(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 385 450**

(51) Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05725577 .0**
(96) Fecha de presentación: **15.03.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1727892**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

(54) Título: **Células madre mesenquimatosas y sus utilizaciones**

(30) Prioridad:
22.03.2004 US 555118 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.07.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.07.2012

(73) Titular/es:
OSIRIS THERAPEUTICS, INC.
2001 ALICEANNA STREET
BALTIMORE, MD 21231, US

(72) Inventor/es:
PITTENGER, Mark F. y
AGGARWAL, Sudeepta

(74) Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 385 450 T3

DESCRIPCIÓN

Células madre mesenquimatosas y sus utilizaciones.

La presente invención se refiere a nuevas utilizaciones para las células madre mesenquimatosas.

Las células madre mesenquimatosas (MSC) son células madre pluripotentes que pueden diferenciarse fácilmente en linajes incluyendo los osteoblastos, los miocitos, los condrocitos y los adipocitos (Pittenger, *et al.*, *Science*, Vol. 284, pág. 143 (1999); Haynesworth, *et al.*, *Bone*, Vol. 13, pág. 69 (1992); Prockop, *Science*, Vol. 276, pág. 71 (1997)). Los estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de las MSC para diferenciarse en el músculo (Wakitani, *et al., Muscle Nerve*, Vol. 18, pág. 1417 (1995)), precursores de tipo neuronal (Woodbury, *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, Vol. 69, pág. 908 (2002); Sanchez-Ramos, *et al.*, *Exp. Neurol.*, Vol. 171, pág. 109 (2001)), cardiomiocitos (Toma, *et al., Circulation*, Vol. 105, pág. 93 (2002); Fakuda, *Artif. Organs*, Vol. 25, pág. 187 (2001)) y posiblemente otros tipos de células. Además, se ha demostrado que las MSC proporcionan capas de alimentación eficaces para la expansión de las células madre hematopoyéticas y embrionarias (Eaves, *et al., Ann. N.Y. Acad. Sci.,* Vol. 938, pág. 63 (2001); Wagers, *et al., Gene Therapy*, Vol. 9, pág. 606 (2002)). Los estudios recientes con una variedad de modelos de animales han demostrado que las MSC pueden ser útiles en la reparación o regeneración de los tejidos dañados de hueso, cartílago, menisco o miocardio (DeKok, *et al., Clin. Oral Implants Res.*, Vol. 14, pág. 481 (2003)); Wu, *et al., Transplantation*, Vol. 75, pág. 679 (2003); Noel, *et al., Curr. Opin. Investig. Drugs*, Vol. 3, pág. 1000 (2002); Ballas, *et al., J. Cell. Biochem. Suppl.,* Vol. 38, pág. 20 (2002); Mackenzie, *et al., Blod Cells Mol. Dis.*, Vol. 27 (2002)). Varios investigadores han utilizado las MSC con resultados alentadores para el trasplante en modelos de enfermedades de animales incluyendo la osteogenia imperfecta (Pereira, *et al., Proc. Nat. Acad. Sci.,* Vol. 95, pág. 1142 (1998)), el parkinsonismo (Schwartz, *et al., Hum. Gene Ther.*, Vol. 10, pág. 2539 (1999)), lesión de la médula espinal (Chopp, *et al., Neuroreport,* Vol. 11, pág. 3001 (2000); Wu, *et al., J. Neurosci. Res.,* Vol. 72, pág. 393 (2003)) y trastornos cardíacos (Tomita, *et al., Circulation,* Vol. 100, pág. 247 (1999); Shake, *et al., Ann. Thorac. Surg.*, Vol. 73, pág. 1919 (2002)). En gran medida, se han publicado también resultados prometedores en pruebas clínicas para la osteogenia imperfecta (Horowitz, *et al., Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 99, pág. 8932 (2002)) y el aumento de trasplante de trasplantes heterólogos de medula ósea (Frassoni, *et al., Int. Society for Cell Therapy,* SA006 (resumen) (2002); Koc, *et al., J. Clin. Onco*l., Vol. 18, pág. 307 (2000)).

Las MSC expresan el antígeno de clase I del complejo con histocompatibilidad mayor (MHC) en su superficie pero limitaban el MHC de clase II (Le Blanc, *et al., Exp. Hematol.*, Vol. 31, pág. 890 (2003); Potian, *et al., J. Immuno*l., Vol. 171, pág. 3426 (2003)) y moléculas coestimulantes ni B7 ni CD40 (Majumdar, *et al., J. Biomed. Sci.,* Vol. 10, pág. 228 (2003)), lo que sugiere que estas células tienen un fenotipo poco inmunógeno (Tse, *et al., Transplantation*, Vol. 75, pág. 389 (2003)). Las MSC inhiben también las respuestas proliferantes de los linfocitos T de manera independiente de MHC (Bartholomew, *et al., Exp. Hematol.*, Vol. 30, pág. 42 (2002); Devine, *et al., Cancer J.*, Vol. 7, pág. 576 (2001); DiNicola, *et al., Blood,* Vol. 99, pág. 3838 (2002)). Estas propiedades inmunológicas de las MSC pueden acentuar su implante del trasplante y limitar la capacidad del sistema inmunitario del receptor para reconocer y rechazar las células del alotrasplante después del trasplante. La producción de factores por las MSC, que modulan la respuesta inmunitaria y ayudan a la hematopoyesis junto con su capacidad para diferenciarse en tipos de células apropiadas bajo estímulos locales las convierten en células madre deseables para los estudios de trasplante celular (Majundar, *et al., Hematother. Stem. Cell. Res.*, Vol. 9, pág. 841 (2000); Haynesworth, *et al., J. Cell. Physiol.*, Vol. 166, pág. 585 (1996)).

Los documentos US 2003/049843, WO 03/004661 y EP 1 279 738 describen vehículos adenovíricos con un tropismo para las células madre mesenquimatosas destinadas a suministrar ácidos nucleicos de interés a las células madre mesenquimatosas. El documento WO 01/80865 da a conocer la reparación de articulaciones lesionadas o enfermas mediante la administración de células madre mesenquimatosas para sustituir el tejido desaparecido y/o dañado en la articulación. El documento WO 2004/006942 describe un procedimiento para mantener el suministro de las células en un área objetivo en un cuerpo de mamífero, en el que las células, por ejemplo, células madre mesenquimatosas normales o modificadas genéticamente, se introducen a través de una zona de introducción de un área objetivo y un elemento tampón que contiene un agente terapéutico se deposita en el punto de introducción. El documento WO 03/105908 describe el direccionamiento de las células, por ejemplo, células madre mesenquimatosas expandidas en el cultivo, a un tejido objetivo utilizando una molécula que presenta el carbohidrato. El documento WO 03/068248 describe la inducción de la formación del folículo de cabello en una capa dérmica que está situada bajo una superficie externa de la piel suministrando células inductivas de la cubierta dérmica y/o células inductivas de la papila dérmica, por ejemplo, las procedentes de células madre mesenquimatosas, en la capa dérmica utilizando un dispositivo de suministro. El documento WO 03/078609 describe procedimientos de inducir diferenciación de células madre tales como las células madre mesenquimatosas cultivando las células en presencia de una muestra de tejido y/o medio extracelular de una muestra de tejido. El documento US 2002/110544 se refiere a la utilización de células madre mesenquimatosas para regenerar el cartílago hialino en osteoartritis. El documento KR 10-2004-0016785 describe la transdiferenciación de células madre mesenquimatosas en células neuronales transduciendo células madre mesenquimatosas con factores de transcripción hélice-bucle-hélice básicos (bHLH, por sus siglas en inglés) neurógenos. El documento WO 00/49136 describe células madre mesenquimatosas que están genéticamente modificadas con un ácido nucleico que modifica un polipéptido supresor del sistema inmunitario para evitar el rechazo de las células madre mesenquimatosas por un receptor. El documento WO 03/059276 describe células de

desarrollo más potente producidas a partir de células de desarrollo menos potente tales como las células madre mesenquimatosas y las utilizaciones potenciales de las mismas.

Los solicitantes actualmente han examinado las interacciones de las células madre mesenquimatosas con poblaciones de células inmunitarias aisladas, incluyendo los dendrocitos (DC1 y DC2), los linfocitos T efectores (Th1 y Th2) y las células NK. Basándose en dichas interacciones, los solicitantes descubrieron que las células madre mesenquimatosas pueden regular la producción de varios factores que pueden regular varias etapas en los procesos de respuesta inmunitaria. De este modo, las células madre mesenquimatosas pueden emplearse en el tratamiento de enfermedades y trastornos que implican al sistema inmunitario, o enfermedades, afecciones o trastornos que implican inflamación o respuestas alérgicas. Dichas enfermedades, afecciones y trastornos comprenden de manera no limitativa, enfermedades autoinmunitarias, alergias, artritis, heridas inflamadas, alopecia circunscrita (calvicie), enfermedades periodontales incluyendo la gingivitis y periodontitis, y otras enfermedades, afecciones o trastornos que implican una respuesta inmunitaria.

Además, se cree que las células madre mesenquimatosas estimulan las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) para producir el factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF, que favorece la angiogenia al estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Además, se cree que las células madre mesenquimatosas estimulan los dendrocitos (DC) al producir interferón-beta (IFN-β), que favorece la supresión tumoral y la inmunidad contra la infección vírica.

La presente invención proporciona células madre mesenquimatosas no manipuladas genéticamente para el tratamiento de la encefalomielitis autoinmunitaria, la esclerosis múltiple o las enfermedades inflamatorias del intestino en un animal.

Aunque el alcance de la presente invención no debe limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que por lo menos un mecanismo por el que las células madre mesenquimatosas suprimen la enfermedad autoinmunitaria consiste en por ocasionar la liberación de interleucina-10 (IL-10) de los linfocitos T reguladores (linfocitos T_{reg}) y/o de los dendrocitos (DC).

En una forma de realización, el animal es un mamífero, el mamífero puede ser un primate, incluyendo los primates humanos y no humanos.

En general, la terapia con células madre mesenquimatosas (MSC) se basa por ejemplo, en la secuencia siguiente: recolección del tejido que contiene las MSC, aislamiento y expansión de las MSC y administración de las MSC al animal, con o sin manipulación bioquímica.

Las células madre mesenquimatosas que se administran pueden ser una composición homogénea o pueden ser una población de células mezcladas enriquecidas en MSC. Las composiciones de células madre mesenquimatosas homogéneas pueden obtenerse cultivando células de médula adherentes o de periostio y las composiciones de células madre mesenquimatosas pueden obtenerse cultivando células adherentes de la medula o del periostio y las células madre mesenquimatosas pueden identificarse mediante marcadores específicos de la superficie celular que se identifican con anticuerpos monoclonales únicos. Un procedimiento para obtener una población de células enriquecida en células madre mesenquimatosas se describe, por ejemplo, en la patente US nº 5.486.359. Las fuentes alternativas para las células madre mesenquimatosas comprenden de manera no limitativa la sangre, la piel, la sangre del cordón umbilical, los músculos, grasa, los huesos y el pericondrio.

