

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 689**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2005 E 10011225 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2298863**

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:

02.09.2015

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:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 544 689 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre mesenquimales y usos de las mismas.

La invención se relaciona con células madre mesenquimales para uso en el tratamiento o prevención de fibrosis en un humano, en donde la fibrosis es fibrosis de los riñones asociada con enfermedad renal de etapa terminal de la fibrosis de los pulmones.

La células madre mesenquimales (MSCs) son células madre potentes que pueden diferenciarse rápidamente en líneas que incluyen osteoblastos, miocitos, condrocitos y adipocitos (Pittenger, et al., Science, Vol. 284, pg. 143 (1999); Haynesworth, et al., Bone, Vol. 13, pg. 69 (1992); Prockop, Science, Vol. 276, pg. 71 (1997)). Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de las MSCs para diferenciarse en músculos (Wakitani, et al., Muscle Nerve, Vol. 18, pg. 1417 (1995)), precursores tipo neuronal (Woodbury, et al., J. Neurosci. Res., Vol. 69, pg. 908 (2002); Sánchez-Ramos, et al., Exp. Neurol., Vol. 171, pg. 109 (2001)), cardiomiocitos (Toma, et al., Circulation, Vol. 105, pg. 93 (2002); Fakuda, Artif. Organs, Vol. 25, pg. 187 (2001)) y posiblemente otros tipos de células. Además, las MSCs han demostrado proveer capas de alimentación efectivas para la expansión de células madre hematopoyéticas y embrionales (Eaves, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 938, pg. 63 (2001); Wagers, et al., Gene Therapy, Vol. 9, pg. 606 (2002)). Estudios recientes con una variedad de modelos animales han demostrado que las MSCs pueden ser útiles en la reparación o regeneración de tejidos óseos, de cartílagos, meniscos o del miocardio deteriorados (DeKok, et al., Clin. Oral Implants Res., Vol. 14, pg. 481 (2003)); Wu, et al., Transplantation, Vol. 75, pg. 679 (2003); Noel, et al., Curr. Opin. Investig. Drugs, Vol. 3, pg. 1000 (2002); Ballas, et al., J. Cell. Biochem. Suppl., Vol. 38, pg. 20 (2002); Mackenzie, et al., Blood Cells Mol. Dis., Vol. 27 (2002)). Varios investigadores han utilizado las MSCs con resultados alentadores para el trasplante en modelos de enfermedad en animales incluyendo osteogénesis imperfecta (Pereira, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 95, pg. 1142 (1998)), parkinsonismo (Schwartz, et al., Hum. Gene Ther., Vol. 10, pg. 2539 (1999)), lesiones de la médula espinal (Chopp, et al., Neuroreport, Vol. 11, pg. 3001 (2000); Wu, et al., J. Neurosci. Res., Vol. 72, pg. 393 (2003)) y trastornos cardíacos (Tomita, et al., Circulation, Vol. 100, pg. 247 (1999). Shake, et al., Ann. Thorac. Surg., Vol. 73, pg. 1919 (2002)). De manera importante, se han reportado también resultados prometedores en ensayos clínicos para osteogénesis imperfecta (Horwitz, et al., Blood, Vol. 97, pg. 1227 (2001); Horowitz, et al. Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 99, pg. 8932 (2002)) e injerto potenciado de trasplante de médula ósea heterólogos (Frassoni, et al., Int. Society for Cell Therapy, SA006 (resumen) (2002); Koc, et al., J. Clin. Oncol., Vol. 18, pg. 307 (2000)).

Las MSCs expresan un antígeno clase I de complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) sobre su superficie MHC clase II limitada (Le Blanc, et al., Exp. Hematol., Vol. 31, pg. 890 (2003); Potian, et al., J. Immunol., Vol. 171, pg. 3426 (2003)) y no B7 o moléculas coestimuladoras de CD40 (Majumdar, et al., J. Biomed. Sci., Vol. 10, pg. 228 (2003)), sugiriendo que estas células tienen un fenotipo inmunogénico bajo (Tse, et al., Transplantation, Vol. 75, pg. 389 (2003)). Las MSCs también inhiben respuestas proliferativas de células T en una forma independiente de MHC (Bartholomew, et al., Exp. Hematol., Vol. 30, pg. 42 (2002); Devine, et al., Cancer J., Vol. 7, pg. 576 (2001); DiNicola, et al., Blood, Vol. 99, pg. 3838 (2002)). Estas propiedades inmunológicas de MSCs pueden potenciar su injerto en trasplantes sin limitar la capacidad del sistema inmune receptor para reconocer y rechazar células alogeneicas después del trasplante. La producción de factores por MSCs, que modulan la respuesta inmune y soportan la hematopoyesis junto con su capacidad para diferenciarse en tipos celulares apropiados bajo estímulos locales las convierten en células madre deseables para estudios de trasplante celular (Majumdar, et al., Hematother. Stem Cell Res., Vol. 9, pg. 841 (2000); Haynesworth, et al., J. Cell. Physiol., Vol. 166, pg. 585 (1996)).

La WO 03/105908 A2 divulga terapias con células madre regenerativas que incluyen el uso de MSCs.

Los solicitantes presentes han examinado las interacciones de células madre mesenquimales con poblaciones celulares inmunes, incluyendo células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras (Th1 y Th2) y células NK. Con base en tales interacciones, los solicitantes descubrieron que las células madre mesenquimales pueden regular la producción de diversos factores que pueden regular varias etapas en el proceso de respuesta inmune. Así, las células madre mesenquimales pueden ser empleadas en el tratamiento de condiciones de enfermedad y trastornos que involucran el sistema inmune, o enfermedades, condiciones, o trastornos que involucran la inflamación o respuestas alérgicas. Tales enfermedades, condiciones y trastornos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes, alergias, artritis, heridas inflamadas, alopecia areata (calvicie), enfermedades periodontales incluyendo gingivitis y periodontitis, y otras enfermedades, condiciones o trastornos que involucran una respuesta inmune.

Además, se cree que las células madre mesenquimales estimulan las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) para producir el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF, el cual promueve la angiogénesis estimulando la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Adicionalmente, se cree que las células madre mesenquimales estimulan las células dendríticas (DCs) para producir interferón beta (IFN- β), el cual promueve la supresión tumoral y la inmunidad contra infecciones virales.

El alcance de la presente invención está definido en las reivindicaciones anexas.

También se divulga un método para tratar una enfermedad autoinmune en un animal. El método comprende la administración al animal de células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad autoinmune en el animal.

5 Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no debe ser limitado por ningún razonamiento teórico, se cree que al menos un mecanismo mediante el cual las células madre mesenquimales suprimen la enfermedad autoinmune es causando la liberación de interleucina-10 (IL-10) de células T reguladoras (células en cesta) y/o células dendríticas (DC).

10 Las enfermedades autoinmunes que pueden ser tratadas de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no están limitadas a, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, uveítis, enfermedad autoinmune de la tiroides, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad autoinmune linfoproliferativa (ALPS), enfermedad desmielinizante, encefalomiелitis autoinmune, gastritis autoinmune (AIG), y enfermedades glomerulares autoinmunes. Debe entenderse, sin embargo, que el alcance de la presente divulgación no debe limitarse al tratamiento de las enfermedades autoinmunes específicas mencionadas aquí.

15 En una realización, el animal al cual las células madre mesenquimales son administradas, es un mamífero. El mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos.

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

20 Las células madre mesenquimales que son administradas pueden ser una composición homogénea o pueden ser una población celular mixta enriquecida en MSC. Las composiciones de células madre mesenquimales homogéneas pueden ser obtenidas cultivando médula adherente o células perlosteales, y las composiciones con células madre mesenquimales pueden ser obtenidas cultivando células de médula adherentes o periosteales, y las células madre mesenquimales pueden ser identificadas por marcadores de superficie celular específicos que son identificados con anticuerpos monoclonales exclusivos. Un método para obtener una población celular enriquecida en células madre mesenquimales está descrito, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,486,359. Fuentes alternativas para células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a, sangre, piel, cordón umbilical, músculo, grasa, hueso y pericondrio.

25 Las células madre mesenquimales pueden ser administradas mediante una variedad de procedimientos. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas por vía sistémica, tal como por ejemplo administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal.

Las células madre mesenquimales pueden ser de un espectro de fuentes que incluyen autólogas, alogeneicas y xenogeneicas.

35 Las células madre mesenquimales son administradas en una cantidad efectiva para tratar una enfermedad autoinmune en un animal. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente desde aproximadamente 1×10^6 células/kg hasta aproximadamente 5×10^6 células/kg. La cantidad de células madre mesenquimales que va a ser administrada depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso y sexo del paciente, la enfermedad autoinmune que va a ser tratada, y el grado de severidad de la misma.

40 Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en conjunción con un vehículo farmacéutico aceptable. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden ser administradas como una suspensión celular en un medio líquido farmacéuticamente aceptable para inyección.

45 También se divulga un método para tratar una respuesta inflamatoria en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar la respuesta inflamatoria en el animal.

50 Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no debe limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la maduración de células T a células T reguladoras (T_{reg}), controlando por lo tanto las respuestas inflamatorias. También se cree que las células madre mesenquimales inhiben las células T auxiliares 1 (células Th1), haciendo disminuir por lo tanto la expresión del interferón- γ (IFN- γ) en ciertas reacciones inflamatorias, tales como las asociadas con psoriasis, por ejemplo.

En una realización, la respuesta inflamatoria puede ser tratada como las asociadas con la psoriasis.

