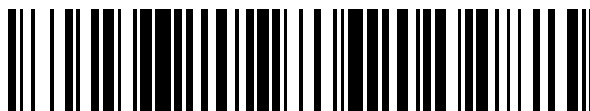


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 382**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2005 E 14172807 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **28.10.2020 EP 2824175**

54 Título: **Células madre mesenquimales y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**22.03.2004 US 555118 P**

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

**12.07.2021**

73 Titular/es:

**MESOBLAST INTERNATIONAL SÀRL (100.0%)  
Route de Pre-Bois 20  
1217 Meyrin, CH**

72 Inventor/es:

**PITTENGER, MARK F. y  
AGGARWAL, SUDEEPTA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

## DESCRIPCIÓN

Células madre mesenquimales y usos de las mismas

Esta invención se refiere a células madre mesenquimales. Más particularmente, esta invención se relaciona con las células madre mesenquimales para usar en el tratamiento de la inflamación.

5 Las células madre mesenquimales (CMM) son células madre multipotentes que se pueden diferenciar fácilmente en linajes que incluyen osteoblastos, miocitos, condrocitos y adipocitos (Pittenger, y otros, *Science*, vol. 284, pág. 143 (1999); Haynesworth y otros, *Bone*, vol. 13, pág. 69 (1992); Prockop, *Science*, vol. 276, pág. 71 (1997)). Los estudios in vitro han demostrado la capacidad de las CMM para diferenciarse a músculo (Wakitani, y otros, *Muscle Nerve*, vol. 18, pág. 1417 (1995)), precursores similares a neuronas (Woodbury y otros, *J. Neurosci. Res.*, vol. 69, pág. 908 (2002); Sanchez-Ramos, y otros, *Exp. Neurol.*, vol. 171, pág. 109 (2001)), cardiomiocitos (Toma, y otros, *Circulation*, vol. 105, pág. 93 (2002); Fakuda, *Artif. Organs*, vol. 25, pág. 187 (2001)) y posiblemente otros tipos de células. Además, se demostró que las CMM proporcionan capas alimentadoras eficaces para la expansión de las células madre hematopoyéticas y embrionarias (Eaves, y otros, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 938, pág. 63 (2001); Wagers y otros, *Gene Therapy*, vol. 9, pág. 606 (2002)). Los estudios recientes con una variedad de modelos animales han demostrado que las CMM pueden ser útiles para la reparación o regeneración de huesos, cartílagos, meniscos o tejidos del miocardio dañados (DeKok, y otros, *Clin Oral Implants Res.*, vol. 14, pág. 481 (2003)); Wu, y otros, *Transplantation*, vol. 75, pág. 679 (2003); Noel, y otros, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, vol. 3, pág. 1000 (2002); Ballas, y otros, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, vol. 38, pág. 20 (2002); Mackenzie, y otros, *Blood Cells Mol. Dis.*, vol. 27 (2002)). Varios investigadores han usado las CMM con resultados esperanzadores para el trasplante en modelos de enfermedades de animales, incluyendo la osteogénesis imperfecta (Pereira y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol. 95, pág. 1142 (1998)), el mal de Parkinson (Schwartz, y otros, *Hum. Gene Ther.*, vol. 10, pág. 2539 (1999)), lesión de la médula espinal (Chopp, y otros, *Neuroreport*, vol. 11, pág. 3001 (2000); Wu, y otros, *J. Neurosci. Res.*, vol. 72, pág. 393 (2003)) y trastornos cardíacos (Tomita, y otros, *Circulation*, vol. 100, pág. 247 (1999)). Shake, y otros, *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 73, pág. 1919 (2002)). Es importante destacar que también se han informado resultados prometedores en pruebas clínicas para la osteogénesis imperfecta (Horwitz, y otros, *Blood*, vol. 97, pág. 1227 (2001H); Horowitz, y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol. 99, pág. 8932 (2002)) y para el injerto mejorado de trasplantes heterólogos de la médula ósea (Frasson, y otros, *Int. Society for Cell Therapy, SA006* (resumen) (2002); Koc y otros, *J. Clin. Oncol.*, vol. 18, pág. 307 (2000)).

Las CMM expresan el antígeno del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) clase I en su superficie, pero no expresan el CPH clase II (Le Blanc, y otros, *Exp. Hematol.*, vol. 31, pág. 890 (2003); Potian, y otros, *J. Immunol.*, vol. 171, pág. 3426 (2003)) ni las moléculas coestimuladoras CD40 o B7 (Majumdar, y otros, *J. Biomed. Sci.*, vol. 10, pág. 228 (2003)), sugiriendo que estas células tienen un fenotipo poco inmunogénico (Tse, y otros, *Transplantation*, vol. 75, pág. 389 (2003)). Las CMM también inhiben las respuestas proliferativas de 1 célula de manera independiente del CPH (Bartholomew, y otros, *Exp. Hematol.*, vol. 30, pág. 42 (2002); Devine y otros, *Cancer J.*, vol. 7, pág. 576 (2001); DiNicola, y otros, *Blood*, vol. 99, pág. 3838 (2002)). Estas propiedades inmunológicas de las CMM pueden mejorar su injerto por trasplante y limitar la capacidad del sistema inmunitario receptor de reconocer y rechazar las células alogénicas después del trasplante. La producción de factores por las CMM, que modulan la respuesta inmunitaria y soportan la hematopoyesis, junto con su capacidad para diferenciarse en tipos de células adecuados bajo estímulos locales, las hacen células madre deseables para los estudios de trasplante celular (Majumdar, y otros, *Hematother. Stem Cell Res.*, vol. 9, pág. 841 (2000); Haynesworth, y otros, *J. Cell. Physiol.*, vol. 166, pág. 585 (1996)).

40 Los presentes solicitantes examinaron las interacciones de las células madre mesenquimales con las poblaciones de células inmunitarias aisladas, que incluyen las células dendríticas (DC1 y DC2), las células T efectoras (Th1 y Th2) y las células NK. Basado en tales interacciones, los solicitantes descubrieron que las células madre mesenquimales pueden regular la producción de varios factores que pueden regular varias etapas en el proceso de respuesta inmunitaria. Así, las células madre mesenquimales pueden usarse para tratar enfermedades, afecciones o trastornos donde está presente la inflamación.

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones anexas.

Generalmente, la terapia de células madre mesenquimales (CMM) se basa, por ejemplo, en la siguiente secuencia: cosechar el tejido que contiene CMM, aislar y expandir las CMM y administrar las CMM al animal, sin manipulación bioquímica o genética.

50 Las células madre mesenquimales administradas pueden ser una población de células de composición homogénea o pueden ser una población de células mixtas enriquecida en CMM. Composiciones de células madre mesenquimales homogéneas pueden obtenerse por cultivo de células del periostio o de la médula adherentes, y las composiciones de células madre mesenquimales pueden obtenerse por cultivo de células del periostio o de la médula adherentes, y las células madre mesenquimales pueden identificarse mediante marcadores de superficie celular específicos que se identifican con anticuerpos monoclonales únicos. Un método para obtener una población celular enriquecida en células madre mesenquimales se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 5,486,359. Fuentes alternativas para las células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a, sangre, piel, sangre del cordón umbilical, músculo, grasa, hueso y pericondrio.

De acuerdo con la presente invención, las células madre mesenquimales se administran por vía sistémica, tal como por administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Las células madre mesenquimales pueden obtenerse de un espectro de fuentes que incluyen autólogas, alogénicas o xenogénicas.

5 La presente invención proporciona células madre mesenquimales para usar en un método para tratar una respuesta inflamatoria en un animal. El método comprende administrar al animal las células madre mesenquimales en una cantidad eficaz para tratar la respuesta inflamatoria en el animal.

10 De acuerdo con la presente invención, las células madre mesenquimales promueven la maduración de las células T a las células T reguladoras ( $T_{Reg}$ ), y de ese modo controlan las respuestas inflamatorias. Se cree, además, que las células madre mesenquimales inhiben las células T helper 1 (células  $Th1$ ), disminuyendo así la expresión del interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en ciertas reacciones inflamatorias, tal como las asociadas con la psoriasis, por ejemplo.

