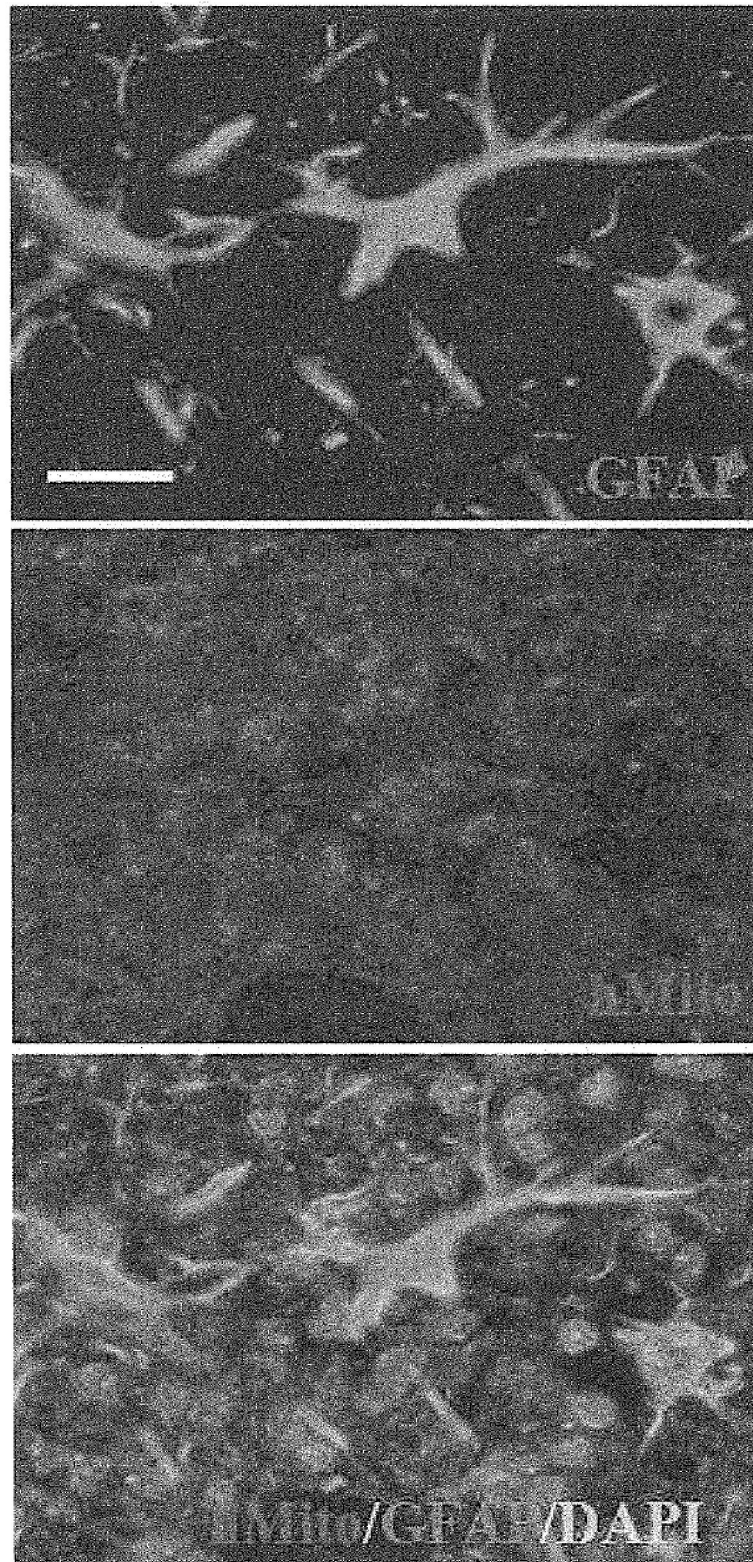


Fig. 4e

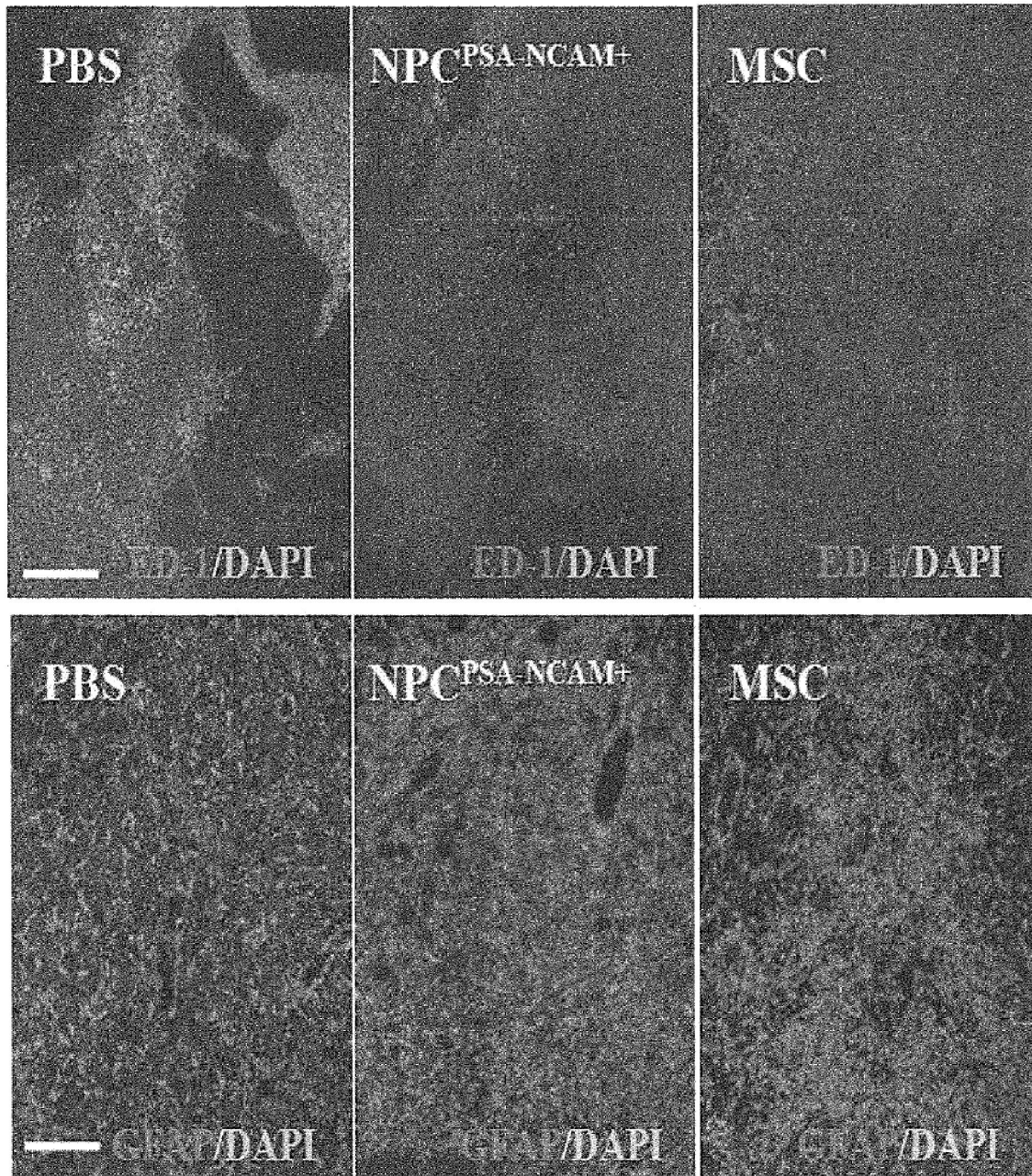


