

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 939**

51 Int. Cl.:

A61K 35/44 (2015.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2007 PCT/CA2007/000781**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2007 WO07128115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2007 E 07719706 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2029149**

54 Título: **Células progenitoras inmuno-privilegiadas y moduladoras**

30 Prioridad:

05.05.2006 US 746500 P

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

26.09.2017

73 Titular/es:

**TISSUE REGENERATION THERAPEUTICS INC.
(100.0%)
790 Bay Street, Suite 512
Toronto ON M5G 1N8, CA**

72 Inventor/es:

**DAVIES, JOHN E.;
ENNIS, JANE;
GOMEZ-ARISTIZABAL, ALEJANDRO y
BAKSH, DOLORES**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 633 939 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 progenitoras inmuno-privilegiadas y moduladoras

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a células progenitoras que son inmunoprivilegiadas y/o inmunomoduladoras, su producción, su formulación y su uso terapéutico.

10 **Antecedentes de la invención**

La médula ósea adulta (BM) es la fuente más común de células mesenquimales madres/progenitoras (MSC) (también denominadas células estromales mesenquimales¹) que se definen funcionalmente por su capacidad de diferenciarse en forma de tejidos esqueléticos: hueso²⁻⁴, cartílago⁵⁻⁷, grasa⁸ y músculo⁹ in vitro. Las MSC se distinguen clásicamente del medio teterogéneo de las células a través de la adhesión al plástico de cultivo de tejidos y la formación de fibroblastos unitarios de colonias (CFU-F), cuya frecuencia son 1:100.000 - 1:500.000 células nucleadas en médula adulta¹⁰, y algunos estudios han identificado ahora un conjunto de marcadores con los que se clasifican las MSC. Esta baja proporción de MSC conduce a la necesidad de expansión de cultivos y la selección antes de su uso para alcanzar los números apropiados de células para cualquier tipo de terapia celular. Hay otras fuentes emergentes de MSC como: tejido adiposo¹², hueso trabecular¹³ e hígado fetal¹⁴ que tienen una frecuencia de CFU-F de: 1:32¹⁵, 1:636¹³ y 1:88.495¹⁴, respectivamente. Aunque el tejido adiposo parece que tiene la frecuencia más elevada de progenitores, el tiempo de duplicación de esas células varía en el intervalo entre 3,6 y 4,4 días¹⁵, y el procedimiento de extracción es complicado, invasivo y prolongado¹². La extracción de hueso trabecular da lugar a un rendimiento celular bajo (89 x 10⁶ células/gramo de hueso a partir de donantes jóvenes¹³), especialmente cuando se combina con la frecuencia de DFU-F; y es extremadamente invasiva, dando lugar a la morbilidad del sitio donante.

Son únicas entre estas nuevas fuentes de MSC las células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVC), que son una fuente fácilmente accesible y altamente proliferativa de células con un tiempo de duplicación de la población de 20 horas (dependiente del suero)¹⁶. La frecuencia de CFU-F en HUCPVC es 1:300 en el paso 0 pero aumenta hasta 1:3 en el paso 1¹⁷, que es órdenes de magnitud mayor que la médula ósea¹⁶. Por lo tanto, las HUCPVC representan una población de células con una proporción extremadamente elevada de MSC que proceden a dividirse muy rápidamente, haciéndolas así un candidato excelente para terapias mesenquimales clínicas. Estas células han sido usadas en diversos ensayos para determinar su fenotipo de expresión marcador y potencial de diferenciación^{16,18}, y se ha encontrado que son bioequivalentes, o rinden mejor, que las BM-MS.

Además de su capacidad para diferenciarse, las MSC tienen también usos inmunológicos potenciales ya que las BM-MS han mostrado tanto inmunoprivilegiadas como inmunomoduladoras¹⁹⁻²¹. Estos términos se refieren a la capacidad de una célula para evadir el reconocimiento a partir de un sistema inmune del hospedante no coincidente, y la capacidad de atenuar una respuesta en marcha por ese sistema, respectivamente. Las MSC de varias fuentes distintas de la médula ósea han sido ensayadas en cuanto a su inmunogenicidad en cultivos in vitro. Las MSC del tejido adiposo derivado de dermolipectomías de adultos se mostró que eran capaces de inmunoprivilegio e inmunomodulación in vitro²², mientras que las células de hígado fetal se encontró que eran capaces de evitar una respuesta inmune no coincidente, sin embargo, no fueron capaces de modular la alo-reactividad provocada por dos poblaciones no coincidentes de linfocitos^{23, 24}. Por tanto, la fuente de MSC afecta directamente a las capacidades inmunógenas de esas células.

Este trabajo in vitro ha comenzado a ser validado en ajuste clínico; por ejemplo, un muchacho se recuperó de una enfermedad aguda grave de injerto contra hospedante (GvHD) mediante la transfusión de médula ósea haploidéntica de su madre²⁵. Un año después del tratamiento, en comparación con un grupo de pacientes que padecía del mismo nivel de gravedad de la enfermedad, fue el único que vivía. Como este paciente inicial, un conjunto de 8 pacientes fue tratado con BM-MS, de los que 6 mostraron una remisión completa de los síntomas²⁶. Las BM-MS alógenas se usaron también en la enfermedad de Crohn para tratar pacientes que eran refractarios a los tratamientos actuales, y este tratamiento está actualmente en ensayos clínicos en los Estados Unidos^{27, 28}. Las MSC de hígado fetal han mostrado eficacia en el tratamiento temprano de osteogénesis imperfecta (OI). Las MSC de un hígado fetal de macho fueron trasplantadas a un feto de hembra de 32 semanas con OI grave, que padecía de diversas fracturas intrauterinas²⁹. A continuación del trasplante, el resto del embarazo evolucionó normalmente, y no hubo más fracturas. Este paciente fue sometido a seguimiento hasta 2 años después del nacimiento, y el niño mostró una curva de crecimiento normal y sufrió solamente 3 fracturas. Usando una sonda específica XY, el paciente se encontró que tenía un injerto de 0,3% en una biopsia ósea.

Además de células no diferenciadas, las BM-MS de conejo osteogénicamente inducidas se encontró que eran inmunoprivilegiadas e inmunomoduladoras in vitro, pero cuando fueron trasplantadas in vivo, la capacidad inmunomoduladora se perdió³⁰. Esto no afectaría a la función de las células, sin embargo, ya que solo requieren protección de una respuesta inmune con el fin de cumplir su función. En una inducción más implicada, se manipularon MSC de médula ósea de múridos para liberar eritropoyetina y se implantó en ratones, lo que dio lugar a

un injerto significativamente menor en comparación con testigos no manipulados³¹. Por tanto, la manipulación de MSC puede conducir a su pérdida de inmunomodulación y/o inmunoprivilegio y puede ser crucial para la supervivencia y función del injerto.

5 Hay una evidencia que apoya que el inmunoprivilegio de las MSC trasciende las barreras entre especies y pueden ser usadas xenógenamente. Esto se demostró en primer lugar por Bartholomew et al. que usaron BM-MSCHumanas en babuinos, y mostraron una supervivencia mejorada del injerto de piel²¹. Aunque el resultado final de este estudio fue positivo, el destino final específico de las células administradas no fue determinado. Wang et al. utilizaron células transfectadas GFP y análisis histológicos para estudiar la supervivencia de MB-MSCHenógenas, y mostraron que las células sobrevivieron hasta la finalización de la semana 11 sin inmunosupresión, sin embargo, hubo una reacción inmune aumentada del hospedante. Las MSC se ha informado también que sobreviven en trasplantes xenógenos en dos modelos cardíacos^{33, 34}. En un trabajo preliminar con HUCPVC, las células fueron suministradas por vía peritoneal en cámaras permeables. Después de 3 semanas, no hubo inflamación apreciable observada tras visualización macroscópica³⁵. Este es un trabajo preliminar alentador que indica la capacidad potencial no solamente para el inmunoprivilegio de las HUCPVC, sino también para su capacidad para ensayarlas en modelos de animales sin rechazo.

Los inventores investigaron las propiedades inmunoprivilegiadas e inmunomoduladoras de HUCPVC *in vitro* realizando: co-cultivos de HUCPVC con linfocitos no coincidentes y cultivos de linfocitos mixtos (MLC) poblados por dos donantes no coincidentes de HLA. También se estudiaron la muerte de HUCPVC, proliferación de linfocitos y activación con niveles variables de HUCPVC presentes en entornos de linfocitos desprovistos de sistema inmune y activados. Además, se investigó la necesidad del contacto celular para la observación de efectos inmunológicos.

Lu et al (Crit. Rev. Oncol. Hematol. 1996;22(2):61-78) hacen referencia al estado actual y posibles aplicaciones futuras de células madre derivadas de médula ósea, cordón umbilical, sangre y sangre periférica. Ennis et al. (Cytotherapy. 2008;10(2):174-81) hacen referencia a las propiedades inmunológicas *in vitro* de células perivasculares de cordón umbilical humano. El documento WO 2006/019357 A1 se refiere al aislamiento de células madre/progenitoras de membrana amniótica de cordón umbilical. Weiss et al. (2006) hacen referencia a la caracterización preliminar de células madre de matriz de cordón umbilical humano y un examen del efecto del trasplante en un modelo de roedores de la enfermedad de Parkinson. El documento US 2005/148074 se refiere a células progenitoras de gelatina de Wharton de cordón umbilical humano. Ryan et al (J Inflamm. 2005 Jul 26;2:8) hacen referencia a células madre mesenquimales y su capacidad para evitar un rechazo alógeno.

Sumario de la invención

Los inventores describen ahora en la presente memoria descriptiva una serie de experimentos que ilustran las capacidades inmunoprivilegiadas e inmunomoduladoras de HUCPVC al ser ensayadas en cultivos de linfocitos mixtos *in vitro* (HUCPVC) de una y dos vías. Además, cuando se realizaron MLC que ponen de manifiesto una disminución inducida de HUCPVC en la activación de linfocitos previamente estimulados. Los inventores muestran adicionalmente que la función inmunomoduladora de HUCPVC está mediada a través de un(os) factor(es) soluble(s) producidos tras el cultivo de las HUCPVC, ya que no es necesario el contacto celular para que se observe el efecto inmunomodulador. Además, los inventores ilustran que las HUCPVC son capaces de modular un MLC *in vitro* de dos vías y describen el uso de estas células para aplicaciones en terapias celulares, particularmente para modular la respuesta inmune.

Por tanto, la presente invención proporciona un agente seleccionado entre (1) células perivasculares de cordón umbilical y/o (2) un factor soluble inmunomodulador proporcionado en forma de un extracto de medio acondicionado mediante el crecimiento de HUCPVC, para ser usado en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una reacción inmune adversa.

La invención proporciona también un agente seleccionado entre (1) células perivasculares de cordón umbilical y/o (2) un factor soluble inmunomodulador proporcionado en forma de un extracto de medio acondicionado por factor de HUCPVC, para ser usado en la reducción de la enfermedad de injerto contra hospedante en un receptor de injerto mediante un método que comprende la etapa de exponer el injerto, antes de su trasplante, a una cantidad eficaz inmunomoduladora del agente.