- 5 En otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser administradas a un animal de tal manera que las células madre mesenquimales entren en contacto con la microglia y/o astrocitos en el cerebro para reducir la inflamación, con lo cual las células madre mesenquimales limitan la neurodegeneración causada por células gliales activadas en enfermedades o trastornos tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía o lesiones de células cerebrales.
- 10 En aún otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser administradas a un animal de tal manera que las células madre mesenquimales entren en contacto con los queratinocitos y células de Langerhans en la epidermis de la piel para reducir la inflamación tal como puede suceder en la psoriasis, dermatitis crónica y dermatitis por contacto. Aunque esta realización no debe limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales pueden entrar en contacto con los queratinocitos y células de Langerhans en la epidermis, y después de la expresión de los receptores de células T y de los perfiles de secreción de citoquina, llevar a una expresión disminuida del factor α de necrosis tumoral (TNF- α) y una población reguladora de células T (células T_{reg}) incrementada.
- 15 En una realización adicional, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para reducir la inflamación en el hueso, tal como ocurre en la artritis y en condiciones similares a la artritis, incluyendo pero no limitándose a, osteoartritis y artritis reumatoide, y otras enfermedades artríticas que aparecen en lista en la página www.arthritis.org/conditions/diseases. Aunque el alcance de esta realización no pretende estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales pueden inhibir la secreción de interleucina-17 por células T de memoria en el fluido sinovial.
- 20 En otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para limitar la inflamación del vientre e hígado durante la enfermedad inflamatoria de los intestinos y hepatitis crónica, respectivamente. Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no pretende estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la secreción incrementada de interleucina-10 (IL-10) y la generación de células T reguladoras (células T_{reg}).
- 25 En otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para inhibir la activación excesiva de neutrófilos y macrófagos en condiciones patológicas tales como sepsis y trauma, incluyendo lesiones en los glúteos, cirugías y trasplantes. Aunque el alcance de esta realización no debe estar limitado 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.
- 30 En otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para controlar la inflamación en sitios privilegiados inmunes, tales como el ojo, incluyendo la córnea, el cristalino, epitelio pigmentado y retina, cerebro, médula espinal, útero en embarazo y placenta, ovario, testículos, córtex adrenal, hígado y folículos vellosos. Aunque el alcance de esta realización no debe estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales proveen la secreción de citoquinas supresoras tales como IL-10 y la generación de células T_{reg}.
- 35 En aún otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para controlar infecciones por enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) durante la diálisis y/o glomerulonefritis. Aunque el alcance de esta realización no debe estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales inducen que las células mononucleares sanguíneas periféricas expresen el factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF, el cual estimula la estructuración glomerular.
- 40 En una realización adicional, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para controlar infecciones virales tales como influenza, hepatitis C, Virus de Herpes Simplex, infecciones por virus de vacuna y virus de Epstein-Barr. Aunque el alcance de esta realización no debe estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la secreción de interferón beta (IFN- β).
- 45 En aún otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para controlar infecciones parasitarias tales como infecciones por Leishmania e infecciones por Helicobacter. Aunque el alcance de esta realización no debe estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales median las respuestas por células T auxiliares 2 (Th2), y por lo tanto promueven la producción incrementada de inmunoglobulina E (IgE) por parte de las células β .
- 50 Debe entenderse, sin embargo, que el alcance de este aspecto de la presente divulgación no debe estar limitado al tratamiento de ninguna respuesta inflamatoria en particular.

Las células madre mesenquimales pueden ser administradas a un mamífero, incluyendo primates humanos y no humanos, tal como se describió aquí más arriba.

Las células madre mesenquimales también pueden ser administradas por vía sistémica, como se describió aquí más

arriba. Alternativamente, en el caso de osteoartritis o artritis reumatoide, las células madre mesenquimales pueden ser administradas directamente a una articulación artrítica.

5 Las células madre mesenquimales son administradas en una cantidad efectiva para tratar la respuesta inflamatoria en un animal. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente desde aproximadamente 1×10^6 células/kg hasta aproximadamente 5×10^6 células/kg. La dosificación exacta de células madre mesenquimales que va a ser administrada depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso y sexo del paciente, la respuesta inflamatoria que está siendo tratada y el grado y severidad de la misma.

10 Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en conjunción con un vehículo farmacéutico aceptable, tal como se describió aquí más arriba.

También se divulga un método para tratar cáncer en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar cáncer en el animal.

15 Aunque el alcance de este aspecto de la presente invención no debe estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales interactúan con las células dendríticas, las cuales llevan a la secreción de IFN- β , el cual a su vez actúa como un supresor tumoral. Los cánceres que pueden ser tratados incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular, cáncer de la cervix, cáncer pancreático, cáncer de próstata, fibrosarcoma, meduloblastoma y astrocitoma. Debe entenderse, sin embargo, que el alcance de la presente divulgación no debe estar limitado a ningún tipo específico de cáncer.

20 El animal puede ser un mamífero, incluyendo primates humanos y no humanos, tal como se describió aquí más arriba.

25 Las células madre mesenquimales son administradas al animal en una cantidad efectiva para tratar cáncer en el animal. En general, las células madre mesenquimales son administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente desde aproximadamente 1×10^6 células/kg hasta aproximadamente 5×10^6 células/kg. La cantidad exacta de células madre mesenquimales que va a ser administrada es dependiente de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso y sexo del paciente, el tipo de cáncer que está siendo tratado, y el grado y severidad del mismo.

Las células madre mesenquimales son administradas en conjunción con un vehículo farmacéutico aceptable, y pueden ser administradas por vía sistémica, tal como se describió aquí más arriba. Alternativamente, las células madre mesenquimales pueden ser administradas directamente al cáncer que está siendo tratado.

30 También se divulga un método para tratar una enfermedad o trastornos alérgicos en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno alérgicos en el animal.

35 Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no debe estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales, cuando se administran después de una respuesta alérgica aguda, proveen la inhibición de la activación y desgranulación de mastocitos. También, se cree que las células madre mesenquimales subregulan la activación de basófilos e inhiben citoquinas tales como TNF- α , quimioquinas tales como interleucina-8 y proteína quimioatrayente de monocitos, o MCP-1, mediadores de lípidos tales como leucotrienos e inhiben mediadores principales tales como histamina, heparina, sulfatos de condroitina y catepsina.

40 Las enfermedades o trastornos alérgicos que pueden ser tratados incluyen, pero no se limitan a, asma, rinitis, dermatitis atópica y dermatitis por contacto. También debe entenderse, sin embargo, que el alcance de la presente divulgación no debe estar limitado a ninguna enfermedad o trastorno alérgicos.

45 Las células madre mesenquimales son administradas a un animal en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno alérgicos en un animal. El animal puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos. En general, las células madre mesenquimales son administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente desde aproximadamente 1×10^6 células/kg hasta aproximadamente 5×10^6 células/kg. La dosificación exacta es dependiente de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso y sexo del paciente, la enfermedad o trastorno alérgicos que están siendo tratados, y el grado de severidad de los mismos.

50 Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en conjunción con un vehículo farmacéutico aceptable, tal como se describió aquí más arriba. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas por vía sistémica, tal como por administración intravenosa o intraarterial, por ejemplo.

También se divulga un método para promover la curación de heridas en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para promover la curación de heridas en el animal.

5 Aunque el alcance de la presente divulgación no debe estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que, tal como se mencionó más arriba, que las células madre mesenquimales hacen que las células T_{reg} y las células dendríticas liberen interleucina-10 (IL-10). La IL-10 limita o controla la inflamación en una herida, promoviendo por lo tanto la curación de una herida.

10 Adicionalmente, las células madre mesenquimales pueden promover la curación de heridas y curación de fracturas induciendo factores de secreción por otros tipos de células. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden inducir la liberación mediada por prostaglandina E_2 (PGE_2) del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por parte de células mononucleares sanguíneas periféricas, (PBMCs), así como la liberación mediada por PGE_2 de hormona de crecimiento, insulina, factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1) proteína 3 de enlazamiento al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP-3) y endotelina 1.

15 Las células madre mesenquimales son administradas al animal en una cantidad efectiva para promover la curación de heridas en el animal. El animal puede ser un mamífero, y el mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos. En general, las células madre mesenquimales son administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 5×10^6 células/kg. La cantidad exacta de células madre mesenquimales que va a ser administrada es dependiente de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso y sexo del paciente, y el grado y severidad de la herida que está siendo tratada.

25 Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en conjunción con un vehículo farmacéutico aceptable, tal como se describió aquí más arriba. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas por vía sistémica, tal como se describió aquí más arriba. Alternativamente, las células madre mesenquimales pueden ser administradas directamente a una herida, tal como en un fluido o en una venda o reservorio que contiene las células madre mesenquimales.

La presente invención se relaciona con células madre mesenquimales para uso en un método para tratar o prevenir fibrosis en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la fibrosis en un animal.

30 De acuerdo con la presente invención, la fibrosis es fibrosis de los riñones asociada con enfermedad o fibrosis renal en etapa terminal de los pulmones.

35 De acuerdo con la presente invención, el animal es un humano. En general, las células madre mesenquimales son administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 5×10^6 células/kg. La cantidad exacta de células madre mesenquimales que se van a administrar es dependiente de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso y sexo del paciente, y el grado y severidad de la fibrosis que está siendo tratada o prevenida.

Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en conjunción con un vehículo farmacéutico aceptable, tal como se describió aquí más arriba. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas por vía sistémica, también como se describió aquí más arriba.

40 También se divulga un método para promover la angiogénesis en un órgano o tejido de un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para promover angiogénesis en un órgano o tejido del animal.

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de un lecho microvascular preexistente.

45 La inducción de la angiogénesis puede ser utilizada para tratar insuficiencia coronaria y arterial periférica, y así puede ser una metodología no invasiva y curativa para el tratamiento de enfermedades de la arteria coronaria, enfermedad cardíaca isquémica y enfermedad arterial periférica. La angiogénesis puede jugar un papel en el tratamiento de enfermedades y trastornos en tejidos y órganos diferentes al corazón, así como en el desarrollo y/o mantenimiento de órganos diferentes al corazón. La angiogénesis puede proveer un papel en el tratamiento de heridas internas y externas así como úlceras dérmicas. La angiogénesis también juega un papel en la implantación de embriones y en el crecimiento de la placenta, así como en el desarrollo de la vasculatura de los embriones. La angiogénesis también es esencial para el acoplamiento de la resorción de cartílagos con la formación de hueso, y es esencial para la correcta morfogénesis de la placa de crecimiento.

Adicionalmente la angiogénesis es necesaria para el diseño y mantenimiento exitoso de órganos altamente metabólicos, tales como el hígado, en donde una red vascular densa es necesaria para proveer transporte de nutrientes y gases suficientes.

5 Las células madre mesenquimales pueden ser administradas al tejido u órgano que requiere de la angiogénesis mediante una variedad de procedimientos. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas por vía sistémica, tales como por administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal, o las células madre mesenquimales pueden ser administradas directamente al tejido u órgano que requiere de la angiogénesis, tal como por inyección directa en el tejido u órgano que requiere de la angiogénesis.

10 Las células madre mesenquimales pueden ser de un espectro de fuentes que incluyen autólogas, alogeneicas o xenogeneicas.

Aunque el alcance de la presente divulgación no debe estar limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales, cuando se administran a un animal, estimulan las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMMCs) para producir factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF, el cual estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos.