Fig. 4f

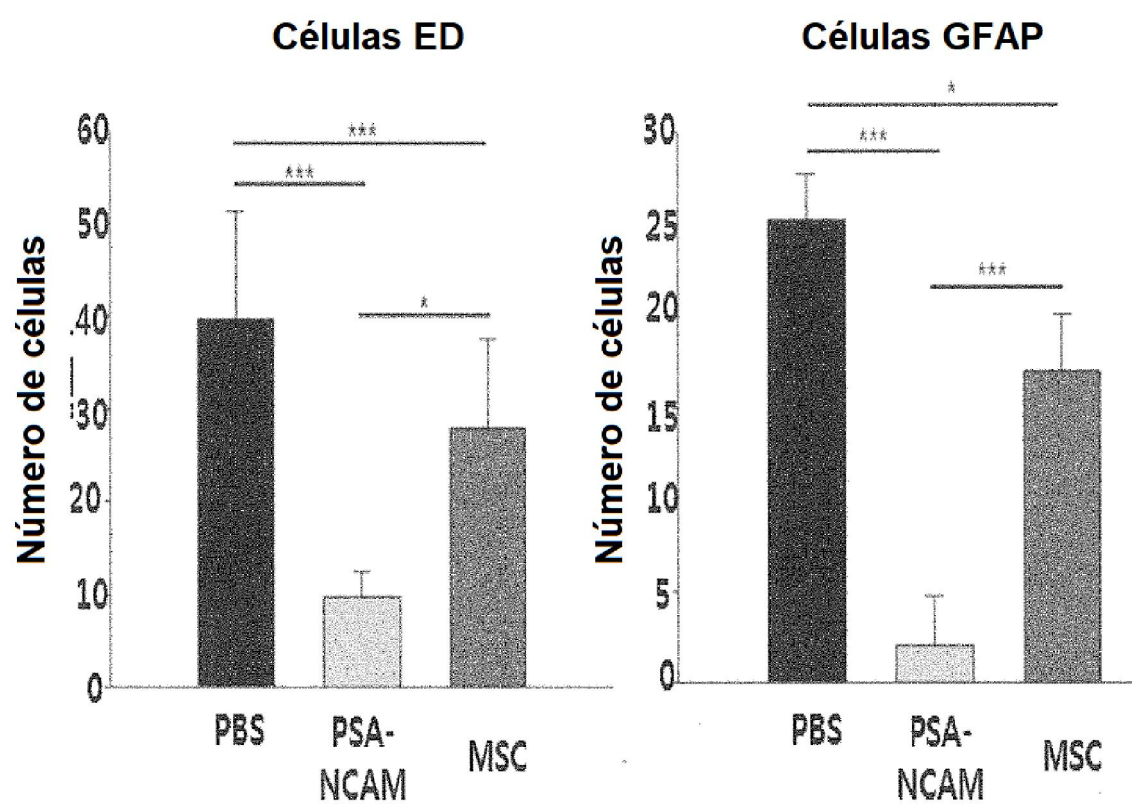


Fig. 5a

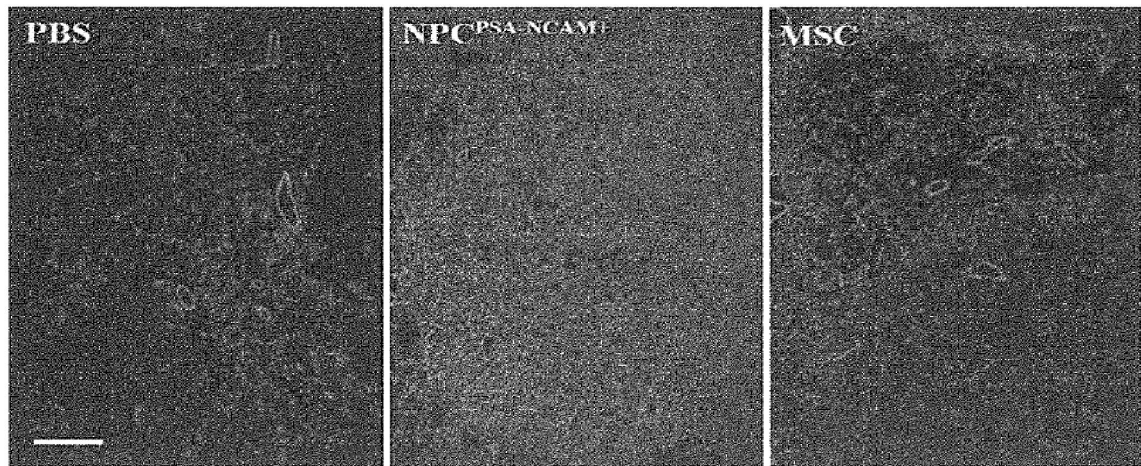