En una modalidad, las respuestas inflamatorias que pueden tratarse son aquellas asociadas con la psoriasis.

15 En otra modalidad, las células madre mesenquimales pueden usarse para limitar la inflamación en el intestino y el hígado durante la enfermedad inflamatoria del intestino y la hepatitis crónica, respectivamente. Aunque el alcance de este aspecto de la presente invención no pretende limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven una mayor secreción de Interleucina-10 (IL-10) y la generación de células T reguladoras (células  $T_{Reg}$ ).

20 En otra modalidad, las células madre mesenquimales pueden usarse para inhibir la activación excesiva de neutrófilos y macrófagos. Aunque el alcance de este aspecto de la presente invención no se limita a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la secreción de citoquinas supresoras tales como IL-10, e inhiben el factor inhibidor de la migración de macrófagos.

25 En otra modalidad, las células madre mesenquimales pueden usarse para controlar la inflamación en sitios inmunitarios privilegiados como el ojo, incluida la córnea, el cristalino, el epitelio pigmentario y la retina, el cerebro, la médula espinal, el útero embarazado y la placenta, el ovario, los testículos y la glándula suprarrenal corteza, hígado y folículos capilares. Aunque el alcance de esta modalidad no se limita a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la secreción de citoquinas supresoras tales como IL-10 y la generación de células  $T_{Reg}$ .

Debe entenderse que el alcance de la presente invención no se limita al tratamiento de ninguna respuesta inflamatoria particular.

30 Las células madre mesenquimales pueden administrarse a un mamífero, que incluye primates humanos y no humanos, tal como se describió anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, las células madre mesenquimales se administran sistémicamente, como se describió anteriormente en la presente descripción.

35 Las células madre mesenquimales se administran en una cantidad eficaz para tratar una respuesta inflamatoria en un animal. Las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/kg a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/kg, preferentemente, de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/kg a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/kg. La dosis exacta de células madre mesenquimales que se administra depende de varios factores, que incluyen la edad, peso y sexo del paciente, respuesta inflamatoria a tratar, y extensión y severidad de esta.

Las células madre mesenquimales se pueden administrar junto con un vehículo farmacéutico aceptable, como se describió anteriormente en la presente descripción.

40 Se entenderá que las células madre mesenquimales, cuando se usan en las terapias y tratamientos anteriormente mencionados, se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, citocinas, fármacos como los fármacos antiinflamatorios y células diferentes de las células madre mesenquimales, como las células dendríticas y pueden administrarse con vehículos solubles para las células como el ácido hialurónico, o en combinación con matrices sólidas, como colágeno, 45 gelatina u otros polímeros biocompatibles, según sea apropiado.

Ahora la invención será descrita con respecto a las figuras, en donde:

50 Fig. 1 Las CMM modulan las funciones de las células dendríticas. (A) Análisis por citometría de flujo de células DC1 monocíticas maduras usando anticuerpos contra HLA-DR y CD11c y de células plasmocitoides DC2 usando anticuerpos contra HLA-DR y CD123 (receptor de IL-3). (---): control de isotipo; (-): Anticuerpos conjugados FITC/PE. (B) Las CMM inhiben la secreción de TNF- $\alpha$  (eje- $\gamma$  primario) y aumentan la secreción de IL-10 (eje- $\gamma$  secundario) de células DC1 y DC2 activadas respectivamente. (C) Las CMM cultivadas con células DC1 maduras inhiben la secreción de IFN- $\gamma$  (eje- $\gamma$  primario) por las células T y aumentan los niveles de IL-4 (eje- $\gamma$  secundario) comparado con las CMM o las DC solas. La producción aumentada de IFN- $\gamma$  proinflamatorio y la producción disminuida de IL-4 antiinflamatorio en presencia de CMM indicaron un cambio en la población de células T hacia un fenotipo antiinflamatorio.

Fig. 2 Las CMMC inhiben la función de las células T efectoras proinflamatorias. (A) Análisis por citometría de flujo del número de células T<sub>Reg</sub> (en %) por tinción de las CMSP o la fracción no adherente en el cultivo de CMM+CMSP (CMM+CMSP) con anticuerpos CD4 conjugados con FITC (eje-x) y CD25 conjugados con PE (eje-y). Las regiones se establecieron basadas en los anticuerpos de control de isotipo como fondo. Los gráficos representan 5 experimentos independientes. (B) Las células T<sub>H1</sub> que se generaron en presencia de CMM secretaron niveles reducidos de IFN- $\gamma$  (eje-Y primario) y las células T<sub>H2</sub> generadas en presencia de CMM secretaron cantidades mayores de IL-4 (eje-y secundario) en los sobrenadantes del cultivo celular. (C) Las CMM inhiben la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK purificadas que se cultivaron durante 0, 24 o 48 horas en una placa de 24 pocillos. Los datos que se muestran son la media  $\pm$  SD de la secreción de citocinas en un experimento y representan 3 experimentos independientes.

Fig. 3 Las CMM conducen a un número aumentado de poblaciones de células T<sub>Reg</sub> y una expresión aumentada de GITR. (A) Una población de células T<sub>Reg</sub> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> se aisló a partir de cultivos de CMSP o CMM + CMSP (relación CMM a CMSP 1:10) (que se cultivaron sin estimulación adicional durante 3 días) usando un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Estas células se irradiaron (para bloquear cualquier proliferación adicional) y se usaron como estimuladoras en una reacción de linfocitos mixtos (RLM), donde los respondedores fueron CMSP alogénicas (relación estimuladores a respondedores 1:100) en presencia de fitohemaglutinina (PHA) (2,5 mg/ml). Las células se cultivaron por 48 horas, después de lo cual se añadió <sup>3</sup>H timidina, y se contó la radiactividad incorporada después de 24 horas. Los resultados mostraron que la población T<sub>Reg</sub>, que se generó en presencia de CMM (carril 3), era funcionalmente similar a las células T<sub>Reg</sub> que se generaron en ausencia de CMM (carril 2). (B) CMSP se cultivaron por 3 días en ausencia (gráfico superior) o presencia de CMM (gráfico inferior) (relación CMM a CMSP 1:10), y después de esto se recogió la fracción no adherente y se sometió a inmunotinción con GITR marcado con FITC y CD4 marcado con PE. Los resultados muestran un aumento mayor del doble en la expresión de GITR en las células que se cultivaron en presencia de CMM.

Fig. 4 Las CMM producen PGE<sub>2</sub> y el bloqueo de PGE<sub>2</sub> invierte los efectos inmunomoduladores mediados por las CMM. (A) Secreción de PGE<sub>2</sub> (media $\pm$ SD) en sobrenadantes de cultivo obtenidos a partir de CMM cultivadas en presencia o ausencia de bloqueadores de PGE<sub>2</sub> NS-398 o indometacina (Indometh.) a diversas concentraciones. Las concentraciones del inhibidor están en  $\mu$ M y los datos que se presentan son valores obtenidos después de 24 horas de cultivo. (B) expresión de COX-1 y COX-2 en CMM y CMSP usando RT-PCR en tiempo real. Las CMM expresaron niveles significativamente más altos de COX-2 comparado con las CMSP, y cuando se cultivaron las CMM en presencia de CMSP, hubo un aumento >3 veces en la expresión de COX-2 en las CMM. Se muestran los datos representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Los cultivos de CMM+CMSP se configuraron en una placa de cámara de transpocillo donde se colocaron las CMM en la cámara inferior y las CMSP en la cámara superior. (C) La presencia de los bloqueadores de PGE<sub>2</sub> indometacina (Ind.) o NS-398 aumenta la secreción de TNF- $\alpha$  de las DC activadas ( $\square$ ) y la secreción de IFN- $\gamma$  de las células T<sub>H1</sub> ( $\square$ ) comparado con los controles. Los datos se calcularon como % de cambio de los cultivos generados en ausencia de CMM e inhibidores de PGE<sub>2</sub>. (D) La presencia de los bloqueadores de PGE<sub>2</sub> indometacina (Indo) y NS-398 durante el cocultivo de CMM-CMSP (1:10) invierte los efectos antiproliferativos mediados por las CMM sobre las CMSP que se trataron con PHA. Los datos que se muestran son de un experimento y representan 3 experimentos independientes.