15 En una realización, el animal es un mamífero. El mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos

20 Las células madre mesenquimales, de acuerdo con la presente divulgación, pueden ser empleadas en el tratamiento, alivio o prevención de cualquier enfermedad o trastorno que pueda ser aliviado, tratado o prevenido a través de la angiogénesis. Así, por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden ser administradas a un animal para tratar arterias bloqueadas, incluyendo las de las extremidades, esto es, brazos, piernas, manos y pies, así como en el cuello o en diversos órganos. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para tratar arterias bloqueadas que alimentan el cerebro, tratando o previniendo por lo tanto la apoplejía. También, las células madre mesenquimales pueden ser utilizadas para tratar vasos sanguíneos en córneas de embriones y posnatales y pueden ser utilizadas para proveer estructuración glomerular. En otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser empleadas en el tratamiento de heridas, tanto internas como externas, así como en el tratamiento de úlceras dérmicas encontradas en pies, manos, piernas o brazos, incluyendo, pero no limitándose a, úlceras dérmicas causadas por enfermedades tales como diabetes y anemia de células falciformes.

25 Adicionalmente, debido a que la angiogénesis está involucrada en la implantación de los embriones y formación de placenta, las células madre mesenquimales pueden ser empleadas para promover implantación de embriones y prevenir abortos.

30 Además, las células madre mesenquimales pueden ser administradas a un animal nonato, incluyendo humanos, para promover el desarrollo de la vasculatura en el animal nonato.

35 En otra realización, las células madre mesenquimales pueden ser administradas a un animal, nacido o nonato, con el fin de promover la resorción de cartílago y la formación de hueso, así como para promover la correcta morfogénesis de la placa de crecimiento.

40 Las células madre mesenquimales son administradas en una cantidad efectiva para promover la angiogénesis en un animal. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente desde aproximadamente 1×10^6 células/kg hasta aproximadamente 5×10^6 células/kg. La cantidad de células madre mesenquimales que va a ser administrada es dependiente de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso y sexo del paciente, la enfermedad o trastorno que van a ser tratados, aliviados o prevenidos, y el grado y severidad de los mismos.

45 Las células madre mesenquimales pueden ser administradas en conjunción con un vehículo farmacéutico aceptable. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden ser administradas como una suspensión celular en un medio líquido farmacéuticamente aceptable para inyección. La inyección puede ser local, esto es, directamente en el tejido u órgano que requiere de la angiogénesis, o sistémica.

50 Las células madre mesenquimales pueden ser manipuladas genéticamente con uno o más polinucleótidos que codifican un agente terapéutico. Los polinucleótidos pueden ser administrados a las células madre mesenquimales a través de un vehículo de expresión apropiado. Los vehículos de expresión que pueden ser empleados para manipular genéticamente las células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovirales, vectores adenovirales, y vectores de virus adenoasociados.

La selección del polinucleótido apropiado que codifica un agente terapéutico depende de diversos factores

incluyendo la enfermedad o trastorno que están siendo tratados, y el grado y severidad de los mismos. Los polinucleótidos que codifican agentes terapéuticos, y los vehículos de expresión apropiados están descritos adicionalmente en la Patente de los Estados Unidos No. 6,355,239.

5 Debe entenderse que las células madre mesenquimales, cuando se emplean en las terapias y tratamientos antes mencionados, pueden ser empleados en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos por los experimentados en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, factores de crecimiento, citoquinas, fármacos tales como fármacos antiinflamatorios, y células diferentes a las células madre mesenquimales, tales como células dendríticas, y pueden ser administradas con vehículos solubles para las células tales como ácido hialurónico, o en combinación con matrices sólidas, tales como colágeno, gelatina u otros polímeros biocompatibles, según sea apropiado.

15 Debe entenderse que los métodos descritos aquí pueden llevarse a cabo en un cierto número de formas y con diversas modificaciones y cambios de las mismas que son bien conocidos en el arte. También puede ser evidente que cualquier teoría fijada como modo de acción o interacción entre los tipos de células no debería ser considerada como limitante de esta invención de manera alguna, sino que se presentan de tal forma que los métodos divulgados aquí pueden ser entendidos de manera más completa.

Se divulgan:

1. Un método para promover angiogénesis en un órgano o tejido de un animal diferente al corazón, que comprende:
administrar a dicho animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para promover angiogénesis en un órgano o tejido diferente al corazón de dicho animal.
- 20 2. El método del ítem 1 en donde dicho animal es un mamífero.
3. El método del ítem 2 en donde dicho mamífero es un primate.
4. El método del ítem 3 en donde dicho primate es un humano.
5. El método del ítem 1 en donde dichas células madre mesenquimales son administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta aproximadamente 1×10^7 células/kg.
- 25 6. El método del ítem 5 en donde dichas células madre mesenquimales son administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^6 células/kg hasta aproximadamente 5×10^6 células/kg.
7. El método del ítem 1 en donde dichas células madre mesenquimales son administradas por vía sistémica.
8. El método del ítem 1 en donde dichas células madre mesenquimales son administradas por vía intravenosa.
- 30 9. El método del ítem 1 en donde dichas células madre mesenquimales son administradas por inyección directa a dicho órgano o tejido diferente al corazón de dicho animal.
10. Un método de tratamiento de una enfermedad autoinmune en un animal, que comprende:
administrar a dicho animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar dicha enfermedad autoinmune en dicho animal.
11. El método del ítem 10 en donde dicho animal es un mamífero.
- 35 12. El método del ítem 11 en donde dicho mamífero es un humano.
13. El método del ítem 10 en donde dicha enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple.
14. Un método para tratar una respuesta inflamatoria en un animal, que comprende:
administrar a dicho animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar dicha respuesta inflamatoria en dicho animal.
- 40 15. El método del ítem 14 en donde dicho animal es un mamífero.

16. El método del ítem 15 en donde dicho mamífero es un humano.

17. El método del ítem 14 en donde dicha respuesta inflamatoria está asociada con psoriasis.

18. Un método para tratar cáncer en un animal, que comprende:

5 administrar a dicho animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar cáncer en dicho animal.

19. El método del ítem 18 en donde dicho animal es un mamífero.

20. El método del ítem 19 en donde dicho mamífero es un humano.

21. Un método para tratar una enfermedad o trastorno alérgicos en un animal, que comprende:

10 administrar a dicho animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar dicha enfermedad o trastorno alérgicos en dicho animal.

22. El método del ítem 21 en donde dicho animal es un mamífero.

23. El método del ítem 22 en donde dicho mamífero es un humano.

24. El método del ítem 14 en donde dicha enfermedad o trastorno alérgicos es artritis.

25. Un método para promover la curación de heridas en un animal, que comprende:

15 administrar a dicho animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para promover la curación de heridas en dicho animal.

26. El método del ítem 25 en donde dicho animal es un mamífero.

27. El método del ítem 26 en donde dicho mamífero es un humano.

28. Un método para prevenir fibrosis en un animal, que comprende:

20 administrar a dicho animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para prevenir fibrosis en dicho animal.

La invención será descrita ahora con respecto a los dibujos, en donde:

25 Figura 1. Las MSCs modulan las funciones de células dendríticas. (A) Análisis citométrico de flujo de células DC1 monocíticas maduras utilizando anticuerpos contra HLA-DR y CD11c y de células DC2 plasmacitoides utilizando anticuerpos contra HLA-DR y CD123 (receptor IL-3). (---): control de isotipo; (□): anticuerpos conjugados FITC/PE. (B) Las MSCs inhiben la secreción de TNF- α (eje y primario) se incrementa la secreción de IL-10 (eje y secundario) a partir de DC1 y DC2 activados respectivamente. (C) Las MSCs cultivadas con células DC1 maduras inhiben la secreción de IFN- γ (eje y primario) por células T e incrementan los niveles de IL4 (eje y secundario) en comparación con las MSC o DC solas. La producción disminuida del proinflamatorio IFN- γ y la producción incrementada de antiinflamatorio IL-4 en la presencia de MSCs indican un desplazamiento en la población de células T hacia un fenotipo antiinflamatorio.

35 Figura 2. Las MSCs inhiben la función de células T efectoras proinflamatorias. (A) Análisis citométrico de flujo del número de células T_{Reg} (en %) por tinción en PBMCs o fracción no adherente en cultivo de MSC+PBMC (MSC+PBMC) con anticuerpos de CD4 conjugados con FITC (eje x) y de CD25 conjugados con PE (eje y). Las salidas fueron fijadas con base en anticuerpos de control de isotipo como señal de fondo. Las gráficas son representativas de 5 experimentos independientes. (B) Células T_H1 generadas en presencia de niveles reducidos secretados por MSCs de IFN- γ (eje y primario) y células T_H2 generadas en presencia de cantidades incrementadas secretadas por MSCs de IL-4 (eje y secundario) en células de cultivos sobrenadantes. (C) MSCs inhiben la secreción de IFN- γ a partir de células NK purificadas cultivadas durante 0, 24, o 48 horas en una placa de 24 pozos. Los datos mostrados son la media $\pm$ SD de secreción de citoquina en un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

40 Figura 3. Las MSCs se llevan a números incrementados de población de células T_{Reg} y expresión incrementada de GITR. (A) Una población de células T_{Reg} CD4⁺ CD25⁺ de cultivos de PBMC o MSC + PBMC (relación MSC a PBMC

1:10) (cultivadas sin ninguna estimulación adicional durante 3 días) fue aislada utilizando un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Estas células fueron irradiadas (para bloquear cualquier proliferación adicional) y usadas como estimuladores en una reacción linfocítica mixta (MLR) donde los respondedores fueron PBMCs alogeneicos (relación estimulador a respondedor 1:100) en la presencia de fitohemaaglutinina (PHA) (2.5 mg/ml). Las células fueron cultivadas durante 48 horas, siguiendo con adición de ^3H timidina y la radioactividad incorporada fue contada después de 24 horas. Los resultados mostraron que la población de T_{reg} generada en la presencia de MSCs (línea 3) era similar funcionalmente a las de las células T_{reg} generadas en la ausencia de MSCs (línea 2). (B) Se cultivaron PBMCs durante 3 días en ausencia (gráfica superior) o presencia (gráfica inferior) de MSCs (relación de MSC a PBMC 1:10), después de lo cual la fracción no adherente fue recolectada e inmunoteñida con GITR marcado con FITC y CD4 marcada con PE. Los resultados muestran un incremento mayor a dos veces en la expresión de GITR en células cultivadas en la presencia de MSCs.