Fig. 5b

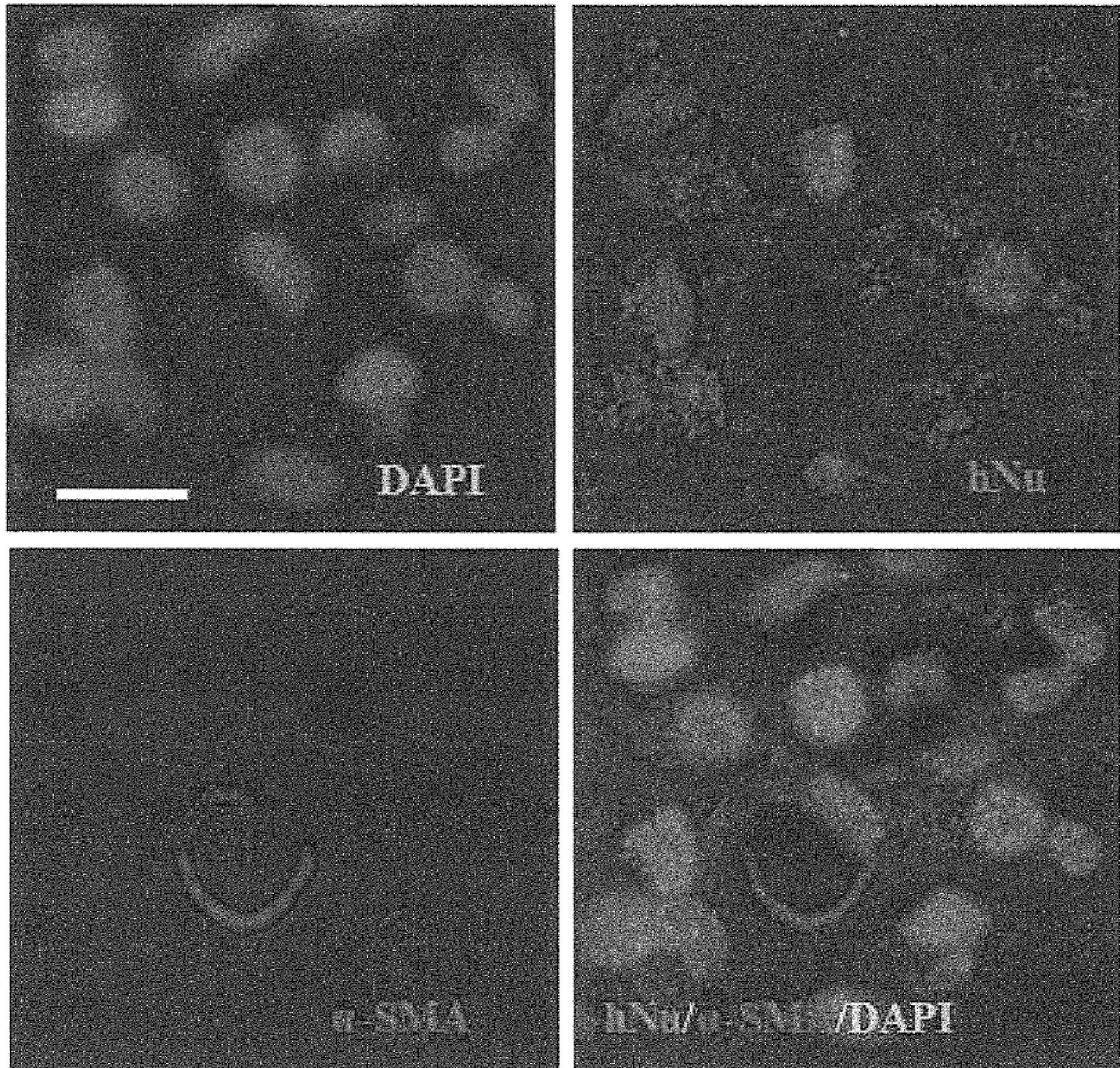


Fig. 5c

