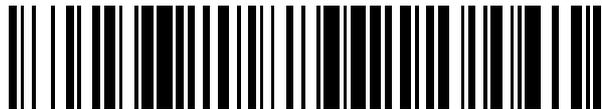


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 946**

51 Int. Cl.:

**A61P 37/06** (2006.01)

**A61K 35/12** (2006.01)

**A61K 35/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2012 PCT/IT2012/000232**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13014691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2012 E 12773379 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2736600**

54 Título: **Microvesículas aisladas de células madre mesenquimales para usar como agentes inmunosupresores**

30 Prioridad:

**28.07.2011 IT RM20110403**

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

**10.03.2017**

73 Titular/es:

**CRYO-SAVE AG (100.0%)  
Churerstrasse 65 b  
8808 Pfäffikon, CH**

72 Inventor/es:

**MURACA, MAURIZIO y  
FIERABRACCI, ALESSANDRA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 604 946 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

Microvesículas aisladas de células madre mesenquimales para usar como agentes inmunosupresores

La presente invención se refiere a microvesículas aisladas de células madre mesenquimales para uso como agentes inmunosupresores. En particular, la invención se refiere a microvesículas aisladas a partir de células madre mesenquimales para ser usadas como agentes inmunosupresores para el tratamiento de patologías inflamatorias e inmunes.

Las propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales estromales son objeto de un creciente interés y de una creciente aplicación clínica, pero el efecto de reproducibilidad de las mismas es controvertido e implica mecanismos resueltos solo parcialmente. Las células estromales mesenquimales (MSC, del inglés “mesenchymal stromal cells”) presentan propiedades inmunorreguladoras *in vitro*, en modelos animales y en aplicaciones clínicas como en la enfermedad injerto-contra-hospedante (ver las revisiones de Nauta 2007, Zhao 2010, Caimi 2010). Sin embargo, sus mecanismos de acción no han sido elucidados completamente. En particular, aunque el efecto inmunosupresor de las MSC sobre linfocitos T activados ha sido estudiado más extensamente (Krampera, 2003), y se han descrito múltiples factores implicados, tanto el efecto de MSC sobre los linfocitos B y como el mecanismo de acción son muy controvertidos (Corcione 2006, Tabera 2008, Comoli 2008, Traggiai 2008, Rasmussen 2007). Habiéndose publicado diferencias entre especies (humano frente a ratón) en la interacción de MSC y células B (Renseneb, 2009), a continuación solo se discutirán resultados derivados de células humanas. Generalmente, se asume la aparición de factores solubles que median en la interacción MSC-linfocitos B y, de hecho, también se ha publicado que dichos factores tendrían un efecto más importante sobre linfocitos B que sobre linfocitos T (Augello, 2006).

Como se ha indicado anteriormente, el efecto de las MSC sobre los linfocitos B no parece ser unívoco. De hecho, se han descrito efectos tanto inhibidores (Corcione 2006, Tabera 2008, Comoli 2008) como estimulantes (Traggiai 2008, Rasmussen 2007) sobre la proliferación, diferenciación y producción de linfocitos B. Cabe destacar que en determinadas condiciones las MSCs pueden desempeñar una función de células presentadoras de antígeno (Chan, 2006), amplificando de este modo la respuesta inmune. Este fenómeno parece producirse en determinadas condiciones ambientales, por ejemplo en presencia de niveles bajos de interferón gamma (Chan, 2006). Según un estudio sobre la interacción de linfocitos B, las MSCs presentaron efectos opuestos (de inhibición o de estimulación) dependiendo de la intensidad de estímulo usada para células B de origen donante (Rasmussen, 2007). Estos resultados contrapuestos y no predecibles generan dificultades para el uso de MSC en el tratamiento de enfermedades autoinmunes complejas.

A la vista de lo anterior es evidente, por tanto, la necesidad de proporcionar nuevos tratamientos de enfermedades inflamatorias e inmunes adecuadas para superar las desventajas de la técnica anterior.

Recientemente se ha demostrado que múltiples interacciones de células inmunes están mediadas por microvesículas (MV) o micropartículas, es decir, cuerpos recubiertos de membrana secretados por muchos fenotipos celulares (Théry, 2009). Se han descrito diversas especies, con un tamaño de 50 a 1000 nm o más, y con diferentes propiedades estructurales y bioquímicas dependiendo del compartimento intracelular del que deriven. Una cantidad creciente de evidencias experimentales sugiere que dichas MVs desempeñan un papel fundamental en la comunicación intercelular, a través de transferencia de proteínas, ARNm y microARN (Valadi, 2007; Camussi, 2010).

La función de las MVs como vehículos de respuesta inmune ha sido demostrada para fenotipos celulares como las células dendríticas o los linfocitos T. Se han usado microvesículas aisladas de células dendríticas que expresan antígeno tumoral en ensayos clínicos de fase I con pacientes que padecían melanoma o carcinoma pulmonar (Escudier, 2005; Morse, 2005), con el objetivo de estimular la respuesta inmune tumoral. Dichos estudios demostraron que las MVs son seguras para uso sistémico en humanos, un resultado clínico alentador que se produjo en pacientes individuales. El uso de exosomas con actividad inmunosupresora ha sido estudiado por P. Robbins et al (US20060116321), que aislaron exosomas de diferentes tipos celulares que incluían células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos). De forma análoga, se ha propuesto el uso de microvesículas procedentes de células dendríticas con fines inmunoterapéuticos (Lamparsky, US 6812023) como prevención de respuestas autoinmunes o respuestas inmunes de antígeno de injerto, o la reducción de una respuesta de antígenos exagerada (Mattews Albert L, US 20020004041).

También se han estudiado exosomas procedentes de células presentadoras de antígeno como vehículos de vacuna (Delcayre A, US20060222654) o como generadores de respuesta antitumoral (Delcayre A, US7704964).

Las microvesículas derivadas de células endoteliales, preferiblemente de progenitores endoteliales, ha sido estudiadas como posibles adyuvantes en el trasplante de islas de células pancreáticas endoteliales para el tratamiento de la diabetes de Tipo 1 o de Tipo 2. El efecto adyuvante permitiría la supervivencia y la funcionalidad de las islas trasplantadas (Cantaluppi V, US20100233216).

Además, se ha descrito que el efecto de inhibición de las MSCs sobre los linfocitos B también se produce cuando dichas dos poblaciones celulares están separadas por membranas permeables, una observación que ha sido considerada como un soporte de la aparición de mediadores solubles (Corcione, 2006; Augello, 2005). Sin embargo,

el efecto de inhibición no se produjo (Corcione, 2006), o lo hizo solo parcialmente (Augello, 2005), cuando se usó sobrenadante de cultivo de MSC. Por lo tanto, se ha asumido que para que el efecto de inhibición de las MSC se ejerza completamente sería necesario un contacto intercelular o una liberación de señal de linfocitos B (Corcione, 2006).

5 En lo que se refiere a las células madre mesenquimales, las microvesículas procedentes de células madre mesenquimales (MSC-MVs) han sido descritas como posibles mediadores del efecto antiapoptótico y pro-regenerativo asociado a la administración de MSC en modelos de animales (Bruno 2009; Herrera, 2009; Gatti, 2011).

10 Los inventores de la presente invención han descubierto ahora que las microvesículas aisladas de células madre son adecuadas para mediar de forma efectiva en el efecto inmunosupresor sobre linfocitos B. De hecho, los inventores han identificado mediadores específicos de efecto inhibidor de células madre mesenquimales sobre linfocitos B en micropartículas producidas a partir de células madre mesenquimales, también denominadas microvesículas (MV) y reconocidas recientemente como mediadores de la comunicación intercelular. Por lo tanto, las microvesículas o exosomas procedentes de células madre mesenquimales pueden usarse de forma ventajosa como  
15 agentes inmunosupresores, en particular en patologías inflamatorias crónicas y en enfermedades autoinmunes, como por ejemplo la diabetes de Tipo 1. En particular, se ha observado que usando MVs que derivan de un medio de cultivo de células madre mesenquimales se obtiene un fuerte efecto dependiente de la dosis sobre la proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos por linfocitos B estimulados con CpG. Empleando una marca fluorescente, se ha demostrado usando tanto FACS como análisis de microscopía confocal que las MVs  
20 están asociadas a linfocitos B estimulados por CpG, pero no a otras células inmunes como los linfocitos T, las células dendríticas o las células NK, apoyando dicho resultado adicionalmente la especificidad del efecto detectado.

Estos resultados indican que las MVs producidas por células madre mesenquimales son vehículos para inhibir el efecto ejercido por dichas células sobre linfocitos B. Por lo tanto, las MVs, producidas por MSCs bajo determinadas condiciones de cultivo, pueden usarse terapéuticamente en lugar de las células de origen, dando como resultado  
25 ventajas destacables en términos de estandarización, facilidad de manejo, seguridad y eficacia. Usando tanto MSCs como MSC-MVs también se obtiene una inhibición funcional de linfocitos B, como demuestra la reducción de la secreción de inmunoglobulina. Además, se observa una correlación lineal de la concentración de MSC-MV y la inhibición de la proliferación y diferenciación de células B.

30 Con el objetivo de verificar si los fenómenos observados estaban mediados por la interacción con otras poblaciones celulares presentes en las PBMCs, las MSC-MVs han sido marcadas con un colorante fluorescente en las condiciones experimentales descritas anteriormente y se ha verificado la asociación con diferentes fenotipos celulares marcados con anticuerpos fluorescentes contra marcadores superficiales específicos usando tanto FACS como análisis de microscopía confocal. Las MSC-MVs demostraron asociarse exclusivamente con linfocitos B y no con linfocitos T, células NK o dendríticas. Estos datos indican que el efecto de inhibición de las MSCs sobre células B está mediado de manera muy importante, si no completamente, por la liberación de MV.  
35

Además, los datos experimentales mostrados más adelante demuestran el efecto anti-inflamatorio *in vivo* de las MSC-MVs. En particular, los resultados obtenidos con un modelo animal de colitis ulcerosa muestran una mejoría clínica y una reducción del índice de flogosis.

40 El uso de MSC-MVs en lugar de células vivas completas podría, por tanto, ofrecer una serie de ventajas significativas, tanto en términos de seguridad como de facilidad de manejo. El uso de MSC-MV ofrece además ventajas tanto en la producción como en el uso clínico.

Las ventajas en la producción son las siguientes:

- Las MSC-MVs pueden producirse debido a su liberación continua por MSCs dentro del medio de cultivo, desde donde pueden ser aisladas por ultrafiltración/ultracentrifugación.
- 45 - La producción de las mismas se puede amplificar usando biorreactores que permitan ajustar grandes cantidades de células a estructuras tridimensionales, y que faciliten el aislamiento del flujo continuo de MSC-MVs.
- La producción de MSC-MVs por las células puede estimularse en base a la composición del medio mediante la adición de diversas sustancias (p.ej., citoquina como interferón gamma) o variando las  
50 condiciones físicas (p.ej., presión de oxígeno).
- Las MSC-MVs pueden aislarse del medio mediante ultrafiltración, usando filtros con un corte de 30 a 100 kD.
- Después de concentrar mediante ultrafiltración, las MSC-MVs se pueden purificar mediante ultracentrifugación a 100.000 g.