Figura 4. Las MSCs producen PGE_2 y el bloqueo de PGE_2 invierte los efectos inmunomoduladores mediados por MSC. (A) La secreción de PGE_2 (media $\pm$ SD) en sobrenadantes de cultivo teñidos de MSCs cultivadas en la presencia o ausencia de bloqueadores de PGE_2 NS-398 o indometacina (Indometh) a diversas concentraciones. Las concentraciones del inhibidor están en μM y los datos presentados son valores obtenidos después de 24 horas de cultivo. (B) Expresión de COX-1 y COX-2 en MSCs y PBMCs utilizando RT-PCR en tiempo real. Las MSCs expresaron niveles significativamente más altos de COX-2 en comparación con PBMCs, y cuando se cultivaron MSCs en presencia de PBMCs, hubo un incremento >3 veces en la expresión de COX-2 en MSCs. Se muestran datos representativos de 1 a 3 experimentos independientes. Los cultivos de MSC+PBMC fueron fijados en una placa de cámara transpoco en donde las MSCs fueron sembradas sobre la cámara inferior y las PBMCs sobre la cámara superior. (C) Presencia de bloqueadores de PGE_2 indometacina (Ind.) o NS-398 incrementa la secreción de $\text{TNF-}\alpha$ a partir de DCs activada ($\square$) y la secreción de $\text{IFN-}\gamma$ a partir de células $T_{\text{H}}1$ ($\blacksquare$) en comparación con los controles. Los datos fueron calculados como cambio en porcentaje de los cultivos generados en ausencia de inhibidores de MSCs y PGE_2 . (C) Presencia de bloqueadores de PGE_2 indometacina (Indo) y NS-398 durante el cocultivo de MSC-PBMC (1:10) invierte los efectos antiproliferativos mediados por MSC sobre PBMCs tratadas con PHA. Los datos mostrados son de un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 5. La secreción de citoquina de MSC constitutiva es elevada en la presencia de PBMCs alogeneico. Utilizando MSCs humano previamente caracterizado, fueron analizados los niveles de citoquinas IL-6 y VEGF, el PGE_2 mediador de lípidos, y la metaloproteinas 1 de matriz (pro-MMP-1) en el sobrenadante de un cultivo de MSCs cultivado durante 24 horas en la presencia (barras sombreadas) o ausencia (barras abiertas) de PBMCs (relación MSC a PBMC 1:10). Las MSCs produjeron IL-6, VEGF, y PGE_2 constitutivamente, y los niveles de estos factores se incrementaron por cocultivo con PBMCs, sugiriendo por lo tanto que las MSCs pueden jugar un papel en la modulación de funciones inmunes en una situación inflamatoria.

Figura 6. Las MSCs inhiben la proliferación de células T inducida por mitógenos en una forma dependiente de la dosis. Se incubaron números crecientes de PBMCs alogeneicos con números constantes de MSCs (2,000 células/pozo) sembradas sobre una placa de 96 pozos en la presencia o ausencia de PHA (2.5 mg/ml) durante 72 horas, y una determinada incorporación de ^3H timidina (en recuentos por minuto, o cpm). Hubo una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de PBMCs tratadas con PHA en la presencia de MSCs. Se muestran los resultados representativos de 1 a 3 experimentos independientes. Resultados similares fueron reportados por LeBlanc, et al., Scand J. Immunol., Vol. 57, pg. 11 (2003).

Figura 7. Diagrama esquemático del mecanismo de acción de las MSC propuesto. Las MSCs median sus efectos inmunomoduladores afectando células tanto de los sistemas inmunes innatos (rutas DCs 2-4; y ruta NK 6) y adaptativos (rutas T 1 y 5 y ruta B 7). En respuesta a un patógeno invasor, las DCs inmaduras migran al sitio de la entrada potencial, maduran y adquieren una capacidad de cebar células T nativas (por medio de señales específicas y coestimuladoras del antígeno) para convertirse en células T efectoras protectoras (inmunidad $T_{\text{H}}1$ mediada por células o $T_{\text{H}}2$ humorales). Durante la interacción MSC-DC, las MSCs, por medio de contacto directo célula-célula o a través de un factor secretado, pueden alterar la generación de respuesta inmune limitando la capacidad de las DCs para montar una respuesta mediada por la célula (ruta 2) o promoviendo la capacidad de montar una respuesta humoral (ruta 4). También, cuando las células T efectoras maduras están presentes, las MSCs pueden interactuar con ellas para inclinar el balance de las respuestas $T_{\text{H}}1$ (ruta 1) hacia respuestas $T_{\text{H}}2$ (ruta 5), y probablemente hacia la actividad de células B productoras de IgE incrementada (ruta 7), resultados deseables para la supresión de GvHD y síntomas de enfermedades autoinmunes. Las MSCs en su capacidad de dar como resultado una generación incrementada de la población T_{reg} (ruta 3) pueden dar como resultado un fenotipo tolerante y puede ayudar a un hospedero receptor amortiguando la inflamación testigo en su microambiente local. La línea punteada (----) representa el mecanismo propuesto.

La invención será descrita ahora con respecto al siguiente ejemplo. Debe entenderse, sin embargo, que el alcance de la presente invención no debe estar limitado por el mismo.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Cultivo de MSCs humanas

5 Las MSCs humanas fueron cultivadas como lo describen Pittenger et al., Science, Vol. 284, pg. 143 (1999). En resumen, se recolectaron muestras de médula a partir de la cresta iliaca de donantes anónimos después de un consentimiento informado por Poietics Technologies, Div of Cambrex Biosciences. Las MSCs fueron cultivadas en medio bajo en glucosa de Eagle modificado de Dulbecco (Life Technologies, Carlsbad, California) que contenía solución antibiótica-antimiótica al 1% (Invitrogen, Carlsbad, California) y suero bovino fetal al 10% (FBS, JRH BioSciences, Lenexa, Kansas). Las MSCs crecieron en una monocapa adherente y fueron desprendidas con tripsina/EDTA (0.05% de tripsina a 37°C durante 3 minutos). Todas las MSCs usadas fueron caracterizadas
10 previamente en cuanto a su potencial de multilinaje y mantuvieron la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales (condrocítico, adipogénico, y osteogénico) (Pittenger, et al., Science, Vol. 284, pg. 143 (1999)).

Aislamiento de las células dendríticas

15 Se obtuvieron células mononucleares de sangre periféricas (PBMCs) de Poietics Technologies, Div of Cambrex Biosciences (Walkersville, MD). Los precursores de células dendríticas (DCs) de linaje monocítico (CD1c⁺) fueron seleccionados positivamente de las PBMCs utilizando un método de separación magnética de 2 etapas de acuerdo con Dzionek, et. al., J. Immunol., Vol. 165, pg. 6037 (2000). En resumen, las células B que expresan CD1 fueron retiradas magnéticamente de las células CD19⁺ utilizando perlas magnéticas, seguidas por marcación de la fracción separada de células B con CD1 c marcadas con biotina (BDCA1⁺) y anticuerpos antibiotina y separándolas de la fracción celular no marcada utilizando columnas magnéticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Auburn, California). Los precursores de DCs de linaje plasmacitoide fueron aislados de la PBMCs por separación inmunomagnética de células recubiertas de anticuerpos marcados positivamente (BDCA2⁺) (Miltenyi Biotech, Auburn, California).
20

Cultivo de MSC-DC

En la mayoría de los experimentos, las MSCs y DCs humanas fueron cultivadas en números iguales en diversos períodos de tiempo y fueron recolectados los sobrenadantes de los cultivos celulares y almacenados a -80°C hasta evaluación posterior. En experimentos seleccionados, las MSCs fueron cultivadas con células DC1 o DC2 maduras (relación 1:1 MSC:DC) durante 3 días, y luego los cultivos combinados (MSCs y DCs) fueron irradiados para prevenir cualquier proliferación. A continuación, se agregaron células T alogeneicas, ingenuas purificadas en anticuerpos (CD4⁺,CD45RA⁺) a las MSCs/DCs irradiadas y se cultivaron durante 6 días adicionales. La fracción celular no adherente (células T purificadas) fue recolectada entonces de los cultivos, lavada dos veces y reestimulada con PHA durante otras 24 horas después de lo cual los sobrenadantes del cultivo celular fueron recolectados y analizados en cuanto a IFN-γ e IL-4 secretados por ELISA.

Aislamiento de células NK

Se obtuvieron poblaciones purificadas de células NK retirando células no NK que están 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 marcación secundario. Las células no NK marcadas magnéticamente fueron mantenidas en columnas MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, California) en un campo magnético, mientras que las células NK pasaron a través del mismo y fueron recolectadas.

Aislamiento de la población de células T_{Reg}

La población de células T_{Reg} fue aislado utilizando un procedimiento de aislamiento en 2 etapas. Primero las células T no CD4⁺ fueron marcadas magnéticamente de forma indirecta con un cóctel de anticuerpos marcados con biotina y microperlas antibiotina. Las células marcadas fueron eliminadas entonces por separación sobre una columna MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, California). A continuación las células CD4⁺CD25⁺ fueron marcadas directamente con microperlas CD25 y aisladas por selección positiva a partir de la fracción de células T CD4⁺ preenriquecida. Las células T CD4⁺CD25⁺ marcadas magnéticamente fueron mantenidas en la columna y se eluyeron después de la eliminación de la remoción de la columna del campo magnético.

Con el fin de determinar si la población incrementada de CD4⁺CD25⁺ generada en la presencia de MSCs fue supresora en naturaleza, se aislaron poblaciones de células T_{Reg} de CD4⁺CD25⁺ de cultivos de PBMC o MSC+PBMC (relación MSC a PBMC 1:10) (cultivadas sin ningún factor de estimulación adicional durante 3 días) usando un procedimiento de aislamiento magnético en 2 etapas. Estas células fueron irradiadas para bloquear cualquier proliferación posterior y, utilizadas como estimuladores en una reacción de linfocitos mixtos (MLR), en donde los respondedores fueron PBMCs alogeneicas (relación estimuladores a respondedor 1:100) en la presencia de PHA (2.5 μg/ml). El cultivo fue llevado a cabo durante 48 horas, después de lo cual se agregó ³H timidina. La radioactividad incorporada fue contada después de 24 horas.