La invención proporciona también un método *in vitro* para modular una reacción inmune entre linfocitos y un cuerpo reconocido por los linfocitos como extraño, que comprende la etapa de introducir, en una cantidad eficaz para inhibir o reducir dicha reacción inmune, un agente seleccionado entre (1) células perivasculares de cordón umbilical y/o (2) un factor soluble inmunomodulador proporcionado en forma de un extracto de medio acondicionado por el crecimiento de HUCPVC.

Una cantidad eficaz inmunomoduladora de (1) una población celular que comprende, y preferentemente consiste esencialmente, en células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVC) y/o (2) un factor soluble inmunomodulador producido tras cultivar dichas células puede ser administrado a un sujeto. El agente puede ser aplicado para tratar receptores de injertos alógenos o xenógenos, que incluyen células, tejidos y órganos, para

reducir la aparición o gravedad de una reacción inmune a los mismos, incluida la enfermedad de injerto contra hospedante. En un aspecto general, la presente invención proporciona por tanto un método in vitro para modular una reacción inmune entre linfocitos, como linfocitos de sangre periférica, y un cuerpo reconocido por los linfocitos como extraño, que comprende la etapa de introducir una formulación que comprende un vehículo fisiológicamente tolerable y células HUCPV o factores solubles inmunomoduladores que son extraíbles de las mismas, en una cantidad eficaz para modular y, particularmente, para inhibir o reducir esa reacción inmune.

También se expone el uso de células HUCPVC o un factor soluble inmunomodulador producir mediante las mismas en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una reacción inmune adversa, o para el tratamiento de un injerto antes del trasplante, para atenuar o reducir una reacción inmune entre el injerto y el receptor.

También se expone una formulación, en forma de dosificación unitaria o en forma de dosis múltiples, que comprende una cantidad eficaz inmunomoduladora de HUCPVC y/o un factor soluble inmunomodulador producido por las mismas, y un vehículo fisiológicamente tolerable para la misma.

Un extracto inmunomodulador, o una fracción inmunomoduladora del mismo, puede comprender uno o más factores solubles producidos mediante HUCPVC cultivadas.

Las células administradas pueden ser obtenidas y administradas sin almacenamiento criogénico.

Las HUCPVC administradas pueden ser células inmunoprivilegiadas e inmunomoduladoras. Las HUCPVC pueden carecer sustancialmente de los fenotipos de clase I y clase II de MHC. Las HUCPVC administradas pueden ser obtenidas descongelando una población de HUCPVC congeladas.

Las HUCPVC inmunoprivilegiadas administradas por ser tratadas por ingeniería genética e incorporar un transgen que codifique una proteína heteróloga de interés, particularmente, pero no exclusivamente, que incluya una proteína eficaz para manipular el sistema inmune como una proteína que aumente la inmunomodulación, y especialmente una proteína que inhiba una reacción inmune adversa, como CTLA4.

Estos y otros aspectos de la presente invención se describen más en detalle a continuación, haciendo referencia a las Figuras que se acompañan, en las cuales:

Breve referencia a las figuras

Figura 1: Recuentos de células HUCPVC después de 7 días en cultivo de tratamiento post-MMC (n = 2). Las células fueron tratadas con concentraciones variables de MMC durante 20 minutos a 37°C a 5% de CO₂ y fueron ensayadas en cuanto a su proliferación. Se observó que todos fueron significativamente inferiores al testigo (p < 0,001).

Figura 2: Proliferación de células dispuestas en placas en pocillos tratados y sin tratar con MMC. La proliferación se midió usando citometría de flujo para BrdU y se cuantificó usando intensidad de fluorescencia media. No hubo diferencia significativa entre los producidos tratados y sin tratar (p = 0,62).

Figura 3: Se midió la muerte de HUCPVC usando la intensidad de fluorescencia media (MFI) para anexina 5, un marcador de muerte celular temprana, después de 4 horas de co-incubación con PBL del donante 1 (n = 5). Hubo un aumento significativo en la expresión de anexina 5 en el cultivo con 10% de HUCPVC con relación al testigo (p = 0,01, indicado por *); este fue el único aumento significativo.

Figura 4: La proliferación de linfocitos se midió usando intensidad de fluorescencia media (MFI) para BrdU, después de 6 días de co-incubación con niveles variables de HUCPVC (n = 5). Hubo un aumento significativo de la expresión media de BrdU en el cultivo con un 10% de HUCPVC con relación al testigo (p = 0,02, indicada mediante *).

Figura 5: El número total de linfocitos se midió desde el día 1 al 6 a lo largo de tratamientos de 10 y 40% de HUCPVC añadidos los días 0, 3 ó 5 (n = 3). Se puede observar que en el día 6, los linfocitos testigos aumentan en número en respuesta unos a otros, mientras que los tratamientos con HUCPVC fueron significativamente inferiores independientemente del porcentaje de día añadido (p < 0,05, indicado mediante *).

Figura 6: El recuento de linfocitos totales se midió desde el día 1 al 6 a lo largo de tratamientos de 10 y 40% de HUCPVC añadidos en un inserto TransWell® (n 0 3). Se puede observar que en cualquier día, no hay diferencia significativa entre el testigo alógeno y los tratamientos con HUCPVC.

Figura 7: Las HUCPVC no aumentan el número de linfocitos en reposo o activados. La adición de HUCPVC no mostró un aumento significativo del número de células de linfocitos en comparación con los testigos sobre 6 días en cultivo (n = 6). Esta figura muestra los números medios de células + desviaciones típicas.

Figura 8: Expresión de BrdU de PBL en un co-cultivo con HUCPVC medido con citometría de flujo. El porcentaje de

células en división no aumenta con la adición de HUCPVC, independientemente de la dosis (n = 3). El testigo fue la expresión de BrdU de los PBL sin HUCPVC.

5 Figura 9. Las HUCPVC actúan a través de un factor soluble. Las HUCPVC son capaces de reducir significativamente el número de linfocitos en MLC, cuando se separan usando un inserto TransWell. El número de linfocitos testigos medio se ajusta a 100% en la figura para reducir la variación en recuentos entre experimentos. Esta figura muestra recuentos de linfocitos en porcentaje medio + desviación típica (n = 6). ($p^* < 0,05$).

10 Figura 10: Las HUCPVC reducen la expresión de CD25 en co-cultivos de linfocitos activados. Esta figura ilustra la expresión de porcentaje medio (barra) y la intensidad de fluorescencia media (línea) de expresión de CD25 sobre linfocitos co-cultivados con y sin 10% de HUCPVC. Los linfocitos fueron teñidos con PKH26 para asegurar una detección apropiada de la población, y los resultados están encerrados en la expresión de PKH26. Las medias son \pm desviaciones típicas (n = 3). ($p < 0,05$).

15 Figura 11: Expresión de CD45 en MLC de dos vías (con linfocitos activados) con HUCPVC. Los linfocitos activados fueron teñidos con PKH26 para delinearlos de la población inactiva, y los resultados están incluidos en la expresión de PKH26. Se muestra los porcentajes de expresión (bar* $< 0,05$) y MFI (línea + p $< 0,05$) (n = 3). El testigo fue la expresión de CD45 de ATL sin HUCPVC.

20 Figura 12: (A) HUCPVC transfectados con proteína fluorescente verde (GFP), con un nivel de expresión de 97,89% (B). Estas células fueron transfectadas con un vector lentiviral, usando técnicas establecidas; y

Figura 13: Resultados de la ordenación de genes Pathfinder cancerígenos de alta producción derivados de médula ósea (A) y HUCPVC (B). Los genes entre paréntesis representan los genes que están ausentes

25

Descripción detallada y realizaciones preferidas

30 La presente invención se refiere a aplicaciones nuevas y clínicamente útiles de HUCPVC, particularmente para ser usadas en el tratamiento de estados que se beneficiarían de una reducción en la respuesta adversa provocada por cuerpos aloantígenos y xenoantígenos, que resultan de una respuesta inmune adversa por el hospedante, o de una reacción inmune adversa por el cuerpo antígeno para el hospedante. Más generalmente, la presente invención se refiere a un método en el que HUCPVC y/o factores solubles producidos por los mismos son introducidos para inhibir o reducir reacciones inmunes entre linfocitos y cuerpos reconocidos como extraños.

35 Como se usan en la presente memoria descriptiva, estos cuerpos pueden incluir cualquier material vivo o muerto que es suministrado o es invasivo para el cuerpo de un mamífero, incluido un ser humano. Estos cuerpos antígenos son los que en el transcurso normal provocan una respuesta inmune por el receptor o por el cuerpo, por ejemplo, cuando el propio cuerpo comprende células inmunes que incluyen linfocitos, como médula ósea, tejido o injerto de órgano. Los cuerpos antígenos son cuerpos que son antígenos entre individuos en la misma especie; los cuerpos xenoantígenos son antígenos entre individuos de especies diferentes. Los cuerpos autólogos son cuerpos del receptor. Los cuerpos pueden ser cuerpos no coincidentes de HLA. Los cuerpos pueden comprender linfocitos no coincidentes de HLA.

45 Aunque el mecanismo de la acción inmunomoduladora HUCPVC no está completamente comprendida, se espera que las HUCPVC y los factores solubles producidos por ellas tengan un efecto sobre las poblaciones celulares principales implicadas en el reconocimiento y eliminación de aloantígenos, como células que presentan antígenos, células T incluidas células T citotóxicas y células asesinas naturales.

50 Las HUCPVC útiles en la presente descripción están descritas en la bibliografía, como se indicó con anterioridad, y se caracterizan más particularmente como células progenitoras extraíbles de la zona perivascular del cordón umbilical incluido, pero sin limitación, el cordón umbilical humano. Usando el protocolo descrito en la presente memoria descriptiva, se apreciará que las células perivasculares de cordón umbilical pueden ser extraídas también de la vasculatura del cordón umbilical de otros mamíferos que incluyen caballos, vacas, cerdos, primates y similares. La zona perivascular comprende la gelatina de Wharton asociada con la vasculatura del cordón umbilical y externa al mismo. Las HUCPVC son extraíbles de la gelatina de Wharton que se sitúa en la región perivascular, usando métodos estándar de digestión como con colagenasa o enzimas relacionadas adecuadas para suprimir tejido conectivo asociado, como se describe, por ejemplo, por Sarugaser et al., 2005. Preferentemente, las HUCPVC son extraídas solamente a partir de las células perivasculares y no a partir de la gelatina de Wharton que se extiende más allá de la región perivascular, o a partir de tejidos o fluidos que son parte o internas de la propia vasculatura.