- Las MSC-MVs aisladas y purificadas pueden someterse opcionalmente a un proceso de esterilización mediante irradiación, al contrario que con células vivas.
- Las MSC-MVs pueden congelarse fácilmente en PBS, opcionalmente con la adición de agentes crioprotectores aprobados para uso clínico (DMSO), y después de descongelar se lavan mediante ultrafiltración/ultracentrifugación. En ese momento ya estarían listas para ser usadas, esto es, no es necesaria (al contrario que con las células) la verificación de su viabilidad y funcionalidad.
- El producto obtenido es más fácilmente estandarizable que las células vivas; esto da como resultado una mejor aceptación para la regulación farmacéutica y una reducción de costes.
- Las MSC-MVs pueden usarse como vehículo para moléculas amplificadoras de efecto como la anexina V (ver la Figura 9).

Respecto al nivel clínico, existen las siguientes ventajas:

- Las MSC-MVs se metabolizan rápidamente (Gatti, 2011) y no generan problemas de colonización ectópica como las células vivas.
- Las MSC-MVs no implican riesgo de transformación oncogénica como ocurre con las células vivas, especialmente cuando se manipulan *in vitro* (Tolar, 2007).
- Las MSC-MVs presentan una actividad más específica y reproducible sobre células B diana activadas (linfocitos B) que las MSCs.
- La administración sistémica de MSC-MV, al contrario que la de las MSCs, implica la infusión de volúmenes muy pequeños de material particulado, lo que resulta en un menor riesgo de embolización.
- La administración repetida de MSC-MV, también próxima en el tiempo, no conlleva los problemas de seguridad mencionados anteriormente derivados del uso de células vivas, facilitando de este modo la consecución del efecto deseado.
- Las MSC-MVs son cuerpos más sencillos y más estables que las células de origen, y presentan un comportamiento reproducible y predecible, por el contrario, el destino final de las MSC tras un trasplante es indeterminado. Por ejemplo, el comportamiento de las MSC puede variar dependiendo del entorno de interacción, como también hemos confirmado con nuestros datos experimentales. Por el contrario, las condiciones del entorno no afectaron a la actividad de las MSC-MV sobre linfocitos.
- Todas las anteriores ventajas adquieren una importancia aún mayor a nivel pediátrico, debido tanto a razones éticas como al tamaño más pequeño de los cuerpos y a la mayor esperanza de vida.

Por lo tanto, un objetivo específico de la presente invención son las microvesículas, o exosomas, aisladas a partir de células madre mesenquimales para uso en terapias inmunosupresoras.

El término microvesículas se refiere a la mezcla de micropartículas que tienen tamaños generalmente variables entre aproximadamente 0,1 y 1 micrómetros.

En particular, las microvesículas según la invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, inflamatorias crónicas y autoinmunes. Las patologías inflamatorias y autoinmunes, en particular las enfermedades mediadas por anticuerpos, pueden ser graves y crónicas. El tratamiento con microvesículas de la invención está dirigido a reducir la extensión de la flogosis, sus síntomas y complicaciones relacionadas. Las enfermedades crónicas inflamatorias son, por ejemplo, enfermedades inflamatorias autoinmunes, enfermedades reumatológicas como la inflamación de tejidos conectivos y vasculares. Por ejemplo, enfermedades que pueden ser tratadas con MVs según la presente invención son las siguientes: vasculitis sistémica, poliarteritis nodosa, arteritis de célula gigante, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schonlein, crioglobulinemia, vasculitis del sistema nervioso central, mononeuritis múltiple, arteritis de Takayasu, enfermedad de Behçet, enfermedad de Buerger, enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, como por ejemplo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Addison, diabetes mellitus Tipo I, diabetes autoinmune latente del adulto (LADA), diabetes autoinmune recurrente en pacientes de diabetes de larga duración tras recibir un trasplante de páncreas o de isletas, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, dermatomiositis, escleroderma, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune crónica, cirrosis biliar primaria, soriasis, alopecia areata, vitíligo, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillame-Barrè, glomerulonefritis crónica, dermatitis y eczema, síndrome de Reiter, artritis reactiva, fibrosis quística, sinusitis, bronquitis crónica, enfermedad periodontal, diverticulosis/diverticulitis.

Adicionalmente, las microvesículas según la presente invención pueden usarse para el tratamiento y prevención del rechazo de trasplantes. Por ejemplo, dichas microvesículas pueden usarse en trasplantes de células, tejidos y órganos sólidos, buscando favorecer la compatibilidad donante/receptor, reduciendo la respuesta inmune y favoreciendo el desarrollo de la tolerancia de inmunidad: enfermedad injerto-contras-hospedante, rechazo de

trasplante (injerto), tanto de células como de órganos sólidos. Las microvesículas de la invención se pueden usar además con el objetivo de inhibir el desarrollo de una reacción inmune como resultado de un trasplante celular alogénico/xenogénico o de una terapia génica.

5 Otro objetivo de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende o que consiste en microvesículas aisladas a partir de células madre mesenquimales, como principio activo, opcionalmente moléculas de unión que potencien la actividad inmunosupresora de las mismas, como por ejemplo anexina, junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables para su uso según se describe en las reivindicaciones 6-10.

10 A partir de este punto se describirá la presente invención de un modo ilustrativo, aunque no limitativo, de acuerdo a las realizaciones preferidas de la misma, haciendo referencia en particular a las figuras incluidas, en las que:

Figura 1: muestra un co-cultivo de CLMs estimuladas con CPG y MSC. 1A-1B) Gráficos de densidad representativos del análisis citofluorimétrico de CLMs marcadas con CFMDA (c) o CLMs después de co-cultivo con SCMs (MSC/C) en una relación MSC/C de 1:20, 1:50 y 1:100. 1A) Las células CD19 positivas fueron seleccionadas en la puerta R1 del cultivo solo de CLM (C) o del co-cultivo de MSC. 1B) En el cuadrante superior izquierdo Q1, se muestra el porcentaje de células CD19/CMFDA positivas para el cultivo de solo CLM (C) o para el co-cultivo de MSC. 1C) Histograma (izquierda) y gráfico (derecha) que muestran la media y el porcentaje de inhibición, respectivamente, de viabilidad de linfocitos CD19 positivos (células B) para 3 experimentos independientes del cultivo solo de CLM (c) o del co-cultivo de MSC. 1D) Histogramas (izquierda) y gráfico (derecha) que muestran la media y el porcentaje de inhibición de la proliferación, respectivamente, de células CD19 positivas y de células marcadas con CMFDA para 3 experimentos independientes del cultivo solo de CLM (c) o del co-cultivo de MSC.

Figura 2: muestra un co-cultivo en paralelo de CLMs estimuladas con CpG, MSC o MSC-MV. 2A) Gráficos de densidad representativos del análisis citofluorimétrico de CLMs marcadas con CMFDA del grupo de control (C) y CLMs después de co-cultivo con MSC o MSC-MV. Los linfocitos fueron seleccionados en la puerta Q1 mediante parámetros morfológicos (FSC-H; SSC-H) como células viables (izquierda). Dichos linfocitos son analizados sucesivamente en base a la tasa de proliferación mediante selección de eventos CD19/CD27 positivos (derecha, panel superior) o mediante fase de diferenciación en células plasmáticas (PC) por selección de eventos CD19/CD27 positivos (derecha, panel inferior). 2B-2C) Histogramas que muestran la media y el porcentaje de inhibición, respectivamente, de linfocitos CMFDA/CD19 positivos de cultivo solo de CLM (C) o de co-cultivo de MSC o MSC-MV. 2D-2E) Histogramas que muestran la media y el porcentaje de inhibición de la proliferación, respectivamente, de células de plasma (PC) CD19/CD27 positivas de cultivo solo de CLM (C) o de co-cultivo de MSC o MSC-MV. Los resultados son la media y el error estándar de 3 experimentos independientes. \* p<0,05.

Figura 3: muestra la inhibición de la producción de inmunoglobulina en CLMs estimuladas con CpG después de co-cultivo con MSC o MSC-MV. Ensayo ELISA de sobrenadantes de cultivo solo de CLM (C), incubados con MSC o con MSC-MV. Los resultados son la media y la desviación estándar de concentración (ng/mL) de IgM, IgG ó IgA para 3 experimentos independientes. \*p<0,05.

Figura 4: muestra la caracterización de MSC-MVs. Gráfico de puntos representativo obtenido para MVs liberadas por MSC usando un citofluorímetro FACSCanto. 4A) La puerta de MV se seleccionó usando partículas de calibración de 0,5-1  $\mu\text{m}$  de tamaño. 4B) Las MSC-MVs derivadas de la puerta mostrada en 4A fueron identificadas en el cuadrante Q4 con partículas de anexina V,7-ADD y Trucount (P1).

Figura 5: muestra el efecto dependiente de la dosis de MSC-MVs sobre linfocitos B en CLMs. El panel A muestra la inhibición de la proliferación (izquierda) y la diferenciación (derecha) de CLMs estimuladas con CpG tras cultivo de MSC-MV no diluido (MV) o a una dilución de 1:3 ó 1:6. Se observa una fuerte inhibición. Los resultados son de 4 experimentos independientes.

Figura 6: muestra el análisis FAC para la incorporación de MVs marcadas con PKH26 mediante poblaciones seleccionadas de CLM tras estimulación con CpG. 6A) Gráficos de densidad para linfocitos CD3+, CD86+ y doble negativos (Dneg) seleccionados en 3 puertas diferentes; 6B) Gráficos de histograma de intensidades de fluorescencia para linfocitos positivos CD3-FITC, CD86-APC seleccionados y analizados antes (panel superior) o después de incubación con MSC-MVs marcadas con PKH26 (panel inferior). La intensidad de fluorescencia es mayor en las células CD86 positivas. 6C) Gráficos de densidad para linfocitos CD56+, CD19+ y doble negativos (Dneg) seleccionados en 3 puertas diferentes; 6D) Gráficos de histograma de intensidades de fluorescencia para linfocitos positivos CD56-FITC, CD19-APC-Cy7 seleccionados y analizados antes (panel superior) o después de incubación con MSC-MVs marcadas con PKH26 (panel inferior). La intensidad de fluorescencia es mayor en las células CD86 positivas.

Figura 7: muestra los análisis de microscopía confocal de CLM. Las células han sido teñidas con anticuerpos conjugados a APC contra CD3, CD19 y CD86 (pseudo tinción verde) y anti-CD 56 conjugados (verde) con adición (panel superior) o sin (panel izquierdo) incubación con MSC-MV teñidas con PKH26 (rojo). Las MVs se producen mayoritariamente dentro del citoplasma de células positivas CD19 (punta de flecha) y CD86 (flecha). Los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst. Barra de aumento: 10  $\mu\text{m}$ .