Las PBMCs fueron cultivadas en ausencia o presencia de MSCs (relación MSC a PBMC 1:10), después de lo cual la fracción no adherente fue recolectada e inmunoteñida con el receptor de TNF inducido por glucocorticoides marcado con FITC, o GITR, y CD4 marcado con PE.

Generación de células T_{H1}/T_{H2}

Se sembraron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a 2x10⁶ células/ml durante 45 minutos a 37°C con el fin de eliminar monocitos. La fracción no adherente fue incubada en la presencia de anticuerpos anti-CD3 (5 μg/ml) y anti-CD28 (1 μg/ml) enlazados a la placa bajo condiciones de T_{H1} (IL-2 (4 ng/ml) + IL-12 (5 ng/ml) + anti-IL-4 (1 μg/ml)) o T_{H2} (IL2 (4 ng/ml) + IL-4 (4 ng/ml) + anti-IFN-γ (1 μg/ml)) durante 3 días en la presencia o ausencia de MSCs. Las células fueron lavadas y luego reestimuladas con PHA (2.5 μg/ml) durante otras 24 o 48 horas, después de lo cual se midieron los niveles de IFN-γ e IL-4 en sobrenadantes de cultivo por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota).

Análisis de niveles de VEGF, PGE₂, y proMMP-1 en sobrenadante de cultivo de MSCs.

Utilizando MSCs humano caracterizado previamente, se analizaron los niveles de interleucina-6 (IL-6), VEGF, prostaglandina E₂ mediadora de lípidos (PGE₂) y metaloproteínas 1 de matriz (pro-MMP-1) en el sobrenadante de cultivo de MSCs cultivadas durante 24 horas en la presencia o ausencia de PBMCs (relación MSC a PBMC 1:10).

Proliferación de PBMCs

Las PBMCs purificadas fueron preparadas centrifugando leucopack (Cambrex, Walkersville, Maryland) en Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Oslo, Noruega). Las células separadas fueron cultivadas (en triplicados) en la presencia o

ausencia de MSCs (sembradas 3-4 horas antes de la adición de PBMC para permitirles asentarse) durante 48 horas en presencia del mitógeno PHA (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri). En experimentos seleccionados, las PBMCs fueron resuspendidas en un medio que contenía los inhibidores de PGE₂ indometacina (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) o NS-938 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan). Se agregó (³H)-timidina (20 µl en un cultivo de 200 µl) y las células fueron recolectadas después de un cultivo adicional de 24 horas utilizando un recolector automático. Los efectos de los bloqueadores de MSCs o PGE₂ fueron calculados como porcentaje de la respuesta del control (100%) en presencia de PHA.

RT-PCR cuantitativa

Se preparó ARN total a partir de pellas de células usando un kit comercialmente disponible (Qiagen, Valencia, California) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN genómico contaminante fue eliminado utilizando el kit DNA-free (Ambion, Austin, Texas). El RT-PCR fue llevado a cabo sobre un sistema de detección MJ Research Opticon (South San Francisco, California) utilizando el kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen, Valencia, California) con cebadores a una concentración de 0.5 µM. Se calcularon cambios relativos en niveles de expresión en células cultivadas bajo condiciones diferentes mediante la diferencia en los valores Ct (punto de cruzamiento) utilizando acción β como control interno. Las secuencias para cebadores específicos de COX-1 y COX-2 fueron: COX-1: 5'-CCG GAT GCC AGT CAG GAT GAT G-3'(avance), 5'-CTA GAC AGC CAG ATG CTG ACA G-3' (reverso); COX-2: 5'-ATC TAC CCT CCT CAA GTC CC-3'(avance), 5'-TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG3' (reverso).

Se incubaron números crecientes de PBMCs alogeneicas con números constates de MSCs (2,000 células/pozo) sembrados sobre una placa de 96 pozos en la presencia de PHA (2.5 µg/ml) durante 72 horas, y se determinó la incorporación de ³H timidina (recuentos por minuto, cpm). Las PBMCs y MSCs fueron cultivadas en relaciones de MSC:PBMC de 1:1, 1:3, 1:10, 1:30, y 1:81.

Resultados

En los presentes estudios, se examinaron las interacciones de las MSCs humanas con poblaciones celulares inmunes aisladas, incluyendo células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras (T_H1 y T_H2) y células NK. La interacción de las MSCs con cada tipo de célula inmune tuvo consecuencias específicas, sugiriendo que las MSCs pueden modular varias etapas en el proceso de respuesta inmune. La producción de los factores secretados que modulan y pueden ser responsables por los efectos inmunomoduladores de las MSC fue evaluada y se implicó la síntesis de la prostaglandina.

Las células dendríticas precursoras mieloides (DC1) y plasmacitoides (DC2) fueron aisladas por selección inmunomagnética de células BDCA1⁺ y BDCA2⁺ respectivamente y maduras por incubación con GM-CSF e IL-4 (1x10³ IU/ml y 1x10³ IU/ml, respectivamente) para células DC1, o IL-3 (10 ng/ml) para células DC2. Utilizando citometría de flujo, las células DC1 fueron HLA-DR⁺ y CD11c⁺, mientras que las células DC2 fueron HLA-DR⁺ y CD123⁺ (Figura 1A). En la presencia del agente inflamatorio bacteriano lipopolisacárido (LPS, 1 ng/ml), las células DC1 produjeron niveles moderados de TNF-α pero cuando estaban presentes las MSCs (relaciones examinadas 1:1 y 1:10), hubo una reducción de >50% en la secreción de TNF-α (Figura 1B). Por otro lado, las células DC2 produjeron IL-10 en la presencia de LPS y sus niveles fueron incrementados más de 2 veces por cocultivo con MSC:DC2 (1:1) (Figura 1B). Por lo tanto, las MSCs modificaron el perfil de citoquinas de las DCs activadas en cultivo hacia un fenotipo más tolerogénico. Adicionalmente, las DCs activadas, cuando se cultivaron con MSCs, fueron capaces de reducir la IFN-γ e incrementar los niveles de IL-4 secretados por las células T CD4⁺ ingenuas (Figura 1C) sugiriendo un desplazamiento mediado por MSC de el fenotipo de células T proinflamatorio a antiinflamatorio.

Una secreción incrementada de IL-10 juega un papel en la generación de células reguladoras (Kingsley, et al., J. Immunol., Vol. 168, pg. 1080 (2002)). Las células reguladoras T (T_{Reg}) fueron cuantificadas por citometría de flujo en cocultivos de PBMCs y MSCs. Al cultivar PBMCs con MSCs durante 3-5 días, hubo un incremento en los números de células T_{Reg} determinado por tinción de las PBMCs con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 (Figura 2A), soportando adicionalmente una respuesta tolerogénica inducida por MSC. La población de células T_{Reg} CD4⁺CD25⁺, generada en presencia de las MSCs expresó niveles incrementados del receptor de TNF inducido por glucocorticoide (GITR), un receptor de la superficie celular expresado en poblaciones de células T_{Reg}, y fue supresor en naturaleza puesto que suprimió la proliferación de células T alogeneicas (Figuras 3A, B). A continuación, se investigaron las MSCs en cuanto a su capacidad directa para afectar la diferenciación de células T. Utilizando células T purificadas seleccionadas con anticuerpos (células Th CD4⁺), Se generaron células T_H1 productoras de IFN-γ y T_H2 productoras de IL-4 en presencia o ausencia de MSCs. Cuando estaban presentes las MSCs durante la diferenciación, hubo una secreción reducida de IFN-γ por células T_H1 y una secreción incrementada de IL-4 por células T_H2 (Figura 2B). No se observó un cambio significativo en los niveles de IFN-γ o IL-4 cuando se agregaron las MSCs al cultivo después de que las células Th se habían diferenciado (a los 3 días) en tipos efectoras T_H1 o T_H2 (datos no mostrados). Estos experimentos sugieren que las MSCs pueden afectar la diferenciación de las células T efectoras directamente y alterar la secreción de citoquina de las células T hacia un fenotipo humoral.

De la misma manera, cuando se cultivaron las MSCs con células NK purificadas (CD3-, CD14-, CD19-, CD36-) a una relación 1:1 durante diferentes períodos de tiempo (0-48 horas), hubo una secreción disminuida de IFN- γ en el sobrenadante del cultivo (Figura 2C), sugiriendo por lo tanto que las MSCs pueden modular también las funciones de las células NK.