60 Esto evita la contaminación por otras células en el cordón, generalmente. De forma alternativa, se puede realizar la extracción de la gelatina de Wharton sin selección de células perivasculares, con la condición de que la población celular resultante esté enriquecida en HUCPVC usando, por ejemplo, citometría de flujo para enriquecer en células progenitoras que tengan el fenotipo y las características indicadas en la presente memoria descriptiva. Las HUCPVC además se caracterizan por una proliferación relativamente rápida, exhibiendo un tiempo de duplicación, en cada uno de los pasos 2-7, de aproximadamente 20 horas (dependiente del suero) cuando se cultivan bajo condiciones adherentes estándar. Fenotípicamente, las HUCPVC se caracterizan, en la extracción, como Oct 4-, CD14-, CD19-,

65

CD34-, CD44+, CD45-, CD49e+, CD90+, CD105(SH2)+, CD73(SH3)+, CD79b-, HLA-G-, CXCR4+, c-kit+. Además, HUCPVCs contiene células que son positivas para CK8, CK18, CK19, PD-L2, CD146 y 3G5 (un marcador de pericitos), a niveles mayores que en poblaciones celulares extraídas de fuentes de gelatina de Wharton distintas de la región perivascular.

5 Las HUCPVC pueden expresar también niveles variables de clase I de MHC, de 0-100% dependiendo de la manipulación. Al someter las células extraídas a un ciclo de congelación-descongelación como se describe, por ejemplo, por Sarugaser et al., 2005, se obtiene una población de HUCPVC que es sustancialmente negativa para clase I de MHC y clase II de MHC (95%). Como se usan en la presente memoria descriptiva, las HUCPVC se
10 considera que son "sustancialmente" negativas para clase I de MHC y clase II de MHC si el número de células residentes en una población dada y que expresan uno o los dos fenotipos no es de más de aproximadamente 20% de la población celular, por ejemplo, no más de 15%, 10%, 5% o menos de la población total de HUCPVC. Se puede hacer una determinación usando técnicas estándar de citometría de flujo con un anticuerpo etiquetado apropiado. Esta población de HUCPVC negativa de doble MHC es particularmente útil en los métodos descritos en la presente memoria descriptiva. Se apreciará que la población de HUCPVC administrada puede comprender células negativas
15 de clase I MCH (opcionalmente expandidas) recientemente extraídas, o las HUCPVC negativas de doble MCH descongeladas. Las HUCPVC negativas de doble MHC es mucho menos probable que estimulen una respuesta inmune en un receptor y consecuentemente su uso clínico es preferido en la presente invención. Sin embargo, debe apreciarse que la manipulación del fenotipo de MHC no es esencial. Las propiedades inmunoprivilegiadas e inmunomoduladoras se observan también en HUCPVC recientemente extraídas que han sido opcionalmente almacenadas y no solamente en HUCPVC que han sido manipuladas mediante congelación/descongelación.

Las HUCPVC pueden ser explotadas por sus propiedades inmunoprivilegiadas e inmunomoduladoras, en un ajuste clínico que se beneficie de ellas. El término "inmunoprivilegiada" es usado en la presente memoria descriptiva con
25 referencia a célula, como HUCPVC, que cuando son incubadas con linfocitos de sangre periférica, no estimulan la proliferación de PBL hasta un alcance estadísticamente significativo, o retienen su viabilidad a un nivel estadísticamente significativo, particularmente cuando son ensayadas usando el denominado ensayo MLC de una vía establecido en esta técnica e ilustrado en la presente memoria descriptiva.

30 El término "inmunomodulador" es usado en la presente memoria descriptiva en referencia a las HUCPVC para atenuar, reducir o inhibir la reacción entre poblaciones no coincidentes de linfocitos, según se pone de manifiesto por una reducción en la mortalidad de una población de linfocitos, o por un aumento de la viabilidad de una población de linfocitos, según se determina usando, por ejemplo, la denominada reacción de linfocitos mixtos de una o dos vías (MLR).

35 Además, se ha encontrado que los factores exudados por HUCPVC cultivadas pueden solos ejercer un efecto inmunomodulador, del tipo observado cuando se usan HUCPVC intactas. Por tanto, los factores solubles extraídos producidos tras el cultivo de HUCPVC son usados solos o en combinación con las células HUCPVC, como inmunomoduladores.

40 Los uno o más factores inmunomoduladores exudados tras cultivar HUCPVC se denominan en la presente memoria descriptiva factores solubles y son extraíbles del medio en el que se cultivan las HUCPVC. Los factores solubles inmunomoduladores pueden ser proporcionados en forma de un extracto obtenido cuando las células HUCPVC son retiradas del medio acondicionado por su crecimiento, como mediante centrifugación. Cuando se emplea la
45 centrifugación, el extracto es proporcionado en forma de la materia sobrenadante. Las condiciones de cultivo de HUCPVC adecuadas se ilustran en la presente memoria descriptiva. El extracto es obtenido separando las células del medio de cultivo acondicionado, como mediante centrifugación. Los factores solubles pueden ser proporcionados en forma de una fracción inmunomoduladora de este extracto. Una fracción de extracto que tiene actividad inmunomoduladora es útil también en la presente memoria descriptiva, y puede ser identificado usando las reacciones de linfocitos mixtos descritas en la presente memoria descriptiva. Estas fracciones de extractos pueden ser obtenidas naturalmente fraccionando el extracto de HUCPVC usando cualquier técnica conveniente que incluye extracción con disolventes, fraccionamiento por HPLC, centrifugación, exclusión de tamaños, fraccionamiento
50 gradiente salino u osmótico y similares. Las fracciones eluidas o recogidas pueden ser sometidas cada una al MLR y las fracciones activas para inmunomodulación pueden ser identificadas y puede ser clínicamente usada una fracción con actividad inmunomoduladora de la manera descrita en la presente memoria descriptiva.

Por tanto, la presente descripción comprende el uso de extracto inmunomoduladores o fracciones inmunomoduladoras de los mismos que comprende factores solubles exudados durante el cultivo de HUCPVC.

60 El uso de las HUCPVC y sus poblaciones que son inmunoprivilegiadas y/o inmunomoduladoras implica su recogida, opcionalmente su expansión, además opcionalmente su almacenamiento criogénico y reavivamiento a partir del estado congelado y su posterior formulación para una administración al receptor previsto. El régimen particular de manipulación, dosificación y tratamiento dependerá naturalmente de numerosos factores, que incluyen el tipo y gravedad de la enfermedad o estado que va a ser tratado. Para estados inmunológicos (por ejemplo, GvHD, estados autoinmunes), el tamaño de la población de HUCPVC, es decir, la dosificación administrada al receptor, se situará
65 generalmente en el intervalo de 0,01 a aproximadamente 5 millones de células por kilogramo de peso corporal del

receptor. Para el suministro, las células son proporcionadas adecuadamente en forma de una formulación que comprende adicionalmente un vehículo fisiológicamente tolerable, es decir, un vehículo que sea tolerable no solamente por las células sino también por el receptor. Adecuadamente, las células se proporcionan en una formulación esterilizada que comprende, como vehículo, un vehículo fisiológicamente tolerable como solución salina, solución salina tamponada como PBS, medio de cultivo celular o líquido similar que contiene cualquiera de:

5 aminoácidos esenciales, factores de crecimiento, citoquinas, vitaminas, antibióticos o medios químicamente definidos exentos de suero, etc., o agua esterilizada. Las células formuladas pueden ser administradas mediante infusión o mediante inyección usando, por ejemplo, volúmenes en el intervalo de 1-25 ml.

10 Los factores solubles inmunomoduladores producidos por HUCPVC y extraíbles a partir de un medio de cultivo de HUCPVC agotado son análogamente solubles de la manera anteriormente descrita con referencia a HUCPVC intactas. El propio extracto puede constituir la composición farmacéutica, que comprende así el agente activo en la forma de factor soluble inmunomodulador, y el medio que constituye el vehículo fisiológicamente tolerable. De forma alternativa, el extracto puede ser secado, para retener el (o los) factor(es) soluble(s) y ser reconstituido en un

15 vehículo diferente, como solución salina tamponada con fosfato. El tamaño de la dosis y régimen de dosificación adecuados para aplicaciones clínicas pueden ser determinados con referencia al efecto de dosificación para HUCPVC intactas. El equivalente de dosis de extracto puede ser determinado calculando las potencias relativas del extracto y células intactas en el ensayo MLR, o cualquier alternativa para el mismo que sea un reflejo del entorno clínico en el que será utilizada la terapia, como en modelos de animales apropiados de la indicación dirigida a diana.

20 En uso, las HUCPVC formuladas o factores solubles producidos mediante las mismas son administrados para tratar sujetos que experimentan o están en riesgo de desarrollar una reacción inmune adversa. Estos objetos incluyen particularmente sujetos que reciben o van a recibir un trasplante o injerto alógeno o xenógeno, en la forma de células como médula y sangre periférica, tejidos que incluyen tejidos de piel y vasculares que incluyen tejido

25 coronario y tejido gastrointestinal o un órgano como hígado, riñón, corazón, pulmón, etc. Las HUCPVC formuladas son útiles particularmente para reducir la aparición o gravedad de la enfermedad de injerto contra hospedante, un estado que resulta de un ataque inmune de los tejidos del hospedante mediado por linfocitos presentes en el injerto del donante. Las HUCPVC pueden ser usadas para tratar el injerto mediante incubación con el mismo durante un período de tiempo, antes del trasplante, suficiente para reducir o detener la actividad de los linfocitos residentes en el injerto. Esta incubación requeriría la inclusión de HUCPVC (a partir de una reserva de nueva aportación o congelada) a una dosis de 5-60% de los linfocitos totales del injerto (según se determina mediante el volumen de sangre presente en el injerto), preferentemente 10-40% entre 4 y 10 días, con el fin de parar la proliferación antes de la implantación. En el caso de injerto de órganos, el órgano sería incubado con HUCPVC (en suspensión en un

30 vehículo fisiológicamente tolerable como se mencionó anteriormente), a partir de una reserva de nueva aportación o congelada, a una dosis de 0,01 a 5×10^3 células por gramo de masa del órgano, antes de la implantación, durante un período de tiempo que provoque que los linfocitos del órgano se hagan inactivos. Para sujetos que sean receptores de injertos, las HUCPVC son administradas deseablemente a través del tejido que rodea directamente el órgano alógeno para el receptor antes (por ejemplo, en horas), de forma simultánea o posterior al injerto (por ejemplo, en horas después, o posteriormente en la medida necesaria para regular la reacción inmune). Las

35 HUCPVC pueden ser administradas, lo más adecuadamente, en el sitio del injerto, como mediante infusión o inyección, ya sea subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. El receptor puede ser tratado en el momento del injerto por infusión con dosis de HUCPVC en el intervalo de 5×10^4 a 5×10^7 células por kg de peso corporal, como aproximadamente 1 a 5×10^6 células. Las células son formuladas en 10 ml de solución salina normal con albúmina de suero humano al 5%. Pueden ser usadas dos o más infusiones, que dura cada una aproximadamente 10-15

40 minutos. Las células pueden ser implantadas también en una formulación de liberación lenta que permita la liberación de células viables a lo largo del tiempo en el sitio de implantación (como intraperitoneal, intramuscular, etc.). Los vehículos adecuados para esta finalidad incluyen gelatina, ácido hialurónico, alginato y similares. Las HUCPVC pueden ser utilizadas para tratar estados inmunológicos como GvHD que están en curso, y posiblemente son refractarios a otros tratamientos. Las HUCPVC o los factores solubles exudados son útiles por tanto para tratar

45 sujetos afectados con leucemias, anemias aplásticas y deficiencias enzimáticas o inmunes para las que están indicados los trasplantes de células inmunes o tejidos que las contienen.