Figura 8: muestra la microscopía confocal de reconstrucción Z para subpoblaciones celulares. Microfotografías de reconstrucción Z (a, d) realizadas usando microscopía confocal de barrido láser de linfocitos incubados con MSC-MV positivos de PKH26, teñidos con anticuerpos anti-CD19 (a-c) y anti-CD86 (d-f). Las proyecciones sobre los ejes XZ y XY (b-c, e-f) obtenidas de secciones transversales ópticas múltiples consecutivas mostraron una localización intracelular de MSC-MVs marcadas con colorante rojo fluorescente en las células CD19 positivas (c, verde) y CD86 positivas (f, verde), respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barras de aumento: 5  $\mu\text{m}$  (a, d) y 2  $\mu\text{m}$  (b-c, e-f).

Figura 9: muestra histogramas que presentan la media de células en proliferación y en diferenciación obtenidas de un único cultivo de PBMC (c), con MV diluidas 1:3 ó con MV 1:3 incubadas con anexina V (concentración entre 10  $\mu\text{g}$  y 0,1  $\mu\text{g}$ ). El efecto de inhibición de las MVs se ve potenciado por la anexina V de acuerdo a un modo dependiente de la dosis.

Figura 10: muestra la expresión de TNF alfa, IL-1beta, IL-6 y Cox2 en tejido de colon en el sexto día de experimentación en animales de control sin inducción de colitis, administrados solo con PBS (vehículo/PBS), en animales con colitis inducida por DSS y administrados solo con PBS (DSS/PBS) y en animales con colitis inducida por DSS y administrados con inyecciones de microvesículas aisladas de células madre mesenquimales y suspendidas en PBS (DSS/MV). Los valores son la media  $\pm$ SD. \* $p < 0,05$ .

Figura 11: muestra el análisis histológico (hematoxilina-eosina) de tejido de colon procedente de un ratón con colitis inducida por DSS y administrado solo con PBS (A) y de un ratón con colitis inducida por DSS y administrado con inyecciones de microvesículas aisladas a partir de células madre mesenquimales (b). Dentro de la mucosa y la submucosa del ratón tratado se puede ver un infiltrado inflamatorio con componente linfomononuclear marcado y de histiocito.

Ejemplo 1: Aislamiento de microvesículas a partir de células madre mesenquimales y estudio in vitro del efecto de las microvesículas sobre linfocitos B

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 25 Cultivo y expansión de células madre mesenquimales

Células madre mesenquimales humanas comerciales derivadas de médula ósea (MSC; Lonza, Basilea, Suiza) se llevaron a placa en matraces de cultivo de poliestireno de 75  $\text{cm}^2$  con tapón ventilado (Becton Dickinson, EE.UU.) con una densidad de  $4 \times 10^3$  en 10 mL de medio de cultivo basal Mesencult (Stem Cell Technologies, BC, Vancouver, Canadá) al que se añadió suero fetal bovino (20%, FBS, Hyclone Laboratories), penicilina a 100 U/mL y estreptomycin a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Gibco, Grand Island, NY). Los cultivos fueron incubados a 37°C en atmósfera humedecida con un 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de eso, las células fueron mantenidas en el mismo medio de cultivo, se separaron de la placa en una disolución de tripsina/EDTA (Invitrogen, Life Technologies, Italia) hasta una confluencia de 80-90% y se volvieron a llevar a placa con una dilución 1:2. Semanalmente se realizó un reemplazo del medio de cultivo.

### 35 Aislamiento de células linfomononucleares a partir de sangre periférica

Se recogieron muestras de sangre de donantes sanos en el *Centro Trasfusionale Ospedale Pediatrico Bambino Gesù* de Roma. Tras una adquisición consentida informada, las células linfomononucleares sanguíneas periféricas (CLM) fueron separadas con un gradiente Ficoll (Histopaque, Sigma Chemical C., St Louis, MO, EE.UU.) usando 50 mL de sangre venosa heparinizada, lavadas dos veces en tampón de fosfato salino, y a continuación criopreservadas en nitrógeno líquido.

### Co-cultivo de células linfomononucleares procedentes de sangre periférica con MSC

Se han planificado experimentos con el objetivo de evaluar la viabilidad de linfocitos B en co-cultivo con MSCs adheridas en placas de cultivo de 96 pocillos (Corning-Costar, Celbio, Milán, Italia) a concentraciones iniciales de  $2,5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$  ó  $5 \times 10^4$  células/pocillo en FBS al 20% añadido a medio de cultivo basal Mesencult. Para ensayos de inmunomodulación se adhieren MSC a placas de cultivo de 96 pocillos a una concentración inferior,  $5 \times 10^3$  células/pocillo y se cultivan en FBS al 20% añadido a medio de cultivo basal Mesencult. Al día siguiente, en los pocillos con MSC adheridas, se retira el medio de cultivo y se reemplaza con CLMs ( $5 \times 10^5$ /pocillo correspondiente a una relación MSC/CLM de 1:20, 1:50 y 1:100, respectivamente). Las MSCs se han marcado previamente con diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CMFDA, Cell Tracker, Molecular Probes) a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  y co-cultivadas con MSC en FBS al 10% añadido a medio de cultivo RPMI 1640 (BioWhittaker, Lona, Bélgica). Se incubaron linfocitos B mediante incubación con 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de oligodesoxinucleótidos humanos CpG (Hycult Biotechnology). Después de una semana se lavaron las células cultivadas en tampón de fosfato salino de Dulbecco (D-PBS, Euro-Clone, Milán, Italia) y se analizaron usando FACS (Análisis de Clasificación Celular Activado por Fluorescencia, FACSCanto II, BD Biosciences).

### 55 Co-cultivo de CLM con microvesículas derivadas de MSC (MSC-MV)

Se usaron cultivos de MSC confluentes al 90% para la preparación de medio condicionado (CM). Después de 5 días de cultivo, se recuperó el medio de las placas en las que se habían llevado a placa inicialmente las células a una concentración de  $2 \times 10^6$ /pocillo y se centrifugó a 1000 g durante 20 minutos a fin de eliminar los restos celulares. Las MSC produjeron microvesículas (MSC-MVs) que fueron aisladas como se describe en párrafos sucesivos, y se añadieron a  $5 \times 10^5$  linfocitos marcados con CFMDA después de 1 hora y 24 horas de la estimulación con CpG (Hycult Biotechnology). Para ensayos seleccionados, las MSC-MVs se diluyeron a 1:3, 1:6 en medio RPMI 1640 (BioWhittaker), después de añadieron a cultivos marcados con CLM después de 1 hora y de 24 horas de iniciar el cultivo. Después de una semana en presencia de 2,5 µg/mL de oligodesoxinucleótidos humanos CpG añadidos al inicio del cultivo, las CLMs se recogieron por centrifugación, se lavaron y se analizaron con FACS.

#### 10 **Detalle de la metodología de aislamiento de microvesículas del medio de cultivo**

La metodología de aislamiento de microvesículas es un método modificado a partir del de Lamparski et al (2002)

1 MSCs confluentes al 90%: n=6 T75/cm<sup>2</sup> (11 mL/placa)

2 recuperación de medio de cultivo

3 centrifugar a 1000 g durante 10 minutos para eliminar restos celulares

15 4 recuperar 10 mL de medio de cada muestra

5 concentrar el medio usando filtros de 30 kDa de 4 mL (Millipore)

6 recuperar el medio concentrado (aproximadamente 50 µL para cada filtro) y diluir en PBS 10 mL en tubos de ultracentrífuga

7 ultracentrifugar a 100.000 g durante 1 h a 4°C

20 8 recuperar la partícula de MSC-MV y diluir en PBS 10 mL

9 concentrar la disolución de MSC-MV usando filtros de 30 kDa de 4 mL (Millipore)

10 recuperar aproximadamente 15-20 µL de la muestra seleccionada (MSC-MV)

25 Para el aislamiento de microvesículas a partir de las MSCs, se diluye un medio acondicionado obtenido según el procedimiento descrito antes en 10 mL de PBS en tubos de polialómero (Beckman Coulter, Milán, Italia), después de ultracentrífuga a 100000 g a 4°C durante 1 hora. Al final del procedimiento, se recogieron 2 mL de medio ultracentrifugado del fondo de los tubos, se diluyeron en 10 mL de PBS y se concentraron mediante centrifugación durante 20-30 minutos a 2000 g en un filtro de 30 kDa estéril MWCO Amicon Ultra Centrifugal (Millipore) hasta un volumen final de 15-20 µL.

#### **Evaluación de la producción de inmunoglobulina**

30 Se co-cultivaron CLMs marcadas con CFMDA en placas de 96 pocillos con MSCs (en una relación de 1:100) o con MSC-MVs en FBS 10% (Hyclone), añadido a medio RPMI 1640 (BioWhittaker). Después de una semana las placas fueron centrifugadas a 300 g durante 5 minutos, se recuperaron los sobrenadantes y se evaluaron usando un ensayo ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima). Para estimar la producción de inmunoglobulina, se adhirió a la superficie de placas ELISA de 96 pocillos (Corning) inmunoglobulina de cabra purificada contra IgA, IgG ó IgM  
35 humanas diluidas en PBS (IgA 10 µg/mL, IgG 15 µg/mL, IgM 2,5 µg/mL, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), mediante incubación durante una noche a 4 °C. Después de 3 lavados con PBS/Tween al 0,1% el sobrenadante del cultivo celular se añadió a las placas (50 µL/pocillo) y se incubó a 37°C durante 1 hora en condiciones de atmósfera humidificada. Después de lavar las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con anticuerpos conjugados a peroxidasa contra IgA humana (1:1000), IgG humana (1:2000) o IgM humana (1:1000)  
40 diluidas en PBS (Jackson ImmunoResearch Laboratories) (50 µL). Se usaron comprimidos de o-fenilendiamina diluidos en PBS (Sigma-Aldrich) como sustrato cromógeno para poder llevar a cabo el ensayo. La reacción se interrumpió después de 30 minutos mediante la adición de dodecilsulfato sódico al 10% (50 µL/pocillo). Al final del procedimiento se llevó a cabo la lectura de las placas usando un espectrofotómetro (espectrofotómetro de microplacas Benchmark Plus) a 460 DO.

#### 45 **Análisis citofluorimétrico**

Al final del co-cultivo se recuperaron las CLMs de las placas de cultivo, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y resuspendieron en PBS/FBS (2%). Se incubaron suspensiones celulares individuales en condiciones de oscuridad durante 20 minutos a 4°C con anticuerpos monoclonales conjugados directamente contra las siguientes moléculas superficiales humanas: CD19 (1:7, conjugada a Cy5), CD27 [1:7, conjugada a ficoeritrina (PE)], CD38 (1:30, conjugada a PE-Cy7), IgM (1:100, conjugada a Cy5), CD86 (1:5, conjugada a APC), CD3 [1,7, conjugada a fluoresceína (FITC)], CD56 (1:7, conjugada a FITC), CD19 [1:20, conjugada a alofocianina-Cy7 (APC)]. Todos los anticuerpos procedían de Becton Dickinson (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Después de la unión a anticuerpos,

las células fueron lavadas 2 veces con PBS/BSA al 2% y se adquirieron datos usando FACSCanto II (BD). Los perfiles citofluorimétricos fueron analizados mediante Cell Quest Software (BD). Para un ensayo individual se registró un mínimo de 20.000 eventos.