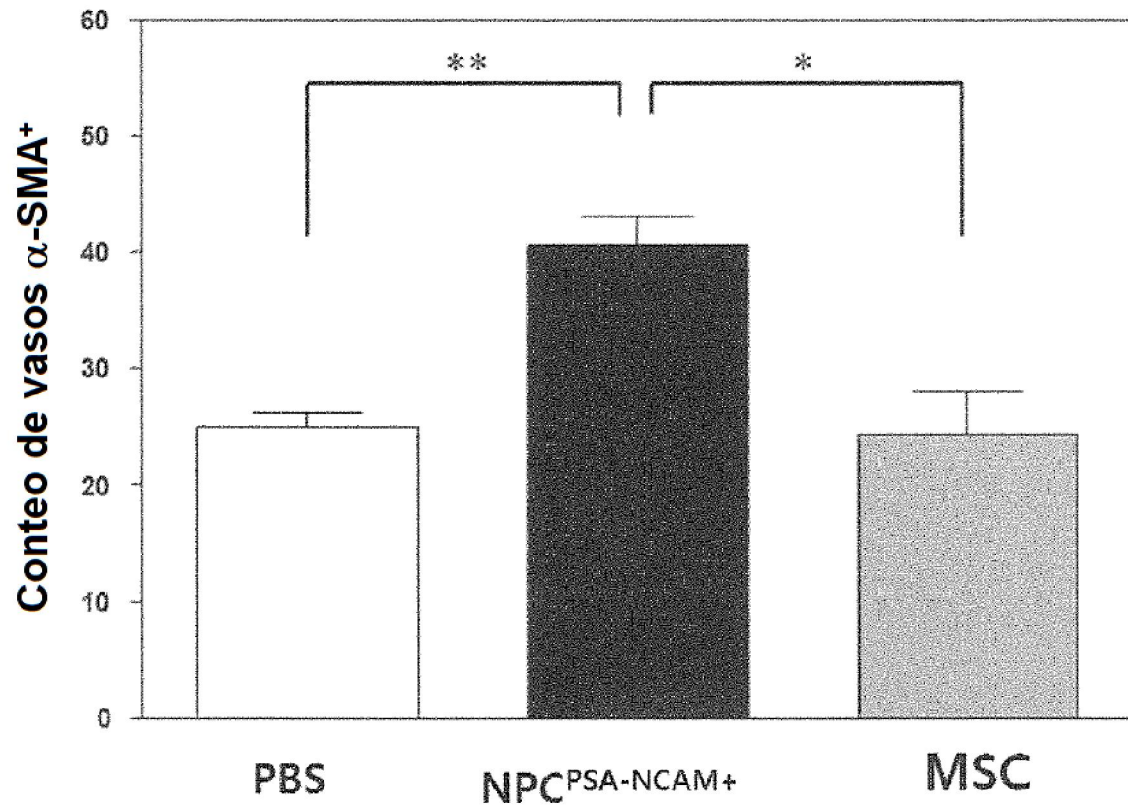


Fig. 5d

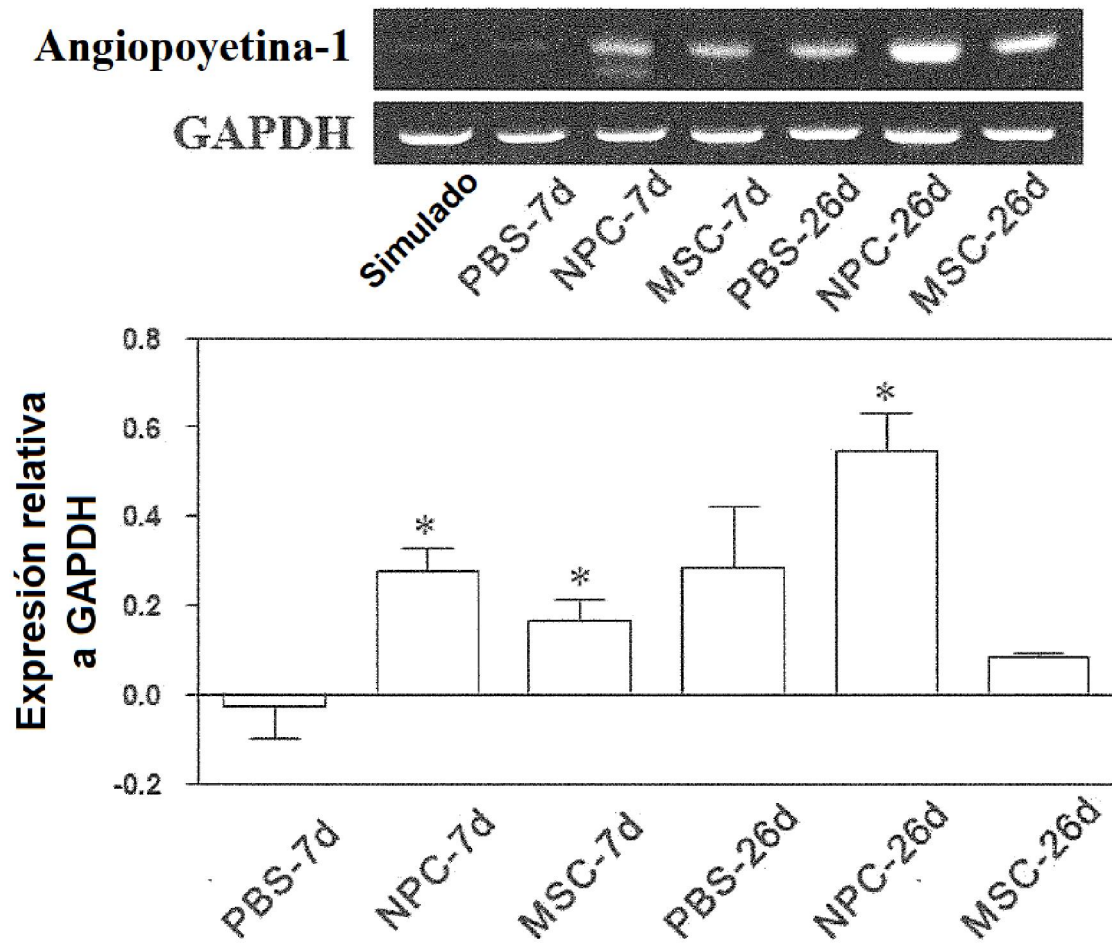


Fig. 6