Fig. 5 La secreción de citocinas de CMM constitutiva se eleva en presencia de CMSP alogénicas. Con el uso de CMM humanas caracterizadas previamente, se analizaron los niveles de las citocinas IL-6 y VEGF, mediador lipídico PGE<sub>2</sub>, y metaloproteinas de matriz 1 (pro MMP-1) en el sobrenadante del cultivo de CMM cultivadas 24 horas en presencia (barras rayadas) o ausencia (barras abiertas) de CMSP (relación CMM a CMSP 1:10). Las CMM produjeron IL-6, VEGF y PGE<sub>2</sub> constitutivamente, y los niveles de estos factores aumentaron con el cocultivo con CMSP, lo que sugiere así que las CMM pueden jugar un papel en la modulación de las funciones inmunitarias en un entorno inflamatorio.

Fig. 6 Las CMM inhiben la proliferación de las células T inducida por mitógenos de una manera dependiente de la dosis. Cantidades crecientes de CMSP alogénicas se incubaron con números constantes de CMM (2,000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos en presencia o ausencia de PHA (2,5 mg/ml) por 72 horas, y se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H timidina (en recuentos por minuto o cpm). Hubo una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de las CMSP tratadas con PHA en presencia de CMM. Se muestran los resultados representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Resultados similares fueron informados por LeBlanc, y otros, Scand J. Immunol., vol. 57, pág. 11 (2003).

Fig. 7 Diagrama esquemático del mecanismo de acción de las CMM propuesto. Las CMM median sus efectos inmunomoduladores al afectar a las células del sistema inmunitario innato (vías 2-4 de las DC y vía 6 de las NK) y adaptativo (vías 1 y 5 de las células T y vía 7 de las células B). En respuesta a un patógeno invasor, las DC inmaduras migran al sitio de entrada potencial, maduran y adquieren la capacidad de cebar las células T vírgenes (por medio de señales específicas coestimuladoras y específicas del antígeno) para convertirse en células T efectoras de protección (inmunidad T<sub>H1</sub> mediada por células u T<sub>H2</sub> humoral). Durante la interacción CMM-DC, las CMM, por medio del contacto directo célula a célula o por medio del factor secretado, pueden alterar el resultado de la respuesta inmunitaria limitando la capacidad de las DC para inducir una respuesta mediada por células (vía 2) promoviendo la capacidad para inducir una respuesta humoral (vía 4). Además, cuando las células T efectoras maduras están presentes, las CMM pueden interactuar con ellas para desviar el equilibrio de las respuestas T<sub>H1</sub> (vía 1) hacia las respuestas T<sub>H2</sub> (vía 5), y probablemente hacia un aumento de la actividad de las células B que producen IgE (vía 7), resultados deseables para la supresión de la GvHD y de los síntomas de las enfermedades autoinmunitarias. Las CMM en su

capacidad para dar como resultado una mayor generación de la población de TReg (vía 3) pueden dar como resultado un fenotipo tolerante y pueden ayudar a un huésped receptor al amortiguar la inflamación inespecífica en su microambiente local. La línea discontinua (----) representa el mecanismo propuesto.

- 5 La invención se describirá ahora con respecto a los siguientes ejemplos; sin embargo, debe entenderse que el alcance de la presente invención no se limita por ello.

#### Ejemplo 1

#### Materiales y Métodos

#### Cultivo de CMM humanas.

- 10 Las CMM humanas se cultivaron como se describe por Pittenger y otros, Science, vol. 284, pág. 143 (1999). En resumen, se recogieron muestras de médula ósea de la cresta ilíaca de donantes anónimos tras el consentimiento informado por Poietics Technologies, Div de Cambrex Biosciences. Las CMM se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa (Life Technologies, Carlsbad, California) que contenía 1 % de solución antibiótica antimicótica (Invitrogen, Carlsbad, California) y suero bovino fetal al 10 % (FBS, JRH BioSciences, Lenexa, Kansas).
- 15 Las CMM crecieron como una monocapa adherente y se separaron con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05 % a 37 °C durante 3 minutos). Todas las CMM usadas se caracterizaron previamente en cuanto a su potencial multilíneaje y mantuvieron la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales (condrocítico, adipogénico y osteogénico) (Pittenger, y otros, Science, vol. 284, pág. 143 (1999)).

#### Aislamiento de células dendríticas

- 20 Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se obtuvieron de Poietics Technologies, Div de Cambrex Biosciences (Walkersville, MD). Los precursores de células dendríticas (DC) de linaje monocítico (DC1c+) se seleccionaron positivamente a partir de CMSP mediante el uso de un método de separación magnética de 2 etapas de acuerdo con Dzionek, y otros, J. Immunol., vol. 165, pág. 6037 (2000). En resumen, las células B que expresan CD1 c se separaron magnéticamente de las células CD19+ usando perlas magnéticas, seguido por el marcado de la fracción separada de células B con anticuerpos CD1c (BDCA1+) marcados con biotina y anticuerpos antibiotina y se
- 25 separaron de la fracción celular no marcada usando columnas magnéticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, California). Los precursores de las DC de linaje plasmocitoide se aislaron de las CMSP por separación inmunomagnética de las células recubiertas con anticuerpo marcadas positivamente (BDCA2+) (Miltenyi Biotec, Auburn, California).

#### Cultivo de CMM-DC

- 30 En la mayor parte de los experimentos, se cultivaron CMM y DC humanas en igual número por varios períodos de tiempo y el sobrenadante del cultivo celular se recogió y se almacenó a -80 °C hasta una evaluación adicional. En los experimentos seleccionados, las CMM se cultivaron con células maduras DC1 o DC2 (relación CMM:DC 1:1) por 3 días y los cultivos combinados (CMM y DC) se irradiaron después para evitar cualquier proliferación. A continuación, células T alogénicas vírgenes (CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>) purificadas por anticuerpos se adicionaron a las CMM/DC irradiadas
- 35 y se cultivaron por 6 días adicionales. La fracción celular no adherente (células T purificadas) se recogió a partir de los cultivos, se lavó dos veces y se reestimuló con PHA durante otras 24 horas, después de lo cual se recolectaron los sobrenadantes del cultivo celular y se analizaron en cuanto a la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-4 por ELISA.

#### Aislamiento de células NK

- 40 Las poblaciones purificadas de células NK se obtuvieron mediante la separación de células no NK marcadas magnéticamente con un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (anticuerpos anti-CD3, -CD14, -CD19, -CD36 y anti-IgE) como reactivo primario y anticuerpos monoclonales antibiotina conjugados a microperlas como reactivo de marcaje secundario. Las células no NK marcadas magnéticamente se retuvieron en las columnas MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, California) en un campo magnético, mientras que las células NK pasaron y se recogieron.

- 45 Aislamiento de la población de células T<sub>Reg</sub>

- La población de células T<sub>Reg</sub> se aisló usando un procedimiento de aislamiento de 2 etapas. Primero, las células T no CD4<sup>+</sup> se marcaron magnéticamente de manera indirecta con un cóctel de anticuerpos marcados con biotina y microperlas antibiotina. Después, las células marcadas se separaron por separación en una columna MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, California). A continuación, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se marcaron directamente con microperlas CD25
- 50 y se aislaron por selección positiva a partir de las CD4<sup>+</sup> preenriquecidas. Fracción de células T. Las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> marcadas magnéticamente se mantuvieron en la columna y se eluyeron después de separar la columna del campo magnético.