- 5 A fin de caracterizar las MSC-MVs, en ensayos individuales, se incubaron las MSC-MVs de sobrenadantes de  $2 \times 10^6$  MSCs según el método presentado anteriormente con 5  $\mu\text{L}$  de anticuerpos monoclonales contra la molécula superficial humana de anexina V conjugada a APC (BD) acoplada con colorante vital 7-amino-actinomicina [7-AAD, conjugado con complejo peridina-clorofil-proteína (PerCP) BD] en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  de 1x tampón de unión de anexina V (BB1x) según las instrucciones incluidas en el kit. Dicho complejo permite la identificación específica de MSC derivadas de MSC-MV no apoptóticas. Después de 15 minutos de incubación a oscuras a temperatura ambiente, las muestras de MSC-MV fueron transferidas a tubos Troucount (BD) que contenían partículas para calibración dimensional. Dichas partículas fueron usadas para definir la puerta de MSC-MV en base a parámetros morfológicos (dispersión hacia delante, FSC-H; dispersión lateral, SSC-H).

#### Incorporación de MSC-MV mediante CLM

- 15 Las MVs se aislaron del medio de cultivo de  $2 \times 10^6$  MSCs (ver más arriba) y se marcaron con colorante PKH26 a una concentración de  $2,5 \times 10^6$  (Sigma, Saint Louis, EE.UU.) según las instrucciones del productor. Las MVs marcadas fueron incubadas con CLM ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) en FBS 10% añadido a RPMI. Después de 1 hora de incubación a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con un 5% de  $\text{CO}_2$ , la población celular se lavó con PBS y se dividió en 2 partes, una se evaluó mediante citofluorimetría, la otra mediante microscopía confocal.

#### Inmunofluorescencia

- 20 Las CLMs incubadas con MVs marcadas con PKH26 fueron lavadas con PBS, fijadas en formaldehído al 4 %, incubadas con PBS/FBS al 5% durante 30 minutos y teñidas individualmente con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD86 (1:10), anti-CD3 (1:10) y anti-CD19 (1:10) conjugados con APC (BD) y anti-CD56 (BD) conjugado con FITC (1:30). Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS/BSA al 1% e incubados durante 1 hora. Los controles negativos se prepararon usando muestras de CLM sin incubación con MV, o sin anticuerpo primario en el procedimiento de tinción.

Los núcleos fueron contrateñidos con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 33342 (Invitrogen, Molecular Probes, OR, EE.UU.). Después de lavar con PBS, las muestras fueron montadas con reactivo Pro-long Anti-Fade (Invitrogen).

#### Microscopía confocal y análisis de imágenes

- 30 El análisis confocal se ha llevado a cabo usando el microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000 que incluye el software FV10-ASW versión 2.0, Multi Ar (458-488 y 515nm) con láser de diodos 2X He/Ne (543 y 633 nm) y 405 usando lentes 60x (aceite 1,35 NA). Se adquirieron secciones ópticas individuales mediante el modo de escaneo de  $1024 \times 1024$  píxeles, con un tamaño de 207 nm/píxel, a una velocidad de muestreo de 40  $\mu\text{s}/\text{píxel}$  y con imágenes de 12 bit/píxel. Se evitó la mezcla con fluorocromo mediante adquisición secuencial de imágenes multicanal, a fin de reducir la interferencia de espectro de canal. La apertura de "pinhole" fue de 1 unidad de Aire.

- 35 La reconstrucción Z de secciones ópticas individuales en serie se llevó a cabo según el modo de escaneo de  $1024 \times 1024$  píxeles con 2 zoom electrónicos correspondientes a 103 nm/píxel, con una velocidad de muestreo de 20  $\mu\text{s}/\text{píxel}$  y una separación Z de 0,40  $\mu\text{s}/\text{sección}$ . Las imágenes fueron procesadas usando el software Photoshop versión 9.0 (Adobe System Inc, CA).

#### Análisis estadístico

- 40 Los datos fueron analizados en términos de los valores de datos medios, máximos y mínimos. Se llevó a cabo un análisis no paramétrico de varianza (ensayo de Kruskal-Wallis) para comparar los datos cuantitativos de grupos; se usó el ensayo U de Mann-Whitney como prueba después del análisis de varianza.  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software GraphPad (GraphPad Prism, Versión 3.03, Avenida de la Playa, La Jolla, CA).

## 45 RESULTADOS

### Co-cultivo de CLM con MSC

#### *Efecto sobre la viabilidad de células B*

- 50 En primer lugar estudiamos los efectos del co-cultivo con MSC sobre la viabilidad de linfocitos B tras estimulación con CpG. Co-cultivamos con MSCs CLMs marcadas con CMFDA (C) obtenidas de 7 donantes sanos con MSC. Después de 7 días de incubación analizamos mediante análisis citofluorimétrico las células CD19 positivas en la muestra total de CLMs marcadas. La inhibición máxima de la viabilidad de células B se observó para una relación de MSC/C de 1:20 (Figura 1A); este efecto todavía era demostrable a diluciones de 1:50 y 1:100 (Figura 1A, 1B).

#### *Efecto sobre la proliferación de células B*

Adicionalmente estimamos el efecto del co-cultivo de MSC sobre la proliferación de células B. Después de 7 días en las condiciones experimentales mencionadas anteriormente, se seleccionó la puerta de doble CD19/marcado con CFMDA mediante análisis citofluorimétrico. Como se observa en la Figura 1C, obtuvimos una inhibición máxima sobre la proliferación de células B a una relación de MSC/C de 1:20. Además, demostramos la inhibición a una relación de MSC/C de 1:50 y un menor efecto a una relación de 1:100. El cuadrante Q1 de la Figura 1D muestra el porcentaje de linfocitos B en proliferación (CD19 positivos y marcados con CFMDA) con respecto al número total de linfocitos; la proliferación ya estaba altamente inhibida (90,3%) a una relación de MSC/C de 1:100. Por lo tanto, se usó esta relación en todos los experimentos de co-cultivo sucesivos.

#### **Co-cultivo de CLM en paralelo con MSCs o MSC-MVs**

En experimentos en paralelo estudiamos los efectos del co-cultivo con MSCs o con MSC-MVs sobre la proliferación y la diferenciación de linfocitos B. Con este fin, se añadieron MSC-MVs a las CLMs después de 1 hora y de 24 horas del inicio del experimento. Se prepararon cultivos paralelos en los que las CLMs fueron co-cultivadas con MSCs en la misma proporción de 1:100. Se observó una inhibición significativa sobre la proliferación de células B tanto en presencia de MSCs como de MSC-MVs (Figura 2A). Se obtuvieron porcentajes de inhibición similares, es decir, del 70% y el 60%, respectivamente, tanto en presencia de MSCs como de MSC-MVs (Figura 2B). En estos experimentos en paralelo también hemos estudiado la diferenciación celular en plasma. La línea celular de plasma (PC) fue identificada mediante doble tinción con CD19 y CD27. Hemos demostrado una inhibición significativa de la producción celular plasmática, siendo del 98% y del 100%, respectivamente, en presencia tanto de MSCs como de MSC-MVs. Al igual que las MSCs, las MSC-MVs también inhibieron la producción de IgM, IgG e IgA (Figura 3).

Además, hemos estimado la producción de inmunoglobulinas a partir de los mismos cultivos celulares. Después de 7 días, los sobrenadantes fueron recogidos y evaluados mediante ELISA. Tanto las MSCs como las MSC-MVs inhibieron la producción de IgM, IgG e IgA, tal como se muestra en la Figura 3.

#### **Caracterización de MSC-MVs**

Hemos verificado que nuestro método permite aislar las MSC-MVs purificadas, estimando también las cantidades mediante análisis citofluorimétrico. La población de MSC-MV se distingue de los fragmentos de las células apoptóticas a través de la negatividad de marcador 7-AAD de ADN y presentándose como positivas para anexina V (Figura 4).

#### **Efecto dependiente de la dosis de las MSC-MVs sobre linfocitos B**

Se ha presentado un efecto dependiente de la dosis de las MSC-MVs tanto sobre la proliferación como sobre la diferenciación de células B (Figura 5). El efecto de inhibición fue mayor sobre la diferenciación que sobre la proliferación.

#### **Incorporación de MSC-MV por parte de las CLMs**

El análisis citofluorimétrico de CLMs pre-incubadas con MSC-MVs marcadas con PKH26 demostró que la incorporación de las mismas fue selectiva en una sub-población de células CD86 positivas, y entre éstas en las células CD19 positivas correspondientes a linfocitos B. Las células CD3 positivas correspondientes a linfocitos T resultaron ser negativas. Las células CD56 positivas correspondientes a células NK también resultaron ser negativas (Figura 6).

Usando la microscopía confocal de láser, se llevó a cabo el análisis de inmunofluorescencia de CLMs pre-incubadas o no con MSC-MVs marcadas con PKH26, con el objetivo de estimar la interacción de las MSC-MVs con el tipo celular específico (Figura 7). Se usó el panel de anticuerpos conjugados a fluoresceína contra moléculas CD3, CD19, CD56 y CD86, y la co-localización del mismo demostró una asociación recurrente de MSC-MVs con células CD19 y CD86 positivas, aunque no se detectó ninguna asociación para las células CD19 y CD56 positivas (Figura 7). El análisis de localización de MSC-MVs marcadas con PKH26 y teñidas de rojo se basó en la reconstrucción Z de secciones ópticas individuales en serie de células CD19 y CD86 positivas (Figura 8). La distribución de MSC-MV en las dimensiones lateral y axial, detectada usando proyecciones de los ejes XZ e YZ, sugirió una localización intracelular en el citoplasma de las células CD19 y CD86 positivas (Figura 8).

#### **EJEMPLO 2: La unión de MVs a anexina V potencia el efecto inhibitorio sobre los linfocitos B**

La anexina V se une a la fosfatidilserina expuesta en membrana celular y modifica la respuesta inmune contra dichas células (Munoz, 2007). En este experimento, las MVs obtenidas según el procedimiento descrito anteriormente y diluidas 1:3 son incubadas durante 15 minutos con anexina V recombinante purificada a temperatura ambiente (BD, rango de concentración de 10 µg a 0,1 µg) en un volumen final de 100 µL de tampón de unión a anexina V (BBB1x) según las instrucciones del productor. A continuación se han lavado las MVs con PBS mediante ultracentrifugación y se han co-cultivado con CpGs marcados con CFMDA y estimulados con PBMC. Después de 7 días los cultivos se analizan mediante citofluorimetría a fin de estimar la proliferación y la diferenciación de linfocitos B. La adición de anexina V potenció de manera destacada el efecto de inhibición de las MV sobre los linfocitos B

activados, en un modo dependiente de la dosis. Esta estrategia puede usarse para potenciar el efecto inmunomodulador de las MV.