Las células madre mesenquimatosas pueden administrarse por varios procedimientos. Las células madre mesenquimatosas pueden administrarse de forma general, tal como por administración intravenosa, intrarterial o intraperitonal.

Las células madre mesenquimatosas pueden proceder de un espectro de fuentes incluyendo el autóloga, alogeneica o xenogeneica.

Las células madre mesenquimatosas se administran en una cantidad eficaz para tratar enfermedades mencionadas anteriormente en un animal. Las células madre mesenquimatosas pueden administrarse en una cantidad desde aproximadamente $1x10^5$ células/kg hasta aproximadamente $1x10^7$ células/kg, preferentemente $1x10^6$ células/kg hasta aproximadamente $5x10^6$ células/kg. La cantidad de células madre mesenquimatosas que debe administrarse depende de varios factores, incluyendo, la edad, el peso y el sexo del paciente, la enfermedad que debe tratarse y el alcance y gravedad de la misma.

Las células madre mesenquimatosas pueden administrarse junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las células madre mesenquimatosas pueden administrarse en forma de suspensión celular en un medio líquido farmacéuticamente aceptable para inyectables.

Aunque el alcance de la presente invención no es limitarse a ningún razonamiento teórico se cree que las células

madre mesenquimatosas favorecen la maduración de linfocitos T a linfocitos T reguladores (T_{reg}), controlando de este modo respuestas inflamatorias. Se cree además que las células madre mesenquimatosas inhiben los linfocitos T colaboradores 1 (linfocitos Th1), disminuyendo de este modo la expresión del interferón-γ (IFN-γ) en determinadas reacciones inflamatorias.

Las células madre mesenquimatosas pueden administrarse a un animal de modo que las células madre mesenquimatosas se ponen en contacto con microglias y/o astrocitos en el cerebro para reducir la inflamación, por lo cual las células madre mesenquimatosas limitan la neurodegeneración originada por las células gliales activadas en enfermedades o trastornos.

Las células madre mesenquimatosas pueden utilizarse para limitar la inflamación en el intestino durante la enfermedad inflamatoria del intestino. Aunque el alcance de la presente invención no pretende limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimatosas favorecen el aumento de secreción de interleucina-10 (IL-10) y la generación de linfocitos T reguladores (linfocitos T_{reg}).

En otra forma de realización, las células madre mesenquimatosas pueden utilizarse para inhibir el exceso de neutrófilos y la activación de macrófagos en condiciones patológicas. Aunque el alcance de la invención no es limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree las células madre mesenquimatosas (i) favorecen la secreción de citocinas supresoras tales como IL-10 e inhiben el factor inhibidor de migración de macrófagos; (ii) inducen a las células mononucleares de la sangre periférica a expresar el factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF, que estimula la estructuración glomerular; (iii) favorecen la secreción del interferón-beta (IFN-β); y (iv) median en las respuestas por los linfocitos T colaboradores 2 (Th2), y con lo cual favorecen el aumento de producción de inmunoglobulina E (IgE) por las células β.

Debe sobrentenderse que las células madre mesenquimatosas, cuando se emplean en las terapias y tratamientos mencionados anteriormente, pueden emplearse en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos por los expertos en la materia, que comprenden de manera no limitativa, factores de crecimiento, citocinas, fármacos tales como los fármacos antinflamatorios y otras células a parte de las células madre mesenquimatosas, tales como los dendrocitos, y pueden administrarse con vehículos solubles para las células tales como el ácido hialurónico, o en combinación con matrices sólidas, tales como colágeno, gelatina u otros polímeros biocompatibles, según proceda.

Debe apreciarse que los procedimientos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo de numerosas maneras y con varias modificaciones y permutaciones de los mismos que son muy conocidas en la técnica. También puede apreciarse que algunas teorías expresadas como modos de actuación o interacciones entre tipos de células no deberían considerarse limitativas de esta invención en modo alguno, pero se presentan de modo que los procedimientos descritos en la presente memoria puedan comprenderse en su totalidad.

La invención se describirá a continuación con respecto a los dibujos, en los que:

Figura 1 Las MSC modulan las funciones de los dendrocitos. (A) Análisis citométrico de flujo de células DC1 monocíticas maduras que utiliza anticuerpos contra HLA-DR y CD11c y de células DC2 plasmacitoides que utiliza anticuerpos contra HLA-DR y CD123 (receptor de IL-3). (---): Control de isótopos; (___): anticuerpos conjugados con FITC/PE. (B) Las MSC inhiben la secreción de TNF-α (eje y primario) y aumentan la secreción de IL-10 (eje y secundario) de DC1 y DC2 activados respectivamente. (C) MSC cultivadas con células DC1 maduras inhiben la secreción de IFN-γ (eje y primario) por linfocitos T y aumentan las concentraciones de IL-4 (eje y secundario) en comparación con MSC o DC sólo. La disminución de la producción de IFN-γ proinflamatoria y el aumento de la producción de IL-4 antinflamatoria en presencia de MSC indicaba un desplazamiento en la población de linfocitos T hacía un fenotipo antinflamatorio.

Figura 2 Las MSC inhiben la función proinflamatoria de los linfocitos T efectores. (A) Análisis citométrico de flujo de las cantidades (en %) de linfocitos T_{reg} por tinción de las PBMC o la fracción no adherente en el cultivo MSC+PBMC (MSC+PBMC) con anticuerpos CD4 conjugados con FITC (eje x) y CD25 conjugados con PE (eje y). Se colocaron entradas basándose en los anticuerpos de referencia del isótopo como fondo. Los gráficos son representativos de 5 experimentos independientes. (B) Linfocitos T_H1 generados en presencia de cantidades reducidas de IFN-γ segregadas por las MSC (eje y primario) y linfocitos T_H2 generados en presencia de cantidades aumentadas de IL-4 segregadas por las MSC (eje y secundario) en sobrenadantes en cultivo celular. (C) Las MSC inhiben la secreción de IFN-γ procedente de las células NK purificadas cultivadas durante 0, 24 o 48 horas en una placa de 24 pocillos. Los datos presentados son la media ± SD de la secreción de citocina en un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 3 Las MSC conducen al aumento de las cifras de población de linfocitos T_{reg} y al aumento de la expresión de GITR. (A) Una población de linfocitos T_{reg} $CD4^+$ $CD25^+$ procedente de cultivos de PBMC o MSC + PBMC (relación de MSC a PBMC 1:10) (cultivados sin ninguna estimulación más durante 3 días) se aisló utilizando un procedimiento de aislamiento magnético en 2 etapas. Estas células se irradiaron (para bloquear cualquier proliferación adicional) y se utilizaron como estimulantes en una reacción de linfocitos mezclados (MLR), donde las que responden al tratamiento eran las PBMC alogeneicas (relación de estimuladores a las que responden al tratamiento 1:100) en presencia de

fitohemaglutinina (PHA) (2,5 mg/ml). Se cultivaron las células durante 48 horas después de lo cual se añadió ^{3}H-timidina, y se hizo el recuento de la radioactividad incorporada después de 24 horas. Los resultados demostraron que la población de T_{reg} generada en presencia de las MSC (banda 3) era similar funcionalmente a los linfocitos T_{reg} generados en ausencia de las MSC (banda 2). (B) Se cultivaron las PBMC durante 3 días en ausencia (gráfico superior) o presencia (gráfico inferior) de las MSC (relación de MSC a PBMC 1:10), tras lo cual la fracción no adherente se recogió y se inmunotiñó con GITR marcado con FITC y CD4 marcado con PE. Los resultados demuestran un aumento mayor del doble en la expresión de GITR en las células cultivadas en presencia de las MSC.

Figura 4 Las MSC producen PGE_2 y bloquean los efectos inmunomoduladores mediados por MSC inversos de PGE_2. (A) Secreción de PGE_2 (media + SD) en sobrenadantes del cultivo obtenidos de las MSC cultivadas en presencia o ausencia de bloqueadores NS-398 de PGE_2 o de indometacina (Indometh.) a varias concentraciones. Las concentraciones de inhibidor se expresan en µM y los datos presentados son los valores obtenidos después de 24 horas de cultivo. (B) Expresión de COX-1 y COX-2 en las MSC y las PBMC utilizando RT-PCR en tiempo real. Las MSC expresaron concentraciones significativamente mayores de COX-2 en comparación con las PBMC y cuando las MSC se cultivaban en presencia las PBMC, aumentaba tres veces la expresión de COX-2 en las MSC. Se presentan los datos representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Se montaron los cultivos de MSC + PBMC en una placa con cámara trans-well donde las MSC se colocaron en placas en la cámara del fondo y las PBMC en la cámara superior. (C) La presencia de los bloqueadores indometacina (Ind.) de PEG_2 o de NS-398 aumenta la secreción de TNF-α de las DC activadas (□) y la secreción de IFN-γ procedente de las células T_H1 (▩) en comparación con las referencias. Se calcularon los datos como % de cambio en los cultivos generados en ausencia de MSC e inhibidores de PEG_2 (D) La presencia de los bloqueadores de PEG_2, indometacina (Indo) y NS-398, durante el cultivo conjunto de MSC-PBMC (1:10) invierte los efectos antiproliferantes mediados por MSC en las PBMC tratadas con PHA. Los datos mostrados proceden de un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 5 La secreción constitutiva de citocina por MSC es elevada en presencia de las PBMC alogeneicas. Utilizando MSC humanas caracterizadas previamente, se analizaron los niveles de las citocinas Il-6 y VEGF, PEG_2 mediador de lípidos y la metaloproteinasa 1 de la matriz (pro-MMP-1) en sobrenadantes de cultivo de MSC cultivadas durante 24 horas en presencia (barras con trama) o ausencia (barras en blanco) de las PBMC (relación MSC a PBMC 1:10). Las MSC produjeron IL-6, VEGF y PGE_2 constitutivamente y los niveles de estos factores aumentaron en el cultivo conjunto con PBMC, sugiriendo de este modo que las MSC pueden ejercer una función en la modulación de las funciones inmunitarias en un escenario inflamatorio.

Figura 6 Las MSC inhiben la proliferación de linfocitos T inducidos por mitógenos en función de la dosis. Unas cifras crecientes de las PBMC alogeneicas se incubaron con cantidades constantes de las MSC (2.000 células/pocillo) colocadas en placas en una placa de 96 pocillos en presencia o ausencia de PHA (2,5 mg/ml) durante 72 horas, e incorporación de ^{3}H-timidina determinada (en recuentos por minuto, o cpm). Se produjo una inhibición en función de la dosis de la proliferación de las PBMC tratadas con PHA en presencia de las MSC. Se muestran los resultados representativos de 1 de cada 3 experimentos independientes. Unos resultados similares fueron publicados por LeBlanc, *et al., Scand. J. Immunol.*, Vol. 57, pág. 11 (2003).