Para determinar si el aumento de la población de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> generado en presencia de las CMM era de naturaleza supresora, las poblaciones de células T<sub>Reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se aislaron de los cultivos de CMSP o CMM+CMSP (relación

CMM a CMSP 1:10) (cultivados sin ninguna estimulación adicional durante 3 días) mediante el uso de un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Estas células se irradiaron para bloquear cualquier proliferación adicional y se usaron como estimuladoras en una reacción de linfocitos mixtos (RLM), en la que los respondedores eran CMSP alogénicas (relación estimulador a respondedor 1:100) en presencia de PHA (2,5 µg/ml). El cultivo se llevó a cabo durante 48 horas, después de lo cual se añadió timidina  $^3\text{H}$ . La radioactividad incorporada se contó después de 24 horas.

Se cultivaron las CMSP en ausencia o presencia de CMM (relación CMM a CMSP 1:10), después de lo cual se recolectó la fracción no adherente y se inmunotizó con el receptor de TNF inducido por glucocorticoide marcado con FITC, o GTR, y CD4 marcado con PE.

#### Generación de células $\text{T}_{\text{H}1}/\text{T}_{\text{H}2}$

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se sembraron a  $2 \times 10^6$  células/ml durante 45 min a 37 °C para eliminar los monocitos. La fracción no adherente se incubó en presencia de anticuerpos anti-CD3 (5 µg/ml) y anti-CD28 (1 µg/ml) unidos a la placa bajo condiciones  $\text{T}_{\text{H}1}$  (IL-2 (4 ng/ml) IL-12 (5 ng/ml) + anti-IL-4 (1 µg/ml)) o  $\text{T}_{\text{H}2}$  (IL-2 (4 ng/ml) + IL-4 (4 ng/ml) + anti-IFN- $\gamma$  (1 µg/ml)) durante 3 días en presencia o ausencia de CMM. Las células se lavaron y después se reestimularon con PHA (2,5 µg/ml) durante otras 24 o 48 horas, después de lo cual se midieron los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4 en los sobrenadantes del cultivo por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota).

Análisis de los niveles de VEGF,  $\text{PGE}_2$  y pro-MMP-1 en el sobrenadante del cultivo de CMM.

Con el uso de CMM humanas caracterizadas previamente, se analizaron los niveles de interleucina-6 (IL-6), VEGF, prostaglandina mediadora de lípidos  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) y metaloproteinasa de la matriz 1 (pro-MMP-1) en el sobrenadante del cultivo de CMM que se cultivaron durante 24 horas en presencia o ausencia de CMSP (relación CMM a CMSP 1:10).

#### Proliferación de CMSP

Las CMSP purificadas se prepararon por centrifugación del paquete leucocitario (Cambrex, Walkersville, Maryland) en Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Oslo, Noruega). Las células separadas se cultivaron (por triplicado) en presencia o ausencia de CMM (sembradas 3-4 horas antes de la adición de CMSP para permitir que sedimentaran) por 48 horas en presencia del mitógeno PHA (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri). En experimentos seleccionados, las CMSP se resuspendieron en medio que contenía los inhibidores de  $\text{PGE}_2$  Indometacina (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) o NS-938 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan). Se añadió ( $^3\text{H}$ )-timidina (20 µl en un cultivo de 200 µl) y las células se recogieron después de un cultivo adicional por 24 h usando un recolector automático. Los efectos de las CMM o de los bloqueadores de  $\text{PGE}_2$  se calcularon como el porcentaje de la respuesta de control (100 %) en presencia de PHA.

#### RT-PCR Cuantitativa

El ARN total de los sedimentos celulares se preparó usando un kit disponible en el mercado (Qiagen, Valencia, California) y de conformidad con las instrucciones del fabricante. El ADN genómico contaminante se eliminó con el kit libre de ADN (Ambion, Austin, Texas). La RT-PCR cuantitativa se realizó en un sistema de detección MJ Research Opticon (South San Francisco, California) con el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen, Valencia, California) con iniciadores a una concentración de 0,5 µM. Los cambios relativos en los niveles de expresión en las células cultivadas en diferentes condiciones se calcularon mediante la diferencia en los valores de Ct (punto de cruce) usando  $\beta$ -actina como control interno. La secuencia para los iniciadores específicos de COX-1 y COX-2 fueron: COX-1: 5'-CCG GAT GCC AGT CAG GAT G-3' (directo), 5'-CTA GAC AGC CAG ATG CTG ACA G-3' (inverso); COX-2: 5'-ATC TAC CCT CAA GTC CC-3' (directo), 5'-TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG-3' (inverso).

Se incubaron cantidades crecientes de CMSP alogénicas con números constantes de CMM (2,000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos en presencia de PHA (2,5 µg/ml) durante 72 horas, y se determinó la incorporación de timidina  $^3\text{H}$  (conteos por minuto, cpm). Las CMSP y las CMM se cultivaron en relaciones de CMM:CMSP de 1:1, 1:3, 1:10, 1:30 y 1:81.

#### Resultados

En los presentes estudios, se examinó la interacción de las CMM humanas con poblaciones de células inmunitarias aisladas, incluyendo las células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras ( $\text{T}_{\text{H}1}$  y  $\text{T}_{\text{H}2}$ ) y células NK. La interacción de las CMM con cada tipo de célula inmunitaria tuvo consecuencias específicas, sugiriendo así que las CMM pueden modular varias etapas en el proceso de la respuesta inmunitaria. La producción de factores secretados que modulan y pueden ser responsables de los efectos inmunomoduladores de las CMM se evaluó y se implicó la síntesis de prostaglandinas.

Las células dendríticas precursoras mieloides (DC1) y plasmocitoides (DC2) se aislaron mediante separación inmunomagnética de las células BDCA1 $^+$  y BDCA2 $^+$  respectivamente y se maduraron mediante incubación con GM-CSF e IL-4 (( $1 \times 10^3$  IU/ml y  $1 \times 10^3$  IU/ml, respectivamente) para las células DC1, o IL-3 (10 ng/ml) para las células DC2. Con el uso de la citometría de flujo, las células DC1 fueron HLA-DR $^+$  y CD11c $^+$ , mientras que las células DC2 fueron

HLA-DR<sup>+</sup> y CD123<sup>+</sup> (Fig. 1A). En presencia del agente inflamatorio lipopolisacárido bacteriano (LPS, 1 ng/ml), las células DC1 produjeron niveles moderados de TNF- $\alpha$  pero cuando estaban presentes las CMM (relaciones examinadas 1:1 y 1:10), hubo una reducción de >50% en la secreción de TNF- $\alpha$  (Fig. 1B). Por otro lado, las células DC2 produjeron IL-10 en presencia de LPS y sus niveles aumentaron más de 2 veces con el cocultivo CMM:DC2 (1:1) (Fig. 1B). Por lo tanto, las CMM modificaron el perfil de citocinas de las DC activadas en cultivo hacia un fenotipo más tolerogénico. Adicionalmente, las DC activadas, cuando se cultivaron con CMM, fueron capaces de reducir los niveles de IFN- $\gamma$  y aumentar los de IL-4 secretados por las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes (Fig. 1C) sugiriendo un cambio mediado por las CMM del fenotipo de las células T de proinflamatorias a antiinflamatorias.

Como el aumento de la secreción de IL-10 juega un papel en la generación de células reguladoras (Kingsley, y otros, J. Immunol., vol. 168, pág. 1080 (2002)), las células reguladoras T (T<sub>Reg</sub>) se cuantificaron por citometría de flujo en cocultivos de CMSP y CMM. Después del cultivo de las CMSP con las CMM por 3-5 días, hubo un aumento en el número de células T<sub>Reg</sub> según se determinó por la tinción de las CMSP con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 (Fig. 2A), lo que apoya adicionalmente una respuesta tolerogénica inducida por las CMM. La población de células T<sub>Reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, generada en presencia de CMM expresó niveles aumentados del receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR), un receptor de superficie celular expresado en poblaciones de células T<sub>Reg</sub>, y fue de naturaleza supresora al suprimir la proliferación de células T alogénicas (Fig. 3A, B). A continuación, las CMM se investigaron en cuanto a su capacidad directa para afectar la diferenciación de células T. Con el uso de células T purificadas seleccionadas por anticuerpos (células (CD4<sup>+</sup> Th), se generaron células T<sub>H1</sub> productoras de IFN- $\gamma$  y T<sub>H2</sub> productoras de IL-4 en presencia o ausencia de CMM. Cuando las CMM estaban presentes durante la diferenciación, hubo una disminución de la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T<sub>H1</sub> y un aumento de la secreción de IL-4 por las células T<sub>H2</sub> (Fig. 2B). No se observaron cambios significativos en los niveles de IFN- $\gamma$  o IL-4 cuando las CMM se añadieron al cultivo después de que las células Th se diferenciaron (a los 3 días) en los tipos T<sub>H1</sub> o T<sub>H2</sub> efectoras (datos no mostrados). Estos experimentos sugieren que las CMM pueden afectar directamente la diferenciación de las células T efectoras y alterar la secreción de citocinas por las células T hacia un fenotipo humoral.