**EJEMPLO 3:** *Tratamiento de colitis ulcerosa experimental con microvesículas derivadas de células madre estromales mesenquimales (MSC-MVs)*

- 5 Este ensayo tiene el objetivo de estimar el efecto de inhibición de las MSC-MVs con fines terapéuticos en un modelo experimental de enfermedad inflamatoria crónica interna.

**Modelo animal**

10 El experimento se llevó a cabo con ratones B57BL/6J hembras de 8 semanas de edad. Se indujo la colitis mediante administración de dodecil sulfato sódico (DSS) al 3% en el agua de bebida, se administró *ad libitum* a lo largo de cinco días. Este es un modelo animal bien establecido y ampliamente usado, estando referenciado cientos de veces en Pub Med (para una revisión, véase Kawada et al., 2007). Todos los animales fueron tratados según el código ético de la Universidad de L'Aquila, en donde se llevaron a cabo los experimentos, teniendo una disponibilidad *ad libitum* de agua y comida y manteniendo un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales fueron subdivididos en tres grupos experimentales.

- 15
- Grupo 1 (n=4, controles normales): inyecciones diarias intraperitoneales (ip) de PBS (sólo vehículo), 0,2 mL del día 1 al 5.
  - Grupo 2 (n=5, inducción de colitis): como el grupo 1, con adición de un 3% de DSS en el agua de bebida.
  - Grupo 3 (n=4, inducción de colitis y tratamiento con microvesículas): como el grupo 2, con la adición de MSC-MVs suspendidas en 0,2 mL de PBS a través de ruta IP.

20 En el sexto día, los animales fueron sacrificados usando CO<sub>2</sub>. Se realizó una escisión del colon, una parte del tejido se fijó en formalina para análisis histológico sucesivo, otra parte se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y a continuación se almacenó a -80°C para una extracción sucesiva de ARN.

**Dosificación y ruta de administración de MSC-MVs**

25 Las MSC-MVs producidas a partir de 2x10<sup>6</sup> MSCs en un cultivo de 24 horas fueron aisladas y se administraron según el procedimiento descrito previamente.

Ruta de administración: MSC-MV suspendidas en 0,2 mL de PBS por vía intraperitoneal, administradas diariamente del día 1 al 5.

Evaluación del daño intestinal

Peso del animal.

30 Índice de actividad de la enfermedad (evaluación de heces; véase Tanaka F, 2008)

- Signos histopatológicos de flogosis
- Determinación de la expresión de mediador de inflamación en extractos de tejido de colon: TNFalfa, IL6, IL-1beta y Cox2 mediante RT-PCR

Análisis estadístico de los resultados.

35 Los datos se expresan como media ± SD. Las diferencias entre grupos se analizan mediante el ensayo t, siendo p<0,05 significativo.

**Resultados**

40 Todos los animales sobrevivieron al tratamiento. Mientras que los animales de control (grupo 1) ganaron progresivamente peso durante la semana, los animales tratados con DSS presentaron una pérdida de peso comenzando en el cuarto día (tabla 1). Tanto la pérdida de peso corporal como el índice de actividad de colitis fueron marcadamente menores en los animales con administración diaria de inyecciones intraperitoneales de MSC-MV además de DSS. La ingesta de agua disminuyó significativamente en los animales administrados con DSS, pero no fue significativamente diferente para los dos grupos experimentales con o sin MSC-MVs (tabla 1).

45 La Tabla 1 muestra los valores de peso corporal, el índice de actividad de la enfermedad y la ingesta de agua en el sexto día de experimentación para los animales de control sin inducción de colitis administrados solo con PBS (vehículo/PBS), para los animales con colitis inducida por DSS y administrados solos con PBS (DSS/PBS) y para los animales con colitis inducida por DSS y administrados con inyecciones de microvesículas aisladas de células madre mesenquimales y suspendidas en PBS (MV/DSS).

El índice de actividad de la enfermedad (puntuación de heces) ha sido evaluado según la siguiente escala:

Heces normales/semi-sólidas = 1; heces hemáticas semi-sólidas = 2; heces hemáticas líquidas = 3

Tabla 1

GRUPO EXPERIMENTAL (DÍA 6)	PESO CORPORAL (g) N=4 Media ± SD	PUNTUACIÓN DE HECES N=5 Media ± SD	INGESTA DE AGUA (mL) N=4 Media ± SD
Vehículo/PBS	17,40 ± 0,57	1,0 ± 0	7,450 ± 3,977
DSS/PBS	15,60 ± 0,93 *	2,5 ± 0 *	3,160 ± 0,844 *
DSS/MV	17,15 ± 0,75 §	1,9 ± 0,23 * §	3,850 ± 0,904 *

\* Diferente del grupo frente a Vehículo/PBS, p<0,05

5 § Diferente del grupo frente a DSS/PBS, p<0,05

10 La Figura 10 muestra el análisis RT-PCR de la expresión génica de TNFalfa, IL-1beta, IL-6 y Cox2 en ARNs extraídos de colon. El tratamiento con DSS da como resultado un incremento destacado de los marcadores de flogosis. La administración de MSC-MVs a los ratones tratados con DSS redujo de forma significativa la activación de TNFalfa, IL-1beta, mientras que la reducción de IL-6 y Cox2 resultó ser inferior al límite de significación. Los análisis histológicos (Figura 11 A y B) presentaron infiltrados inflamatorios tanto en el grupo 2 como en el grupo 3. Aunque no se detectaron diferencias morfológicas para los dos grupos, es probable que dichos infiltrados sean menos activos en el grupo 3 que en el grupo 2, debido a una expresión reducida de los índices de flogosis (Figura 10) unida a una menor actividad clínica (tabla 1). En conclusión, estos resultados demuestran que las MSC-MVs son adecuadas para reducir la reacción inflamatoria asociada a la colitis experimental, dando como resultado una reducción del índice de actividad de enfermedad y un alivio de las condiciones generales. Las MSC-MVs mejoran la imagen clínica y la respuesta flogística en un modelo de animal de enfermedad inflamatoria intestinal.

15

## BIBLIOGRAFÍA

- 5 • Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1482-90.
- Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Saviozzi S, Collino F, Bussolati B, Tetta C, Camussi G (2009) "Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury" *J Am Soc Nephrol* 20(5): 1053-1067.
- Caimi PF, Reese J, Lee Z, Lazarus HM. Emerging therapeutic approaches for multipotent mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17: 505-13.
- 10 • Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010, 78: 838-48.
- Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, Rameshwar P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood.* 2006 15; 107: 4817-24.
- 15 • Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Frassoni F, Locatelli F (2008) "Human mesenchymal stem cell inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation" *Nephrol Dial Transplant* 23: 1196-1202.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferreti E, Giunti D, Pistoia V, Uccelli A (2006) "Human mesenchymal stem cells modulate B-cells functions" *Blood* 107(1): 367-372.
- 20 • Escudier B, Dorval T, Chaput N, André F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulaire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E, Zitvogel L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.* 3, 10 (2005).
- Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Mayo; 26(5): 1474-83. Epub 15 febrero de 2011.
- 25 • Herrera MB, Fonsato V, Gatti S, Deregibus MC, Sordi A, Cantarella D, Calogero R, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 1605-18.
- Kawada M, Arihiro A, Mizoguchi E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007(42): 5581-93.
- 30 • Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Simpson E, Dazzi F (2003) "Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide" *Blood* 101: 3722-3729.
- Lamparski HG, Metha-Damani A, Jenq-Yuan Y, Le Pecq JB (2002) "Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells" *J Immunol Methods* 270: 211-226.
- 35 • Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20: 419-27.
- Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, Valente N, Shreeniwas R, Sutton MA, Delcayre A, Hsu DH, Le Pecq JB, Lysterly HK. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.* 3, 9 (2005).
- 40 • Nauta AJ, Fibbe WE (2007) "Immunomodulating properties of mesenchymal stromal cells" *Blood* 110(10): 3499-3506.
- Rasmussen I, Le Blank K, Sundberg B, Ringden O (2007) "Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells" *Scandinavian Journal of Immunology* 65: 336-343.
- 45 • Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB, Shi Y (2009) "Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression" *Stem Cells* 2009 27(8): 1954-62.

- Tabera S, Perez-Simon J, Diez-Campelo M, Sanchez-Abarca LI, Bianco B, Lopez A, Benito A, Ocio E, Sanchez-Guijo FM, Canino C, San Miguel JF (2008) "The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes" *Haematologica* 93(9): 1301-1309.
- 5 • Tanaka F, Tominaga K, Ochi M, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Ohta K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats. *Life Sci.* 5 diciembre 2008; 83 (23-24): 771-9.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 581-93.
- 10 • Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 371-379.
- Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, Martini A (2008) "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients" *Stem Cells* 26: 562-569.
- 15 • Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic Exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 654-9.

**REIVINDICACIONES**

1. Microvesículas, o exosomas, aislados a partir de células madre mesenquimales para uso en terapia inmunosupresora.
- 5 2. Microvesículas aisladas a partir de células madre mesenquimales para uso según la reivindicación 1, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y de enfermedades autoinmunes.
3. Microvesículas aisladas a partir de células madre mesenquimales para uso según la reivindicación 1, en el tratamiento y prevención del rechazo de trasplantes.
4. Microvesículas aisladas a partir de células madre mesenquimales para uso según la reivindicación 1, en el tratamiento y prevención de la enfermedad de injerto-contra-hospedante.
- 10 5. Microvesículas aisladas a partir de células madre mesenquimales para uso según la reivindicación 1, con el objetivo de inhibir la reacción inmune que se desarrolla como resultado de un trasplante celular alogénico/xenogénico o de terapia génica.
- 15 6. Composición farmacéutica que comprende o que consiste en microvesículas aisladas a partir de células madre mesenquimales, como principio activo, opcionalmente unidas a anexina, junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, para uso en terapia inmunosupresora.
7. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 6, en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y de las enfermedades autoinmunes.
8. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 6, en el tratamiento y prevención del rechazo de trasplante.
- 20 9. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 6, en el tratamiento y prevención de la enfermedad de injerto-contra-hospedante.
10. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 6, con el objetivo de inhibir la reacción inmune que se desarrolla como resultado de un trasplante celular alogénico/xenogénico o de terapia génica.