La administración de HUCPVC o los factores solubles tiene aplicación también en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como enfermedad de Crohn, lupus y esclerosis múltiple así como artritis reumatoide, diabetes mellitus

55 dependiente de insulina de tipo 1, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, enfermedad de inflamación intestinal, dermatitis, meningitis, púrpura trombocitopérmica trombótica, síndrome de Sjorgren, encefalitis, uveitis, deficiencia de adhesión de leucocitos, fiebre reumática, síndrome de Reiter, artritis sorriática, esclerosis sistémica progresiva, cirrosis biliar primaria, miastenia grave, lupus eritematoso, vasculitis, anemia perniciosa, enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo, síndrome de Reynard, glomerulonefritis, hepatitis activa crónica,

60 enfermedad celíaca, complicaciones autoinmunes del SIDA, espondilitis anquilosante y enfermedad de Addison. La administración de HUCPVC en este caso es por vía intravenosa en un vehículo fisiológicamente tolerable (como se mencionó anteriormente, con una dosis que varía en el intervalo de 0,1 - 10×10^6 células/kg de peso corporal. Puede ser necesario más de una dosis, y la dosificación puede ser repetida en la medida necesaria.

65 En segundo lugar, las HUCPVC pueden ser usadas para tratar deficiencias de proteínas/enzimas, en las que las HUCPVC han sido transfectadas con el gen necesario para producir la proteína/enzima deseada. Este

procedimiento puede incluir transducción (incluidas, pero sin limitación: lentiviral, retroviral y adenoviral) y transfección (incluidas, pero sin limitación: nucleofección, electroporación, liposomal) y son transfusionadas a un paciente que padece una deficiencia. La dosis administrada al receptor se situará generalmente en el intervalo de 0,01 a aproximadamente 5 millones de células por kilogramo de peso corporal del receptor. Las HUCPVC producirán seguidamente la proteína o enzima de interés constitutivamente.

Finalmente, las HUCPVC pueden ser tratadas por ingeniería genética para introducir transgenes, a través de los métodos de transfección anteriormente mencionados, para ser usadas como vacunas con el fin de generar grandes cantidades para una administración a personas en riesgo de exponerse a virus/antígenos específicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracciones celulares

HUCPVC

Se obtuvo en consentimiento ético para esta investigación de la Universidad de Toronto, así como del Centro de Ciencias de la Salud del Sunnybrook & Women's College. Los cordones umbilicales se recogieron de partos por cesárea asépticos de bebés a término, tras obtener el consentimiento informado de ambos padres. Los cordones fueron inmediatamente transportados a la Universidad de Toronto donde fueron extraídas células de la zona perivascular bajo condiciones esterilizadas como se informó previamente¹⁶. De forma breve, se cortaron secciones de 4 cm de cordón y se separó el epitelio. Seguidamente fueron extraídos los vasos, incluyendo su gelatina de Wharton circundante, se ataron en un bucle para evitar la digestión de músculos lisos y fueron digeridos durante una noche en una solución de colagenasa. Tras la separación del digesto el día siguiente, las células fueron aclaradas en cloruro de amonio para lisar cualesquiera glóbulos de la sangre del cordón. A continuación de esto, las células fueron aclaradas y dispuestas en placas en α -MEM al 85% que contenía 5% de suero bovino fetal y 10% de antibióticos (penicilina G a 167 unidades/ml; Sigma, gentamicina 50 μ g/ml; Sigma y anfotericina B 0,3 μ g/ml) a una densidad de 4.000 células/cm². Las células son pasadas cuando alcanzan una confluencia de 75-80%, lo que es aproximadamente cada 6-7 días.

MHC -/- HUCPVC

Se lavaron poblaciones de células de ensayo de $> 1 \times 10^5$ células en PBS que contenía 2% de FBS y se volvieron a poner en suspensión en PBS + 2% FBS con concentraciones de saturación (dilución de 1:100) de la IgG1 HLA-A,B,C-PE del siguiente ratón conjugado (BD Biosciences nº 555558, Lote M074842) (MHC II) y CD45-Cy-Cy-cromo (BD Biosciences nº 555484, Lote 0000035746) durante 30 minutos a 4°C. La suspensión celular se lavó dos veces con PBS + 2% de FBS y se volvió a poner en suspensión en PBS + 2% de FBS para un análisis en un citómetro de flujo (XL, Becton-Coulter, Miami, FL) usando el software ExpoADCXL4 (Beckman-Coulter). La tinción positiva se definió como la emisión de una señal de fluorescencia que sobrepasaba los niveles obtenidos por $>99\%$ de células de la población testigo teñida con anticuerpos de isotipos coincidentes (IgG1 de ratón conjugado a FITC-, PE- y Cy-cy-cromo, patrones de isotipos monoclonales κ , BD Biosciences), que se confirmó mediante fluorescencia positiva de muestra BM humana. Para cada muestra, se recogieron al menos 10.000 acontecimientos en modo de lista. Todos los gráficos fueron generados en software de análisis EXPO 32 ADC.

Las células unidas fueron sub-cultivadas (pasadas) usando solución de tripsina al 0,1% después de 7 días, en cuyo momento exhibieron una confluencia de 80-90% según se observó mediante microscopía óptica. Tras el paso, las células fueron observadas mediante citometría de flujo en cuanto a la expresión de MHC-A, B, C, MHC-DR, DP, DQ y CD45. Seguidamente se dispusieron en placas en matraces de poliestireno de cultivo de tejidos T-75 a 4×10^3 células/cm² en SM y se trataron con Dex 10^{-8} M, β -BP 5 mM y 50 μ g/ml de ácido ascórbico para ensayar la capacidad osteogénica de estas células. Estos matraces fueron observados los días 2, 3, 4, 5 y 6 de cultivo en cuanto a la formación de DFU-O, o nódulo óseo. Cualesquiera células residuales del procedimiento de pasado fueron también crioconservadas para un uso futuro.

Se prepararon partes alícuotas de 1×10^6 células PVT en un volumen total de 1 ml que consistía en 90% de FBS, 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma D-2650, Lote nº 11K2320) y se pipetearon en crio-viales de polipropileno de 1 ml. Los viales se colocaron en un congelador a -70°C durante una noche y se transfirieron el día siguiente a un congelador a -150°C para un almacenamiento a largo plazo. Después de una semana de crio-conservación, las células PVT fueron descongeladas y observadas mediante citometría de flujo en cuanto a la expresión de MHC-A,B,C, MHC-DR,DP,DQ y CD45. Se usó un segundo protocolo en el que las células PVT fueron descongeladas después de una semana de crioconservación, vueltas a cultivar durante una semana, sub-cultivadas y a continuación nuevamente analizadas mediante citometría de flujo en cuanto a la expresión de MHC-A, B, C, MHC-DR, DP, DQ y CD45.

No se apreció que la frecuencia de MHC-/- en la población de nueva aportación se mantenga a través de varios pasos. Cuando las células de nueva aportación son congeladas después de pasar, a -150°C durante una semana y a continuación inmediatamente analizadas en cuanto a fenotipo de MHC, esta población analizada exhibe una

frecuencia considerablemente aumentada de células del fenotipo MHC $-/-$. En particular, el primer paso de células crioconservadas aumenta la población relativa de células MCH $-/-$ hasta más de 50% y la congelación y pasos posteriores de esas células produce una población de MHC $-/-$ mayor que 80%, 85% y 95%.

5 *Linfocitos*

Se extrajeron linfocitos de sangre periférica (PBL) de sangre heparinizada de donantes sanos. La separación celular se consiguió mediante un gradiente de densidad de Ficoll-Paque® PLUS (Amersham Biosciences nº 17-1440-03) en el que las células fueron centrifugadas durante 35 minutos a 380 x g. La capa leucocitaria se separó y se sometió a recuento usando un dispositivo ViCell-XR® (Beckman Coulter) con un protocolo específico para linfocitos según se determina mediante el tamaño de células y núcleos. Las células se dispusieron seguidamente en placas en la medida adecuada para las necesidades del ensayo en medios RPMI-1640 al 80% (Sigma nº R5886) que contenían HEPES (25 mmol/l), L-glutamina (2 mmol/l), suero bovino fetal al 10% y antibióticos al 10%.

15 Cultivos de linfocitos mixtos

Mitomicina C

Con el fin de realizar MLCs de una vía, las HUCPVC y una de las poblaciones PBL tienen que permanecer inactivas. Esto se consigue tratando las células con mitomicina C (MMC) a una concentración y tiempo ajustados, permitiendo que la MMC se adhiera al DNA y evite la división. Esta concentración se determinó mediante una curva de titulación de MMC incubada durante 20 minutos a 37°C (5% de CO₂) con una población celular de partida de 5000 células en un pocillo de una placa de 96 pocillos. Se ensayaron concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 75 µg/ml de MMC en medios regulares (85% de α -MEM, 5% de FBS, 10% de antibióticos) y posteriormente se lavaron dos veces con PBS para separar cualesquiera restos de la MMC. Los pocillos se sometieron a recuento después de una semana para valorar la proliferación. Es esencial que todos los restos de MMC sean separados con el fin de no afectar la capacidad proliferadora de los linfocitos cuando las poblaciones celulares se combinan en un MLC. Para asegurar esto, pocillos vacíos de una placa de 96 pocillos (Falcon) fueron tratados con MMC y lavados como para el protocolo. Seguidamente fueron añadidos linfocitos y fueron ensayados en cuanto a su proliferación en comparación con pocillos normales testigos.

Ensayos de inmunoprivilegio

Se dispusieron en placas triplicados de 1×10^4 HUCPVC (se ensayaron tanto de nueva aportación como congelados) en placas de 96 pocillos (n = 5). Una vez que todas las células se unieron (después de aproximadamente 2 horas), fueron tratadas con MMC a 20 µg/ml. Seguidamente las HUCPVC fueron aclaradas y se añadieron a cada pocillo 10^5 PBL del donante 1. Las placas fueron incubadas a 37°C con aire con 5% de CO₂ en medios RPMI-1640 al 80% que contenían HEPES (25 mmol/l), L-glutamina (2 mmol/l), 10% de suero bovino fetal y 10% de antibióticos. Después de 6 días los linfocitos presentes en el cultivo con HUCPVC fueron sometidos a recuento usando el contador ViCell y se compararon con los testigos. Para el ensayo de muerte celular, las placas se dejaron incubar durante cuatro horas y las HUCPVC fueron valoradas en cuanto a marcadores de muerte celular de fase temprana y tardía, anexina 5 (R&D Systems TA4638) y 7-amino-actinomicina D (7-AAD), respectivamente. Estos niveles fueron medidos y comparados usando citometría de flujo en una entidad Beckman Coulter Flow-Center. Para el ensayo de proliferación de PBL, las células se dejaron incubar durante 6 días, después de lo cual fueron teñidas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), un análogo de base de timidina, y fueron medidas usando citometría de flujo. Se usaron testigos de PBL solos y HUCPVC solas para ambos ensayos.