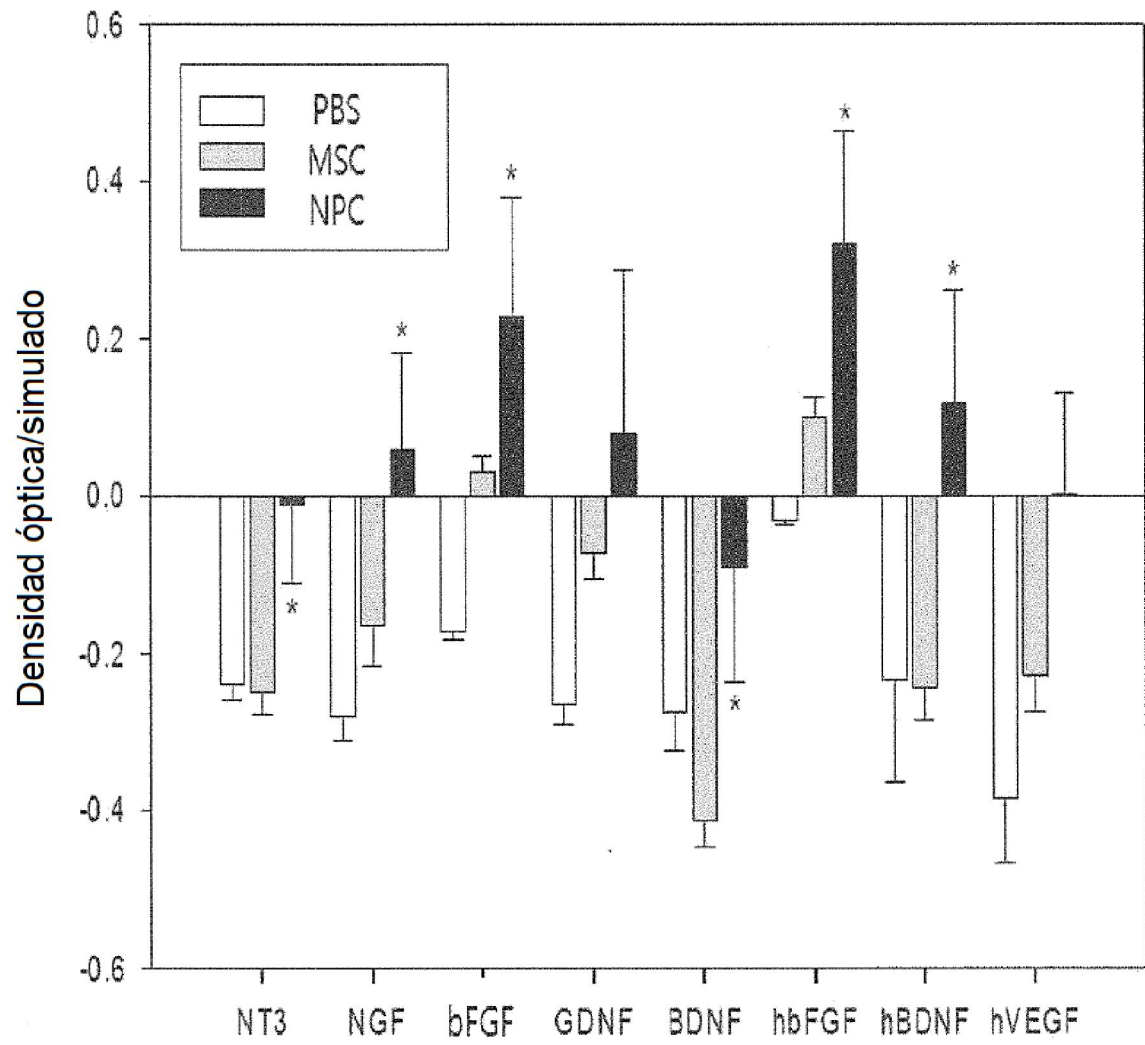


Fig. 7

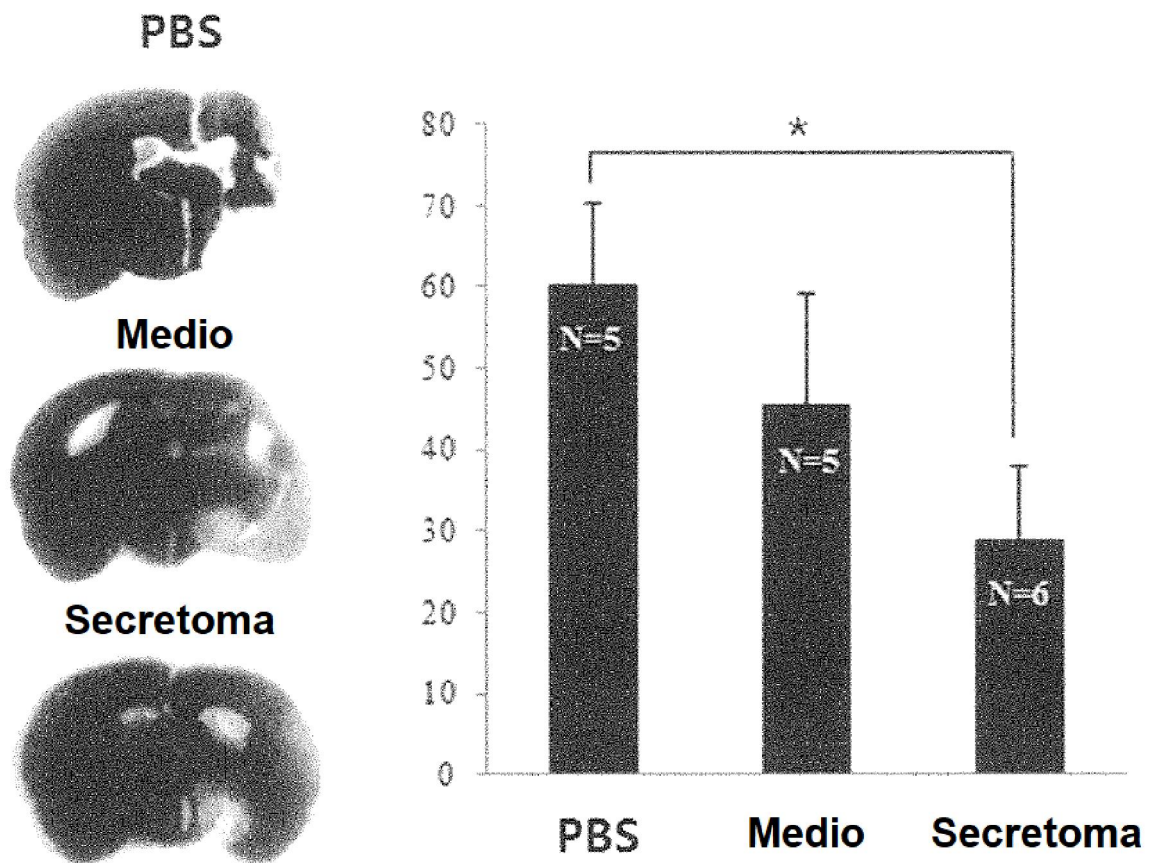