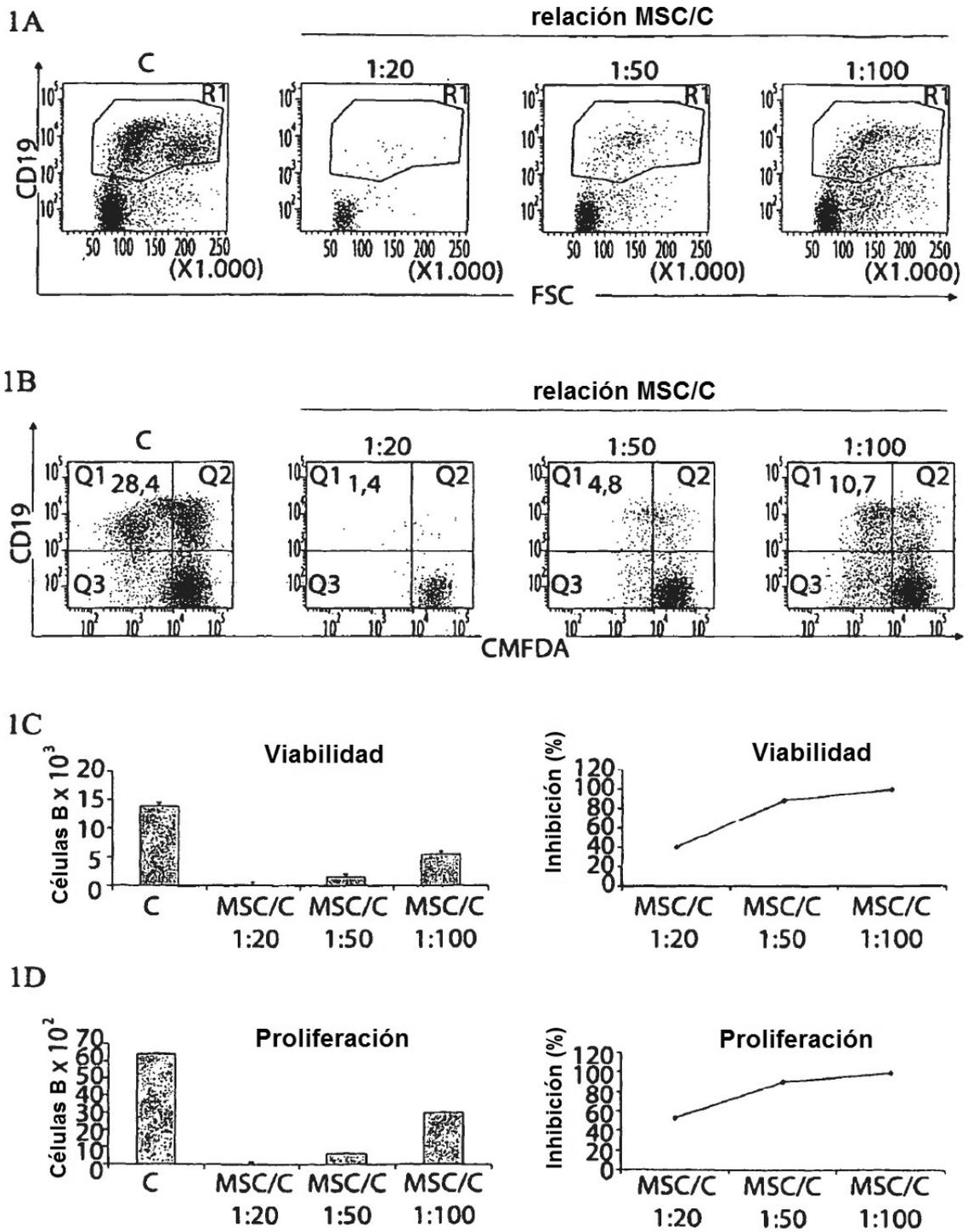


Fig. 1

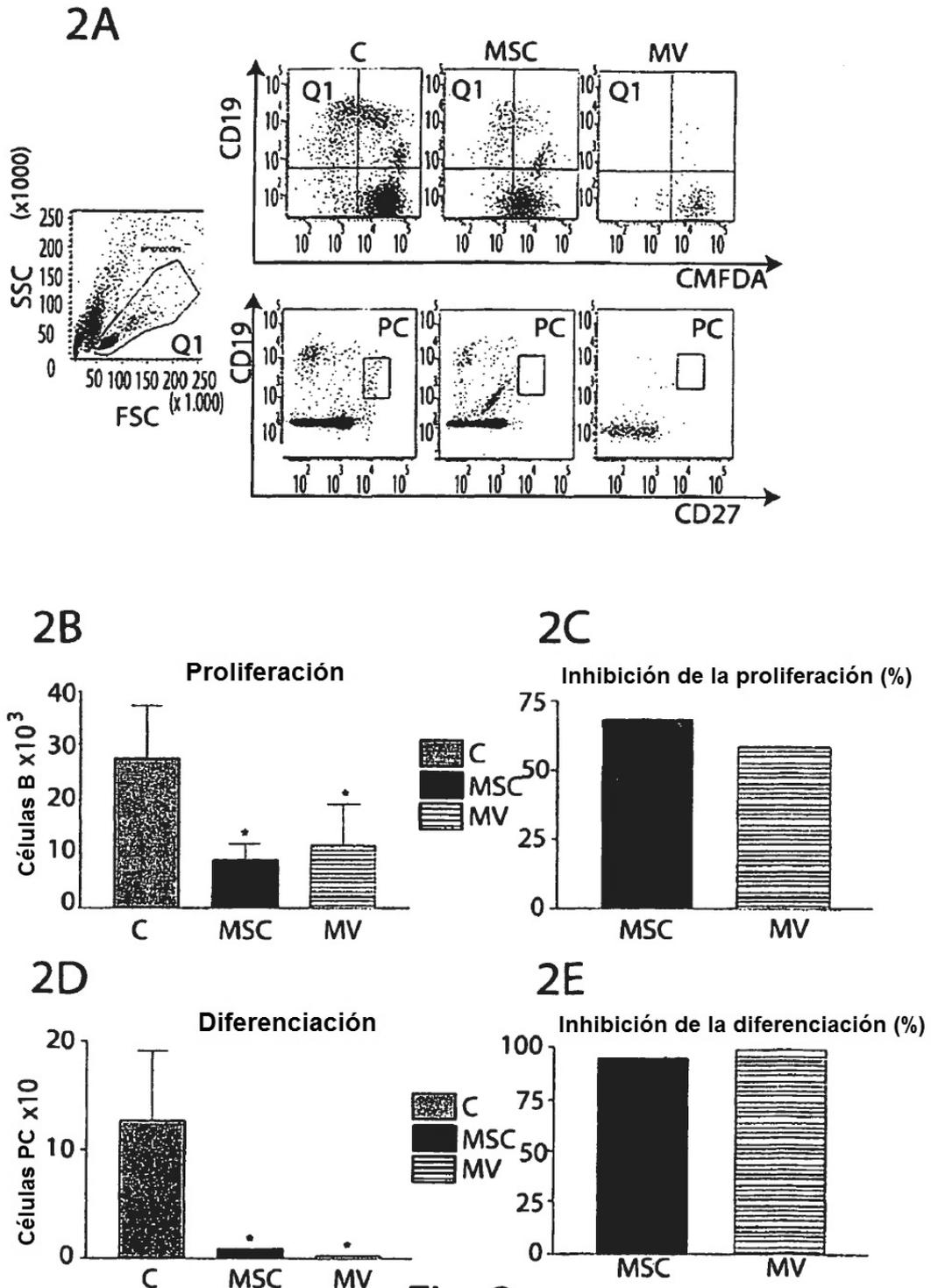


Fig. 2

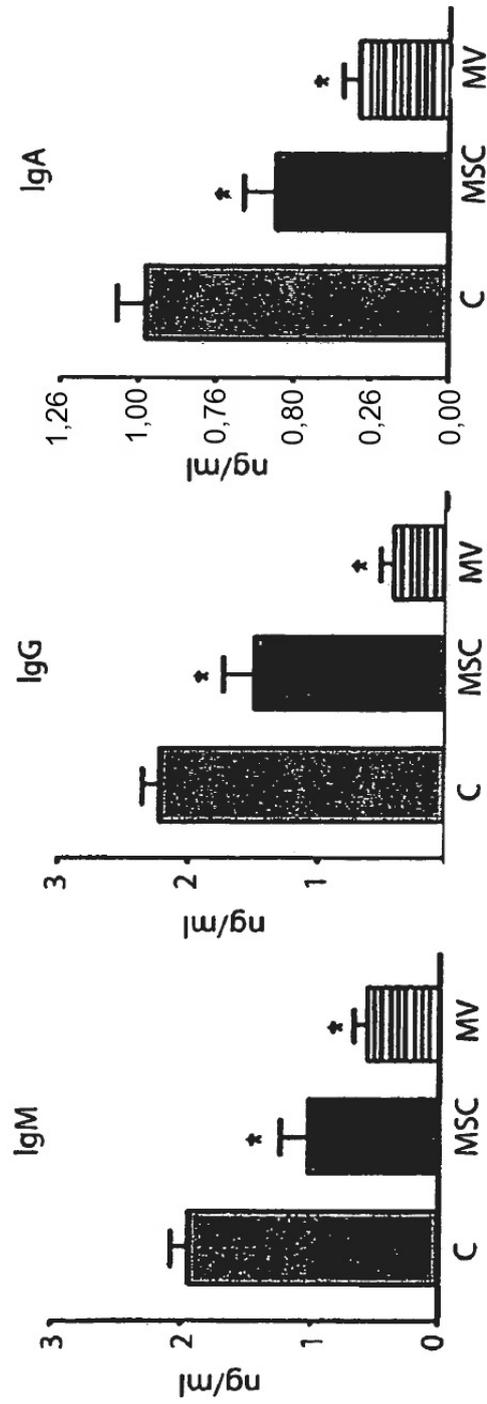


Fig. 3

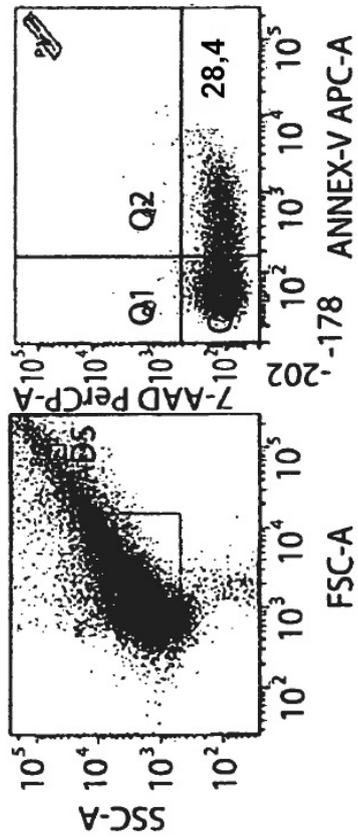