Para MLC de una vía, las HUCPVC se dispusieron en primer lugar en placa en una placa de 96 pocillos por triplicado (1, 2, 3 y 4×10^4 células por pocillo), se trataron con MMC y se lavaron con PBS. Se recuperaron PBL de dos donantes no coincidentes seleccionados entre una agrupación de donantes potenciales (no coincidentes en 5 de 6 HLA ensayados: Donante 1 HLA-A *01, *02, B *07, *18; DRB1 *15, *--; Donante 2 A *01, *--; B *08, *--; DRB1 *03, *..). La tipificación se realizó en el Regional Histocompatibility Laboratory (Toronto General Hospital, Toronto, ON) usando técnicas de asignación de DNA a baja resolución. Después del tratamiento con Ficol, los linfocitos del donante 2 fueron tratados con MMC para que fueran inactivos. Seguidamente las células se centrifugaron y se lavaron y se añadieron a una placa de 96 pocillos a 10^5 células por pocillo. Los linfocitos del donante 1 fueron añadidos a 10^5 células por pocillo y las tres poblaciones celulares se dejaron co-incubar durante 6 días, después de lo cual fueron teñidas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), un análogo de base de timidina. Seguidamente se realizó una citometría de flujo para BrdU sobre los linfocitos para ensayar la proliferación. A continuación de esto, se realizó un ensayo similar, siendo medido el resultado mediante el uso de recuentos diarios de linfocitos (desde el día 1 al 6) usando el contador celular ViCell-XR®, con un protocolo específico para linfocitos. Todos los resultados fueron comparados con testigos alógenos y autógenos de ambos donantes.

Ensayos de inmomodulación

65 Los MLC de dos vías incorporan dos poblaciones de PBL de donantes no coincidentes (los mismos donantes que anteriormente), siendo permitido a ambos que proliferaran. De forma breve, se añadieron 1×10^5 PBL de ambos

donantes a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se dejaron incubar durante seis días. En el transcurso del experimento, se añadieron $1 \text{ ó } 4 \times 10^4$ HUCPVC a pocillos por triplicado en los días 0, tres o cinco con el fin de analizar la eficacia de las HUCPVC si ya ha comenzado una reacción inmune. Las relaciones de 10 y 40% de HUCPVC:PBL se escogieron ya que ambas mostraron resultados positivos previamente y, por tanto, fueron escogidas como los niveles bajo y elevado de inclusión de HUCPVC. Las muestras de cada placa se sometieron a recuento cada día usando el contador celular ViCell-XR® y se compararon con testigos autólogos y alógenos.

Factor soluble

Se realizó nuevamente el ensayo MLC de dos vías, sin contacto celular directo de HUCPVC a PBL para determinar si el efecto apreciado era debido a un factor soluble, o si era necesario el contacto directo. Las HUCPVC ($1 \text{ y } 4 \times 10^4$ células por pocillo) se cultivaron en un inserto Transwell® (Corning) para una placa de 24 pocillos y se dejó que se uniera durante aproximadamente 2 horas. Una vez que se unieron, el inserto fue transferido a la placa de 24 pocillos que contenía un co-cultivo de poblaciones de PBL del donante 1/donante 2 (mismos donantes que anteriormente) ($n = 3$). Los números de linfocitos se contaron diariamente durante seis días y se compararon con los testigos autólogos y alógenos usando el dispositivo ViCell-XR®.

Activación de linfocitos

Se realizaron ensayos de inmunoprivilegio y MLC de dos vías como se mencionó anteriormente. El punto final de este ensayo fue un análisis citométrico de flujo de los linfocitos en cuanto a la presencia de IL-2R (CD25) (Becton Dickinson, nº 555431), un marcador de linfocitos activados. Este ensayo se realizó durante 6 días para determinar si las HUCPVC provocaron un aumento o disminución en la activación de linfocitos. Los linfocitos fueron también co-teñidos con CD45 para asegurar que se obtuvo una población celular apropiada. Los testigos negativos fueron cultivos de linfocitos sin HUCPVC añadidas y sin teñir.

Generación de línea de células T activada

Se extrajeron PBL de los donantes 1 y 2 como anteriormente y se separaron usando el gradiente de Ficol. Las células se contaron y las células del donante 2 se hicieron inactivas con MMC. Se dispusieron en placas 106 células de donante 1 en una placa de 24 pocillos y se estimularon con una relación 1:1 de PBL inactivos del donante 2. Las células fueron alimentadas con 2 ml de medios RPMI-1640 (complementados con 10% de suero y 10% de complementos como anteriormente) y se dejaron activar. Los medios se cambiaron tras un cambio perceptible de su color a amarillo (~3 días). Después de ~11 días (o cuando los medios cambiaron de color en 3 días), las células fueron extraídas y contadas. Se volvieron a disponer en placas a 10^6 por pocillo, y se volvieron a estimular con una relación 1:1 de PBL inactivos del donante 2. Tras la segunda inactivación, se añadió IL-2 a una concentración de 100 U/ml (BD Biosciences nº 354043) cada 2 días con alimentación. Cuando los medios de volvieron amarillos antes de 3 días, las células se extrajeron, se contaron y se escindieron. A continuación de este procedimiento, las células estaban listas para ser usadas como linfocitos T activados (ATL), son antibióticos específicos para el donante 2. El co-cultivo de PBL y las MLC de dos vías se llevaron a cabo como anteriormente y se ensayaron en cuanto a la proliferación celular y expresión de CD25.

Marcado de linfocitos

Con el fin de visualizar y cuantificar la diferencia entre dos poblaciones de linfocitos, se usó PKH26 (Sigma, nº PKH26-GL). El PHK26 es un colorante de membrana no citotóxica con una semivida prolongada (~100 días). Las células se tiñeron como para el protocolo suministrado con el producto: los linfocitos fueron tripsinizados, reunidos y sedimentados; el colorante diluido fue seguidamente añadido a la suspensión celular durante 2 a 5 minutos (2 ml de solución de PHK26 2×10^{-6} molar). Después de la tinción, se añadió un volumen igual de suero para detener la reacción; las células se pusieron en suspensión en medios, tras centrifugar y lavar varias veces. La mancha fue seguidamente visualizada en el microscopio de fluorescencia para asegurar una para asegurar que tuvo lugar una absorción apropiada del colorante. Las células usadas para la tinción fueron ATL obtenidas del donante 1, Esta glóbulos rojos fueron incluidos en un MLC con células sin teñir del donante 2 y HUCPVC. El punto final de este ensayo fue una citometría de flujo para CD45 (BD nº 555482) y CE25, albergadas en presencia o ausencia de PKH26. Los testigos negativos fueron células sin teñir y MLC sin HUCPVC.

Transfección

En primer lugar, 293 células son transfectadas con el DNA deseado y plásmidos (DNA vector, 10 µg de plásmido de expresión gag/pol, 10 µg de ese plásmido de expresión, 5 µg de plásmido de expresión de VSV-G con CaCl_2 2,5 M). Estas se dejan incubar durante una noche, después de lo cual se cambia el medio. Las células se dejan seguidamente con este medio durante tres días más, después de lo cual la materia sobrenadante de las células se recoge y se filtra. La materia sobrenadante viral se concentra seguidamente mediante ultracentrifugación (50000 g durante 90 minutos) o usando un dispositivo Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter (100.000 MVCO, Millipore). Cuando se completa este procedimiento, la materia sobrenadante viral puede ser combinada con las HUCPVC a una concentración determinada titulando el virus concentrado y se deja incubar durante una noche. Al día siguiente, se

añade más medio y las células se incuban durante 6 horas más antes de cambiar el medio. De esta manera, las HUCPVC pueden ser tratadas por ingeniería genética para introducir y expresar un transgen que codifique cualquier proteína, incluidas proteínas útiles para tratar reacciones inmunes adversas (proteínas inmunosupresoras). Estas proteínas incluyen CTLA4, VCP, PLIF, ISF-1, Nip, CD200 y Uromodulin.

5

Análisis de micromatrices

Se usó el dispositivo Oligo GEArray Human Cancer Microarray (Superaaray Biosciences, Frederick MD, Cat#: OHS-802) para encontrar cambios en la expresión de genes representativos de diversas trayectoras diferentes frecuentemente alteradas durante el progreso de The Oligo GE-Array de cáncer ya que el cáncer humano tiene 440 genes cancerígenos representativos y está organizado en agrupaciones génicas funcionales que incluyen apoptosis, ciclo celular, crecimiento y diferenciación celular, transducción de señales y otros genes relacionados con el cáncer.

10

Se hicieron crecer HUCPVC y MSC derivadas de médula ósea humana hasta el paso 2 y se aisló RNA de estas células. El RNA purificado fue tratado según el protocolo del fabricante (Superarray Biosciences Corp.) y fue hibridado a micromatrices Olego GEArray Human Cancer. Se usó el dispositivo Oligo GEArray Human Cancer Microarray para determinar la expresión diferencial de genes relacionados con cáncer en HUCPVC en comparación con MSC derivadas de médula ósea humana normales.

15

20 RESULTADOS

La mitomicina C es un agente antiproliferativo eficaz sobre HUCPVC

Se trataron HUCPVC con una gama de concentraciones de MMC durante 20 minutos a 37°C (5% de CO₂). La figura 1 muestra los números de células de las HUCPVC después de una semana en cultivo posterior al tratamiento de MMC (n = 2). Todas las células muestran una apreciable disminución de proliferación con relación al testigo (p < 0,001), sin diferencias entre tratamientos. Por tanto, se escogieron 20 µg/ml de acuerdo con la bibliografía. La figura 2 ilustra la falta de efecto de las células dispuestas en placas en pocillos tratados con MMC y lavados, frente a pocillos sin tratar (n = 2, p = 0,16). Por lo tanto, la MMC no tendrá un efecto sobre los resultados experimentales obtenidos en pocillos previamente tratados con MMC. Todas las estadísticas presentadas en la presente memoria descriptiva fueron obtenidas usando análisis ANOVA para comparar medias a través del proyecto R Project for Statistical Computing.

