

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 103**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2008 PCT/EP2008/064065**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09050282**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2008 E 08840358 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2205721**

54 Título: **Células Tr1, células madre mesenquimales y usos de estas**

30 Prioridad:

17.10.2007 US 980541 P

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

27.12.2016

73 Titular/es:

**TXCELL (100.0%)
LES CARDOULINES ALLEE DE LA NERTIERE
SOFIA ANTIPOLIS
06560 VALBONNE, FR**

72 Inventor/es:

**FOUSSAT, ARNAUD y
BELMONTE, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 595 103 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 Tr1, células madre mesenquimales y usos de estas

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a células Tr1 y células madre mesenquimales. Más particularmente, esta invención se refiere a los usos de las células Tr1 y las células madre mesenquimales para tratar una respuesta mediada por células T, propia o no, que es excesiva, disfuncional o incontrolada, tales como las enfermedades autoinmunitarias o las enfermedades inflamatorias.

Antecedentes de la invención

15 La función del sistema inmunológico es la eliminación de células extrañas que puedan contener patógenos, mientras se mantiene la falta de respuesta o tolerancia contra los autoantígenos. La tolerancia se manifiesta por el agotamiento de las células T autorreactivas o anergia, esta última se caracteriza por la supervivencia de las células T, pero con una menor capacidad de respuesta. Sin embargo, en varias circunstancias, el sistema inmunológico puede atacar constituyentes propios, lo que provoca las enfermedades autoinmunitarias. Se considera que las enfermedades autoinmunitarias se originan en la respuesta inmunológica anormal a autoantígenos, debido a un cambio en la capacidad inmunogénica de los autoantígenos o a la exposición a antígenos miméticos con reactividad cruzada.

25 Es deseable mejorar los tratamientos actuales de las enfermedades autoinmunitarias u otras reacciones inmunológicas indeseables que usan agentes inmunosupresores generales, tales como compuestos anti-TNF, corticosteroides, azatioprina, o ciclosporina A. Estos tratamientos no son selectivos y no hacen distinción entre las respuestas inmunológicas normales y las anormales. Estos fármacos tienen a menudo efectos secundarios adversos, que incluyen la supresión general del sistema inmunológico con un alto riesgo de infección y neoplasia, así como el desarrollo de enfermedades tales como la diabetes, la osteoporosis, la leucopenia y la hipertensión. Se necesitan enfoques alternativos para el tratamiento de estas enfermedades para los pacientes que no pueden soportar, o que no responden a la terapia farmacológica no específica convencional. Estos enfoques alternativos se basan en la inducción de inmunosupresión y/o tolerancia inmunológica específica, dirigidas al «silenciamiento» de la respuesta patógena a los autoantígenos, mientras se mantienen intactos los mecanismos de defensa del huésped.

Se han considerado enfoques alternativos que utilizan las MSC.

35 Las células madre mesenquimales (MSC) son células madre multipotentes que pueden diferenciarse fácilmente en linajes que incluyen osteoblastos, miocitos, condrocitos y adipocitos. Las MSC expresan el antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I sobre su superficie, pero tienen una expresión limitada de las moléculas de clase II y no expresan moléculas coestimuladoras B7 o CD40, lo que sugiere que estas células tienen una baja capacidad inmunogénica. Las MSC también inhiben las respuestas proliferativas de células T de una manera independiente del MHC. Estas propiedades inmunológicas de las MSC pueden mejorar su trasplante como injerto y limitar la capacidad del sistema inmunológico receptor de reconocer y rechazar las células alogénicas después del trasplante.

45 La solicitud de patente núm. US2002/044923 describe el uso de las MSC, que se han modificado para portar un antígeno, para tratar o inhibir una respuesta inmunológica no deseada o anormal, tal como ocurre en las enfermedades autoinmunitarias. La presentación del antígeno a la célula T en ausencia de una señal coestimuladora induce un estado de una menor capacidad de respuesta, específico del antígeno, o incluso falta de respuesta o anergia en la célula T en una estimulación posterior de la célula T por el antígeno.

50 La solicitud de patente núm. WO2005/093044 (Pittenger y otros) describe cómo las MSC pueden emplearse en el tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos que implican el sistema inmunológico. Pittenger y otros creen que 1/ las MSC pueden estimular las células dendríticas (DC) para producir interferón-beta (IFN-β), que promueve la supresión de tumores y la inmunidad contra una infección viral, y 2/ las MSC pueden suprimir enfermedades autoinmunitarias al provocar la liberación de interleucina-10 (IL-10) a partir de células T reguladoras (células Treg) y/o DC. Sin embargo, todos los experimentos que se muestran en los ejemplos se realizan in vitro y Pittenger y otros no demuestran en esta solicitud de patente que la inyección de MSC puede tratar eficazmente las enfermedades, afecciones y trastornos que implican al sistema inmunológico.

La solicitud de patente núm. US2002/085996 se refiere al uso de las MSC para prevenir, reducir o tratar el rechazo de trasplantes y/o la reacción de injerto contra huésped, pero no se refiere a las afecciones autoinmunitarias.

60 Di Nicola y otros (Blood, 2002) describen que las células estromales de la médula ósea inhiben la proliferación de linfocitos T en reacciones linfocitarias mixtas (MLRs).

Se han considerado otros enfoques alternativos que utilizan las células T reguladoras.

5 Actualmente se han identificado varios subconjuntos de células T reguladoras (Treg) con distintos fenotipos y mecanismos de acción distintos. Estas incluyen las células Treg CD4⁺ CD25⁺, que inhiben las respuestas inmunológicas a través del contacto célula a célula, las células Th3 que secretan principalmente TGF- β , y las células Tr1 que secretan altos niveles de IL-10 y niveles bajos a moderados de TGF- β . Estas células Tr1 producen IL-10, IL-5 e IFN- γ , con o sin TGF- β , pero con poco o nada de IL-2 o IL-4, y proliferan poco después de una activación mediada por TCR policlonal.