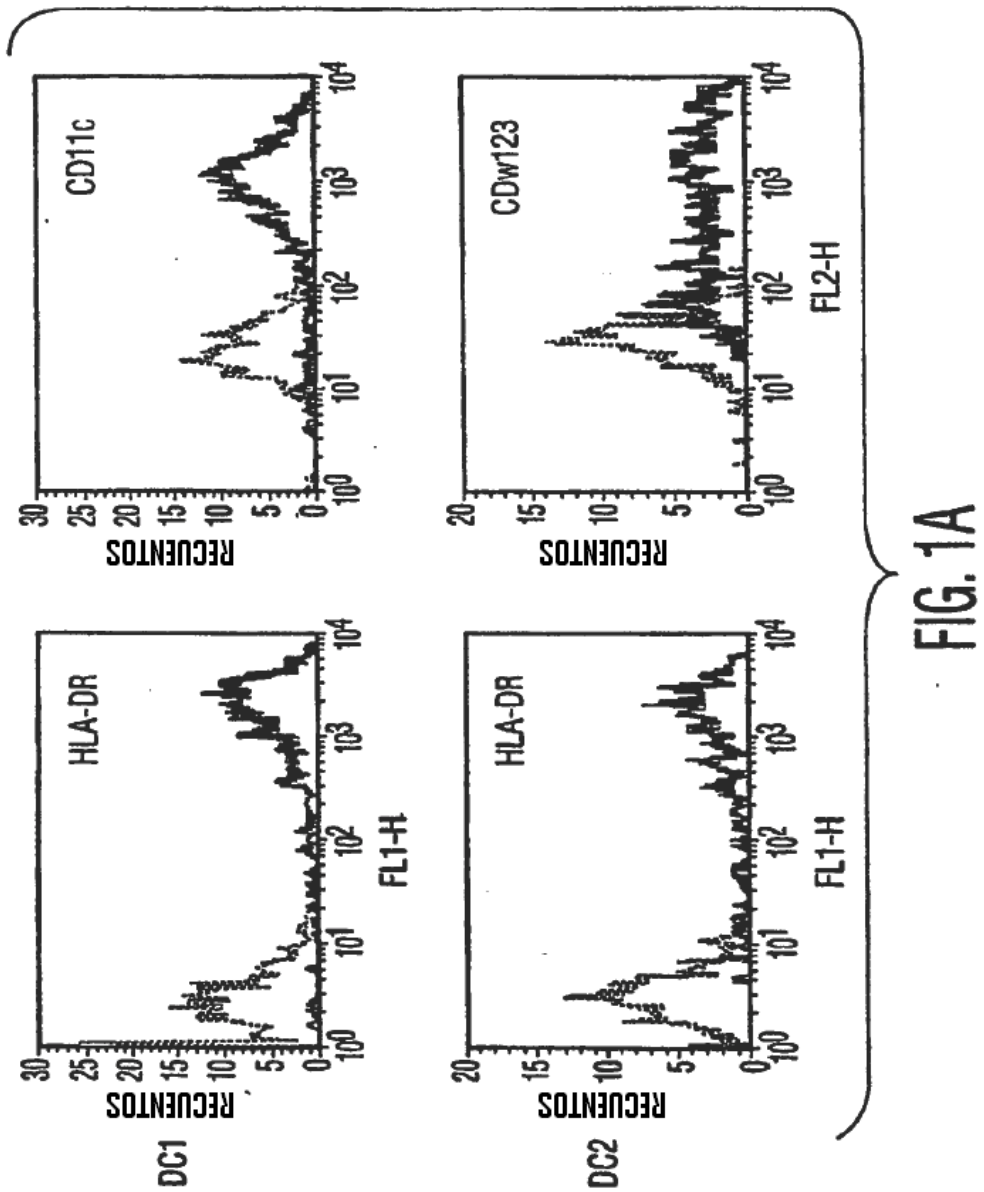
Trabajos previos han indicado que las MSCs modifican las funciones de las células T mediante factores solubles (LeBlanc, et al., Exp. Hematol., Vol. 31, pg. 890 (2003); Tse, et al., Transplantation, Vol. 75, pg. 389 (2003). Se observó que las MSCs secretaron diversos factores, incluyendo IL-6, prostaglandina E₂, VEGF y proMMP-1 constitutivamente, y los niveles de cada una se incrementaron por cultivo con PBMCs (Figura 5). Con el fin de investigar los factores derivados de MSC que llevan a la inhibición de la producción de TNF- α e incremento de la IL-10 por las DCs, fue investigado el papel potencial de la prostaglandina E₂, puesto que ha demostrado inhibir la producción de TNF- α por DCs activados (Vassiliou, et al., Cell. Immunol. Vol. 223, pg. 120 (2003)). Los medios acondicionados a partir de cultivos de MSC (cultivo durante 24 horas de 0.5 x10⁶ células/ml) contenía aproximadamente 1000 pg/ml de PGE₂ (Figura 4A). No hubo presencia detectable de inductores conocidos de la secreción de PGE₂, por ejemplo TNF- α , IFN- γ o IL-1 β (datos no mostrados) en el sobrenadante del cultivo indicando una secreción constitutiva de PGE₂ por parte de las MSCs. La secreción de PGE₂ por las hMSCs fue inhibida en 60-90% en la presencia de inhibidores conocidos de la producción de PGE₂, NS-398 (5 μ M) e indometacina (4 μ M) (Figura 4A). A medida que ocurre la secreción de PGE₂ como resultado de la actividad enzimática de la enzima ciclooxigenasa constitutivamente activa 1 (COX-1) y la enzima ciclooxigenasa inducible 2 (COX-2) (Harris, et al., Trends Immunol., Vol. 23, pg. 144 (2002)), fue analizada la expresión del ARNm para COX-1 y COX-2 en las MSCs y en las PBMCs utilizando sistemas de cultivo transpozo. Las MSCs expresaron niveles significativamente más altos de COX-2 en comparación con las PBMCs y los niveles de expresión se incrementaron más de 3 veces por cocultivo de las MSCs y PBMCs (relación MSC a PBMC de 1:10) durante 24 horas (Figura 4B). Se observaron cambios modestos en los niveles de COX-1 sugiriendo que el incremento en la secreción de PGE₂ por cocultivo de MSC-PBMC (Figura 5) es mediado por la sobreexpresión de COX-2. Para investigar si los efectos inmunomoduladores de las MSC sobre células DCs y T eran mediados por la PGE₂, se cultivaron MSCs con células dendríticas activadas (DC1) o células T_H1 en presencia de los inhibidores de PGE₂ NS-398 o indometacina. La presencia de NS-398 o de indometacina incrementó la secreción de TNF- α por parte de DC1s, y la secreción de IFN- γ de las células T_H1 (Figura 4C), respectivamente, sugiriendo que los efectos de las MSC sobre los tipos celulares inmunes pueden ser mediados por la PGE₂ secretada. Estudios recientes han demostrado que las MSCs inhibe la proliferación de células T inducidas por diversos estímulos (DeNicola, et al., Blood, Vol. 99, pg. 3838 (2002); LeBlanc, et al., Scand. J. Immunol., Vol. 57, pg. 11 (2003)). Se observó que las MSCs inhiben la proliferación de células T inducida por mitógenos en una forma dependiente de la dosis (Figura 6) y cuando los inhibidores de PGE₂ NS-398 (5 μ M) o indometacina (4 μ M) estaban presentes, hubo un incremento de más del 70% en la incorporación de (³H) timidina por PBMCs tratada con PHA en cultivos que contenían MSC en comparación con los controles sin inhibidores (Figura 4D).

En resumen, se propone un modelo de interacción de las MSC con otros tipos de células inmunes (Figura 7). Cuando están presentes células T maduras, las MSCs pueden interactuar con ellas directamente e inhibir la producción de IFN- γ proinflamatoria (ruta 1) y promover el fenotipo de células T reguladoras (ruta 3) y de células T_H2 antiinflamatorias (ruta 5). Adicionalmente, las MSCs pueden alterar el resultado de la respuesta inmune de las células T a través de DCs secretando PGE₂, inhibiendo las células DC1 proinflamatorias (ruta 2) y promoviendo las células DC2 antiinflamatorias (ruta 4) o DCs reguladoras (ruta 3). Un desplazamiento hacia la inmunidad T_H2 a su vez, sugiere un cambio en la actividad de las células B hacia la generación incrementada de anticuerpos subtipos IgE/IgG1 (ruta 7). Las MSCs, por su capacidad de inhibir la secreción de IFN- γ a partir de células NK probablemente modifique la función de las células NK (ruta 6). Este modelo de interacciones de células MSC:inmunes es consistente con la experimentación llevada a cabo en varios otros laboratorios (LeBlanc, et al., Exp. Hematol., Vol. 31, pg. 890 (2003); Tse, et al., Transplantation, Vol. 75, pg. 389 (2003); DiNicola, et al., Blood, Vol. 99, pg. 3838 (2002)). Un examen adicional de los mecanismos propuestos está en camino y ahora son necesarios estudios con animales para examinar los efectos *in vivo* de la administración de MSC.

REIVINDICACIONES

1. Células madre mesenquimales para uso en el tratamiento o prevención de fibrosis en un humano, en donde la fibrosis es fibrosis de los riñones asociada con enfermedad renal en etapa terminal o fibrosis de los pulmones.
- 5 2. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las MSC van a ser administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^5 células por kilogramo de peso corporal hasta aproximadamente 1×10^7 células por kilogramo de peso corporal.
3. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las MSC van a ser administradas en una cantidad que va desde aproximadamente 1×10^6 células por kilogramo de peso corporal hasta aproximadamente 5.0×10^6 células por kilogramo de peso corporal.
- 10 4. Las células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las células madre mesenquimales son alogeneicas.
5. Las células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las células madre mesenquimales son autólogas.
- 15 6. Las células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las MSC van a ser administradas por administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal.
7. Las células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las MSC van a ser administradas como una suspensión celular en un medio líquido farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. Las células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las células madre mesenquimales son recolectadas a partir de un tejido que contiene células madre mesenquimales, aisladas y expandidas en cultivo.
9. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 8, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el tejido que contiene las células madre mesenquimales es sangre, piel, cordón umbilical, músculo, grasa, pericondrio, médula ósea o periostio.
- 25 10. Las células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las células madre mesenquimales no son manipuladas genéticamente.
11. Las células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde las MSC van a ser administradas en combinación con un agente terapéutico.
- 30 12. Las células madre mesenquimales de la reivindicación 11, para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el agente terapéutico es un fármaco antiinflamatorio.