Figura 7 Diagrama esquemático del mecanismo de actuación propuesto para MSC

Las MSC median en sus efectos inmunomoduladores afectando las células tanto de los sistemas inmunitarios innatos (rutas 2-4 de las DC; y ruta 6 de NK) como adaptativos (rutas 1 y 5 de T y ruta 7 de B). En respuesta a un patógeno invasor, las DC inmaduras migran al sitio de entrada potencial, maduran y adquieren una capacidad para cebar linfocitos T naturales (por medio de señales específicas y coestimulantes del antígeno) para llegar a ser linfocitos T efectores protectores (inmunidad de T_H1 mediada por células o de T_H2 humoral). Durante la interacción de MSC-DC, las MSC, por medio de contacto célula a célula o por el factor segregado, pueden alterar el resultado de la respuesta inmunitaria limitando la capacidad de las DC para montar una respuesta mediada por células (ruta 2) o favoreciendo la capacidad para montar una respuesta humoral (ruta 4). Además, cuando están presentes los linfocitos T efectores maduros, las MSC pueden interactuar con ellos para sesgar el equilibrio de las respuestas de T_H1 (ruta 1) hacia las respuestas de T_H2 (ruta 5) y probablemente hacia una actividad aumentada de linfocitos B que producen IgE (ruta 7), resultados deseables para la supresión de GvHD y los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria. Las MSC en su capacidad para producir una generación aumentada de población de T_{reg} (ruta 3) puede producir un fenotipo tolerante y puede ayudar a un hospedador receptor humedeciendo la inflamación pasajera en su micromedio local. La línea de puntos (----) representa el mecanismo propuesto.

La invención se describirá a continuación haciendo referencia al ejemplo siguiente; debe apreciarse, sin embargo, que el alcance de la presente invención no debe estar limitado por esto.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Cultivo de las MSC humanas

Se cultivaron MSC humanas tal como describe Pittenger *et al., Science,* Vol. 284, pág. 143 (1999). En resumen, se recogieron muestras de medula de la cresta ilíaca de donantes anónimos después del consentimiento por escrito por Poletics Technologies, Div. of Cambrex Biosciences. Se cultivaron las MSC en medio de Eagle modificado por Dulbecco bajo en glucosa (Life Technologies, Carlsbad, California) que contenía 1% de antibiótico-solución antimicótica (Invitrogen, Carlsbad, California) y suero bovino fetal al 10% (FBS, JRH BioSciences, Lenexa, Kansas). Las MSC se desarrollaron como una monocapa adherente y se despegaron con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05% a 37ºC durante 3 minutos). En todas las MSC utilizadas se caracterizó previamente el potencial de multilinaje y conservaba la capacidad para diferenciarse en linajes mesenquimatosos (condrocítico, adipógeno y osteógeno) (Pttenger *et al., Science*, Vol. 284, pág. 143 (1999).

Aislamiento de dendrocitos

Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) se adquirieron en Poietics Tecnologies, División de Cambrex Biosciences (Walkersville, MD). Los precursores de dendrocitos (DC) de linaje monocítico ($CD1c^+$) se seleccionaron positivamente de PBMC utilizando un procedimiento de separación magnético de 2 etapas según Dzionek, *et al., J. Immunol.*, Vol. 165, pág. 6037 (2000). En resumen, los linfocitos B que expresan a CD1c se redujeron magnéticamente de las células $CD19^+$ utilizando bolitas magnéticas seguido de marcado de la fracción reducida de linfocitos B con CD1c marcados con biotina ($BDCA1^+$) y los anticuerpos antibiotina y separándolos de la fracción celular sin marcar utilizando columnas magnéticas según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Auburn, California). Los precursores de las DC de linaje plasmacitoide se aislaron de las PBMC por selección inmuno-magnética de las células recubiertas de anticuerpos marcadas positivamente ($BDCA2^+$) (Miltenyi Biotech, Auburn, California).

Cultivo de MSC-DC

En la mayoría de los experimentos, se cultivaron MSC y DC humanas en cantidades iguales durante varios periodos, se recogió el sobrenadante de cultivo celular y se almacenó a -80ºC hasta la evaluación ulterior. En los experimentos seleccionados, se cultivaron las MSC con células maduras DC1 o DC2 (relación MSC:DC 1:1), y a continuación los cultivos combinados (MSC y DC) se irradiaron para evitar cualquier proliferación. A continuación, los linfocitos T naturales, purificados de anticuerpos ($CD4^+$, $CD45RA^+$) se añadieron a las MSC/DC irradiadas y se cultivaron durante 6 días más. La fracción de células no adherentes (linfocitos T purificados) se recogió a continuación de los cultivos, se lavó dos veces y se volvió a estimular con PHA durante otras 24 horas después de los cual se recogieron y analizaron por ELISA IFN-γ e IL-4 segregadas en los sobrenadantes del cultivo celular.

Aislamiento de células NK

Se obtuvieron poblaciones purificadas de células NK reduciendo las células que no son NK que están magnéticamente marcadas con una mezcla de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (anticuerpos anti-CD3, -CD14, -CD19, -CD36 y anti-IgE) como reactivo primario y anticuerpos monoclonales antibiotina conjugados con Microbeads como reactivo de marcaje secundario. Las células que no son NK magnéticamente marcadas se conservaron en columnas MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, California) en un campo magnético, mientras que las células NK pasaron a través y se recolectaron.

Aislamiento de la población de linfocitos T_{Reg}

Se aisló la población de linfocitos T_{Reg} utilizando un procedimiento de aislamiento en dos etapas. En primer lugar los linfocitos T que no son $CD4^+$ se marcaron con magnetismo indirectamente con una mezcla de anticuerpos marcados con biotina y microbolitas de antibiotina. Las células marcadas se redujeron a continuación por separación sobre una columna MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, California). A continuación, las células $CD4^+CD25^+$ se marcaron directamente con microbolitas de CD25 y se aislaron por selección positiva de la fracción de linfocitos T $CD4^+$ enriquecida previamente. Los linfocitos T $CD4^+$ $CD25^+$ magnéticamente marcados se mantuvieron en la columna y se eluyeron después de retirar de la columna el campo magnético.

Para determinar si el aumento de población de $CD4^+CD25^+$ generado en presencia de las MSC era de naturaleza supresora, se aislaron poblaciones de linfocitos T_{reg} $CD4^+$ $CD25^+$ de cultivos de PBMC o MSC+PBMC (relación de MSC a PBMC 1:10) (cultivados sin ninguna estimulación adicional durante 3 días) utilizando un procedimiento de aislamiento magnético en 2 etapas. Se irradiaron estas células para bloquear cualquier proliferación adicional y se utilizaron como estimulantes en una reacción con linfocitos mezclados (MLR) en la que los que responden eran las PBMC alogeneicas (relación 1:100 de estimuladores a los que responden al tratamiento) en presencia de PHA (2,5 µg/ml). El cultivo se llevó a cabo durante 48 horas, después de las cuales se añadió ^{3}H-timidina. Se hizo el

recuento de la radioactividad incorporada después de 24 horas.

Las PBMC se cultivaron en ausencia o presencia de las MSC (proporción de MSC a PBMC 1:10), después de que la fracción no adherente se recolectara y se inmunotiñera con el receptor TNF inducido por glucocorticoides marcado con FITC, o GITR y CD4 marcado con PE:

Generación de linfocitos T_H1/T_H2

Se colocaron en placas células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) a razón de $2x10^6$ células/ml durante 45 min. a 37ºC para eliminar los monocitos. Se incubó la fracción no adherente en presencia de anticuerpos anti-CD3 (5 µg/ml) unido a la placa y anti-CD28 (1 µg/ml) en condiciones de T_H1 (IL-2 (4 ng/ml)+ IL-12 (5 ng/ml) + anti-IL-4 (1 µg/ml)) o de T_H2 (IL-2 (4 ng/ml) + IL-4 (4 ng/ml) + anti-IFN-γ (1 µg/ml)) durante 3 días en presencia o ausencia de las MSC. Se lavaron las células y a continuación se volvieron a estimular con PHA (2,5 µg/ml) durante otras 24 ó 48 horas, después de determinar las concentraciones de IFN-γ e IL-4 en sobrenadantes de cultivo por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota).

Análisis de concentraciones de VEGF, PGE_2 y pro-MMP-1 en sobrenadante de cultivo de las MSC

Utilizando las MSC humanas caracterizadas anteriormente, se analizaron las concentraciones de interleucina-6 (IL-6), VEGF, prostaglandina E_2 mediador de lípidos (PGE_2) y metaloproteinasa 1 de la matriz (pro-MMP-1) en el sobrenadante de cultivo de MSC cultivadas durante 24 horas en presencia o ausencia de las PBMC (proporción de MSC a PBMC 1:10).

Proliferación de las PBMC

Se prepararon PBMC purificadas centrifugando leukopack (Cambrex, Walkersville, Maryland) en Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Oslo, Noruega). Las células separadas se cultivaron (por triplicado) en presencia o ausencia de las MSC (en placa 3 a 4 antes de la adición a PBMC para dejarlas sedimentar) durante 48 horas en presencia del mitógeno PHA (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) en los experimentos seleccionados, las PBMC se volvieron a poner en suspensión en medio que contiene inhibidores de PGE_2 indometacina (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) o NS-938 (Cayman Chemicals, Ann. Arbor, Michigan). Se añadió (^3H)-timidina (20 µl en un cultivo de 200 µl) y se recolectaron las células después de otras 24 horas de cultivo utilizando un recolector automático. Los efectos de las MSC o de los bloqueadores de PGE_2 se calcularon como porcentaje de la respuesta de control (100%) en presencia de PHA.

RT-PCR cuantitativa

Todo el ARN de los sedimentos celulares se preparó utilizando un kit comercializado (Qiagen, Valencia, California) y según las instrucciones del fabricante. Se retiró el ADN genómico contaminante utilizando el kit exento de ADN (Ambion, Austin, Texas). Se llevó a cabo la RT-PCR cuantitativa en un sistema de detección MJ Research Opticon (South San Francisco, California) utilizando el kit de RT-PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Valencia, California) con cebadores a la concentración de 0,5 µM. Se calcularon cambios relativos en los niveles de expresión en las células cultivadas en diferentes condiciones por la diferencia en los valores de Ct (punto de intersección) utilizando la β-actina como patrón interno. Las secuencias para los cebadores específicos COX-1 y COX-2 fueron: COX-1: 5'-CCG GAT GCC AGT CAG GAT GAT G-3' (directo), 5'-CTA GAC AGC CAG ATG CGT ACA G-3' (inverso); COX-2: 5'-ATC TAC CCT CCT CAA GTC CC-3' (directo), 5'-TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG-3' (inverso).