Fig. 4A

Fig. 4B

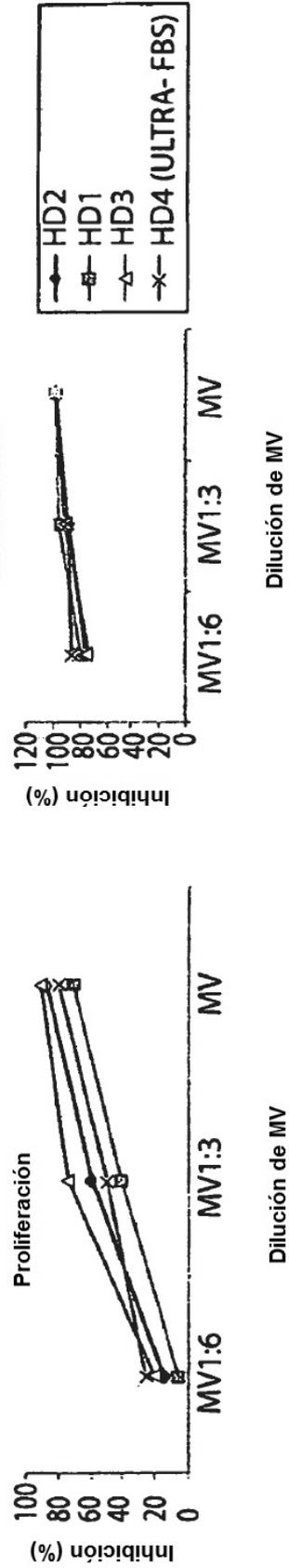


Fig. 5

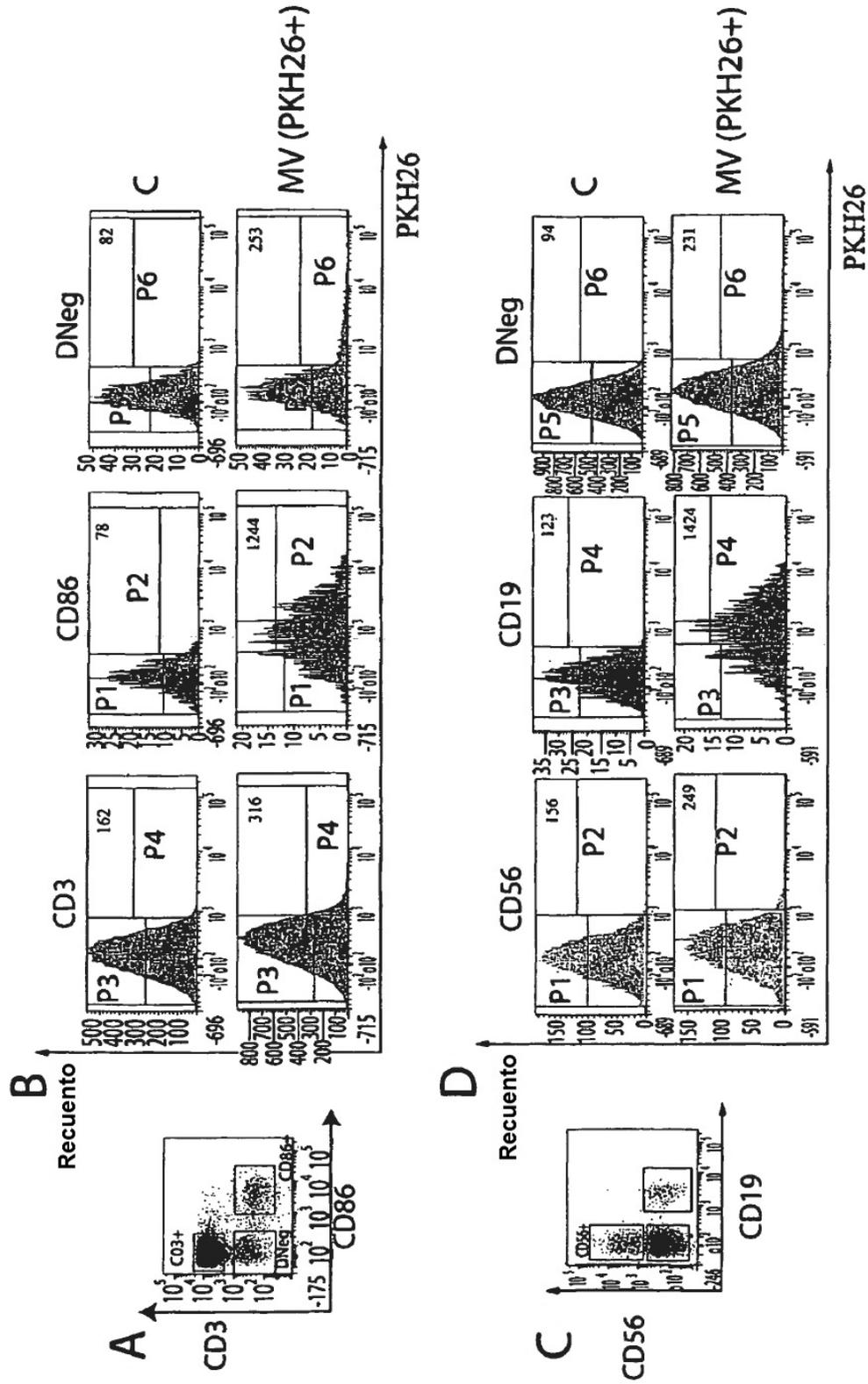


Fig.6

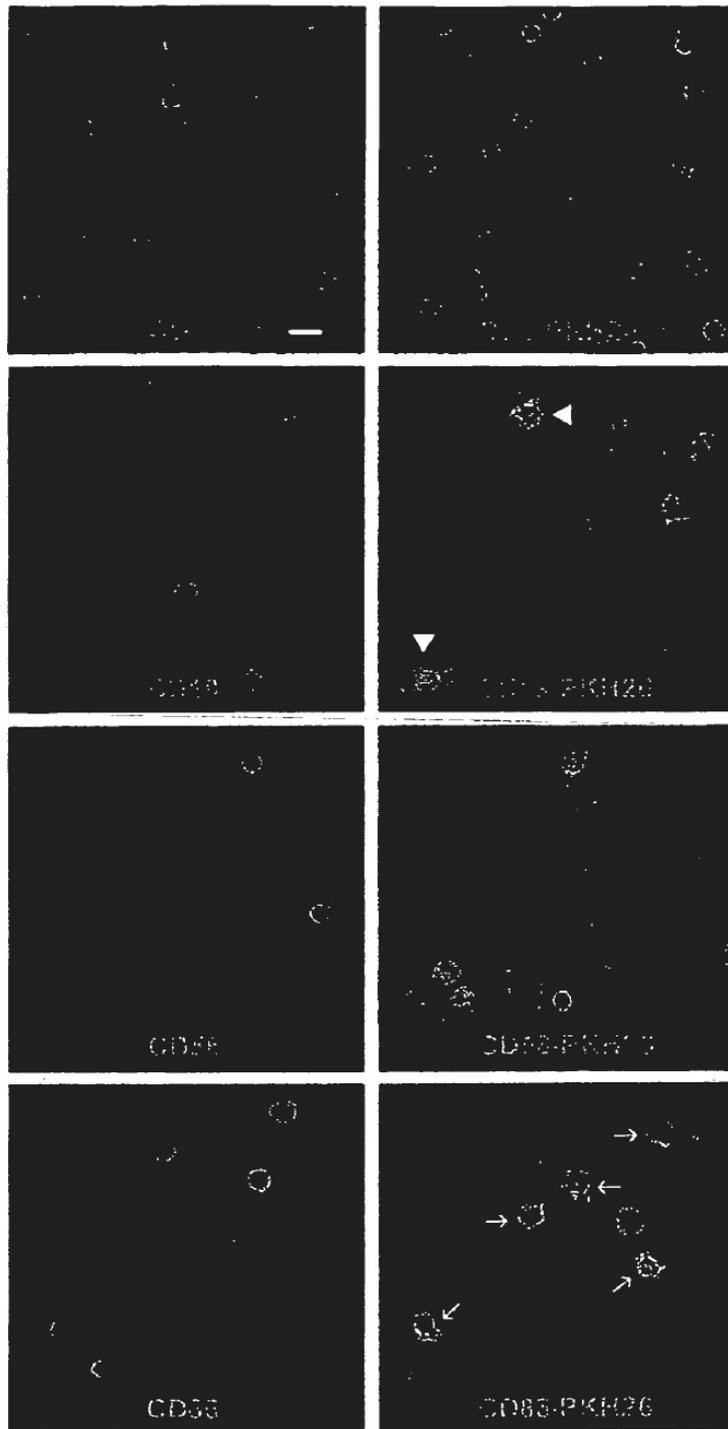


Fig. 7

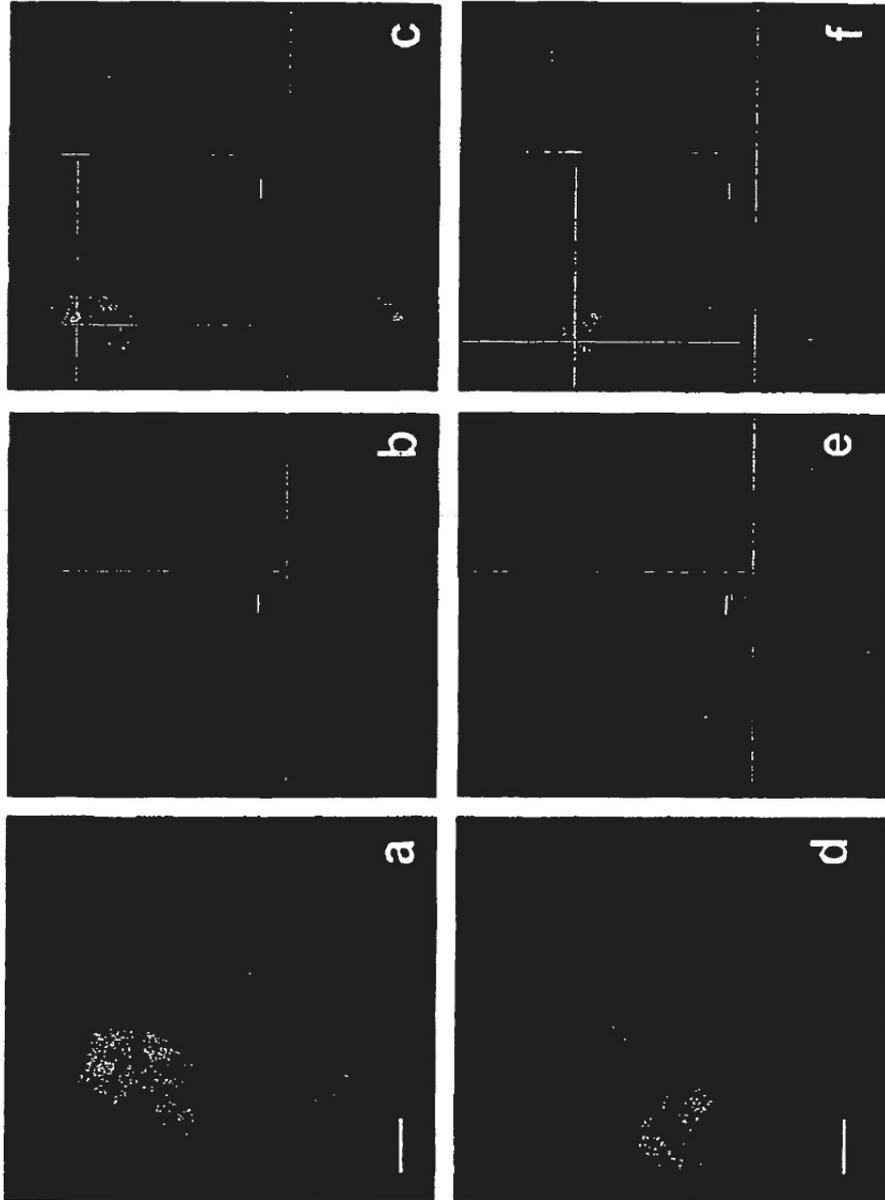