1/9



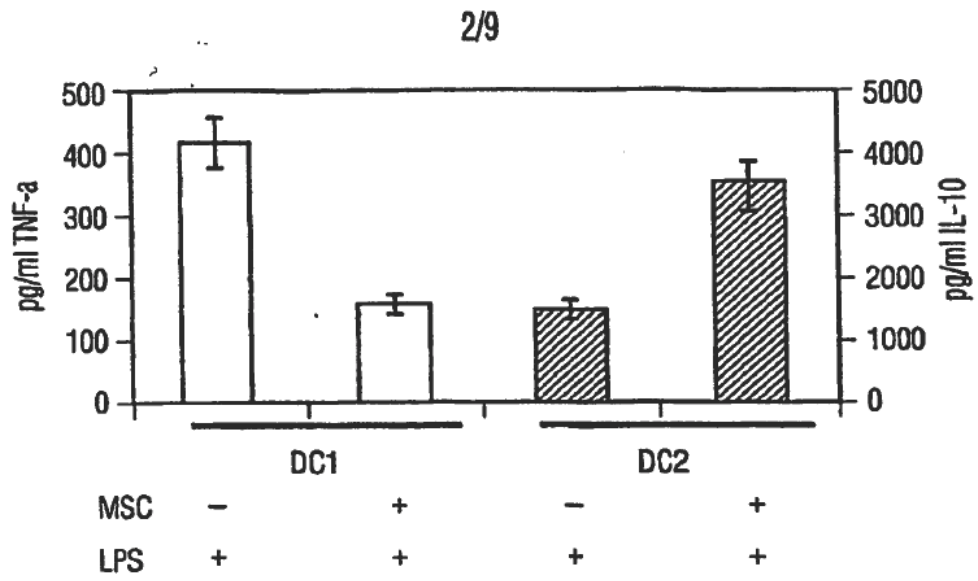


FIG. 1B

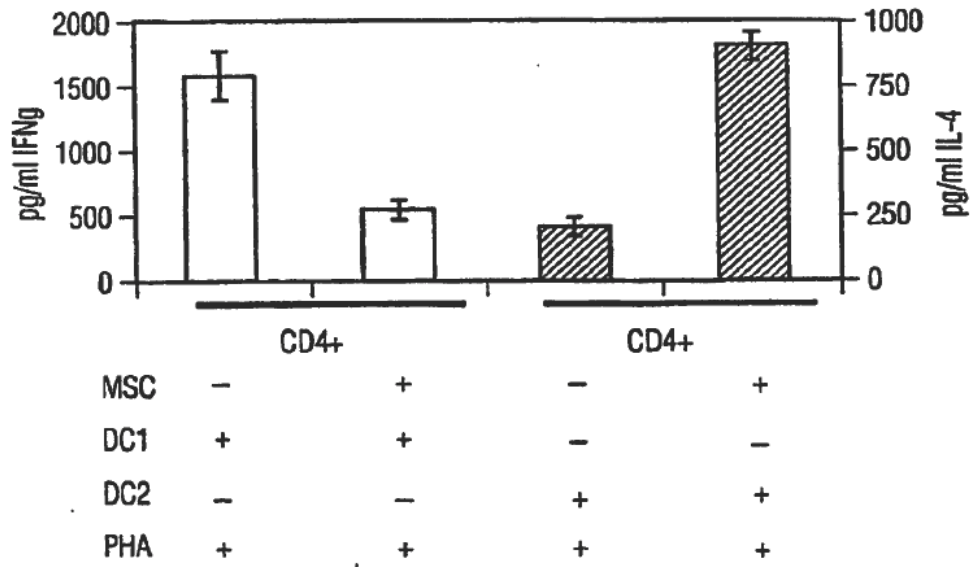
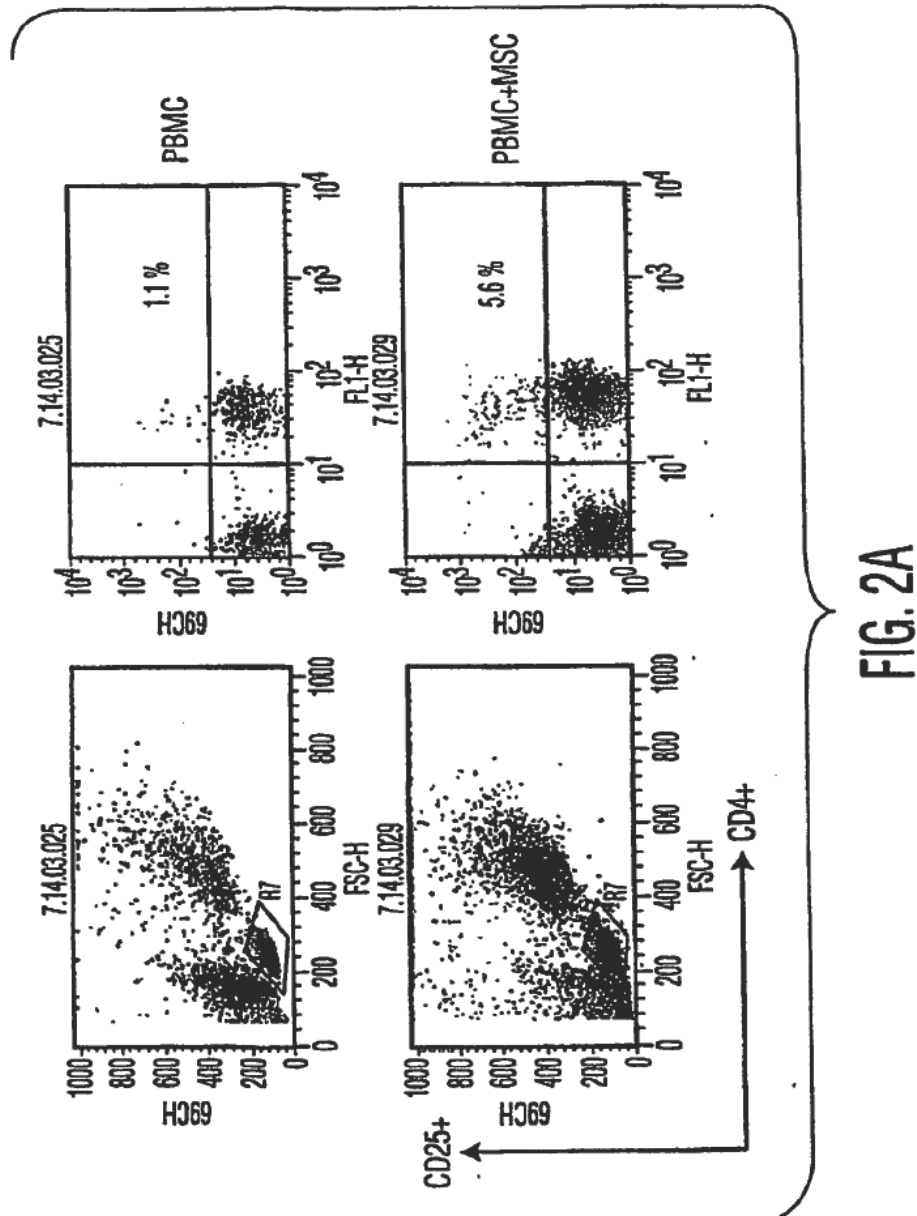