10 Las solicitudes de patentes núms. US2007/009497 y WO2006/090291 describen el uso de células Treg CD4⁺ CD25⁺ para el tratamiento de afecciones autoinmunitarias e inflamatorias.

15 La patente núm. US6281012 describe el uso de células T supresoras para reducir o inhibir el rechazo del trasplante por el huésped. Estas células T supresoras se definen como células T que se han sensibilizado en una reacción linfocitaria mixta por la exposición a un aloantígeno, y posteriormente se han cultivado con células madre mesenquimales. Por tanto, estas células T supresoras comprenden células Tr1 alogénicas.

20 A través de la solicitud de patente núm. WO2006/018674, los solicitantes describen el uso de células Tr1 para el tratamiento de la aterosclerosis. Los solicitantes observaron, además, en un modelo de ratón de la enfermedad de Crohn, en donde las células proinflamatorias se dirigen contra bacterias comensales de la flora digestiva, que la administración a los ratones de células Tr1 dirigidas contra un antígeno suministrado en la alimentación permite la prevención de la inflamación crónica del colon.

25 Los solicitantes pretenden ahora proporcionar un nuevo tratamiento alternativo para mejorar los tratamientos actuales de las enfermedades autoinmunitarias o de otras reacciones inmunológicas indeseables. Este nuevo tratamiento todavía se basa en la inducción de inmunosupresión y/o tolerancia inmunológica específica, dirigidas al «silenciamiento» de la respuesta patógena al autoantígeno, mientras se mantienen intactos los mecanismos de defensa del huésped. Este nuevo tratamiento se basa en el uso de una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los solicitantes descubrieron, sorprendentemente, que el tratamiento con una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables produce mejores resultados que el tratamiento sólo con MSC o células Tr1. Sin desear estar ligados a una teoría, los solicitantes creen que esta composición puede inducir una tolerancia inmunológica específica del antígeno en un sujeto para tratar una respuesta inmunológica mediada por células T, propia o no, que es excesiva, disfuncional o incontrolada, a través de diferentes vías, tales como:

- 35 1/ inhibición de las respuestas proliferativas de células T por las MSC de una manera independiente del antígeno,
 2/ inhibición de las respuestas proliferativas de células T e inducción de tolerancia de las células T por la IL-10 secretada por las células Tr1,
 3/ inducción in vivo de las células Tr1 por las MSC.

40 Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere, por lo tanto, a una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso como un medicamento.

45 La presente invención se refiere, además, a una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso como una composición farmacéutica.

50 En una modalidad de la invención, las composiciones para el uso de acuerdo con la invención comprenden, además, el antígeno para el que las células Tr1 son específicas.

En una modalidad de la invención, las células Tr1 son específicas para un antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano.

55 En una modalidad preferida de la invención, dicho antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano es un alérgeno, un autoantígeno, un antígeno de alimentos o un antígeno microbiano. Preferentemente, dicho alérgeno se selecciona del grupo que comprende polen, ácaros del polvo doméstico, alérgenos de felinos o roedores, humedades, dicho autoantígeno se selecciona del grupo que comprende insulina, proteínas de la mielina, proteínas de choque térmico, desmogleínas, proteínas articulares, fragmentos, variantes y mezclas de estos, dicho antígeno de alimentos se selecciona del grupo que comprende ovoalbúmina, caseína, proteína de soja, gliadina, fragmentos, variantes y mezclas de estos y dicho antígeno microbiano se selecciona del grupo que comprende Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae y proteínas de las bacterias comensales.

65 En otra modalidad de la invención, dichas células Tr1 y MSC son autólogas.

En otra modalidad de la invención, las células Tr1 y MSC se envasan por separado para administrarse secuencialmente o simultáneamente.

5 La presente invención se refiere, además, a una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad alérgica o una enfermedad inflamatoria. En una modalidad preferida, dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que comprende enfermedad de Wegener, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y diabetes resistente a la insulina.

En una modalidad preferida, dicha enfermedad alérgica se selecciona del grupo que comprende asma, rinitis, urticaria, dermatitis atópica; enfermedades fibróticas y alergia a los alimentos.

15 En una modalidad preferida, dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que comprende artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedad de huésped contra injerto.

20 En una modalidad de la invención, dichas células Tr1 y dichas MSC se administran simultáneamente o secuencialmente.

Otro objetivo de la invención es una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales para el uso en la promoción de la regeneración de tejidos.

25 Otro objetivo de la invención es una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales para el uso en el tratamiento de la fibrosis.

Otro objetivo de la invención es una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales para el uso en la promoción de la angiogénesis.

30 Descripción detallada de la invención

Definición

35 El término "células T reguladoras" o "T supresoras" como se usa en la presente descripción se refiere a una población de células T que inhibe o impide la activación, o en otra modalidad, la función efectora y la proliferación, de otro linfocito T.

40 El término "células Tr1" como se usa en la presente descripción se refiere a las células que tienen el siguiente fenotipo en reposo CD4+CD25-FoxP3- y son capaces de secretar altos niveles de IL-10 y niveles bajos a moderados de TGF- β después de la activación. Las células Tr1 se caracterizan, en parte, por su único perfil de citocinas: producen altos niveles de IL-10, niveles significativos de TGF- β y niveles intermedios de IFN- γ , pero poco o nada de IL-4 o IL-2. La producción de citocinas se evalúa típicamente en cultivos de células después de la activación con activadores policlonales de linfocitos T tales como anticuerpos anti-CD3+ anti-CD28 o interleucina-2, PMA + ionomicina.

45 Alternativamente, la producción de citocinas se evalúa en cultivos de células después de la activación con el antígeno específico de células T, presentado por células presentadoras de antígenos. Los altos niveles de IL-10 corresponden con al menos aproximadamente 500 pg/ml, típicamente mayor de aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, ó 20 000 pg/ml o más. Los niveles significativos de TGF- β corresponden con al menos aproximadamente 100 pg/ml, típicamente mayor de aproximadamente 200, 300, 400, 600, 800, o 1000 pg/ml o más. Los niveles intermedios de IFN- γ corresponden a concentraciones comprendidas entre 0 pg/ml y al menos 400 pg/ml, típicamente mayor de aproximadamente 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, ó 2000 pg/ml o más. Poco o nada de IL-4 o IL-2 corresponde con menos de aproximadamente 500 pg/ml, preferentemente menos de aproximadamente 250, 100, 75, ó 50 pg/ml, o menos.