Fig. 8

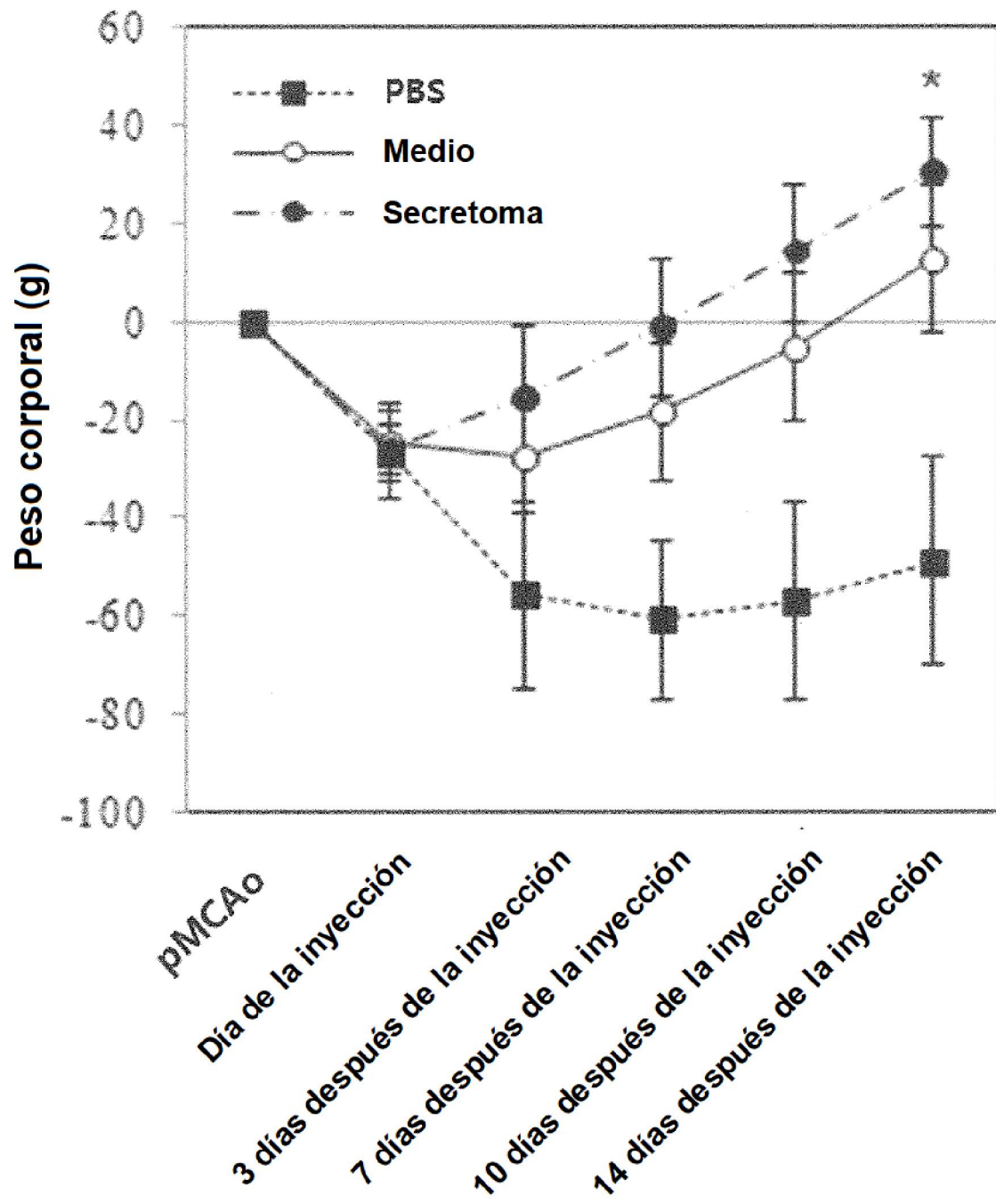


Fig. 9a

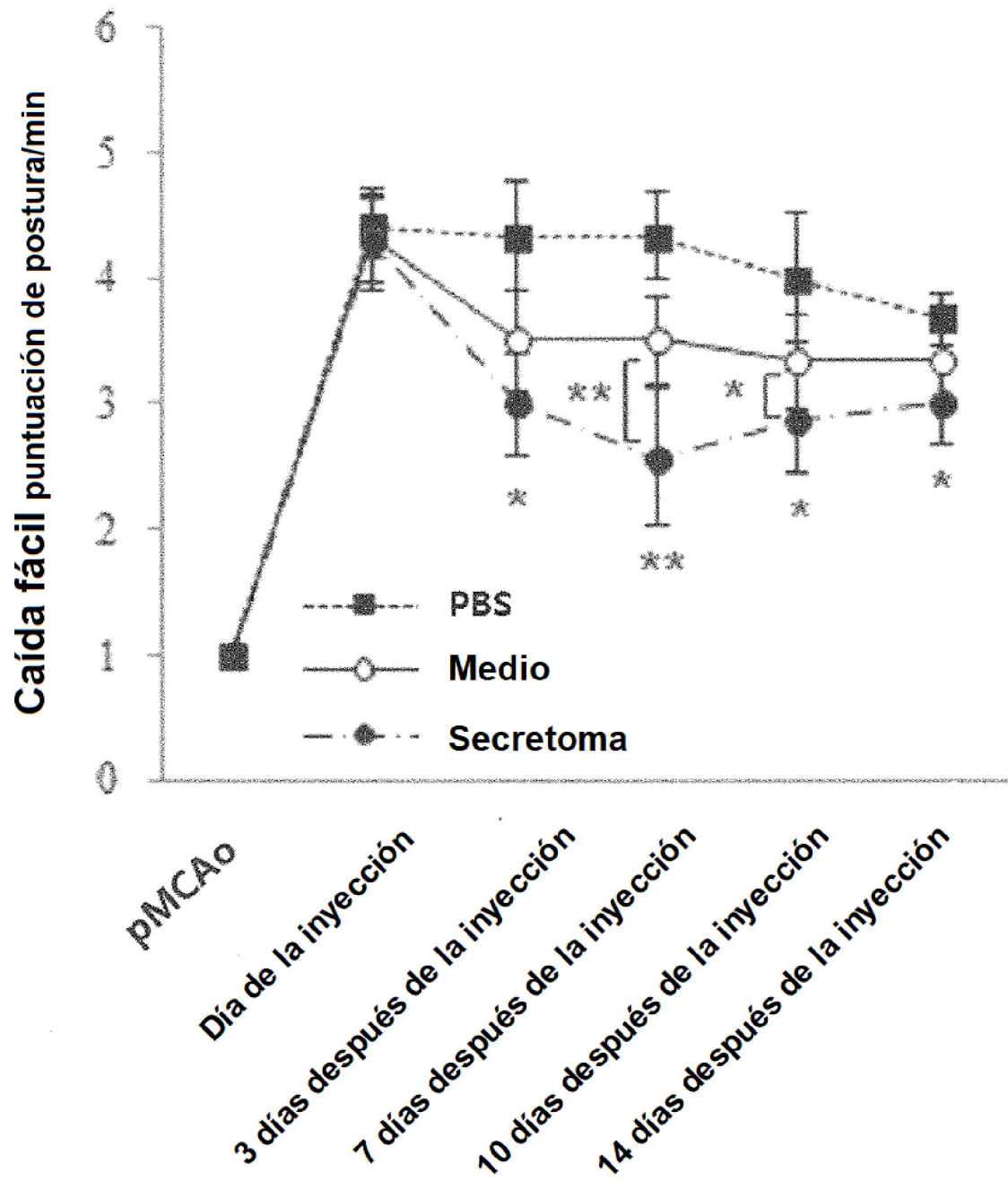