FIG. 1C

3/9



4/9

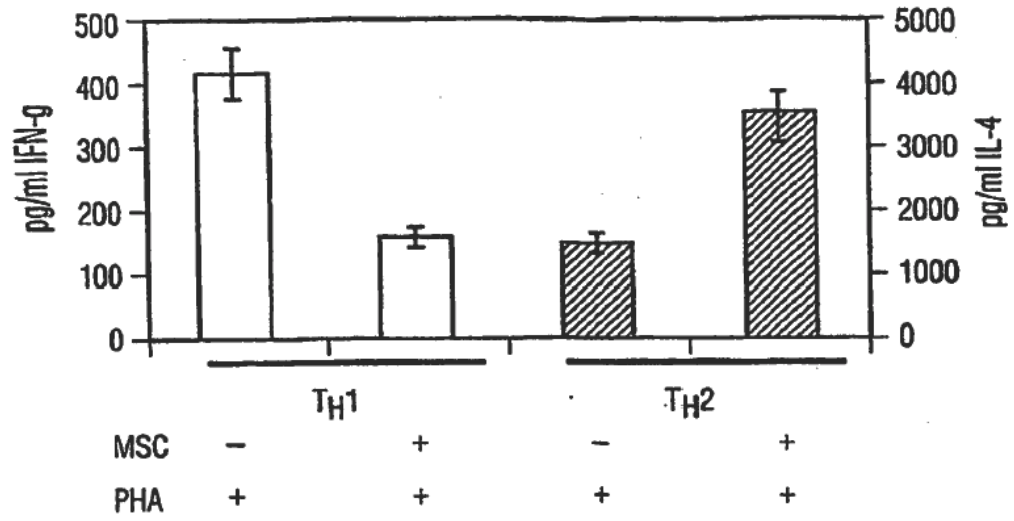


FIG. 2B

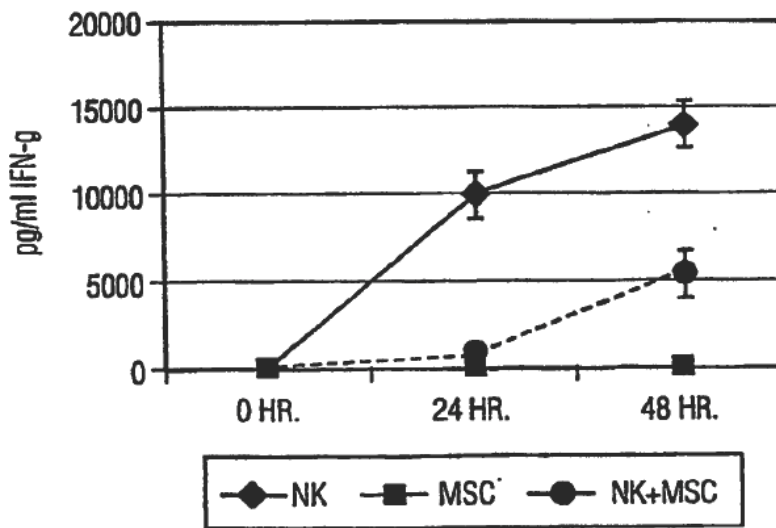


FIG. 2C

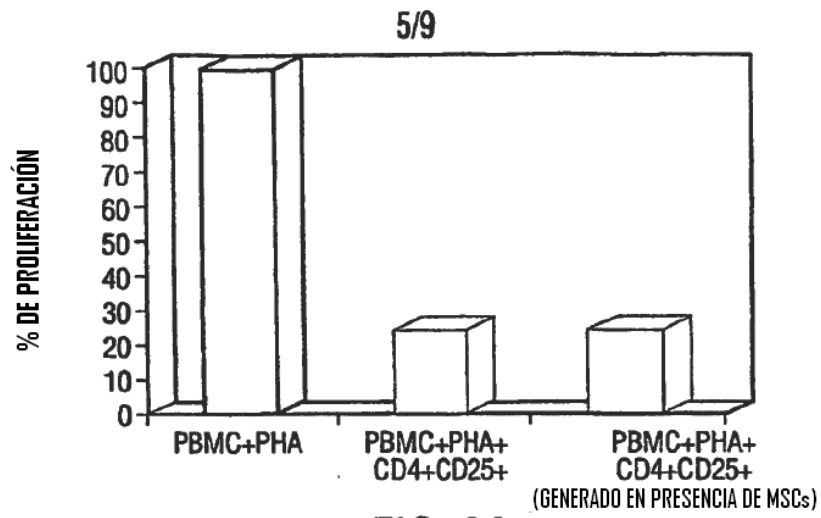


FIG. 3A

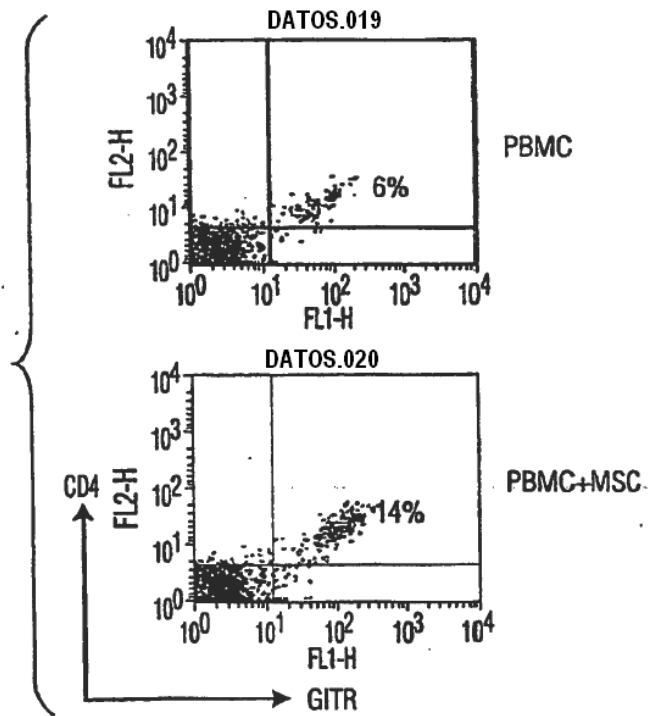


FIG. 3B

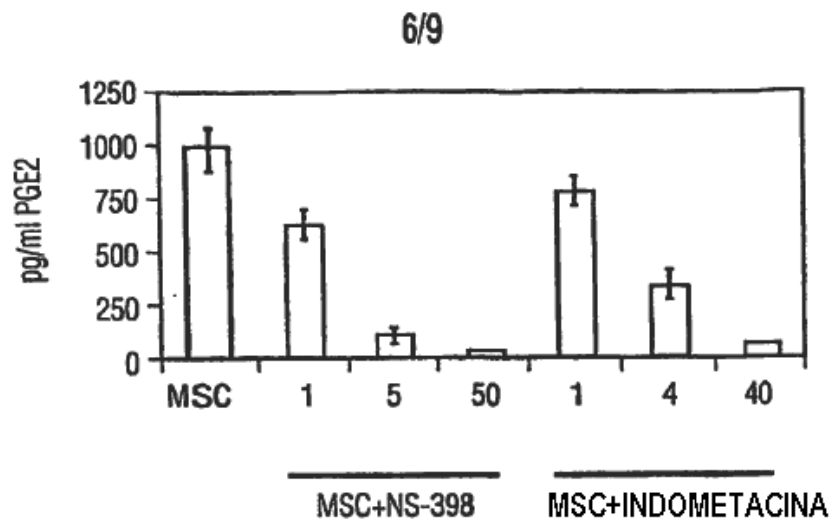


FIG. 4A

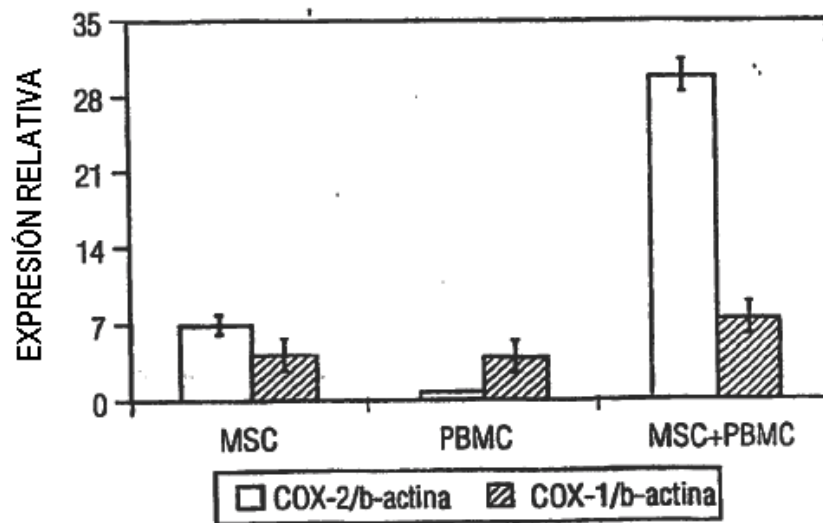


FIG. 4B

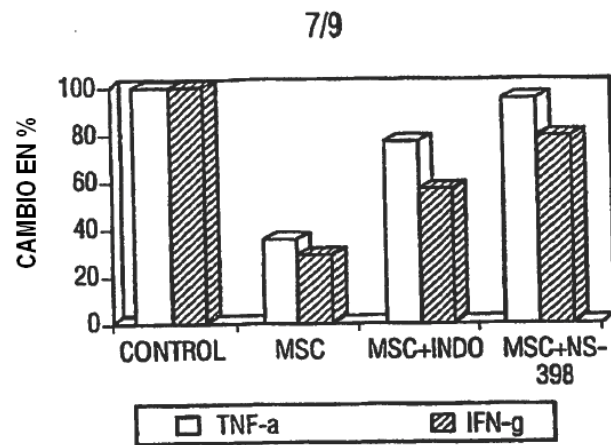


FIG. 4C

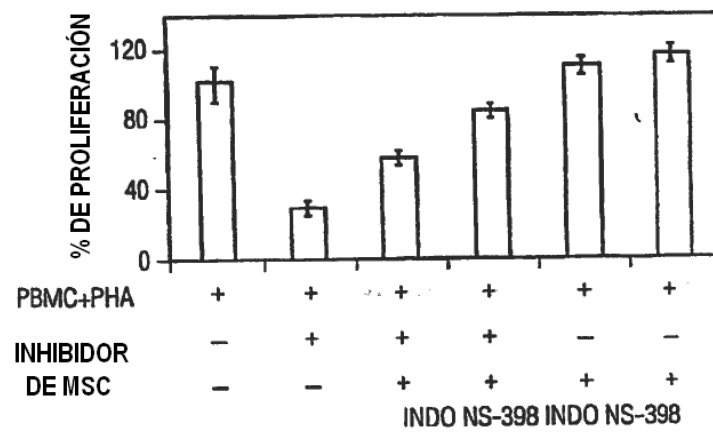


FIG. 4D

8/9

Fig. 5

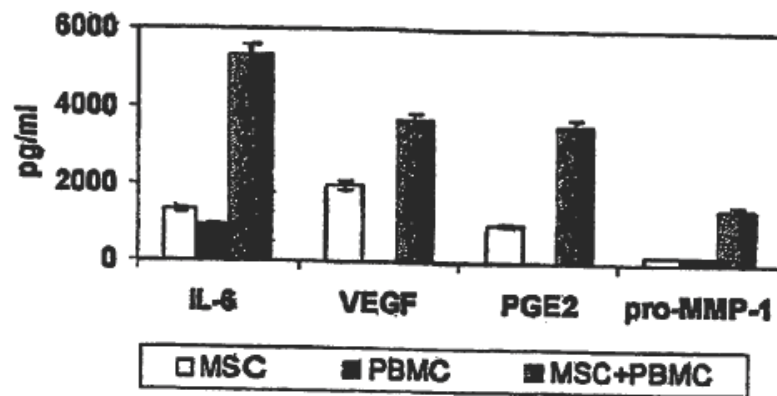
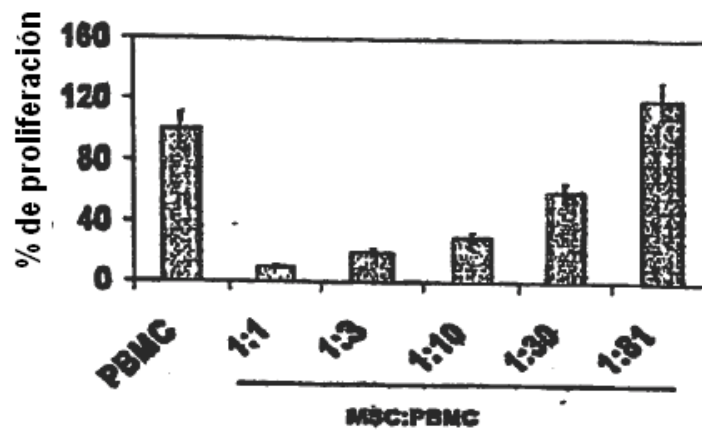


Fig. 6



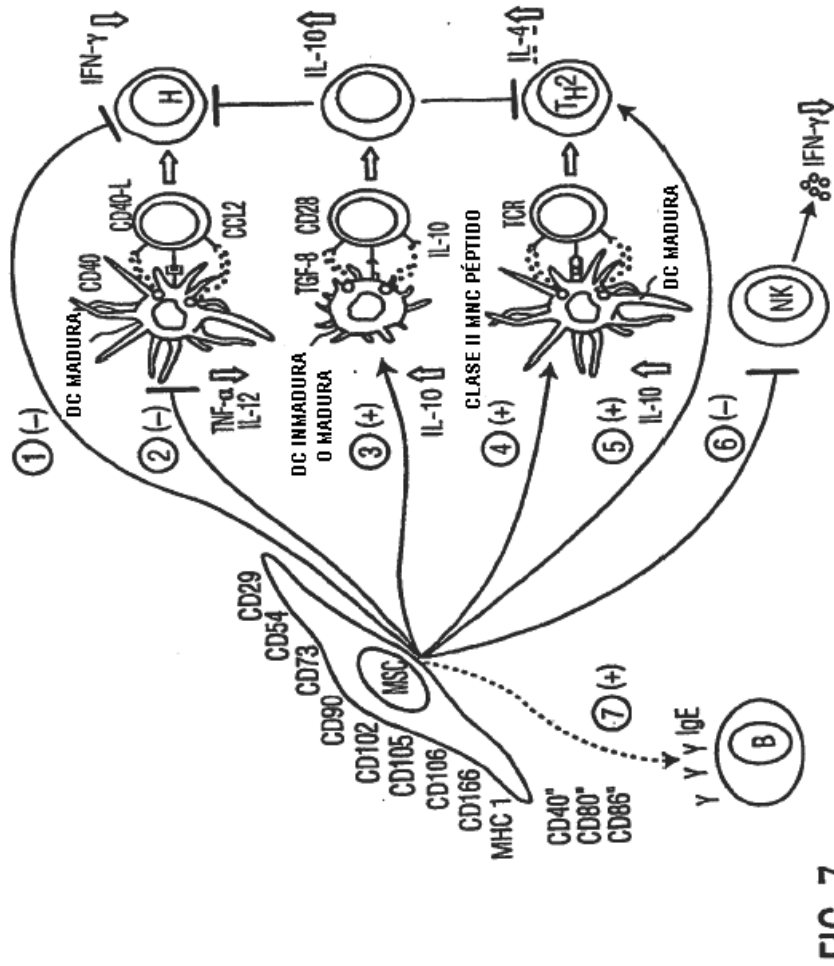


FIG. 7