Se incubaron cantidades crecientes de PBMC alogeneicos con cantidades constantes de MSC (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 ^3H-timidina (recuentos por minuto, cpm). Las PBMC y las MSC se cultivaron en proporciones de MSC:PBMC de 1:1, 1:3, 1:10, 1:30 y 1:81.

Resultados

En los presentes estudios, se examinó la interacción de las MSC humanas con poblaciones de células inmunitarias aisladas, incluyendo los dendrocitos (DC1 y DC2), los linfocitos T efectores (T_H1 y T_H2) y las células NK. La interacción de las MSC con cada tipo de célula inmunitaria tuvo consecuencias específicas lo que sugiere que las MSC pueden modulas varias etapas en el proceso de respuesta inmunitaria. Se evaluó la producción de factor o factores segregados que modulan y pueden ser responsables de los efectos inmunomoduladores de MSC y estaba implicada la síntesis de prostaglandina.

Se aislaron dendrocitos precursores mieloides (DC1) y plasmocitoides (DC2) por separación inmunomagnética de las células $BDCA1^+$ y $BDCA2^+$ respectivamente y maduradas por incubación con GM-CSF e IL-4 ($1x10^3$ UI/ml y $1x10^3$ UI/ml respectivamente) para las células DC1, o IL-3 (10 ng/ml) para las células DC2. Utilizando citometría de flujo, las células DC1 eran $HLA\text{-}DR^+$ y $CD11c^+$, mientras que las células DC2 eran $HLA\text{-}DR^+$ y $CD123^+$ (figura 1A). En presencia del agente inflamatorio lipopolisacárido bacteriano (LPS, 1 ng/ml), las células DC1 produjeron niveles

moderados de TNF-α pero cuando las MSC estaban presentes (las proporciones examinadas 1:1 y 1:10), había >50% de reducción en la secreción de TNF-α (figura 1B). Por otra parte, las células DC2 produjeron IL-10 en presencia de LPS y sus concentraciones aumentaron más del doble en el cultivo conjunto MSC:DC2 (1:1) (figura 1B). Por lo tanto, las MSC modificaron el perfil de citocina de las DC activadas en el cultivo hacia un fenotipo más tolerógeno. Además, cuando se cultivan DC activadas con las MSC, podían reducir IFN-γ y aumentar las concentraciones de IL-4 segregadas por los linfocitos T $CD4^+$ naturales (figura 1C) lo que sugiere un desplazamiento mediado por MSC desde el fenotipo de los linfocitos T proinflamatorios a antinflamatorios.

Un aumento de la secreción de IL-10 desempeña una función en la generación de células reguladoras (Kingsley, *et al., J. Immunol.*, Vol. 168, pág. 1080 (2002)), los linfocitos T reguladores (T_{Reg}) se cuantificaron por citometría de flujo en cultivos conjuntos de las PBMC y las MSC. En el cultivo de las PBMC con las MSC durante 3 a 5 días, hubo un aumento en el número de linfocitos T_{Reg} determinado por la tinción de las PBMC con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 (figura 2A), soportando además una respuesta tolerógena producida por MSC. La población de linfocitos T_{Reg} $CD4^+CD25^+$, generada en presencia de las MSC expresó concentraciones crecientes de receptor TNF inducido por glucocorticoides (GITR), receptor de la superficie celular expresado en las poblaciones de linfocitos T_{Reg}, y era de naturaleza supresora ya que suprimió la proliferación de linfocitos T alogeneicos (figura 3A, B). A continuación, se investigaron las MSC en cuanto a su capacidad directa para afectar la diferenciación de los linfocitos T. Utilizando linfocitos T purificados seleccionados por anticuerpos (linfocitos Th $CD4^+$), se generaron linfocitos T_H1 productores de IFN-γ y linfocitos T_H2 productores de IL-4 en presencia o ausencia de las MSC. Cuando las MSC estaban presentes durante la diferenciación, se producía secreción reducida de IFN-γ por los linfocitos T_H1 y secreción aumentada de IL-4 por los linfocitos T_H2 (figura 2B). No se apreció ningún cambio significativo en las concentraciones de IFN-γ o de IL-4 cuando se añadían las MSC al cultivo una vez se habían diferenciado los linfocitos Th (a los 3 días) en los tipos T_H1 o T_H2 efectores (datos no representados). Estos experimentos sugieren que las MSC pueden afectar la diferenciación de los linfocitos T efectores directamente y alterar la secreción de citocinas de los linfocitos T hacia un fenotipo tumoral.

Asimismo, cuando se cultivaban las MSC con células NK purificadas ($CD3^-$, $CD14^-$, $CD19^-$, $CD36^-$) en una proporción 1:1 durante diferentes periodos (0 a 48 h), había disminuido la secreción de IFN-γ en el sobrenadante del cultivo (figura 2C), sugiriendo de este modo que las MSC también pueden modular las funciones de las células NK.

El trabajo anterior ha indicado que las MSC modifican las funciones de los linfocitos T por el/los factor(es) soluble(s) (LeBlanc, *et al., Exp. Hematol.*, Vol. 31, pág. 890 (2003); Tse, *et al., Transplantation*, Vol. 75, pág. 389 (2003)). Se observó que las MSC segregaban varios factores, incluyendo IL-6, prostaglandina E_2, VEGF y pro-MMP-1 constitutivamente, y los niveles de cada una aumentaron en el cultivo con las PBMC (figura 5). Para investigar los factores derivados de MSC que conducen a la inhibición de TNF-α y al aumento de producción de IL-10 por las DC, se investigó la función potencial de prostaglandina E_2, ya que se había demostrado que inhibe la producción de TNF-α por las DC activadas (Vassillou, *et al., Cell Immunol.*, Vol. 223, pág. 120 (2003)). El medio acondicionado del cultivo de MSC (cultivo de 24 horas de $0{,}5x10^8$ células/ml) contenía aprox. 1.000 pg/ml de PGE_2 (figura 4A). No existía una presencia detectable de inductores conocidos de secreción de PGE_2 por ejemplo TNF-α , IFN-γ o IL-1β (datos no mostrados) en el sobrenadante del cultivo lo que indica una secreción constitutiva de PGE_2 por las MSC. La secreción de PGE_2 por las hMSC se inhibió el 60 al 90% en presencia de inhibidores conocidos de la producción de PGE_2, NS-398 (5 µM) e indometacina (4 µM) (figura 4A). Dado que la liberación de la secreción de PGE_2 se produce como resultado de la actividad enzimática de la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1) constitutivamente activa y la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) inducible (Harris, *et al., Trends Immunol.*, Vol. 23, pág. 144 (2002)) se analizó la expresión de ARNm para COX-1 y COX-2 en las MSC y en las PBMC utilizando el sistema de cultivo trans-well. Las MSC expresaban concentraciones significativamente mayores de COX-2 en comparación con las PBMC y los niveles de expresión aumentan >3 veces en el cultivo conjunto de las MSC y las PBMC (relación MSC a PBMC 1:10) durante 24 horas (figura 4B). Se observaron cambios moderados en las concentraciones de COX-1 que sugerían que el aumento en la secreción de PGE_2 en el cultivo conjunto MSC-PBMC (figura 5) está mediado por la regulación por incremento de COX-2. Para investigar si los efectos inmunomoduladores de MSC en las DC y los linfocitos T estaban mediados por PGE_2, se cultivaron las MSC con dendrocitos activados (DC1) o linfocitos T_H1 en presencia de inhibidores de PGE_2 NS-398 o indometacina. La presencia de NS-398 o indometacina aumentaba la secreción de TNF-α por las DC1, y la secreción de IFN-γ de los linfocitos T_H1 (figura 4C), respectivamente, lo que sugiere que los efectos de MSC sobre los tipos de células inmunitarias pueden estar mediados por la PGE_2 segregada. Estudios recientes han demostrado que las MSC inhiben la proliferación de linfocitos T provocada por varios estímulos (DeNicola, *et al., Blood.*, Vol. 99, pág. 3838 (2002); LeBlanc, *et al., Scand. J. Immunol.,* Vol, 57, pág. 11 (2003)). Se observó que las MSC inhiben la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos en función de la dosis (figura 6) y cuando los inhibidores de PGE_2, NS-398 (5 µM) o indometacina (4 µM) estaban presenten había un aumento >70% en la incorporación de (^3H)-timidina por las PBMC tratadas con PHA en cultivos que contienen MSC en comparación con las referencias sin inhibidores (figura 4D).

En resumen, se propone un modelo de interacción de MSC con otros tipos de células inmunitarias (figura 7). Cuando están presentes los linfocitos T maduros, las MSC pueden interactuar con ellos directamente e inhibir la producción de IFN-γ proinflamatoria (ruta 1) y activar el fenotipo del linfocito T reguladores (ruta 3) y los linfocitos T_H2 antinflamatorios (ruta 5). Además, las MSC pueden alterar el resultado de la respuesta inmunitaria a los linfocitos T mediante las DC segregando PGE_2, inhibiendo las células DC1 proinflamatorias (ruta 2) y activando las células DC2

antinflamatorias (ruta 4) o las DC reguladoras (ruta 3). Un desplazamiento hacia la inmunidad de T_H2 a su vez, sugiere un cambio en la actividad de los linfocitos B hacia la generación aumentada de anticuerpos de subtipo IgE/IgG1 (ruta 7). Las MSC, por su capacidad para inhibir la secreción de IFN-γ de las células NK modifican probablemente la función de las células NK (ruta 6). Este modelo de interacciones de las células MSC:inmunitarias es coherente con la experimentación llevada a cabo en varios otros laboratorios (LeBlanc, *et al., Exp. Hematol.,* Vol. 31, pág. 890 (2003); Tse, *et al., Transplantation*, Vol. 75, pág. 389 (2003); DiNicola, *et al., Blood*, Vol. 99, pág. 3838 (2002)). Más experimentación de los mecanismos propuestos está en curso y actualmente son necesarios estudios en animales para examinar los efectos *in vivo* de la administración de MSC.

Debe apreciarse, sin embargo, que el alcance de la presente invención no se limita a las formas de realización específicas descritas anteriormente. La invención puede ponerse en práctica de otra forma aparte de la descrita específicamente y estar comprendida todavía dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Células madre mesenquimatosas no manipuladas genéticamente para su utilización en el tratamiento de la encefalomielitis autoinmunitaria, la esclerosis múltiple o las enfermedades inflamatorias del intestino en un animal.