Fig. 9b

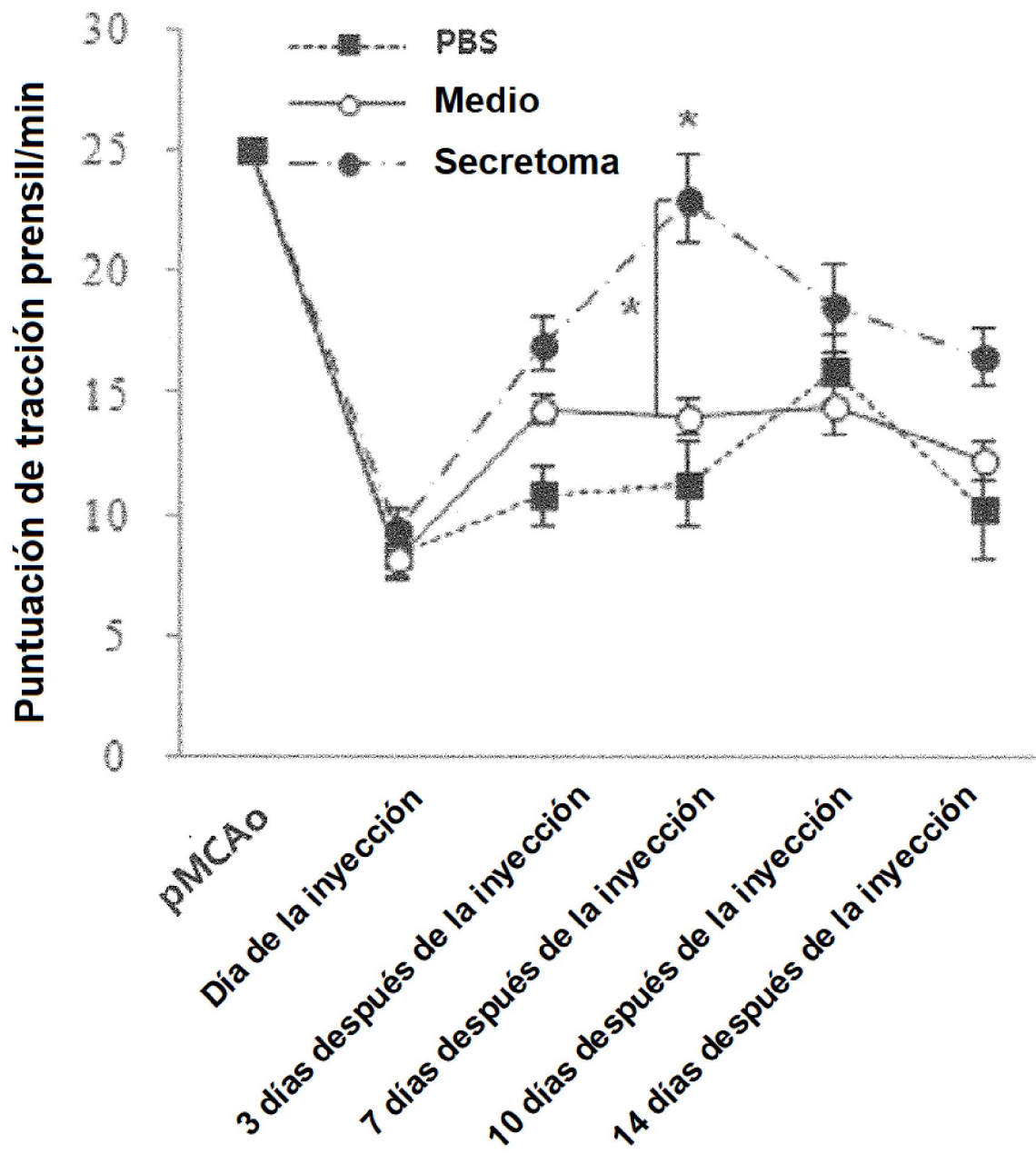


Fig. 9c