De manera similar, cuando las CMM se cultivaron con células NK purificadas (CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD36<sup>-</sup>) en una relación 1:1 durante diferentes períodos de tiempo (0-48 h), hubo una disminución de la secreción de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del cultivo (Fig. 2C), lo que sugiere que las CMM pueden modular también las funciones de las células NK.

El trabajo anterior indicó que las CMM modifican las funciones de las células T por factor(es) soluble(s) (LeBlanc, y otros, Exp. Hematol., vol. 31, pág. 890 (2003); Tse, y otros, Transplantation, vol. 75, pág. 389 (2003). Se observó que las CMM secretaron varios factores, que incluyen IL-6, prostaglandina E<sub>2</sub>, VEGF y proMMP-1 constitutivamente y los niveles de cada uno aumentaron tras el cultivo con CMSP (Fig. 5). Para investigar los factores derivados de las CMM que conducen a la inhibición de TNF- $\alpha$  y al aumento de la producción de IL-10 por las DC, se investigó el papel potencial de la prostaglandina E<sub>2</sub>, ya que se demostró que inhibe la producción de TNF- $\alpha$  por las DC activas (Vassiliou, y otros, Cell. Immunol., vol. 223, pág. 120 (2003)). Los medios acondicionados del cultivo de las CMM (cultivo de 24 horas de 0,5 x10<sup>6</sup> células/ml) contenían aprox. 1000 pg/ml de PGE<sub>2</sub> (Fig. 4A). No hubo presencia detectable de inductores conocidos de la secreción de PGE<sub>2</sub>, por ejemplo, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-1 $\beta$  (datos no mostrados) en el sobrenadante del cultivo lo que indica una secreción constitutiva de PGE<sub>2</sub> por las CMM. La secreción de PGE<sub>2</sub> por las CMMh se inhibió al 60-90% en presencia de los inhibidores conocidos de la producción de PGE<sub>2</sub>, NS-398 (5  $\mu$ M) e indometacina (4  $\mu$ M) (Fig. 4A). Ya que la liberación de la secreción de PGE<sub>2</sub> se produce como resultado de la actividad enzimática de la enzima ciclooxigenasa 1 constitutivamente activa (COX-1) y de la enzima ciclooxigenasa 2 inducible (COX-2) (Harris, y otros, Trends Immunol., vol. 23, pág. 144 (2002)) se analizó la expresión del ARNm para COX-1 y COX-2 en CMM y CMSP usando el sistema de cultivo por transpocillo. Las CMM expresaron niveles significativamente más altos de COX-2 comparado con las CMSP y los niveles de expresión aumentaron más de 3 veces después del cocultivo de CMM y CMSP (relación CMM a CMSP 1:10) durante 24 horas (Fig. 4B). Se observaron cambios modestos en los niveles de COX-1, lo que sugiere que el aumento de la secreción de PGE<sub>2</sub> después del cocultivo CMM-CMSP (Fig. 5) es mediado por la regulación positiva de COX-2. Para investigar si los efectos inmunomoduladores de las CMM en las células T y DC fueron mediados por la PGE<sub>2</sub>, se cultivaron CMM con células dendríticas activadas (DC1) o células T<sub>H1</sub> en presencia de los inhibidores de T<sub>H1</sub> NS-398 o indometacina. La presencia de NS-398 o indometacina aumentó la secreción de TNF- $\alpha$  por las DC1 y la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T<sub>H1</sub> (Fig. 4C), respectivamente, sugiriendo así que los efectos de las CMM en los tipos de células inmunitarias pueden ser mediados por la PGE<sub>2</sub> secretada. Los estudios recientes han demostrado que las CMM inhiben la proliferación de células T inducida por diversos estímulos (DeNicola, y otros, Blood, vol. 99, pág. 3838 (2002); LeBlanc, y otros, Scand. J. Immunol., vol. 57, pág. 11 (2003)). Se observó que las CMM inhiben la proliferación de células T inducida por mitógenos de una manera dependiente de la dosis (Fig. 6) y cuando los inhibidores de PGE<sub>2</sub> NS-398 (5  $\mu$ M) o indometacina (4  $\mu$ M) estaban presentes, hubo un aumento de >70% en la incorporación de timidina (<sup>3</sup>H) por las CMSP tratadas con PHA en cultivos que contienen CMM en comparación con los controles sin inhibidores (Fig. 4D).

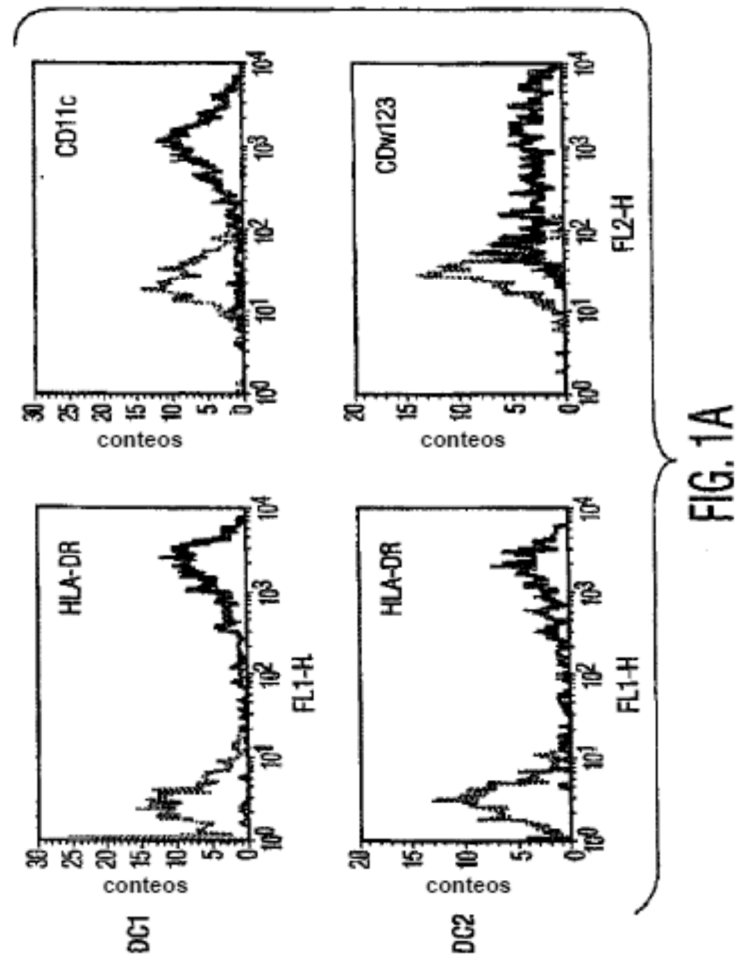
En resumen, se propone un modelo de interacción de las CMM con otros tipos de células inmunitarias (Fig. 7). Cuando las células T maduras están presentes, las CMM pueden interactuar con ellas directamente e inhibir la producción de IFN- $\gamma$  proinflamatorio (vía 1) y promover el fenotipo regulador de las células T (vía 3) y las células T<sub>H2</sub> antiinflamatorias (vía 5). Además, las CMM pueden alterar el resultado de la respuesta inmunitaria de las células T a través de las DC mediante la secreción de PGE<sub>2</sub>, que inhibe las células DC1 proinflamatorias (vía 2) y promueve las células DC<sub>2</sub> antiinflamatorias (vía 4) o DC reguladoras (vía 3). Un cambio hacia la inmunidad TH2 a su vez, sugiere un cambio en

- 5 la actividad de las células B hacia una generación aumentada de anticuerpos del subtipo IgE/IgG1 (vía 7). Las CMM, por su capacidad para inhibir la secreción de IFN- $\gamma$  de las células NK, probablemente modifiquen la función celular de las NK (vía 6). Este modelo de las interacciones CMM:células inmunitarias es consistente con la experimentación realizada en otros varios laboratorios (LeBlanc, y otros, Exp. Hematol., vol. 31, pág. 890 (2003); Tse, y otros, Transplantation, vol. 75, pág. 389 (2003); DiNicola, y otros, Blood, vol. 99, pág. 3838 (2002)). Se está realizando un examen adicional de los mecanismos propuestos y ahora se necesitan estudios en animales para examinar los efectos in vivo de la administración de CMM.