2. Células madre mesenquimatosas no manipuladas genéticamente para su utilización en el tratamiento de la encefalomielitis autoinmunitaria, la esclerosis múltiple o las enfermedades inflamatorias del intestino tal como se han caracterizado en la reivindicación 1, que están destinadas a ser administradas en combinación con un fármaco antinflamatorio.

3. Células madre mesenquimatosas no manipuladas genéticamente para su utilización en el tratamiento de la encefalomielitis autoinmunitaria, la esclerosis múltiple o las enfermedades inflamatorias del intestino tal como se han caracterizado en la reivindicación 1 ó 2 en las que el animal es un mamífero.

4. Células madre mesenquimatosas no manipuladas genéticamente para su utilización en el tratamiento de la encefalomielitis autoinmunitaria, la esclerosis múltiple o las enfermedades inflamatorias del intestino tal como se han caracterizado en la reivindicación 3 en las que el animal es un ser humano.

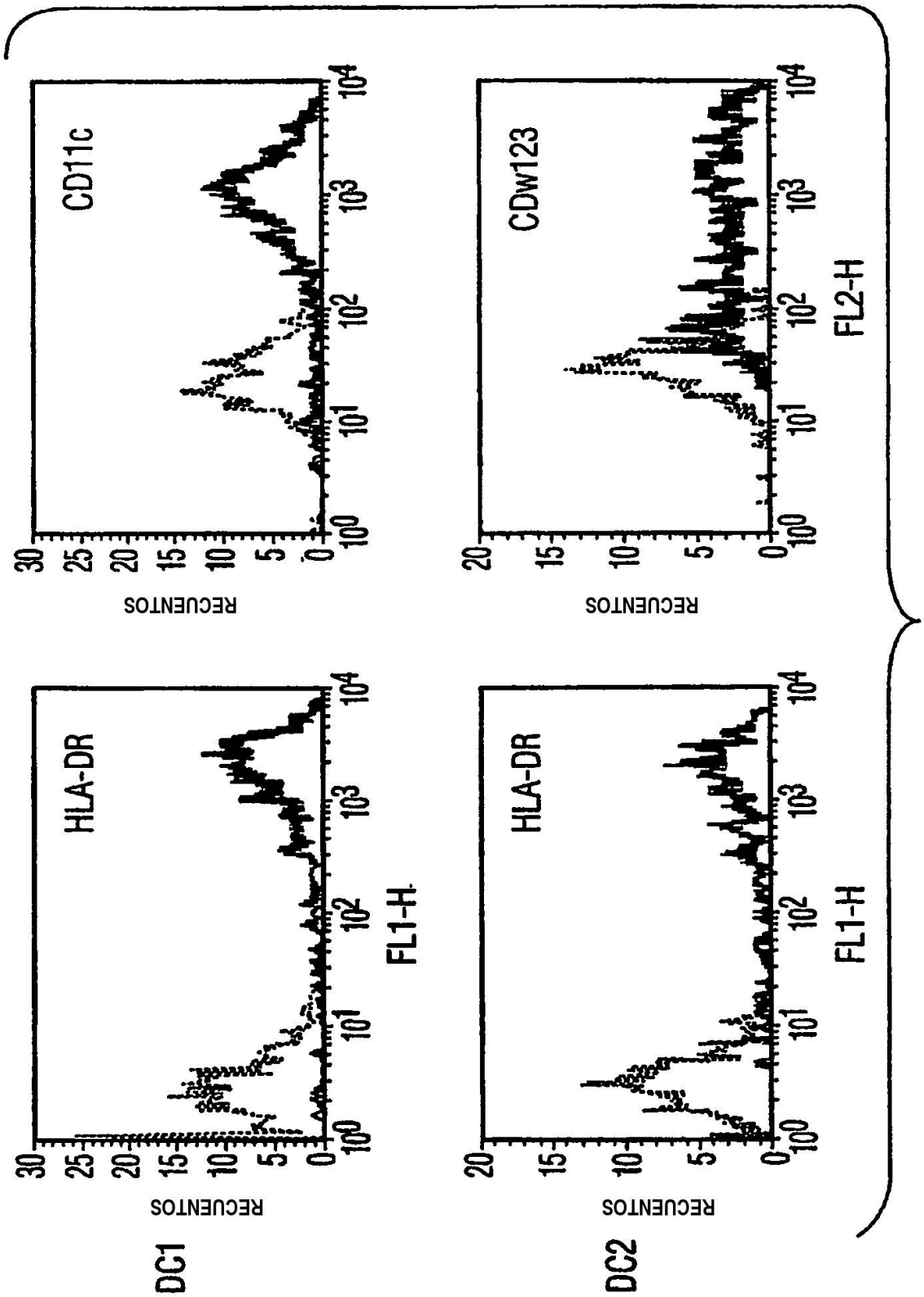

DC1
HLA-DR
CD11c
RECUENTOS
FL1-H
DC2
HLA-DR
CDw123
RECUENTOS
FL1-H
FL2-H

FIG. 1A

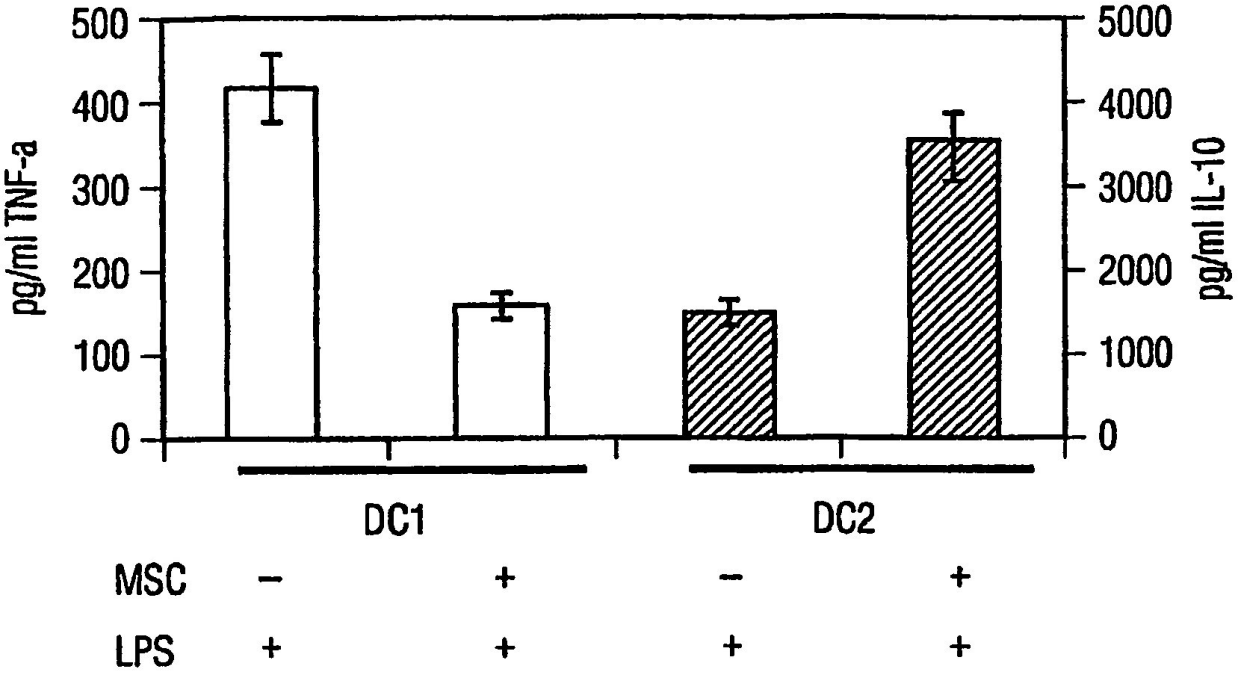

500
400
300
200
100
0
pg/ml TNF-a
5000
4000
3000
2000
1000
0
pg/ml IL-10
DC1
DC2
MSC – + – +
LPS + + + +

FIG. 1B

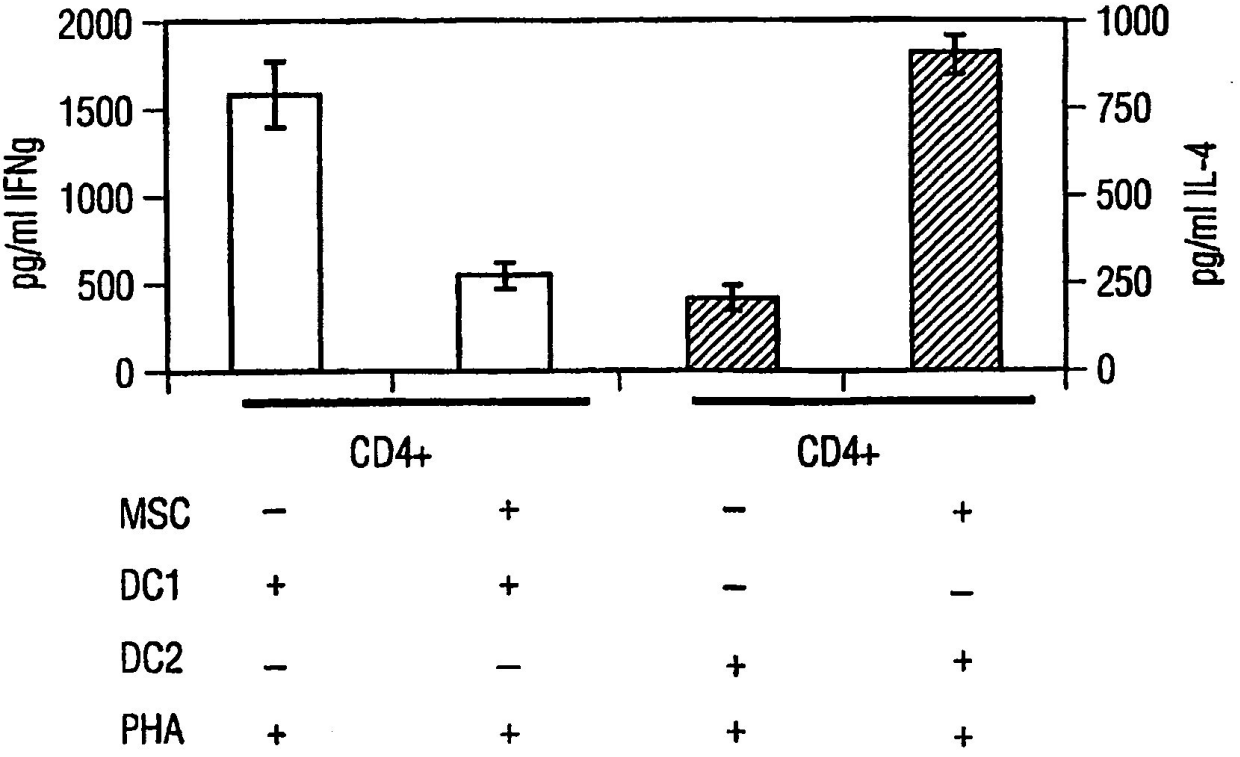

2000
1500
1000
500
0
pg/ml IFNg
1000
750
500
250
0
pg/ml IL-4
CD4+
CD4+
MSC – + – +
DC1 + + – –
DC2 – – + +
PHA + + + +