55 El término "antígeno" como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína, o péptido, asociado con una enfermedad particular para la cual las células de esta invención se utilizan para modular, o para el uso en cualquiera de los métodos de esta invención. En una modalidad, el término "antígeno" puede referirse a una molécula de origen sintético, o una molécula de origen natural, que comparte homología de secuencia con un antígeno de interés, u homología estructural con un antígeno de interés, o una combinación de éstos. En una modalidad, el antígeno puede ser un mimetopo. El término "específico de antígeno" como se usa en la presente descripción se refiere a una propiedad de la población de células de manera que el suministro de un antígeno particular, o un fragmento de este antígeno, resulta en una modalidad en la proliferación de células T reguladoras específicas cuando el antígeno se presenta en el contexto del MHC. En otra modalidad, el suministro del antígeno o fragmento de este, da como resultado la producción de IL-10 por las células T reguladoras. En una modalidad, la población de células T reguladoras expresa un receptor de

células T monoclonal. En otra modalidad, la población de células T reguladoras expresa receptores de células T policlonales.

5 El término "autoantígeno" como se usa en la presente descripción se refiere a un antígeno que se expresa normalmente en el cuerpo del sujeto. En una modalidad, un autoantígeno se refiere a un antígeno, que cuando se expresa en un cuerpo, puede resultar en la formación de células T autorreactivas. En una modalidad, el autoantígeno se expresa en un órgano que es el objetivo de una enfermedad autoinmunitaria. En una modalidad, el autoantígeno se expresa en el páncreas, tiroides, tejido conectivo, riñón, pulmón, hígado, sistema digestivo o sistema nervioso. En otra modalidad, el autoantígeno se expresa en las células β pancreáticas.

10 El término "antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano" se refiere a todas las moléculas o entidades propias o no, que no inducen una respuesta proinflamatoria en sujetos sanos.

15 Estos antígenos tolerados pueden ser autoantígenos, antígenos ingeridos, antígenos inhalados, antígenos de la flora bacteriana o antígenos de contacto.

El término "sujeto" como se usa en la presente descripción, se refiere a un mamífero, en particular a un ser humano.

20 El término "cantidad eficaz" como se usa en la presente descripción se refiere a una cantidad suficiente para producir un resultado clínico beneficioso o deseado (por ejemplo, una mejoría en la afección clínica).

25 El término "tratamiento" o "tratar" como se usa en la presente descripción se refiere generalmente a una intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o la célula que se trata, y puede realizarse como profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables incluyen, pero no se limitan a, prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, aliviar los síntomas, suprimir, disminuir o inhibir las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir las metástasis, reducir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad, y provocar la remisión o mejoría del pronóstico.

30 El término "enfermedad autoinmunitaria" como se usa en la presente descripción se refiere a una respuesta inmunológica dirigida contra un autoantígeno.

35 El término "afección inflamatoria" o "trastorno inflamatorio" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier trastorno que, en una modalidad, es provocado por una "respuesta inflamatoria" denominada además, en otra modalidad, como "inflamación" o, en otra modalidad, cuyos síntomas incluyen la inflamación. A modo de ejemplo, un trastorno inflamatorio provocado por la inflamación puede ser un choque séptico, y un trastorno inflamatorio cuyos síntomas incluyen la inflamación puede ser la artritis reumatoide.

40 El término "respuesta alérgica" como se usa en la presente descripción, se refiere a un ataque del sistema inmunológico contra un antígeno generalmente inofensivo, inocuo, o un alérgeno. Las alergias pueden incluir en una modalidad, pero no se limitan a, fiebre del heno, asma, eccema atópico, así como alergias al roble venenoso y la hiedra venenosa, los ácaros del polvo doméstico, el veneno de abeja, las nueces, los mariscos, la penicilina u otros medicamentos, o cualquier otro compuesto o compuestos que inducen una respuesta alérgica.

45 La presente invención

La presente invención se refiere a una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales (MSC) en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso como un medicamento o como una composición farmacéutica.

50 En una modalidad de la invención, las MSC pueden obtenerse mediante la cosecha de un tejido que contiene MSC y el aislamiento y la expansión de dichas MSC.

55 Las MSC obtenidas pueden ser una población homogénea o pueden ser una población de células mixtas enriquecida en MSC. Las MSC homogéneas pueden obtenerse mediante el cultivo de células adherentes del periostio o de la médula, o de una fracción del estroma vascular del tejido adiposo y las MSC pueden identificarse por marcadores de la superficie celular específicos. Las composiciones de MSC homogéneas se obtienen mediante selección positiva de las células adherentes de la médula, de la fracción del estroma vascular del tejido adiposo o del periostio que están libres de marcadores asociados con las células hematopoyéticas o las células mesenquimales diferenciadas. Estas poblaciones de células mesenquimales aisladas muestran características epitópicas asociadas sólo con las células madre mesenquimales, tienen la capacidad de regenerarse en cultivo sin diferenciarse, y tienen la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales específicos cuando se inducen in vitro o se colocan in vivo en el sitio del tejido dañado. Para obtener células madre mesenquimales humanas, es necesario aislar células madre mesenquimales pluripotentes raras a partir de otras células en la médula ósea u otra fuente de MSC. Las células de la médula ósea pueden obtenerse de la cresta ilíaca, fémures, tibias, columna vertebral, costillas u otros espacios medulares. Otras fuentes de células madre mesenquimales humanas incluyen saco vitelino embrionario, placenta, cordón umbilical, piel fetal y adolescente, sangre y tejidos adiposos.