## REIVINDICACIONES

1. Células madre mesenquimales genéticamente no manipuladas para uso en el tratamiento de la inflamación, en donde las células madre mesenquimales promueven el fenotipo regulador de las células T, y en donde las células madre mesenquimales se administran sistémicamente.
- 5 2. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales inhiben la secreción de TNF- $\alpha$  y aumentan la secreción de IL-10 a partir de células dendríticas DC1 y DC2 activadas, respectivamente.
3. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales inhiben las células T helper 1 (células Th1), disminuyendo así la expresión del Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).
- 10 4. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales interactúan directamente con las células T maduras e inhiben la producción proinflamatoria de Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).
5. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inflamación es inflamación en el intestino y el hígado durante la enfermedad inflamatoria intestinal y la hepatitis crónica, respectivamente.
- 15 6. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las células madre mesenquimales promueven el incremento de la secreción de Interleucina-10 (IL-10).
7. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales inhiben la activación excesiva de neutrófilos y macrófagos.
- 20 8. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las células madre mesenquimales promueven la secreción de IL-10.
9. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inflamación es inflamación en sitios inmunitarios privilegiados tales como el ojo, incluida la córnea, el cristalino, el epitelio pigmentario y la retina, el cerebro, la médula espinal, el útero embarazado y la placenta, el ovario, los testículos, la corteza suprarrenal, el hígado y los folículos capilares.
- 25 10. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las células madre mesenquimales promueven la secreción de IL-10.
11. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales promueven la maduración de células T a células T reguladoras (Treg).
- 30