25

30

Las HUCPVC no son reconocidas como extrañas por linfocitos

35

Tras la co-incubación de una población de HUCPVC con linfocitos (donante 1), hubo un aumento estadísticamente significativo en la muerte de HUCPVC en una proporción de 10% HUCPVC:PBL (n = 5, p = 0,01), al ser medida mediante intensidad de fluorescencia media de anexina 5 (MFI). La figura 3 muestra que esta muerte celular aumentada no fue apreciada a dosis de HUCPVC mayores de 10%, por tanto, a la proporción correcta, las HUCPVC no son atacadas por linfocitos no coincidentes. Esto se confirmó usando un ensayo de proliferación de linfocitos en el que se puede observar que los linfocitos proliferan en respuesta a 10% de HUCPVC:PBL, al ser medida mediante MFI de BrdU (p = 0,02), pero no a concentraciones superiores de HUCPVC (figura 4). La proliferación de linfocitos es una medida estándar de activación, ya que la división de linfocitos T y B se produce en la cascada de activación. Por lo tanto, a una proporción inferior, las HUCPVC no proporcionan una presencia suficiente de forma que se lleven a cabo sus capacidades de evitación inmunológica. Sin embargo, a concentraciones superiores, 20-40%, los PBL no proliferan y las HUCPVC no son destruidas.

40

45

Las HUCPVC se analizaron también en cuanto a su efecto sobre el número de linfocitos tras la inclusión en un co-cultivo con PBL en reposo o ATL. En ambos casos, las HUCPVC no provocaron un aumento significativo sobre el número de células testigos (PBL: $35,2 \pm 3,1 \times 10^3$, +10% HUCPVC $45,0 \pm 5,7 \times 10^3$; ATL: $38,8 \pm 18,2 \times 10^3$, + 10% HUCPVC $40,8 \pm 4,8 \times 10^3$), indicando que su inmunoprivilegio está en reposo o en condiciones estimuladas (figura 7).

50

Las HUCPVC fueron incluidas en un MLC de una vía en proporciones de 10, 20, 30 y 40% de la población de PBL y se valoraron en cuanto a su proliferación por expresión de BrdU después de 6 días. La figura 8 no muestra un aumento significativo en el número de células que proliferan independientemente de la proporción de HUCPVC incluidas.

55

Las HUCPVC son inmunomoduladoras

La figura 5 muestra que en el día 6 los linfocitos co-cultivados alógenos han aumentado de número, mientras que todos los cultivos con HUCPVC presentes, independientemente de cuándo fueron añadidas o de la proporción añadida, tienen un recuento de linfocitos significativamente inferior que el testigo (n = 3).

60

Las HUCPVC pueden ejercer su acción a través de un factor soluble

65

Se usaron insertos TransWell® para separar HUCPVC de PBL en un MLC de dos vías. No se observó una

reducción significativa en el número de linfocitos con relación al testigo en cualquier día con 10% o 40% de HUCPVC (n = 3) (figura 6). Sin embargo, tras aumentar el número de muestras, la adición de 10% de HUCPVC mostró una reducción significativa del número de linfocitos sobre un período de cultivo de 6 días en comparación con el testigo (MLC: $40,7 \pm 32,9 \times 10^3$ células, 10% HUCPVC: $21,3 \pm 14,7 \times 10^3$ células) (Figura 9). Por lo tanto, el (o los) factor(es) soluble(s) contribuye(n) a la inmunomodulación de HUCPVC, sin embargo, no se conoce aún qué factor(es) es/son y el modo en que afectan a los linfocitos.

Las HUCPVC reducen el estado de activación de los linfocitos

Se añadieron ATL tenidos con PKH26 en un co-cultivo con 10% de HUCPVC y se ensayaron en cuanto a su expresión de CD25 (receptor de IL-2), un marcador de activación de linfocitos. Tras la inclusión de HUCPVC, se redujeron significativamente tanto el porcentaje de células que expresan CD25 (testigo: $100\% \pm 0$, 10% HUCPVC: $96,9\% \pm 0,7$) como la intensidad de fluorescencia media (testigo: $28,6 \pm 0,1$, 10% HUCPVC: $3,76 \pm 0,1$) (figura 10). Por tanto, las HUCPVC tienen un efecto físico sobre los linfocitos activadas, reduciendo su estado de activación.

Además, las HUCPVC redujeron la expresión de CD45 de los linfocitos, tanto el porcentaje (testigo: $100\% \pm 0,10\%$ HUCPVC: $99,6\% \pm 0,1$; 40% HUCPVC: $98,4\% \pm 0,36$) como la intensidad de fluorescencia media (testigo: $28,20 \pm 4,24$, 10% HUCPVC: $16,33 \pm 1,27$, 40% HUCPVC: $14,70 \pm 1,22$) fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 11). Estos resultados fueron inesperados ya que CD45 es expresado en todos los linfocitos. Sin embargo, se observó que CD45 es crucial para el desarrollo y funcionamiento de los linfocitos³⁶, y puede ser un indicio adicional de la función reducida de los linfocitos debido a la adición de las HUCPVC.

Transfección

Las HUCPVC fueron satisfactoriamente transfectadas con GFP, y las células expresaron niveles elevados de la proteína. Se consiguió una eficacia de transfección de 97% (figura 12), con un mantenimiento de buenas proporciones proliferativas. Esta proporción satisfactoria varía según el paso al que son transfectadas las células. Con un protocolo de transfección que funciona, es por tanto posible transfectar las células con cualquier proteína y tenerla constitutivamente expresada.

Análisis de micromatrices

Las HUCPVC no expresan niveles detectables de genes asociados con tumorigénesis. Los análisis de micromatrices génicas dieron como resultado la ausencia de genes funcionales asociados a cáncer humano y genes expresados que se conoce que son importantes, por ejemplo, en la regulación del ciclo celular, como ciclina D1 (CCND1), CCND2 y CCND3 (figura 13).

SÍNTESIS EXPOSITIVA

Se describen en la presente memoria descriptiva las propiedades inmunoprivilegiadas e inmunomoduladoras de una población de MSC a partir de una fuente distinta de la médula ósea o el cordón umbilical. Las HUCPVC son extraídas de la zona perivascular del cordón, y esta se cree que es la población más rápidamente proliferante de células. Anteriormente, se mostró que las células endoteliales de la pared de la vena del cordón umbilical estimulaban los linfocitos in vitro²⁷. Esto supone un contraste marcado respecto a los resultados informados y refuerza la zona distinta de la que son extraídas las HUCPVC.

Por tanto, las HUCPVC son bien adecuadas para un uso clínico particularmente, pero no solamente, para reducir la aparición y/o gravedad de la enfermedad de injerto contra hospedante y para reducir o eliminar el rechazo de injertos por el hospedante y para el tratamiento de otros trastornos de mediación inmune que se beneficiarían de la supresión de una reacción de linfocitos mixtos. Además, cuando se manipulan mediante transfección para que contengan el gen de una proteína/enzima de interés, las HUCPVC son capaces de proporcionar este producto constitutivamente y, por tanto, serían útiles en el tratamiento de cualquier estado en el que una deficiencia de proteínas/enzimas diera lugar en un efecto perjudicial para el paciente, especialmente cuando pueden ser usadas alógenamente en un paciente no coincidente sin rechazo. Además, las HUCPVC pueden ser usadas también para generar vacunas de interés después de una transfección con el gen necesario.

Como células progenitoras que tienen propensión a expandirse y diferenciarse a lo largo del tiempo en diversos tejidos mesenquimales dictados por su entorno de crecimiento, las HUCPVC, como otras células progenitoras o madre mesenquimales, pueden implicar algún riesgo de que su crecimiento y diferenciación in vivo no sean controlados. De forma apreciable, como una ventaja adicional del uso de las HUCPVC clínicamente, se ha determinado que las HUCPVC exhiben una actividad de telomerasa extremadamente baja, un indicador de su propensión a la tumorigénesis. Además, se ha determinado que las HUCPVC carecen de muchos marcadores genéticos que son distintivos de tumorigénesis. La tumorigénesis se produce mediante mutaciones que desregulan las trayectorias biológicas y provocan que las células crezcan y se dividan sin control, para evitar la apoptosis (muerte celular programada), para responder anormalmente a factores de crecimiento, para recibir suministro de sangre (angiogénesis) y para desplazarse de un lugar a otro (metástasis e invasivas). Muchos genes están

implicados en cada uno de estos mecanismos de control, u una mutación de uno cualquiera de ellos puede provocar la desregulación.

Listado de referencias

5
1. Horwitz,E. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395 (2005).

10
2. Bruder,S.P. et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat Res*S247-S256 (1998).

3. Quarto,R. et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J Med* 344, 385-386 (2001).

15
4. Krebsbach,P.H., Mankani,M.H., Satomura,K., Kuznetsov,S.A., y Robey,P.G. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation* 66, 1272-1278 (1998).

20
5. Yoo,J. et al. The chondrogenic potential of human bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg* 80, 1745-1757 (1998).

6. Worster,A.A. et al. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop. Res* 19, 738-749 (2001).

25
7. Williams,C.G. et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel. *Tissue Eng* 9, 679-688 (2003).

30
8. Sekiya,I., Larson,B.L., Vuoristo,J.T., Cui,J.G., y Prockop,D.J. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res* 19, 256-264 (2004).

9. Shi,D., Reinecke,H., Murry,C.E., y Torok-Storb,B. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* 104, 290-294 (2004).

35
10. Caplan,A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthopaedic Res* 9, 641-650 (1991).

11. Caplan,A.I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11, 1198-1211 (2005).

40
12. Zuk,P.A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol. Cell* 13, 4279-4295 (2002).

13. Sakaguchi,Y. et al. Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. *Blood* 104, 2728-2735 (2004).

45
14. Campagnoli,C. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-2402 (2001).

15. Mitchell,J.B. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24, 376-385 (2006).

50
16. Sarugaser,R., Lickorish,D., Baksh,D., Hosseini,M.M., y Davies,J.E. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells* 23, 220-229 (2005).

17. Sarugaser,R., Hanoun,L., Kwong,F., Stanford,W.L., y Davies,J.E. Human Umbilical Cord Perivascular Cell (HUCPVC) clones determine mesenchymal stem cell identity. 4th Annual. 2006. International Society for Stem Cell Research. Ref Type: Conference Proceeding.

55
18. Baksh,D., Yao,R., y Tuan,R. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* In Press, (2007).

60
19. Le Blanc,K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 5, 485-489 (2003).