Un método, incorporado en la presente descripción como referencia, para obtener una población de células enriquecida en MSC se describe, por ejemplo, en la patente núm. US5486359.

En una modalidad de la invención, las células Tr1 pueden obtenerse de la siguiente manera:

- a) aislar una población de células progenitoras a partir de un sujeto,
- b) obtener una población de células dendríticas mediante el cultivo de dicha población de células progenitoras en presencia de IL-10
- c) poner en contacto las células de la etapa b) con una población de linfocitos T CD4+ aislados a partir de dicho sujeto en la presencia de un antígeno para permitir la diferenciación de dichas células T CD4+ a la población de células Tr1, y
- d) recuperar la población de células Tr1 de la etapa c).

En la etapa b), IL-10 está presente de 50 a 250 U/ml, preferentemente a 100 U/ml en el medio de cultivo. Dicho método para obtener células Tr1 se describe en Wakkach y otros (Immunity, Mayo de 2003; 18(5):605-17), incorporado en la presente descripción como referencia.

Dicho método puede llevarse a cabo, además, mediante el uso de dexametasona, vitamina D3, o DC tolerogenizadas o inmaduras en lugar de las DC de la etapa b).

En otra modalidad de la presente invención, las células Tr1 pueden obtenerse de la siguiente manera:

- a) cultivar una población de células T CD4+ aisladas de un sujeto en un medio con una cantidad apropiada de IFN- α , y
- b) recuperar la población de células Tr1.

El IFN- α está preferentemente presente en los medios a 5 ng/ml. En la etapa a), los medios pueden comprender además una cantidad apropiada de IL-10, preferentemente a 100 U/ml.

En la etapa b), la población de células Tr1 se cultiva en un medio que comprende IL-15 para permitir la proliferación, donde la IL-15 está preferentemente a 5 ng/ml en el medio. Dicho método, incorporado en la presente descripción como referencia, para obtener células Tr1 se describe en la patente núm. US6746670.

Aún en otra modalidad de la invención, las células Tr1 pueden obtenerse de la siguiente manera:

- a) activar in vitro una población de células T CD4+ en presencia del antígeno, presentado por células presentadoras de antígenos artificiales, y
- b) recuperar las células T CD4+ activadas que comprenden al menos 10 % de células Tr1.

Preferentemente, las células presentadoras de antígenos artificiales expresan una molécula del sistema de HLA II y una molécula LFA-3 humana y no expresan las moléculas de coestimulación B7-1, B7-2, B7-H1, CD40, CD23 e ICAM-1.

Dicho proceso, incorporado en la presente descripción como referencia, para obtener células Tr1 se describe en la solicitud de patente núm. WO02/92793.

Aún en otra modalidad de la invención, las células Tr1 pueden obtenerse de la siguiente manera:

- a) activar in vitro una población de células T CD4+ en presencia de un antígeno y una cantidad apropiada de IL-10; y
- b) recuperar la población de células Tr1.

Preferentemente, la IL-10 está presente en los medios a 100 U/ml. Dicho método se describe en Groux y otros (Nature 1997, 389(6652):737-42), que se incorpora en la presente descripción como referencia.

Aún en otra modalidad de la invención, las células Tr1 específicas de antígeno pueden obtenerse de la siguiente manera:

- a) estimular una población de leucocitos o una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno,
- b) recuperar la población de células Tr1 específicas del antígeno a partir de la población estimulada,
- c) opcionalmente expandir dicha población de células Tr1 específicas del antígeno.

Los leucocitos incluyen varios tipos de células, que se caracterizan por su importancia, su distribución, su cantidad, su duración y su potencialidad. Estos tipos son los siguientes: los leucocitos polinucleares o granulados, entre los que se encuentran los leucocitos eosinófilos, los neutrófilos y los basófilos, y las células mononucleares, o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), que son grandes células blancas de la sangre y consisten en los tipos celulares del sistema inmunológico (linfocitos y monocitos). Los leucocitos o las PBMC pueden separarse de la sangre periférica mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Favorablemente, para la separación de las PBMC, se puede usar la centrifugación, preferentemente centrifugación en gradiente de densidad, centrifugación en

gradiente de densidad preferentemente discontinuo. Una alternativa es el uso de anticuerpos monoclonales específicos. En determinadas modalidades las PBMC típicamente se aíslan a partir de la sangre entera por medio de Ficoll-Hypaque, mediante el uso de procedimientos estándares. En otras modalidades, las PBMC se recuperan por medio de leucoféresis.

5 Dicho método, incorporado en la presente descripción como referencia, se describe en la solicitud de patente núm. WO2007/010406.

Aún en otra modalidad, las células Tr1 pueden obtenerse de la siguiente manera:

10 a) cultivar una población de leucocitos o una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con células madre mesenquimales en presencia de un antígeno,
b) recuperar la población de células Tr1.

15 Dicho método puede llevarse a cabo, además, con células T vírgenes o de memoria en lugar de PBMC o leucocitos.

La población de células Tr1 obtenida de esta manera puede, además, expandirse por cultivo en presencia de citocinas tales como interleucina-2 e interleucina-4. Alternativamente, podrían utilizarse, además, la interleucina-15 y la interleucina-13 en los cultivos de expansión de células Tr1.

20 Aún en otra modalidad, las células Tr1 pueden obtenerse de la siguiente manera:

a) cultivar células T CD4+ con células dendríticas previamente tratadas con dexametasona (aproximadamente 10^{-7} M) y un antígeno seleccionado,
b) recuperar la población de células Tr1 una semana después del comienzo del cultivo.

25 En los métodos descritos anteriormente, las células Tr1 pueden caracterizarse por el método de identificación descrito en la patente núm. WO2005/000344. Dicho método de identificación de células Tr1 se basa en la detección de la presencia simultánea de los productos de expresión de genes que codifican la molécula CD4 y las moléculas del grupo que comprende CD18 y/o CD11a, y CD49b. Las células Tr1 pueden identificarse y/o purificarse por Elisa, citometría de flujo, o métodos de purificación por inmunoadfinidad con anticuerpos dirigidos contra dichos marcadores.