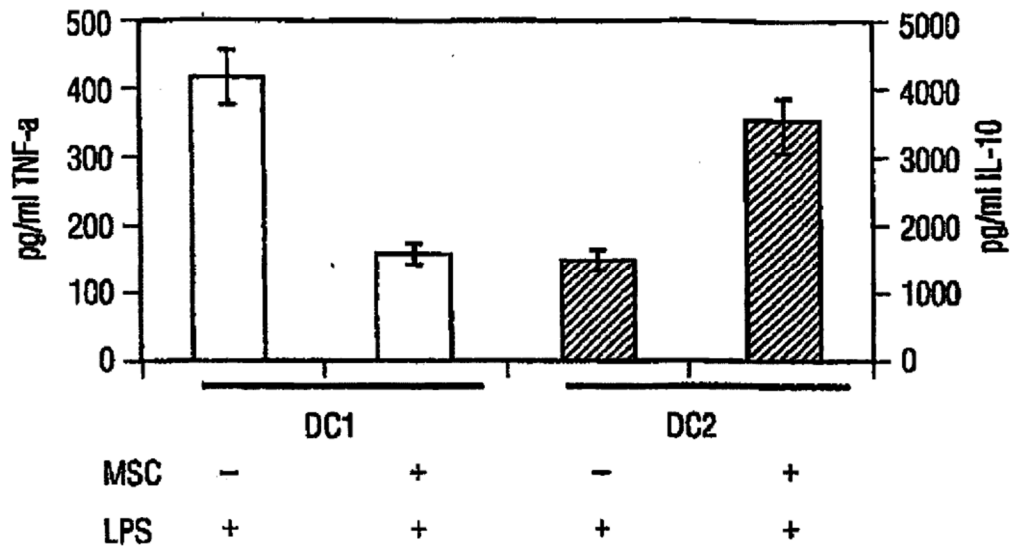


FIG. 1B

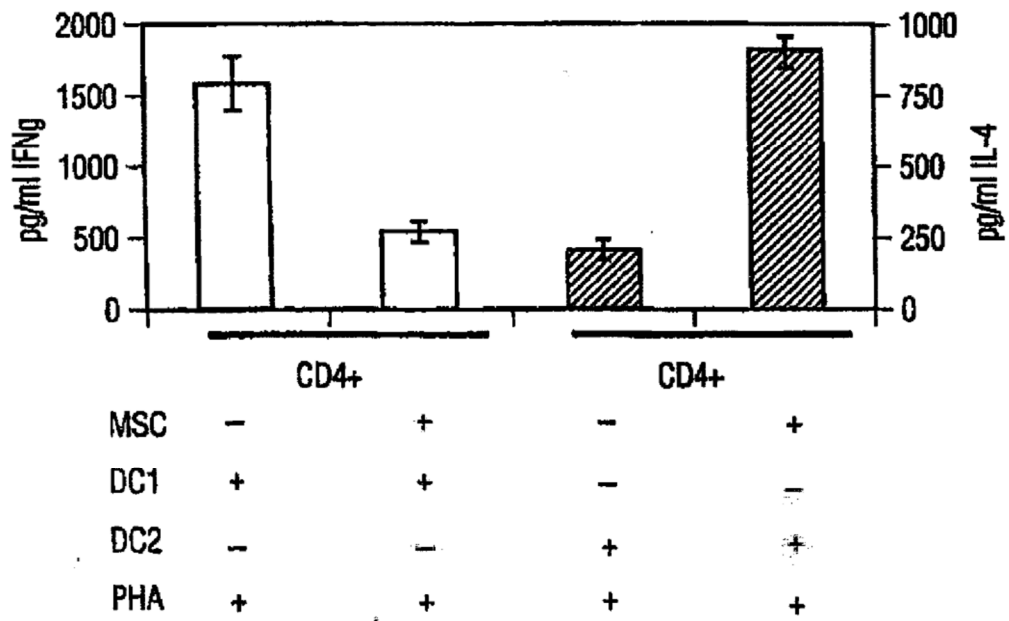


FIG. 1C

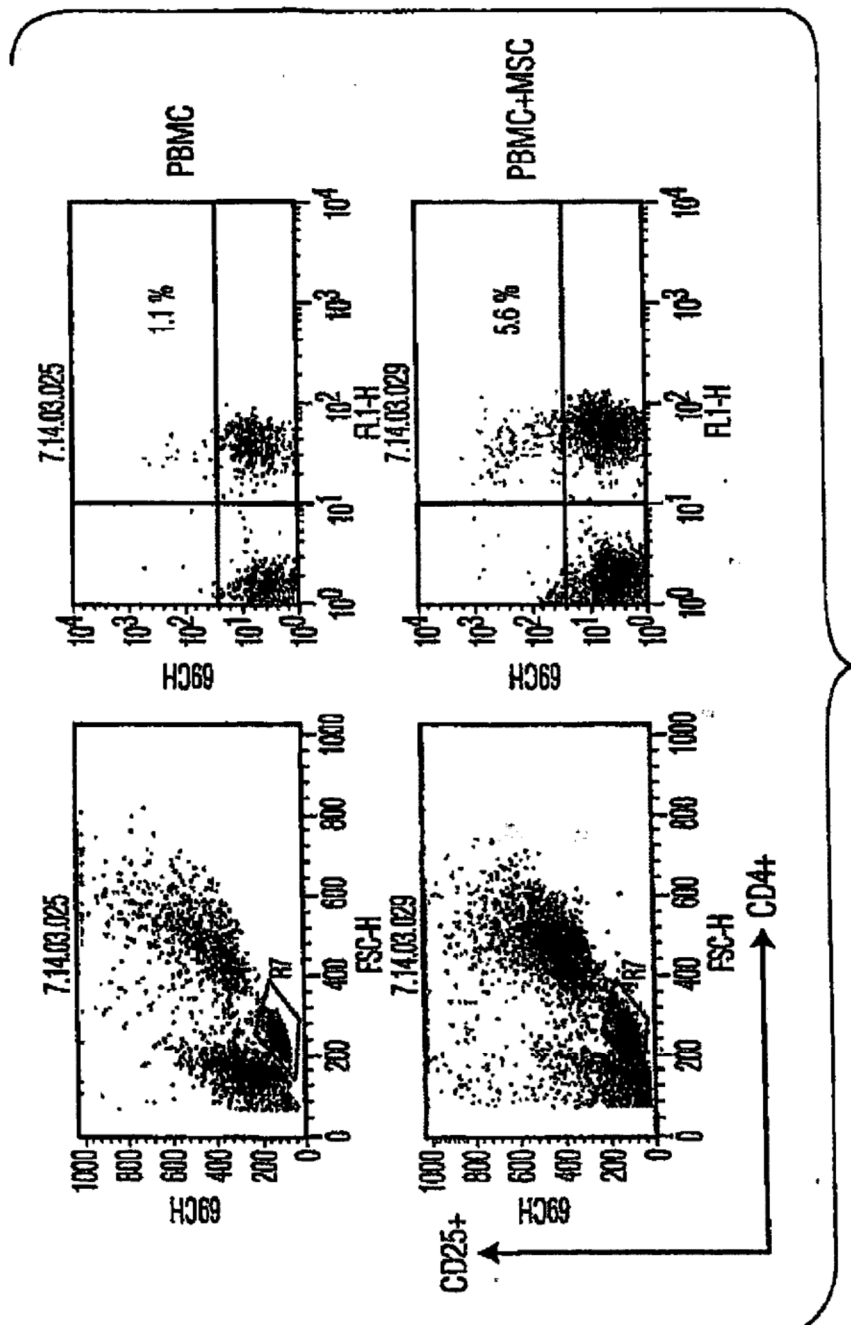


FIG. 2A

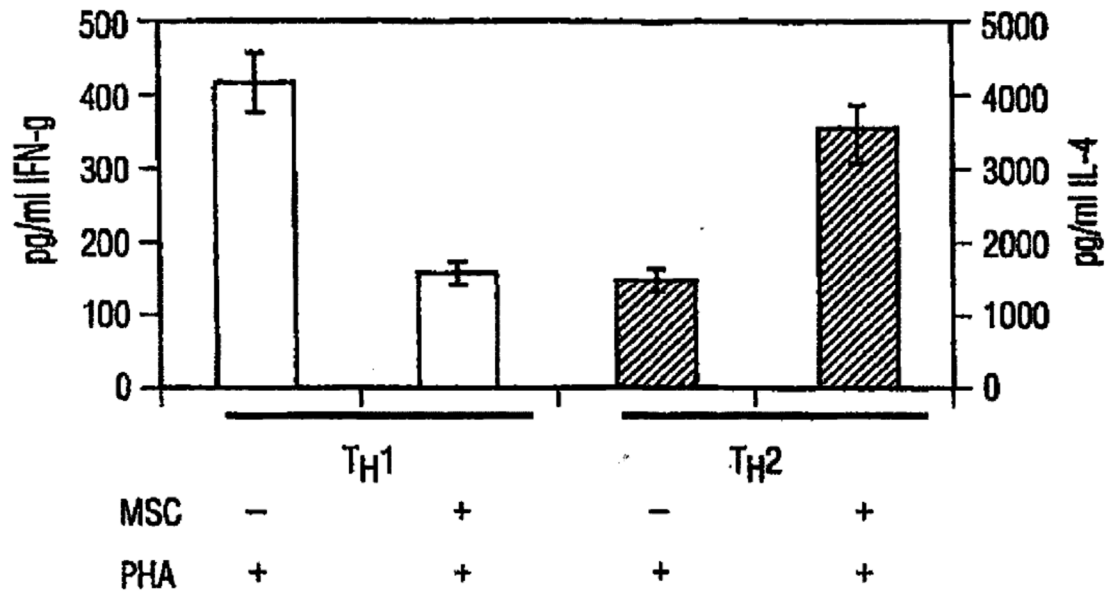


FIG. 2B

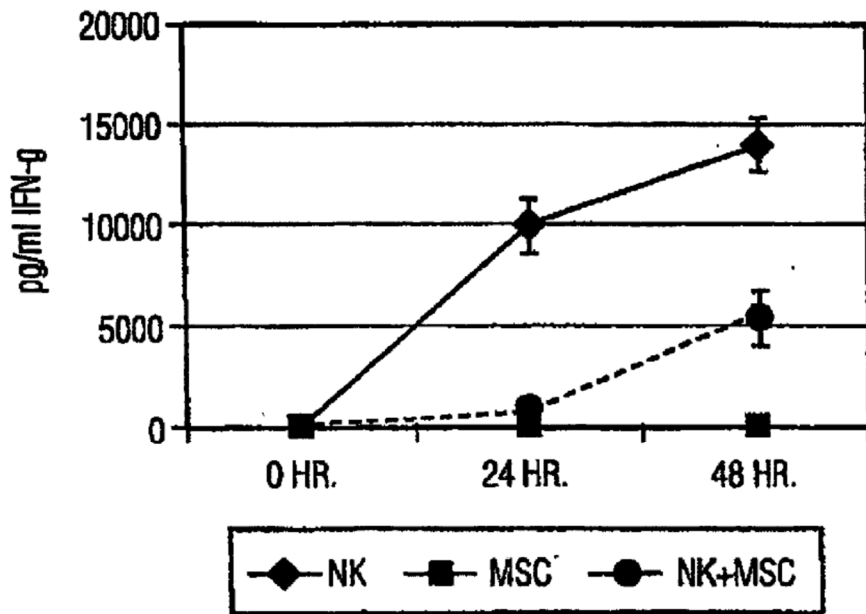


FIG. 2C

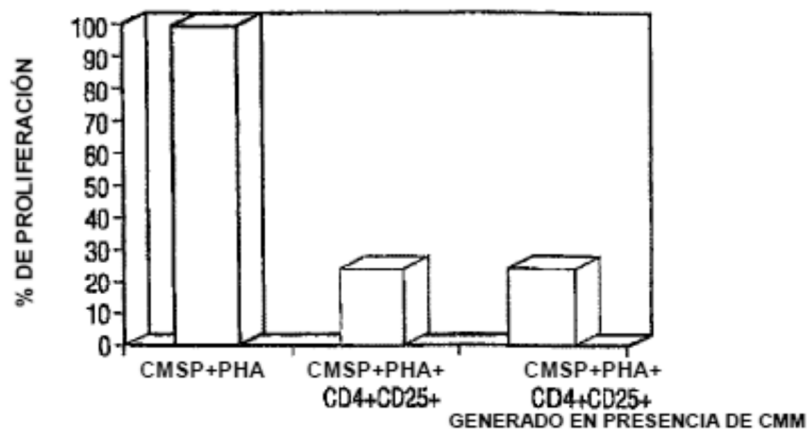


FIG. 3A

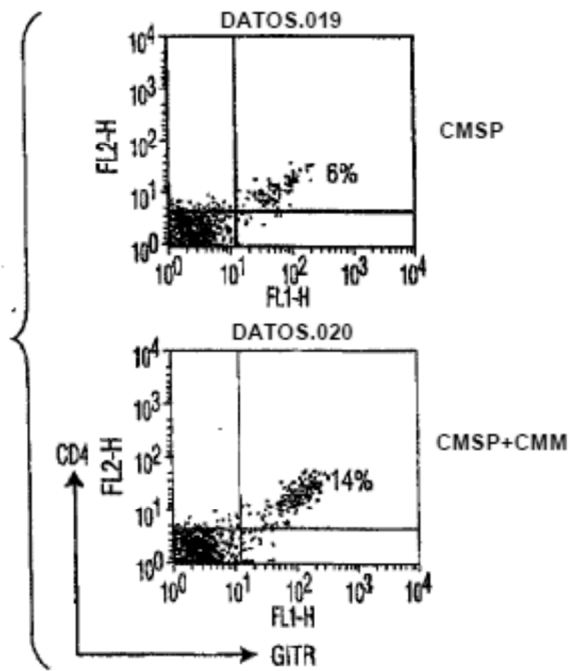


FIG. 3B