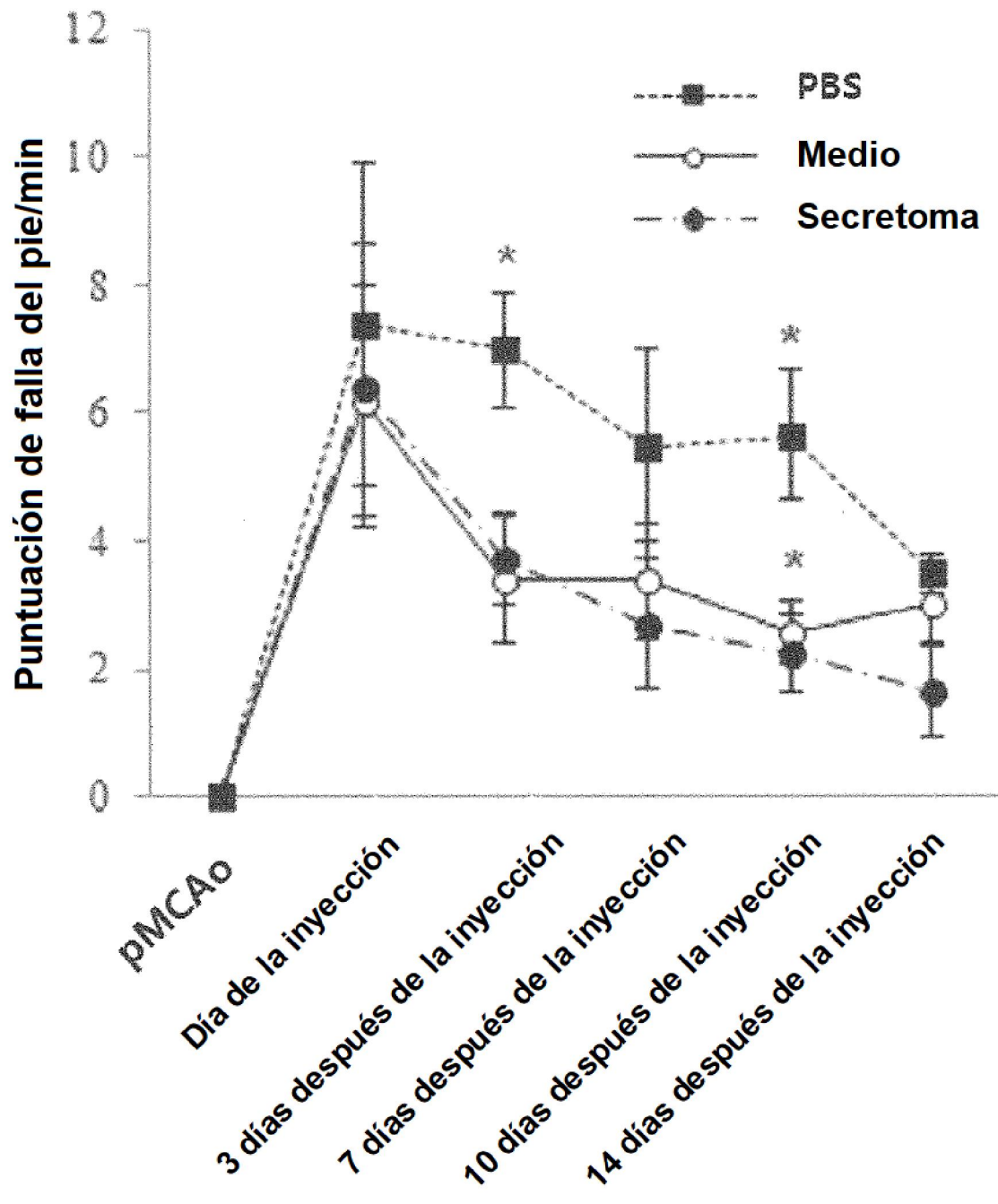


Fig. 9d

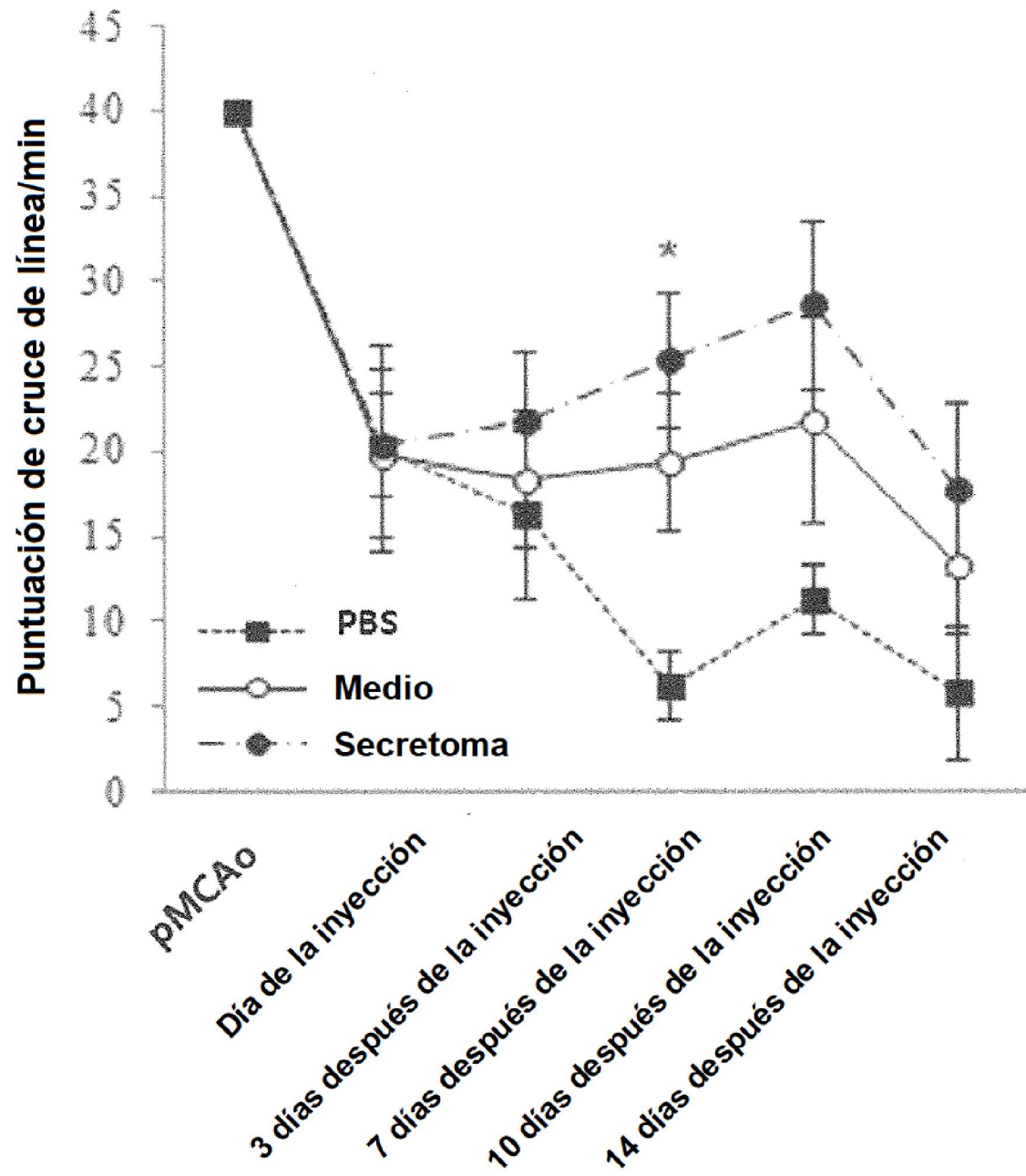


Fig. 10