30 Las células Tr1 pueden enriquecerse, además, mediante selección positiva o selección negativa mediante el uso de citometría de flujo o perlas magnéticas. Tales métodos, incorporados en la presente descripción como referencia, se describen además en la patente núm. WO2005/000344.

35 En otra modalidad de la invención, dicha composición para el uso que consiste en células Tr1 y MSC puede obtenerse por cocultivo de MSC con células T autólogas durante una a dos semanas.

40 En una modalidad preferida de la invención, la composición para el uso que consiste en dichas células Tr1 y dichas MSC, comprende además el antígeno para el que las células Tr1 son específicas.

45 En una modalidad de la invención, el antígeno para el que las células Tr1 son específicas puede administrarse por separado a la composición de la invención, por ejemplo un antígeno de la dieta puede administrarse en el alimento a un sujeto. En otra modalidad, el antígeno para el que las células Tr1 son específicas se añade en la composición de la invención.

En una modalidad preferida de la invención, dicho antígeno para el que las células Tr1 son específicas es un antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano.

50 En una modalidad de la invención, dicho antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano es un alérgeno. Una lista de alérgenos puede encontrarse en <http://www.allergen.org/>.

En una modalidad preferida, dicho alérgeno se selecciona del grupo de polen, ácaros del polvo doméstico, alérgenos felinos o de roedores, humedades.

55 En otra modalidad de la invención, dicho antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano es un antígeno de alimentos.

60 El término "antígeno de alimentos" se refiere a un péptido inmunogénico, que proviene de productos alimenticios, tales como los antígenos de alimentos de la siguiente lista no limitante: antígenos de la especie bovina tal como lipocalina, S100 de unión al Ca, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, albúmina de suero bovino, inmunoglobulina o caseínas. Los antígenos de alimentos pueden ser, además, antígenos de salmón atlántico tal como parvalbúmina, antígenos de pollo tales como ovomucoide, ovoalbúmina, Ag22, conalbúmina, lisozima o albúmina de suero de pollo, cacahuetes, antígenos de camarones tales como tropomiosina, antígenos del trigo tales como aglutinina u omega-5 gliadina, antígenos de apio tales como profilina de apio, antígenos de zanahoria tales como profilina de zanahoria, antígenos de manzana tales como taumatina, proteína de transferencia de lípidos de manzana, profilina de manzana, antígenos de la pera tales como profilina de pera, reductasa de isoflavonas, antígenos de aguacate tales como endoquitinasa, antígenos

de albaricoque tales como la proteína de transferencia de lípidos de albaricoque, antígenos de durazno tales como la proteína de transferencia de lípidos de durazno o profilina de durazno, antígenos de soja, tales como HPS, profilina de soja o prot PR-10 (SAM22).

5 En otra modalidad de la invención, dicho antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano es un autoantígeno.

El término "autoantígeno" se refiere a un péptido inmunogénico derivado de una proteína de dicho individuo. Puede ser, a manera de ejemplo, un autoantígeno de la siguiente lista no limitante: receptor de acetilcolina, actina, translocador de nucleótidos de adenina, receptor β -adrenérgico, descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, receptor de asialoglicoproteínas, proteína aumentadora de la permeabilidad/bactericida (BPI), receptor sensible al calcio, enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol, cadena Oy del colágeno tipo IV, citocromo P450 2D6, desmina, desmogleína-1, desmogleína-3, F-actina, gangliósidos GM, glutamato descarboxilasa, receptor de glutamato, ATPasa de H/K, 17-[alfa]- hidroxilasa, 21-hidroxilasa, IA-2 (ICAS 12), insulina, receptor de insulina, factor intrínseco tipo 1, antígeno 1 asociado con la función leucocitaria, glicoproteína asociada a la mielina, proteína básica de la mielina, proteína de la mielina de los oligodendrocitos, miosina, P80-coilina, complejo de la piruvato deshidrogenasa E2 (PDC-E2), cotransportador simporte de yoduro de sodio, SOX-10, proteína compartida por los músculos de los ojos y la tiroides, tiroglobulina, peroxidasa tiroidea, receptor de tirotropina, transglutaminasa tisular, coactivador de la transcripción p75, triptófano hidroxilasa, tirosinasa, tirosina hidroxilasa, ACTH, aminoacil tPvNA-histidil sintetasa, cardiolipina, anhidrasa carbónica II, proteínas asociadas con el centrómero, ATPasa estimulada por el nucleosoma dependiente de ADN, fibrilarina, fibronectina, glucosa-6-fosfato isomerasa, beta 2-glicoproteína I, golgina (95, 97, 160, 180), proteínas de choque térmico, proteína hemidesmosómica 180, histonas H2A, H2B, queratina, receptor de IgE, Ku-proteína quinasa dependiente de ADN, Ku-nucleoproteína, La fosfoproteína, mieloperoxidasa, proteinasa 3, ARN polimerasa I-III, proteína para el reconocimiento de señales, topoisomerasa I, tubulina, vimentina, proteína mielínica básica asociada a oligodendrocitos (MOBP), proteína proteolípica, proteína específica de oligodendrocitos (OSP/Claudina 11), nucleótido cíclico 3' fosfodiesterasa (CNPasa), antígeno 1 de BP (BPAGI-e), transaldolasa (TAL), autoantígenos mitocondriales humanos PDC-E2 (Novo 1 y 2), OGDC-E2 (Novo 3), y BCOADC-E2 (Novo 4), penfigoide ampolloso (BP) 180, laminina 5 (LN5), proteína 48 con caja DEAD (DDX48) o antígeno 2 asociado a insulinoma.

Preferentemente, el autoantígeno o el antígeno de alimentos es un antígeno recombinante o uno sintetizado.