20. Le Blanc,K. y Ringden,O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11, 321-334 (2005).

65
21. Bartholomew,A. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft

- survival in vivo. *Exp Hematol.* 30, 42-48 (2002).
22. Puissant,B. et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J Haematol.* 129, 118-129 (2005).
- 5 23. Gotherstrom,C. et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet. Gynecol.* 190, 239-245 (2004).
- 10 24. Gotherstrom,C., Ringden,O., Westgren,M., Tammik,C., y Le Blanc,K. Mesenchymal Stem Cells: Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 32, 265-272 (2003).
- 15 25. Le Blanc,K. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* 363, 1439-1441 (2004).
- 20 26. Ringden,O. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006. May. 27.1390-1397 (2006).
27. Taupin,P. OTI-010 Osiris Therapeutics/JCR Pharmaceuticals. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 7, 473-481 (2006).
28. Osiris Therapeutics. Prochymal™ Adult Human Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Moderate-to-Severe Crohn's Disease. NCT00294112. 2006. www.clinicaltrials.gov. Ref Type: Report.
- 25 29. Le Blanc,K. et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* 79, 1607-1614 (2005).
- 30 30. Liu,H. et al. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J Immunol.* 176, 2864-2871 (2006).
- 30 31. Eliopoulos,N., Stagg,J., Lejeune,L., Pommey,S., y Galipeau,J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I and II mismatched recipient mice. *Blood*(2005).
- 35 32. Wang,Y., Chen,X., Armstrong,M.A., y Li,G. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *J Orthop. Res.*, (2007).
33. MacDonald,D.J. et al. Persistence of marrow stromal cells implanted into acutely infarcted myocardium: observations in a xenotransplant model. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130, 1114-1121 (2005).
- 40 34. Saito,T., Kuang,J.Q., Bittira,B., Al-Khalidi,A., y Chiu,R.C. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann. Thorac. Surg.* 74, 19-24 (2002).
- 45 35. Zebardast,N. The Role of Human Umbilical Cord PeriVascular Cells (HUCPVCs) in Dermal Wound Healing. 1-66. 2007. University of Toronto, Faculty of Applied Science and Engineering, Division of Engineering Science. Ref Type: Thesis/Dissertation.
- 50 36. Dawes,R. et al. Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *J Immunol.* 2006. Mar. 15.3417-3425 (2006).
37. Hirschberg,H., Evensen,S.A., Henriksen,T., y Thorsby,E. The human mixed lymphocyte-endothelium culture interaction. *Transplantation* 19, 495-504 (1975).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente seleccionado entre (1) células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVC) y/o (2) un factor soluble inmunomodulador proporcionado como un extracto de medio acondicionado por el crecimiento de HUCPVC, para ser usado en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una reacción inmune adversa.
- 10 2. Un agente para ser usado según la reivindicación 1, en que el agente modula una reacción inmune entre linfocitos y un cuerpo reconocido por los linfocitos como extraño.
3. Un agente para ser usado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sujeto tiene o está en riesgo de una enfermedad de injerto contra hospedante, una reacción de linfocitos mixtos o una reacción a un injerto.
- 15 4. Un agente para ser usado según la reivindicación 3, en que el injerto es un injerto de piel, un injerto de órganos, un injerto de médula o un injerto de sangre periférica.
5. Un agente para ser usado según la reivindicación 1, en que el sujeto tiene un trastorno autoinmune.
- 20 6. Un agente para ser usado según la reivindicación 1, en que el sujeto está afectado por una leucemia y está en riesgo de enfermedad de injerto contra hospedante.
- 25 7. Un agente seleccionado entre (1) células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVC) y/o (2) un factor soluble inmunomodulador proporcionado como un extracto de medio acondicionado por crecimiento de HUCPVC, para ser usado en la reducción de la enfermedad de injerto contra hospedante en un receptor de injerto mediante un método que comprende la etapa de exponer el injerto, antes de su trasplante, a una cantidad eficaz inmunomoduladora del agente.
- 30 8. Un agente para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que el agente es células perivasculares de cordón umbilical.
9. Un agente para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVC).
- 35 10. Un agente para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que las células perivasculares de cordón umbilical comprenden un transgen que codifica una proteína de interés.
- 40 11. Un agente para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que las células perivasculares de cordón umbilical son HUCPVC sustancialmente negativas para doble MHC.
- 45 12. Un agente para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en que las HUCPVC están presentes en una dosis unitaria en el intervalo de 0,01 a 5 millones de HUCPVC por kilogramo de sujeto.
13. Un agente para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en que el agente es un factor soluble inmunomodulador, proporcionado como un extracto de medio acondicionado mediante crecimiento de HUCPVC.
- 50 14. Un método in vitro para modular una reacción inmune entre linfocitos y un cuerpo reconocido por los linfocitos como extraño, que comprende la etapa de introducir, en una cantidad eficaz para inhibir o reducir dicha reacción inmune, un agente seleccionado entre (1) células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVC) y/o (2) un factor soluble inmunomodulador proporcionado como un extracto de medio acondicionado por crecimiento de HUCPVC.
15. Un método in vitro según la reivindicación 14, en que el agente es un agente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.