FIG. 1C

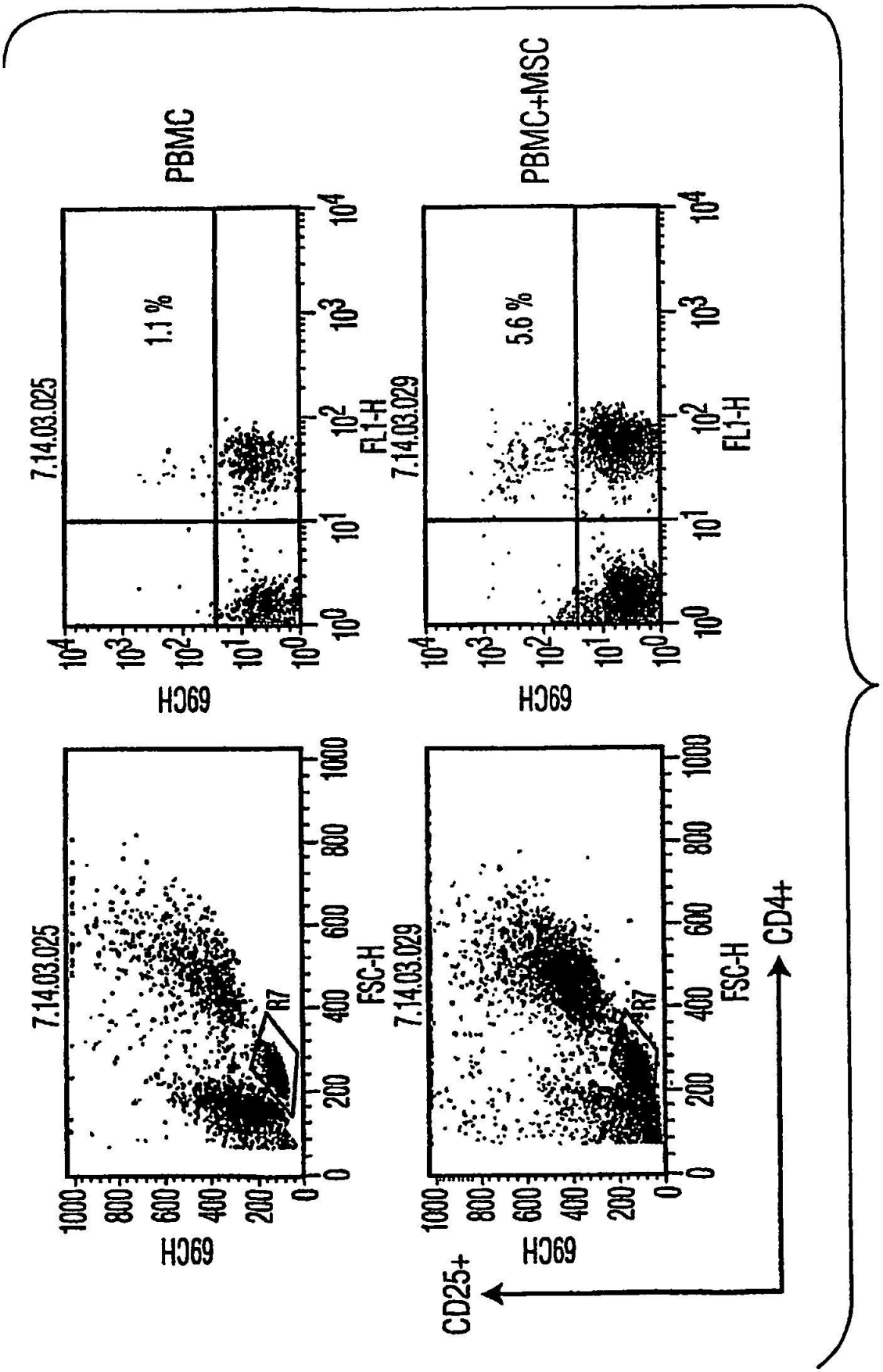

PBMC
PBMC+MSC
7.14.03.025
7.14.03.029
1.1 %
5.6 %
FL1-H
69CH
FSC-H
R7
CD25+
CD4+

FIG. 2A

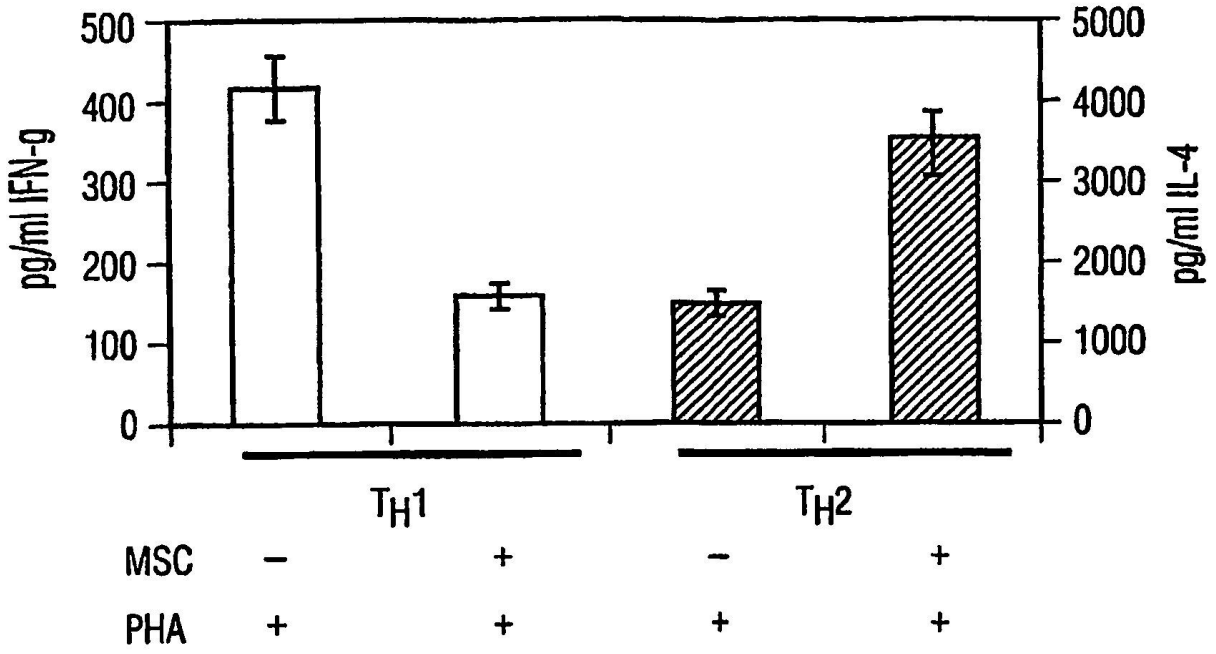

500
400
300
200
100
0
pg/ml IFN-g
5000
4000
3000
2000
1000
0
pg/ml IL-4
TH1
TH2
MSC – + – +
PHA + + + +

FIG. 2B

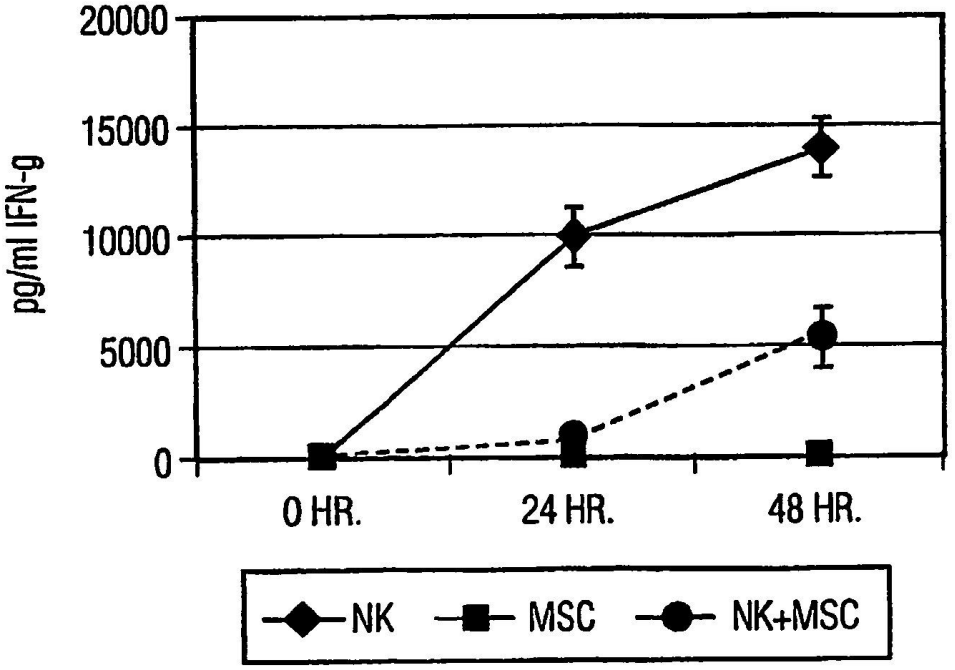

20000
15000
10000
5000
0
pg/ml IFN-g
0 HR.
24 HR.
48 HR.
NK
MSC
NK+MSC

FIG. 2C

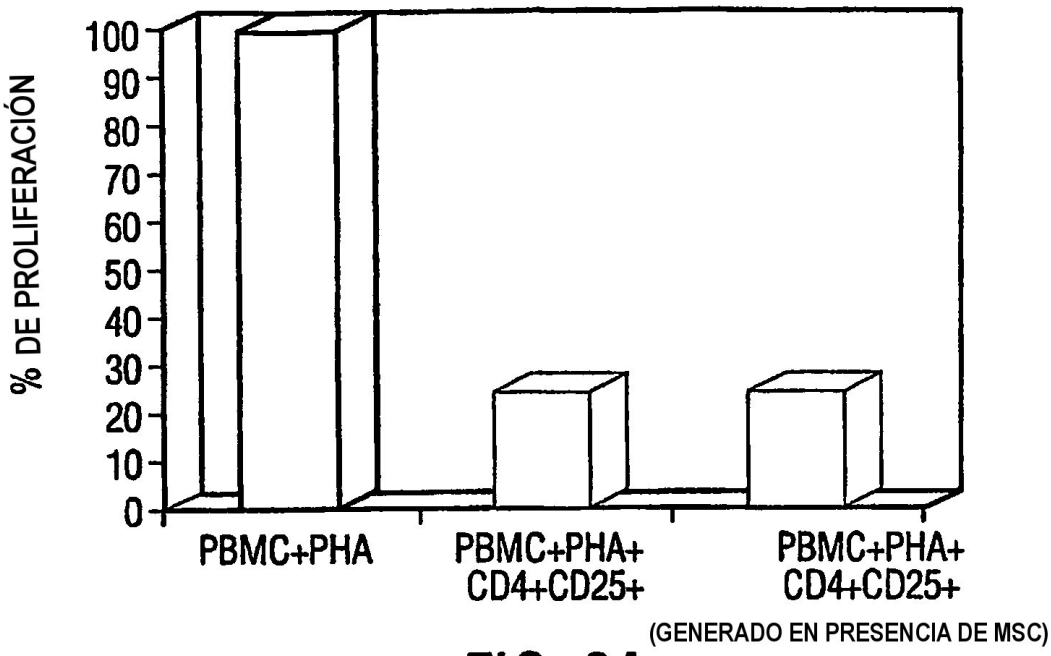

% DE PROLIFERACIÓN
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PBMC+PHA
PBMC+PHA+
CD4+CD25+
PBMC+PHA+
CD4+CD25+
(GENERADO EN PRESENCIA DE MSC)