Preferentemente, el antígeno es un antígeno de alimentos seleccionado del grupo que comprende ovoalbúmina, caseína, proteína de soja, gliadina, cacahuets, fragmentos, variantes y mezclas de estos. Preferentemente, el antígeno es un autoantígeno seleccionado del grupo que comprende insulina, proteína de la mielina, proteínas de choque térmico, desmogleínas, proteínas articulares, proteinasa 3, fragmentos, variantes y mezclas de estos.

El término "variante" del autoantígeno o de un antígeno de alimentos se refiere en la presente descripción a un antígeno que es casi idéntico al antígeno natural y que comparte la misma actividad biológica. La diferencia mínima entre el antígeno natural y su variante puede estar por ejemplo en una sustitución, deleción, y/o adición de aminoácidos. Tales variantes pueden contener, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos en la que los residuos de aminoácidos se sustituyen con residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, e incluyen las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), las cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), las cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), las cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), las cadenas laterales beta- ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y las cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

En una modalidad de la invención, dicho antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano es un antígeno microbiano.

50 Un antígeno microbiano incluye, pero no se limita a, un antígeno derivado de un microorganismo tal como una bacteria, arqueobacteria, hongo, virus, protozoario, parásito, alga, moho mucilaginoso, o prion.

Los ejemplos de dichos microorganismos son *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacteria*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Streptomyces*, *Helicobacter*, *Lactococcus* y *Listeria*.

Preferentemente, el antígeno es un antígeno microbiano derivado del grupo que comprende *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y proteínas de las bacterias comensales.

60 En una modalidad preferida de la invención, dichas células Tr1 y MSC son autólogas.

Esto significa que las MSC y las células Tr1 o precursores de estas se obtienen del mismo sujeto y se administrarán al sujeto del que proceden.

65 Las MSC y las células Tr1 autólogas permiten en primer lugar un injerto a largo plazo: no habrá rechazo de las células ni

respuestas alogénicas. En segundo lugar, en caso de que se necesite una presentación de antígenos por las MSC, el contexto autólogo lo hace posible.

5 La presente invención se refiere, además, a una composición para el uso como se describió anteriormente, en donde las células Tr1 y MSC se envasan por separado para administrarse secuencialmente o simultáneamente. El término secuencial, se refiere a que las MSC pueden inyectarse primero y las células Tr1 pueden inyectarse después, preferentemente 24 a 48 horas después de la inyección de las MSC.

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para inducir tolerancia inmunológica específica de un antígeno en un sujeto que padece de una enfermedad que implica una respuesta inmunológica mediada por células T, propia o no, que es excesiva, disfuncional o incontrolada, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición para el uso como se describió anteriormente.

15 Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para inyección parenteral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, inhalación intranasal, inhalación pulmonar, administración intradérmica, intraarticular, intratecal, o a través del tracto digestivo.

20 Las composiciones para el uso de la invención se administran típicamente al paciente por inyección intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, o mediante inyección directa en los ganglios linfáticos del paciente, preferentemente mediante inyección intravenosa.

25 Típicamente, de 10^4 células/kg a 10^9 células/kg, preferentemente de 10^5 células/kg a 10^7 células/kg y con mayor preferencia aproximadamente 10^6 células/kg se administran al sujeto.

Las vías de administración y las dosificaciones descritas sólo pretenden ser una guía ya que un practicante experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración y dosificación óptimas para cualquier sujeto particular, en dependencia de, por ejemplo, la edad, el peso y el estado del paciente.

30 En una modalidad preferida, dicha enfermedad que implica una respuesta inmunológica mediada por células T, propia o no, que es excesiva, disfuncional o incontrolada es una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad alérgica o una enfermedad inflamatoria.

35 Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, diabetes, esclerosis múltiple, y artritis reumatoide. Las afecciones particulares asociadas con las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse, incluyen: tiroiditis autoinmunitaria (de Hashimoto), hipertiroidismo (enfermedad de Graves), diabetes mellitus tipo I, diabetes resistente a la insulina, insuficiencia suprarrenal autoinmunitaria (enfermedad de Addison), ovaritis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hemoglobinuria paroxística por frío, trombocitopenia autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, anemia perniciosa, eritroblastopenia, coagulopatías autoinmunitarias, miastenia gravis, polineuritis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, pémfigo y otras enfermedades ampollas, carditis reumática, síndrome de Goodpasture, síndrome poscardiotomía, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjorgen, polimiositis, dermatomiositis, esclerodermia; enfermedades inflamatorias del intestino: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa; enfermedades pulmonares obstructivas crónicas; enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedad celíaca, enfermedad de Wegener, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmunitaria, espondiloartritis. Preferentemente, dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Wegener, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la diabetes resistente a la insulina.

45 Las enfermedades alérgicas incluyen, pero no se limitan a, asma, rinitis, urticaria, dermatitis atópica, enfermedades fibróticas y alergia a los alimentos.

50 Los trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, choque séptico, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de huésped contra injerto, asma, rinitis, psoriasis, caquexia asociada con cáncer, o eccema. Preferentemente, dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que comprende artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn.

55 En una modalidad del método de la invención, dichas células Tr1 específicas de un antígeno tolerado y dichas MSC se administran simultáneamente o secuencialmente.

60 El término secuencial, se refiere a que las MSC pueden inyectarse primero y las células Tr1 pueden inyectarse después, preferentemente 24 a 48 horas después de la inyección de las MSC.

65 En otra modalidad del método de la invención, la composición para el uso de esta invención puede administrarse en combinación con las terapias tradicionales, o en otra modalidad, con dosificaciones reducidas de tales terapias tradicionales. Por ejemplo, la administración de la composición para el uso de esta invención puede estar acompañada

por la administración de inmunosupresores, donde se reduce la dosificación del inmunosupresor o el número de inmunosupresores.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para promover la regeneración de tejidos en un sujeto. En una modalidad, una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente se administra a dicho sujeto.