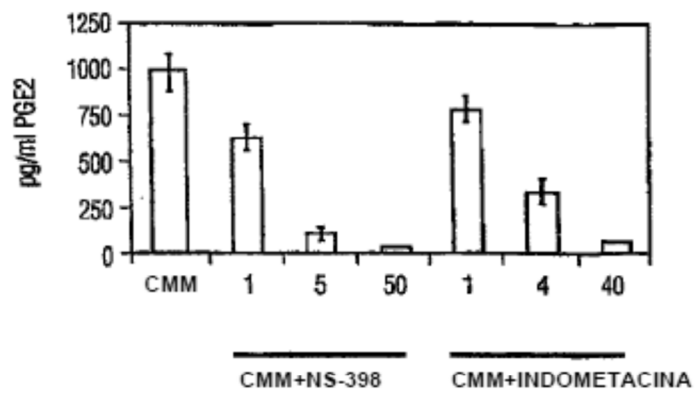


FIG. 4A

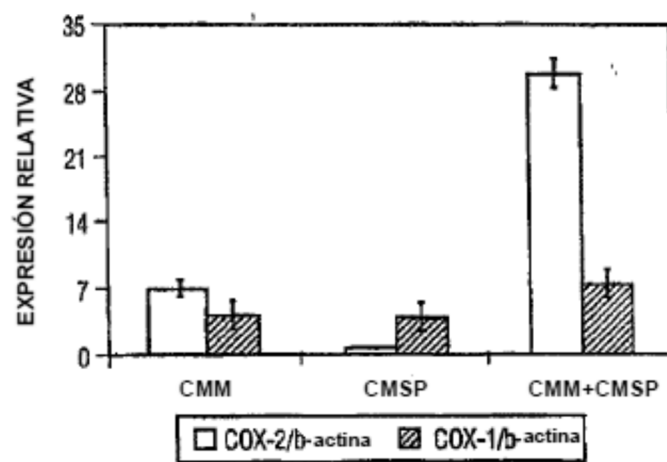


FIG. 4B

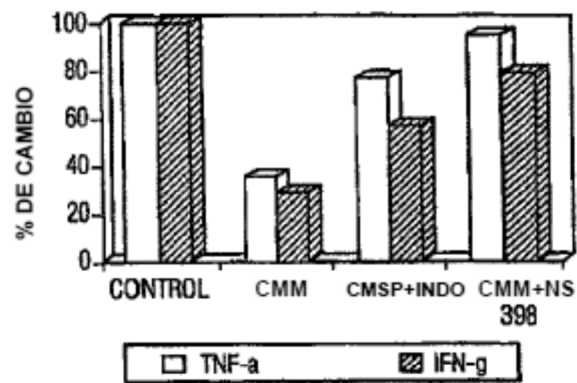


FIG. 4C

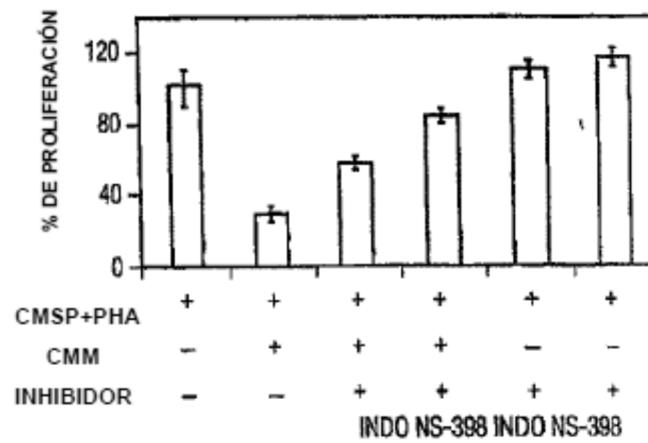


FIG. 4D



Fig. 5

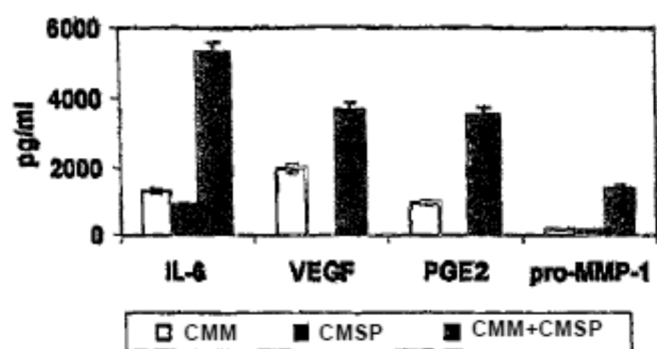
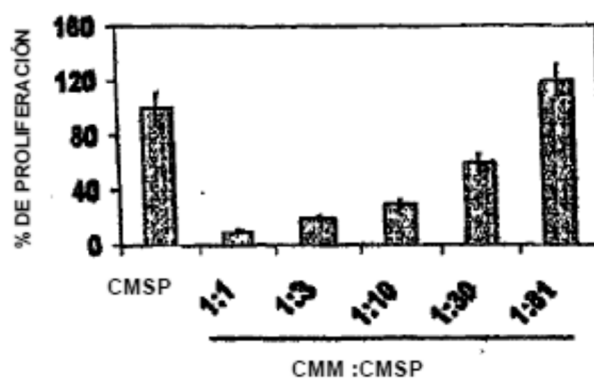


Fig. 6



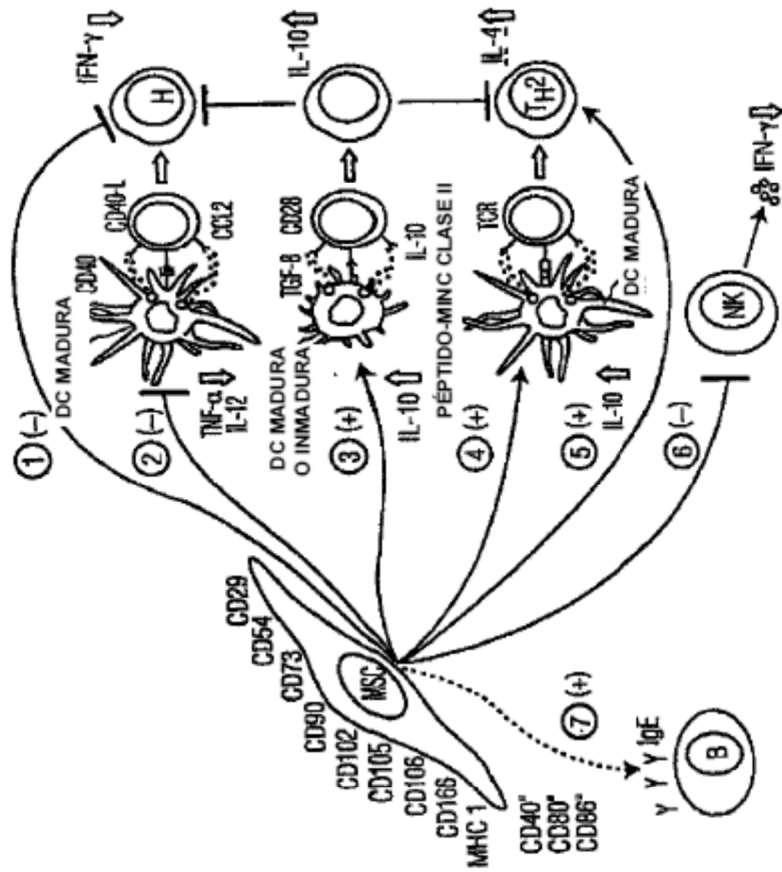


FIG. 7