FIG. 3A

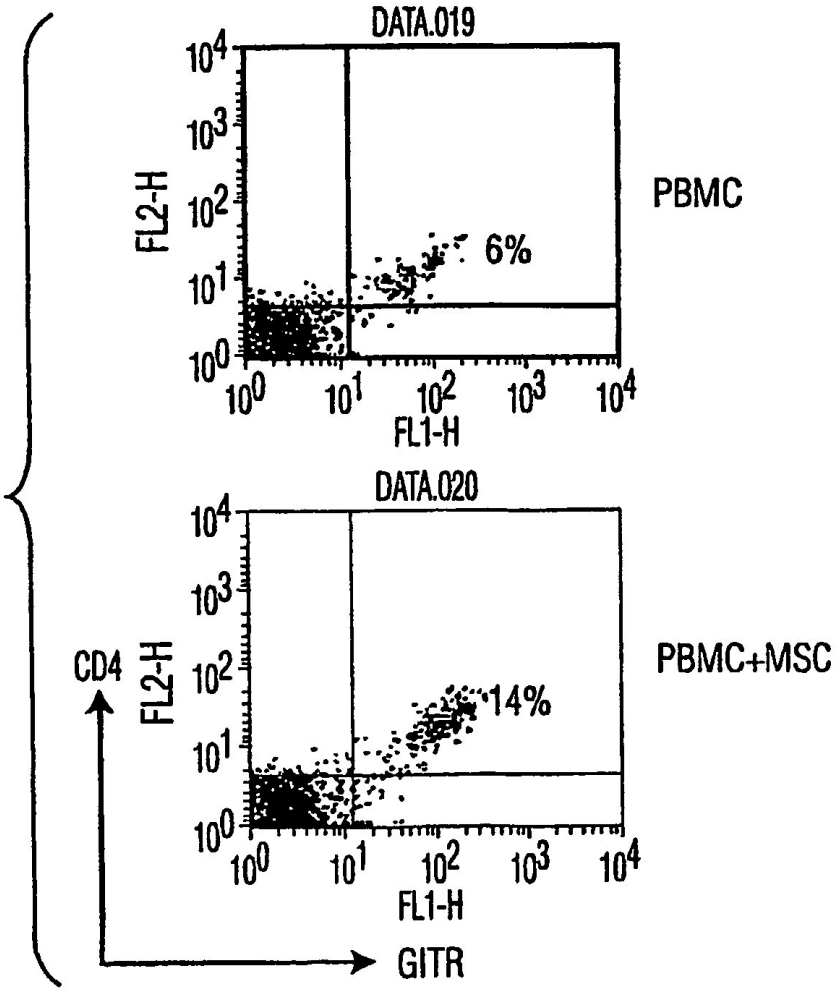

DATA.019
FL2-H
FL1-H
6%
PBMC
DATA.020
CD4
FL2-H
FL1-H
14%
PBMC+MSC
GITR

FIG. 3B

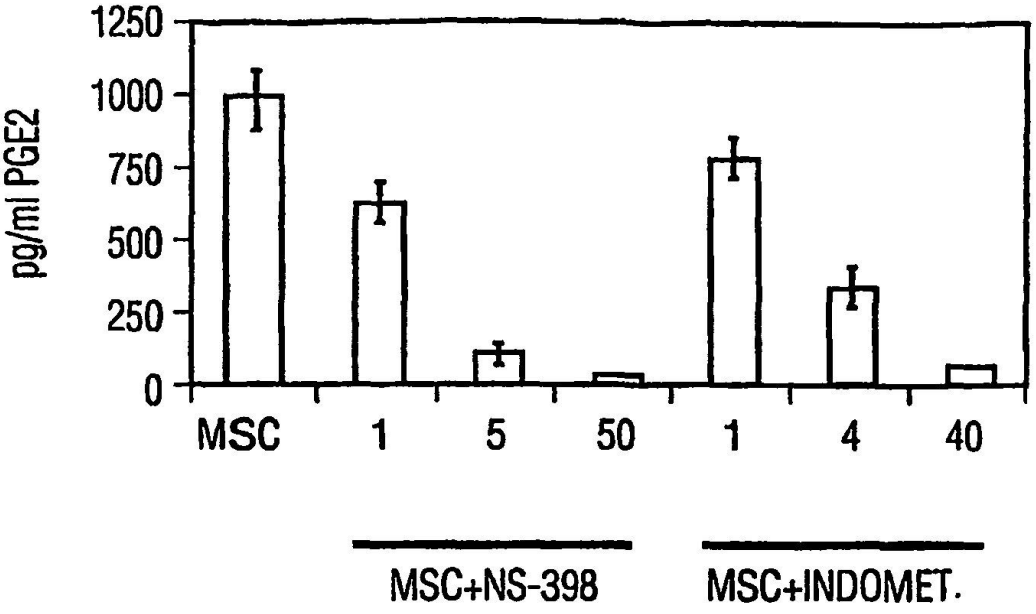

1250
1000
750
500
250
0
pg/ml PGE2
MSC
1
5
50
1
4
40
MSC+NS-398
MSC+INDOMET.

FIG. 4A

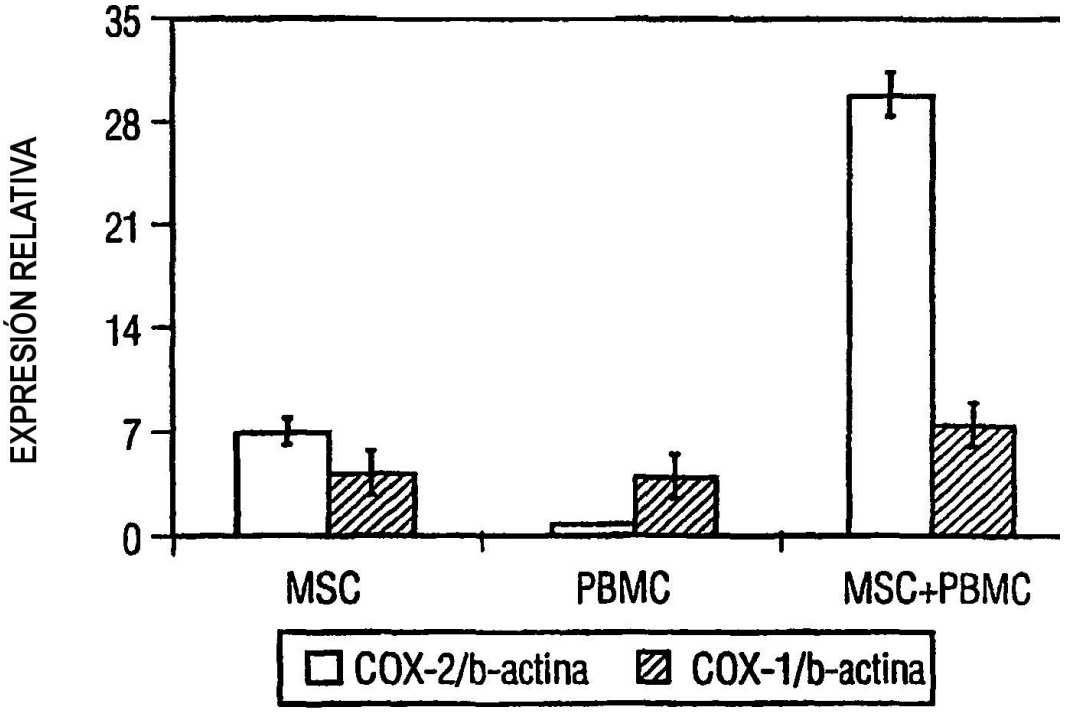

35
28
21
14
7
0
EXPRESIÓN RELATIVA
MSC
PBMC
MSC+PBMC
COX-2/b-actina
COX-1/b-actina