10 Los ejemplos de tejidos a tratar incluyen, pero no se limitan a, músculo, hueso y regeneración del cartílago.

15 Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para inyección parenteral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, inhalación intranasal, inhalación pulmonar, administración intradérmica, intraarticular, intratecal, o a través del tracto digestivo (por ejemplo a través de las placas de Peyer). Preferentemente, el medicamento o composición farmacéutica de la invención puede administrarse directamente a un tejido degenerado.

Típicamente, de 10^4 células/kg a 10^9 células/kg, preferentemente de 10^5 células/kg a 10^7 células/kg y con mayor preferencia aproximadamente 10^6 células/kg se administran al sujeto.

20 Las vías de administración y las dosificaciones descritas sólo pretenden ser una guía ya que un practicante experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración y la dosificación óptimas para cualquier sujeto particular, en dependencia de, por ejemplo, la edad, el peso y el estado del paciente, y el grado y la gravedad de la herida que se trata.

25 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso en el tratamiento de la fibrosis en un sujeto. En una modalidad, una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente se administra a dicho sujeto.

30 Los ejemplos de fibrosis a tratar incluyen, pero no se limitan a, cirrosis del hígado, fibrosis de los riñones asociada con una enfermedad renal en etapa terminal, y fibrosis del pulmón.

35 Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para inyección parenteral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, inhalación intranasal, inhalación pulmonar, administración intradérmica, intraarticular, intratecal, o a través del tracto digestivo.

40 Las composiciones para el uso de la invención se administran típicamente al paciente por inyección intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, o mediante inyección directa en los ganglios linfáticos del paciente, preferentemente mediante inyección intravenosa directa.

Típicamente, de 10^4 células/kg a 10^9 células/kg, preferentemente de 10^5 células/kg a 10^7 células/kg y con mayor preferencia aproximadamente 10^6 células/kg se administran al sujeto.

45 Las vías de administración y las dosificaciones descritas sólo pretenden ser una guía ya que un practicante experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración y la dosificación óptimas para cualquier sujeto particular, en dependencia de, por ejemplo, la edad, el peso y el estado del sujeto, y el grado y la gravedad de la fibrosis que se trata.

50 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso en promover la angiogénesis en un tejido u órgano en un sujeto, en donde dicho tejido u órgano tienen necesidad de angiogénesis. En una modalidad, una cantidad eficaz de una composición como se describió anteriormente se administra a dicho sujeto.

55 La inducción de la angiogénesis puede usarse para tratar una insuficiencia arterial coronaria y periférica, y por lo tanto puede ser un enfoque no invasivo y curativo para el tratamiento de una enfermedad arterial coronaria, una cardiopatía isquémica, y una enfermedad arterial periférica. La angiogénesis puede jugar un papel en el tratamiento de enfermedades y trastornos en tejidos y órganos distintos del corazón, así como en el desarrollo y/o mantenimiento de órganos distintos del corazón. La angiogénesis puede proporcionar un papel en el tratamiento de heridas internas y externas, así como úlceras dérmicas. La angiogénesis es esencial, además, para el acoplamiento de la resorción del cartílago con la formación de hueso, y es esencial para la correcta morfogénesis de las placas de crecimiento. La angiogénesis también juega un papel en la implantación del embrión, y el crecimiento de la placenta, así como en el desarrollo de la vasculatura embrionaria.

60 Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para inyección parenteral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, inhalación intranasal, inhalación pulmonar, administración intradérmica, intraarticular, intratecal, o a través del tracto digestivo.

Las composiciones para el uso de la invención se administran típicamente al paciente por inyección intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, o mediante inyección directa en los ganglios linfáticos del paciente, preferentemente mediante inyección intravenosa directa.

5 Típicamente, de 10^4 células/kg a 10^9 células/kg, preferentemente de 10^5 células/kg a 10^7 células/kg y con mayor preferencia aproximadamente 10^6 células/kg se administran al sujeto.

10 Las vías de administración y las dosificaciones descritas sólo pretenden ser una guía ya que un practicante experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración y dosificación óptimas para cualquier sujeto particular, en dependencia de, por ejemplo, la edad, el peso y el estado del paciente.

Breve descripción de las figuras

15 **Figura 1:** detección de IFN-gamma producido por las células T activadas en presencia o ausencia de MSC y/o células Tr1.

La MLR se cultivó en el pocillo inferior de un sistema transwell solo o en presencia de MSC, Tr1 o MSC y Tr1 en el pocillo superior. El sobrenadante se recogió después de 4 días y la secreción de IFN γ se midió por ELISA.

20 **Figura 2:** La coadministración de las MSC mejora la eficacia de la terapia con células Tr1 en un modelo de colitis en ratones.

Los ratones Balb/c se trataron con DSS en el agua de beber durante 7 días; las células Tr1 y MSC se inyectaron por vía intravenosa el primer día. La puntuación clínica y el peso corporal se controlaron diariamente.

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de MSC

30 Las células madre mesenquimales se derivaron de la fracción de estroma vascular del tejido adiposo de ratones Balb/c. El tejido adiposo se digirió con colagenasa al 0,1 % durante 30 minutos y se filtró a través de una malla de 70 μ . Las células adherentes se cultivaron en medio RPMI que contenía FCS al 10 % y suero de caballo al 10% suplementado con glutamina y penicilina y estreptomycin. Con frecuencia, se controló la capacidad de las células para diferenciarse tanto en linajes de adipocitos como de osteoblastos.

Preparación de células Tr1

40 Las células Tr1 específicas para la ovoalbúmina se diferenciaron a partir de linfocitos T CD4+ vírgenes de ratones transgénicos para TCR específico de la ovoalbúmina DO11-10 después de la activación con el péptido de ovoalbúmina 323-339 e IL-10 en la presencia de células presentadoras de antígenos singénicas irradiadas. Las células se clonaron después por dilución limitante para obtener una población monoclonal de células Tr1 específicas para la ovoalbúmina. Las células utilizadas en el experimento 1 y 2 se obtuvieron a partir del cultivo de un clon de Tr1.