Fig. 8

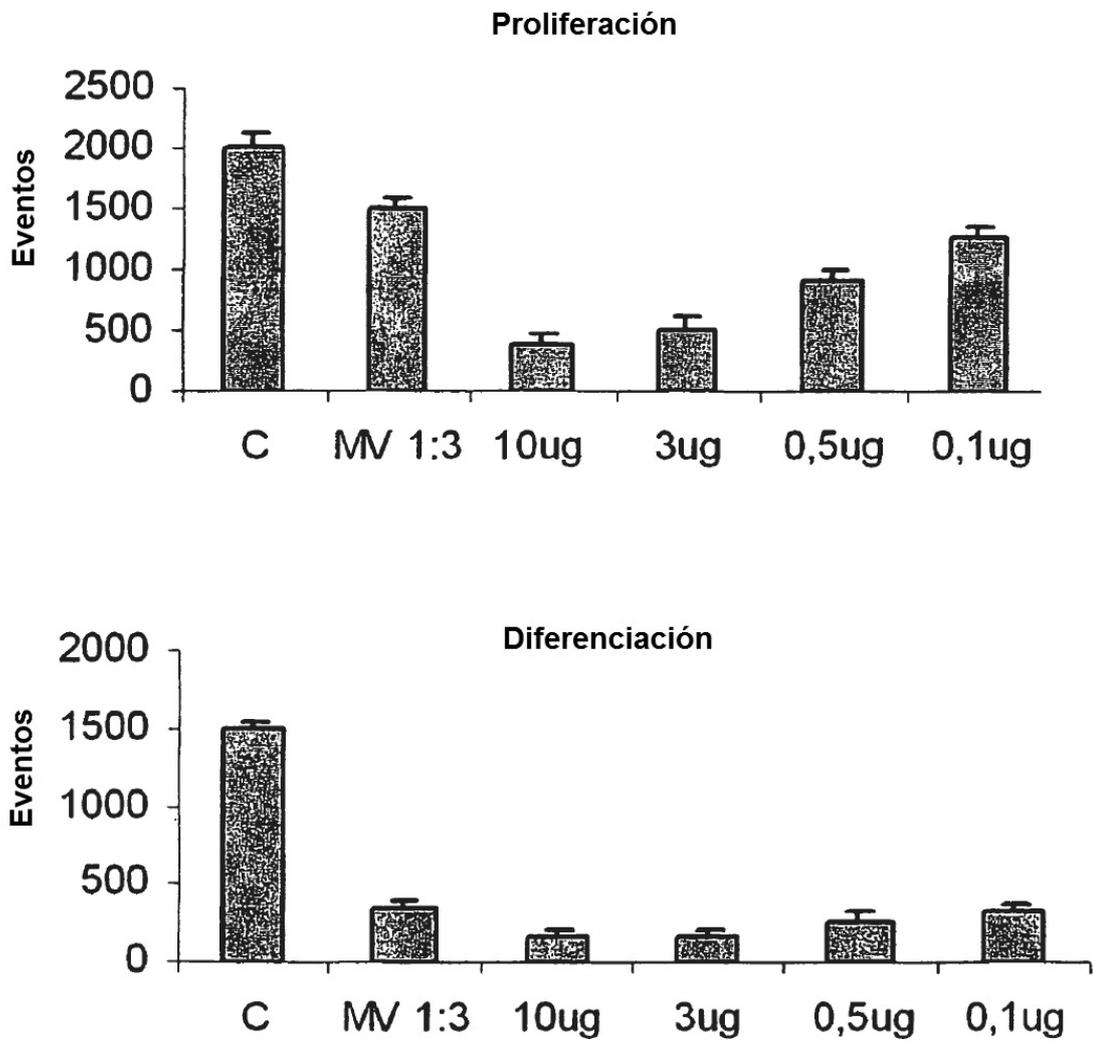


Fig. 9

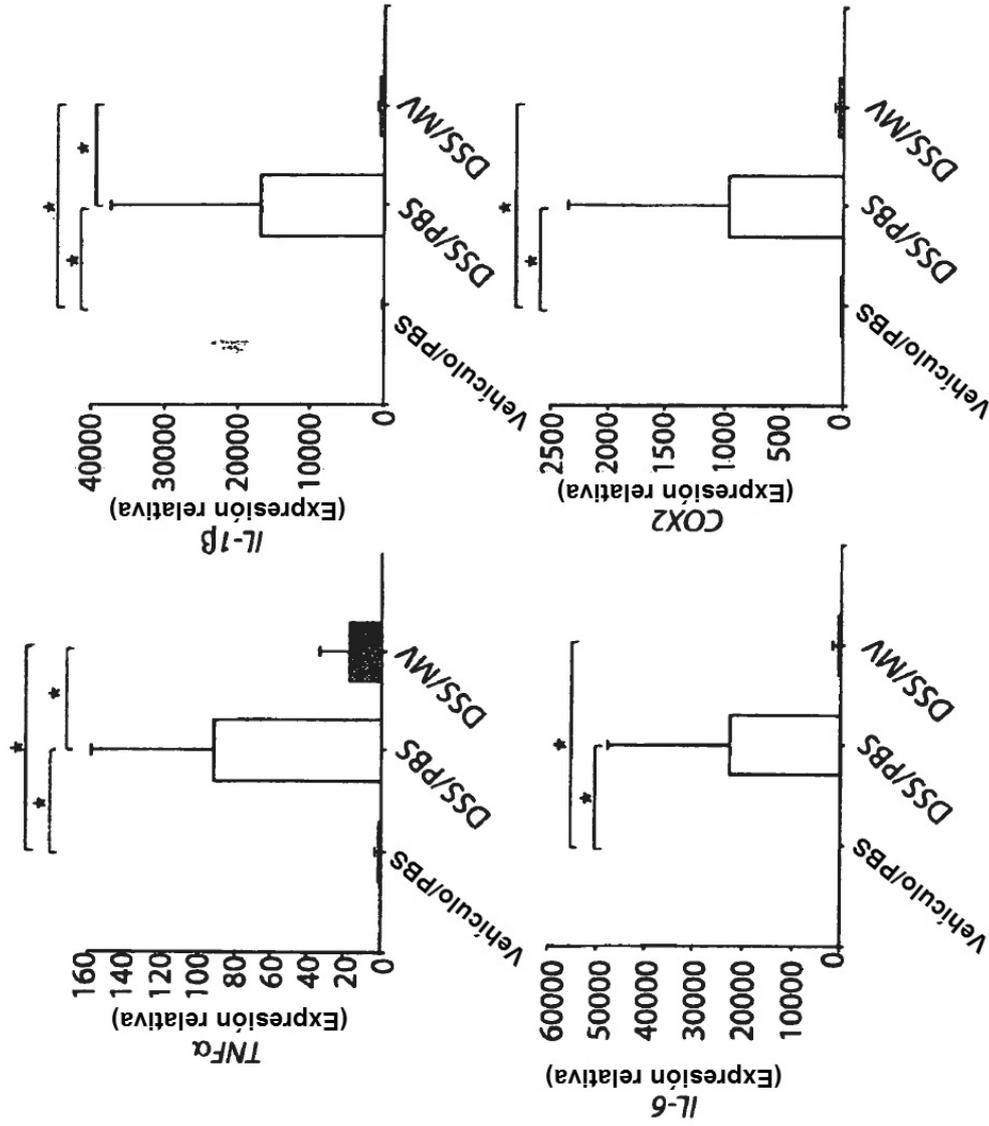


Fig. 10

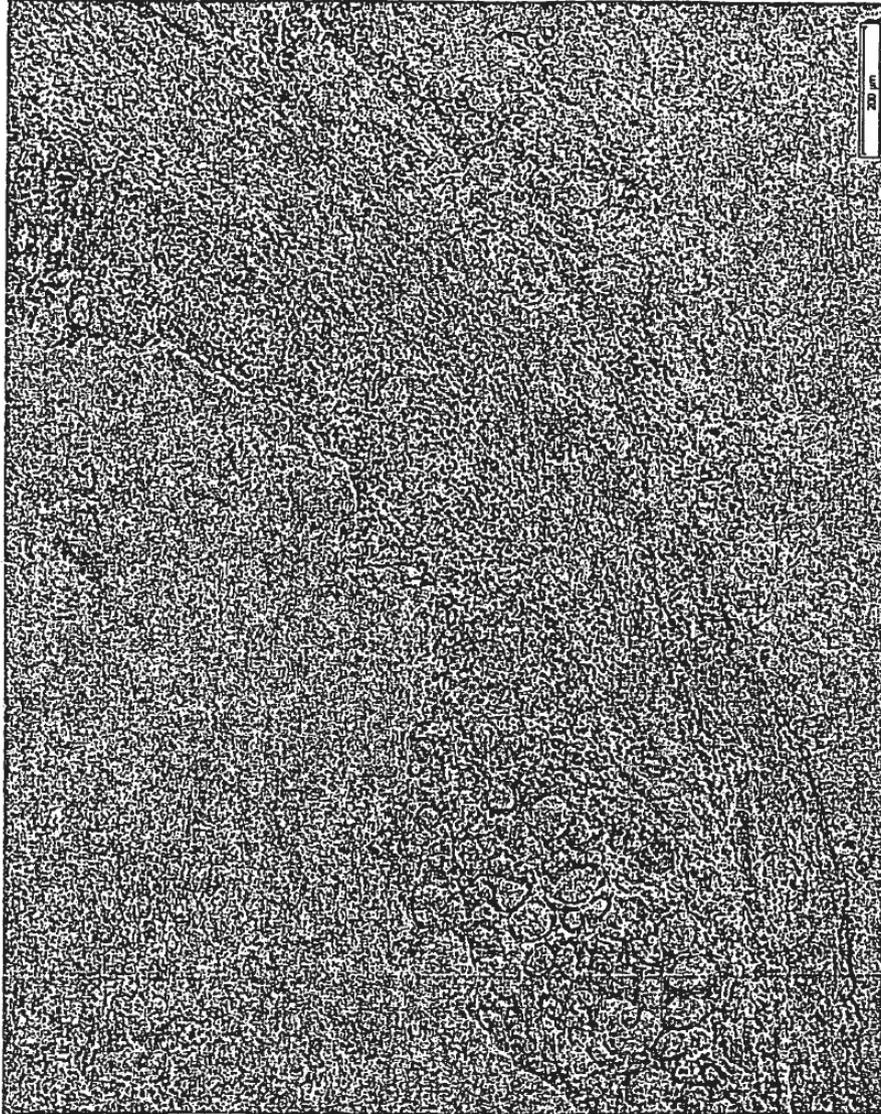


Fig. 11A



Fig. 11B