FIG. 4B

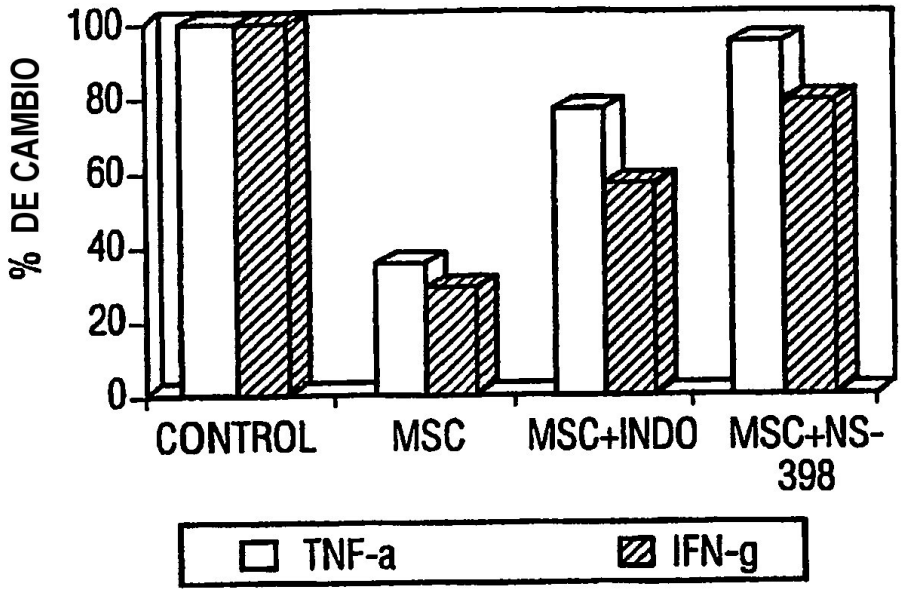

% DE CAMBIO
100
80
60
40
20
0
CONTROL
MSC
MSC+INDO
MSC+NS-398
TNF-a
IFN-g

FIG. 4C

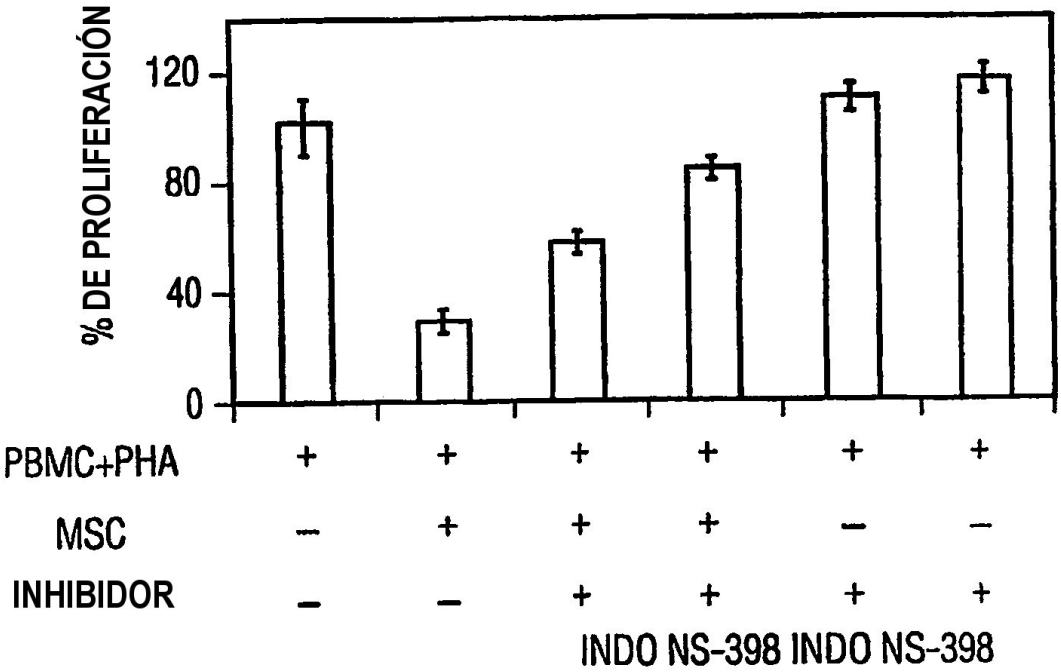

% DE PROLIFERACIÓN
120
80
40
0
PBMC+PHA + + + + + +
MSC – + + + – –
INHIBIDOR – – + + + +
INDO NS-398 INDO NS-398

FIG. 4D

Fig. 5

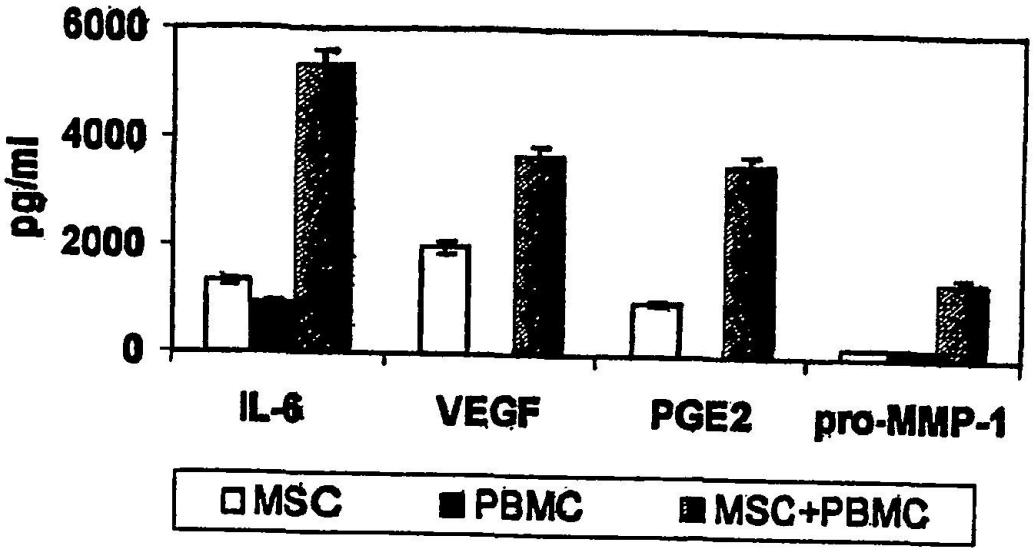


Fig. 6

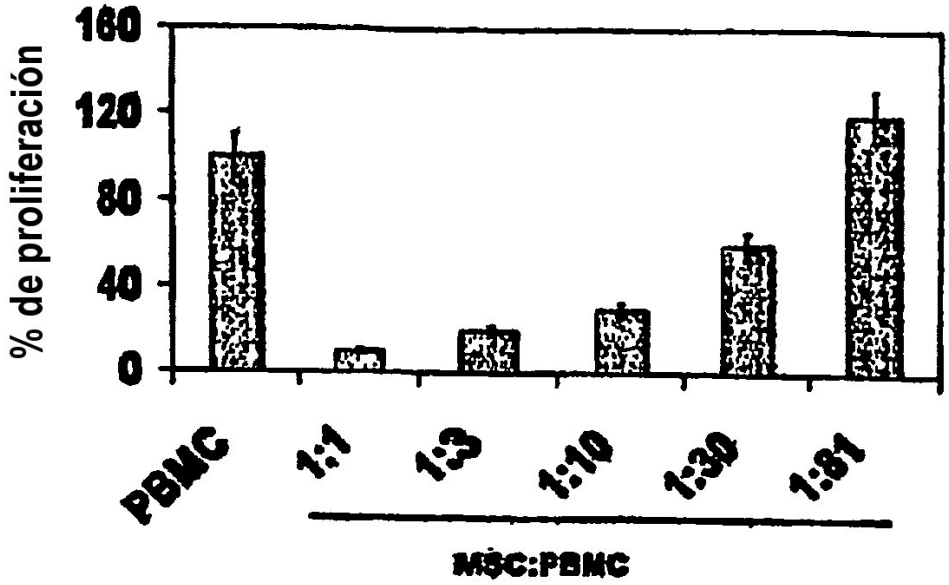
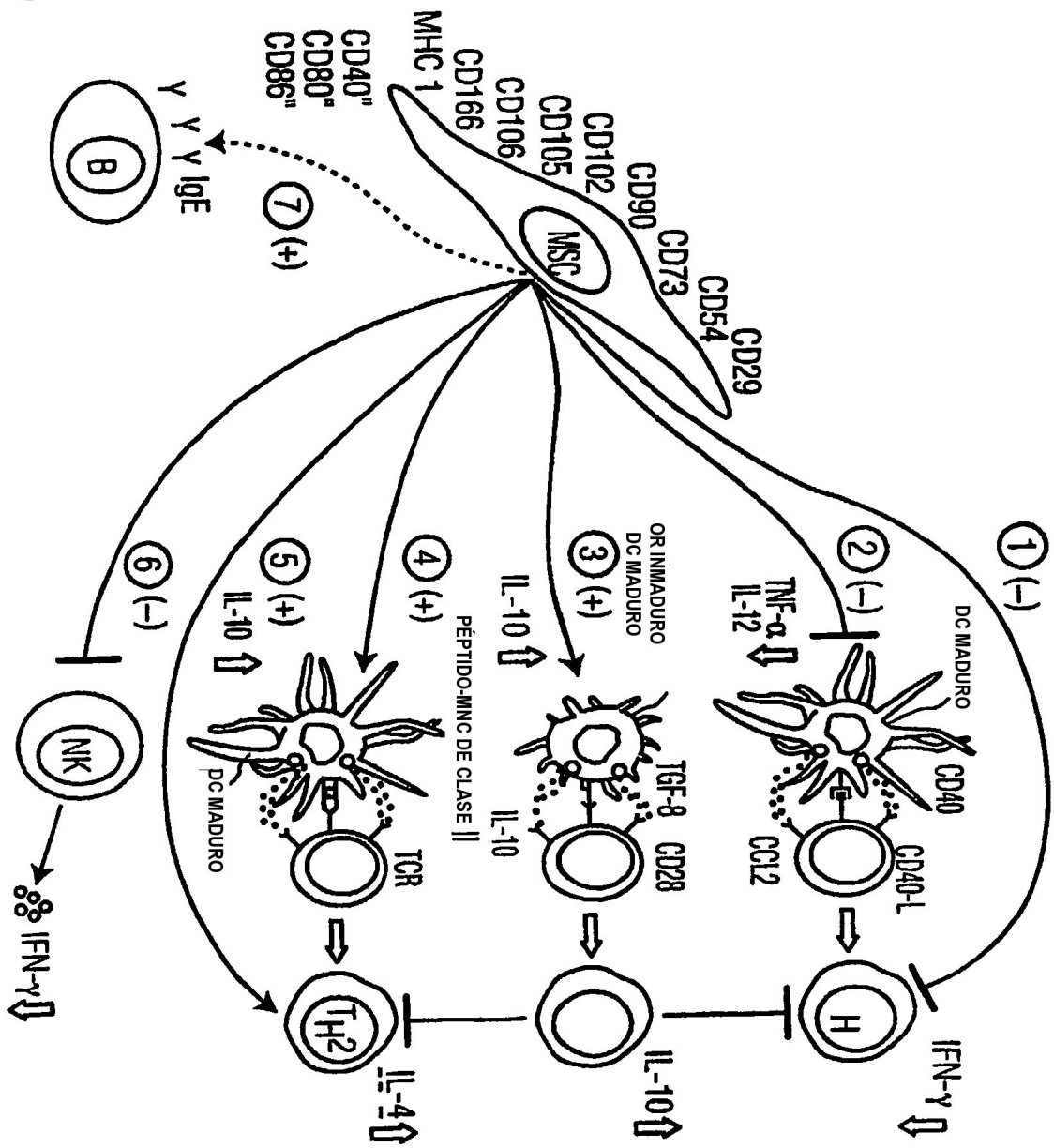

% de proliferación
160
120
80
40
0
PBMC
1:1
1:3
1:10
1:30
1:81
MSC:PBMC

FIG. 7


MHC 1
CD166
CD106
CD105
CD102
CD90
CD73
CD54
CD29
MSC
CD40"
CD80"
CD86"
γ γ γ IgE
B
7 (+)
1 (−)
2 (−)
3 (+)
4 (+)
5 (+)
6 (−)
DC MADURO
TNF-α
IL-12
CD40
CD40-L
CCL2
OR INMADURO
DC MADURO
IL-10
TGF-8
CD28
PÉPTIDO-MNC DE CLASE II
TCR
NK
IFN-γ
H
IL-10
IL-4
T_H2