45 Ensayo de activación de las células T

La capacidad supresora de las células Tr1 y MSC se evaluó sobre la inhibición de la MLR. Las MLR se establecieron en el pocillo inferior del sistema transwell con 10^6 células respondedoras (ratones Balb/c) y 10^6 esplenocitos irradiados de ratones C57 BL6. Las MSC (3×10^4 células) y las células Tr1 (10^5 células) se añadieron en el pocillo superior. Después de 4 días, se recogió el sobrenadante de la MLR y la secreción de IFN gamma se midió por ELISA.

Método para determinar la producción de IFN gamma

55 La producción de interferón gamma por los linfocitos T activados se evaluó por un ELISA disponible comercialmente adquirido de BD Biosciences.

Resultados observados (Figura 1)

60 Los resultados demuestran que tanto las MSC como las células Tr1 inhiben de manera independiente la activación de las células T, lo que se midió por la disminución del IFN gamma liberado por los linfocitos T proinflamatorios. El cocultivo de MSC y células Tr1 permite una mayor inhibición en comparación con las MSC o las células Tr1 solas, lo que muestra que los dos tipos de células exhiben un sinergismo de acción que conduce a una mayor inhibición de la activación de las células T y la liberación de IFN gamma.

65 Ejemplo 2

ES 2 595 103 T3

Los ratones BALB/c se trataron con dextrano sulfato de sodio (DSS, 5 % en el agua de beber) para inducir una colitis aguda. Los grupos de ratones se dejaron sin tratar o se trataron por vía intravenosa en el día 1 con 10^6 células Tr1 específicas para la ovoalbúmina con o sin MSC derivadas de tejido adiposo (0.5×10^6 /ratón). Después de 7 días, los signos clínicos de los ratones se evaluaron en base a la siguiente puntuación:

5

0- No hay signos clínicos

1- Pérdida de peso

2- Pérdida de peso + diarrea leve

3- Pérdida de peso + diarrea severa

10

4- Pérdida de peso + diarrea severa + sangre en las heces

Los resultados muestran que la coadministración de MSC mejora la eficacia de la terapia con células Tr1 en este modelo de colitis (Figura 2).

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso como un medicamento.
2. Una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso como una composición farmacéutica.
- 10 3. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde las células Tr1 son específicas para un antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano.
4. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho antígeno tolerado normalmente en un sujeto sano es un alérgeno, un autoantígeno, un antígeno de alimentos o un antígeno microbiano.
- 15 5. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además el antígeno para el que las células Tr1 son específicas.
- 20 6. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas células Tr1 y células madre mesenquimales son autólogas.
7. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dichas células Tr1 y células madre mesenquimales se envasan por separado para administrarse secuencialmente o simultáneamente.
- 25 8. Una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad alérgica o una enfermedad inflamatoria.
- 30 9. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Wegener, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la diabetes resistente a la insulina.
- 35 10. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que comprende artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedad de huésped contra injerto.
- 40 11. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha enfermedad alérgica se selecciona del grupo que comprende asma, rinitis, urticaria, dermatitis atópica, enfermedad fibrótica y alergia a los alimentos.
12. Una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso en la promoción de la regeneración de tejidos.
- 45 13. Una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso en el tratamiento de fibrosis.
- 50 14. Una composición que consiste en células Tr1 y células madre mesenquimales en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso en la promoción de la angiogénesis.

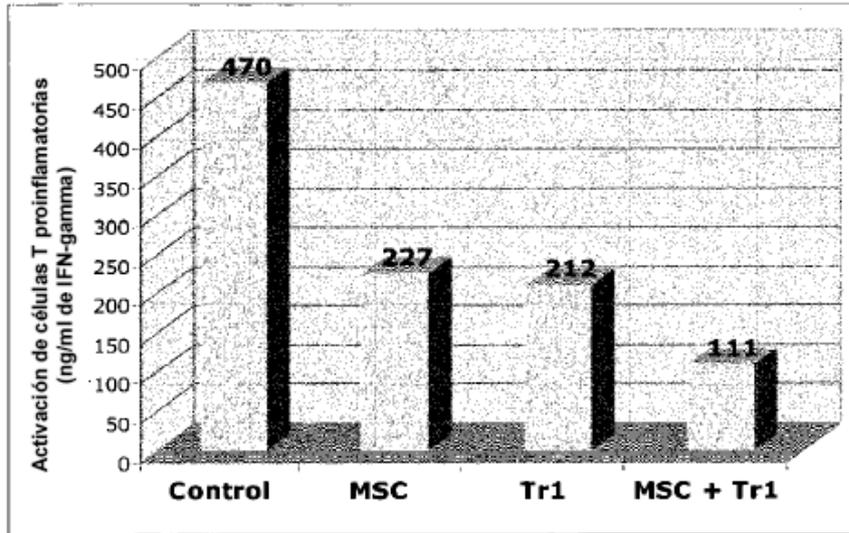


Figura 1

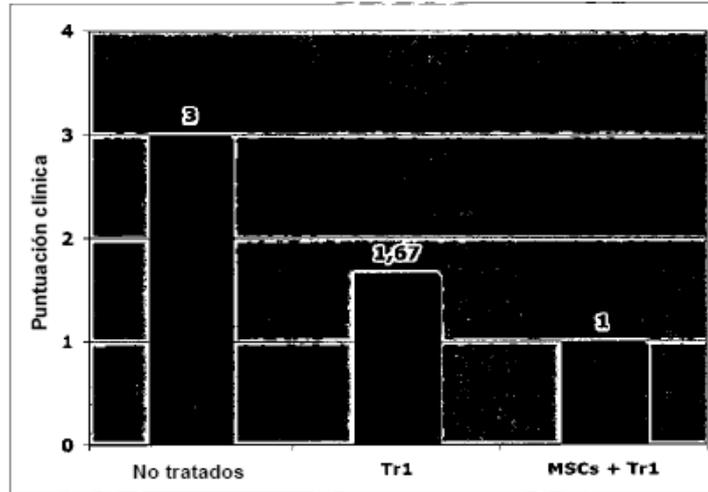


Figura 2