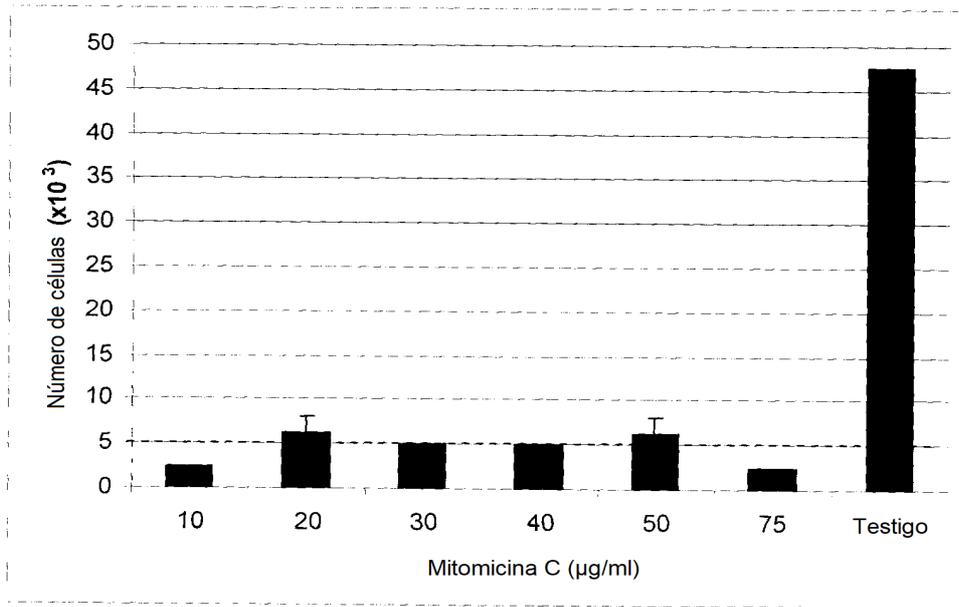


Figura 1

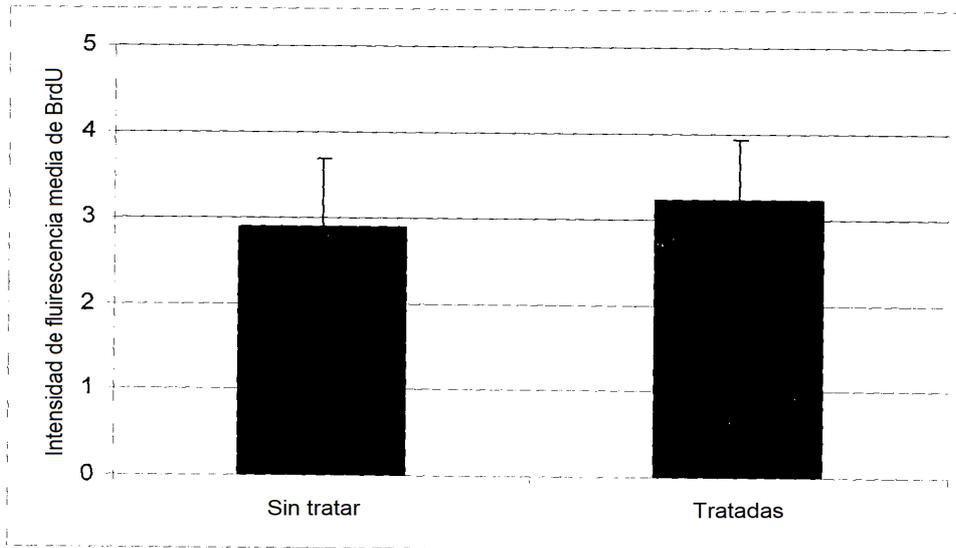


Figura 2

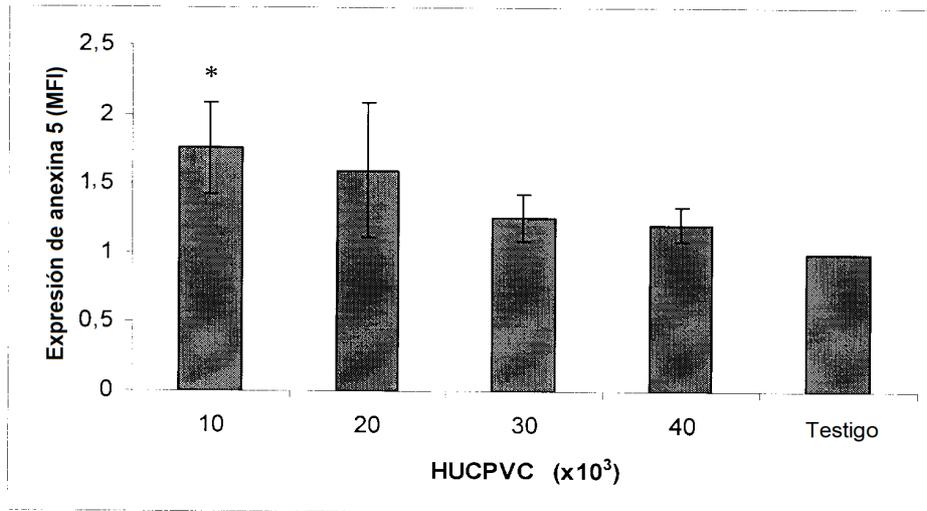


Figura 3

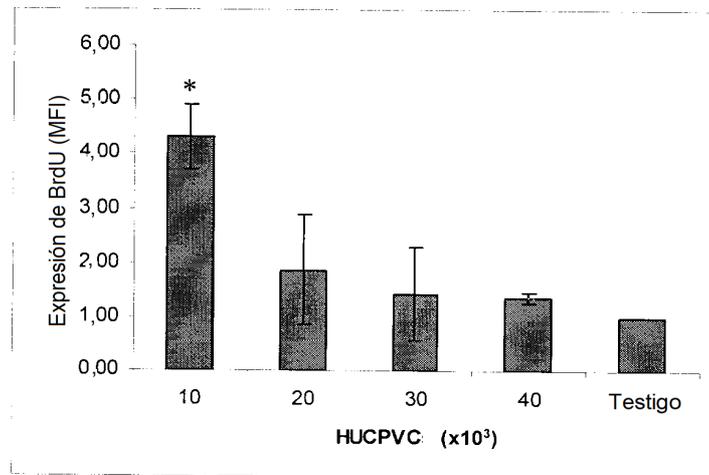


Figura 4

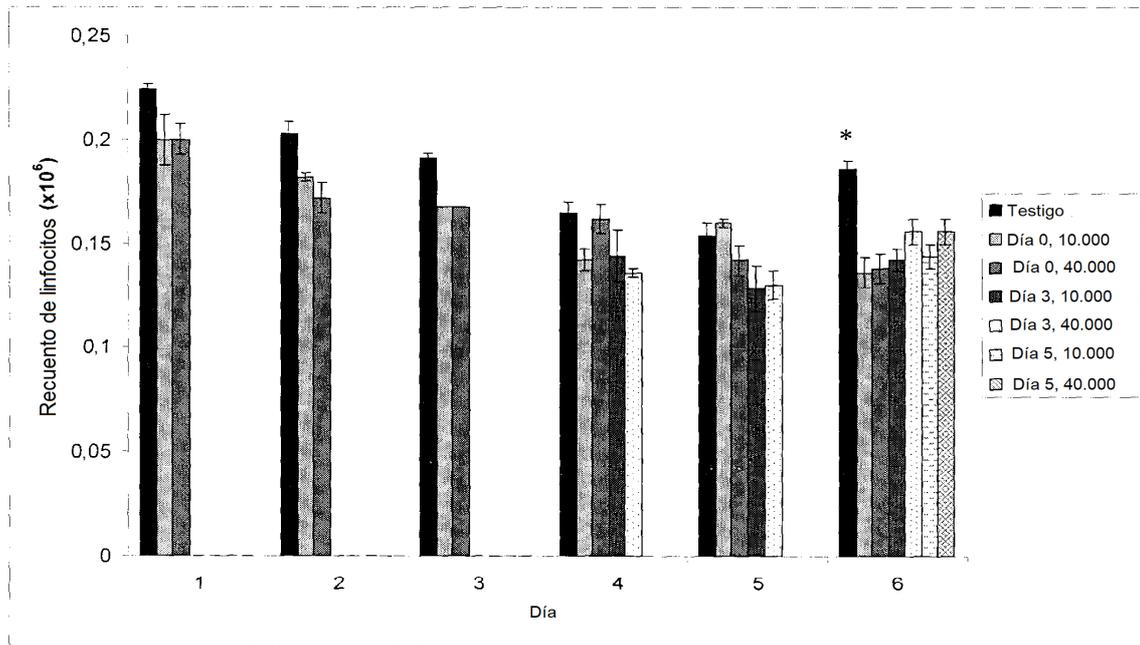


Figura 5

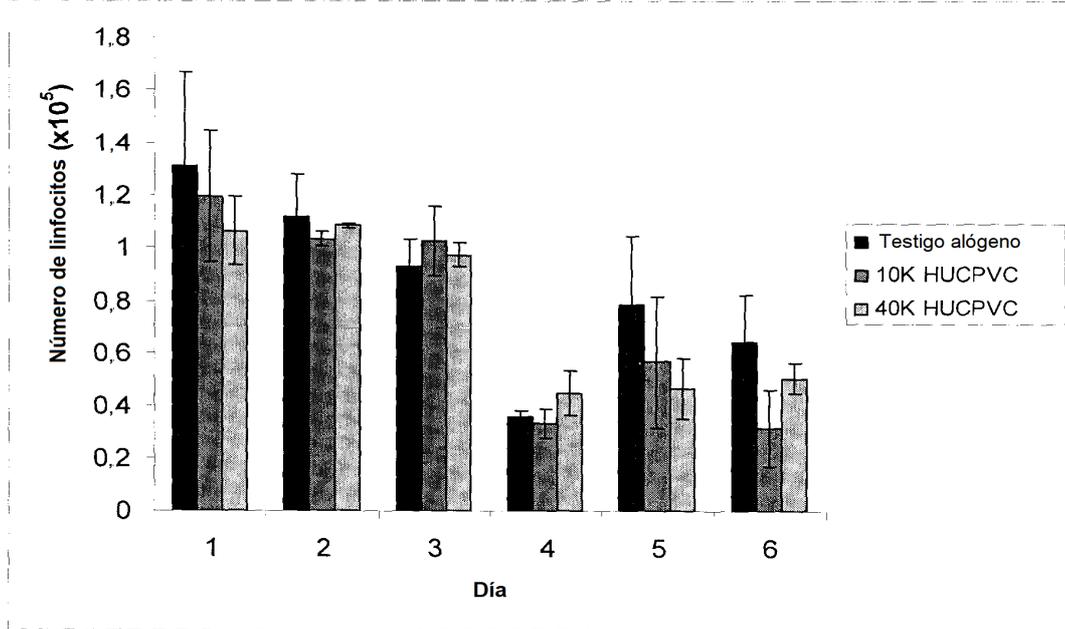


Figura 6

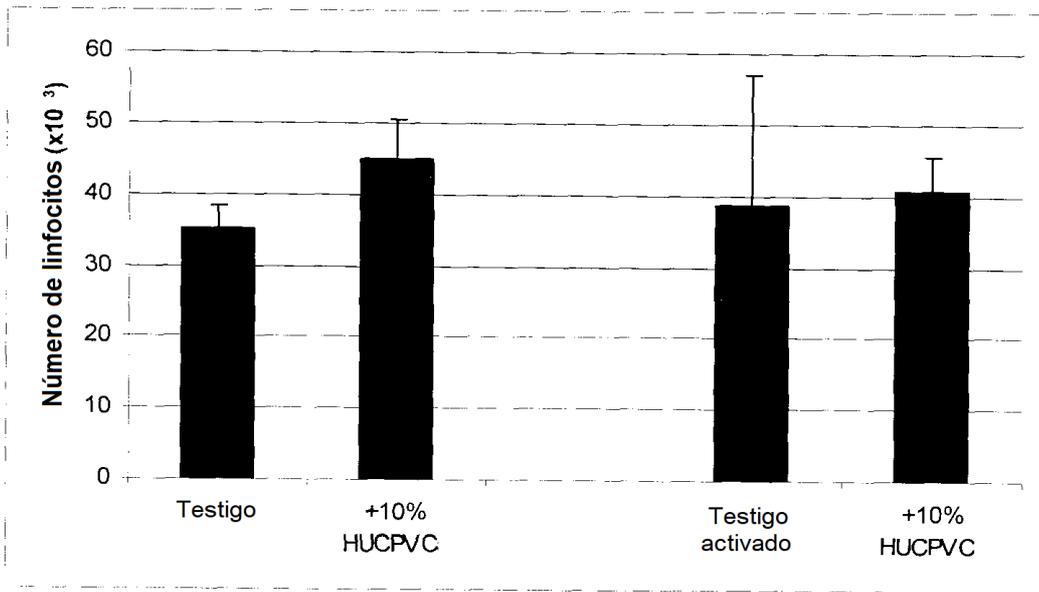


Figura 7

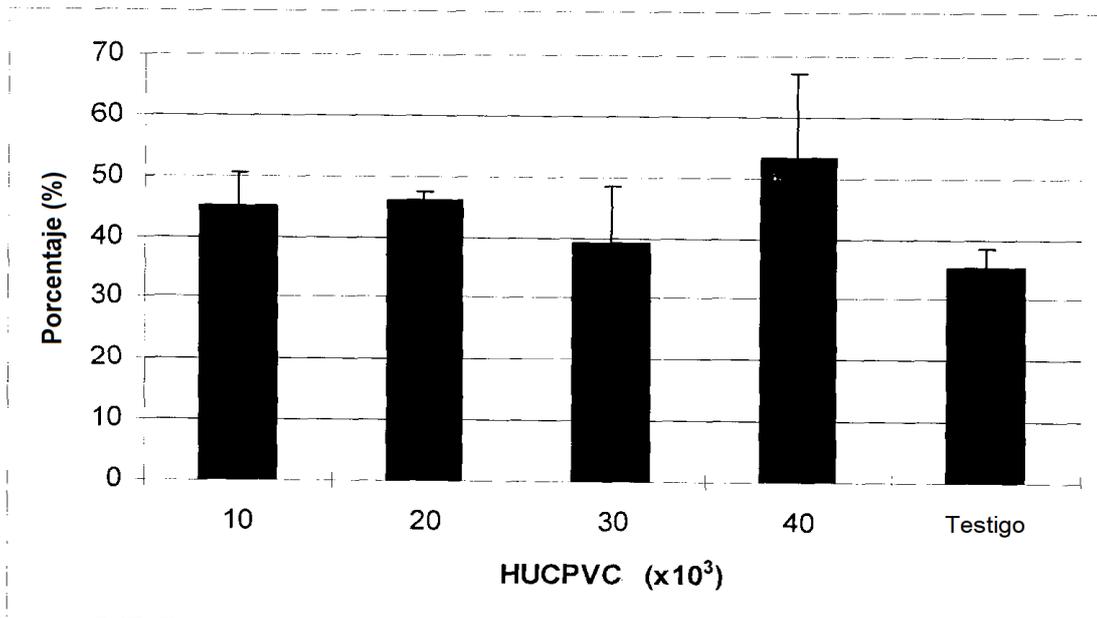


Figura 8

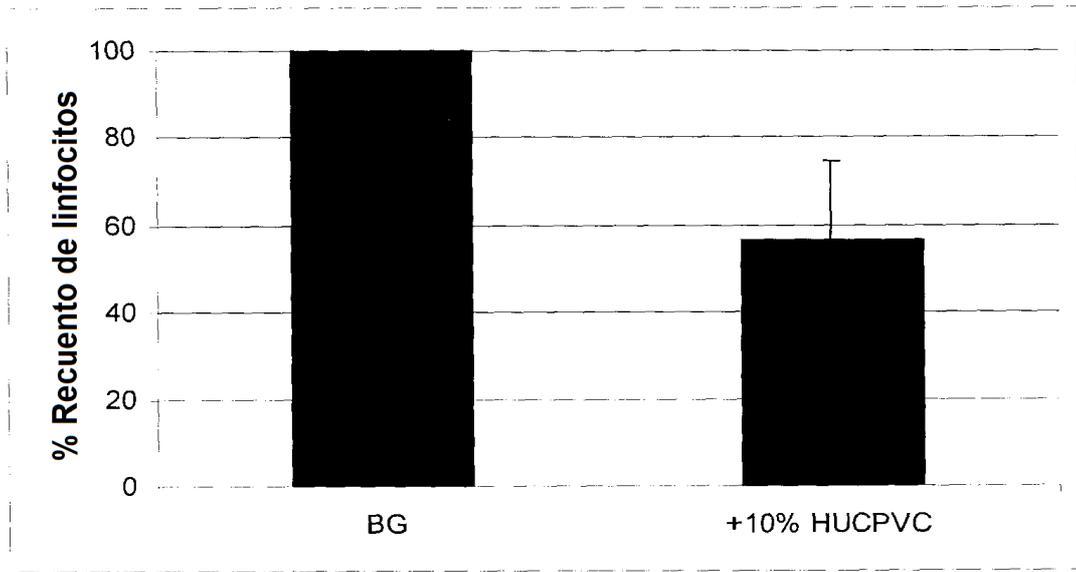


Figura 9

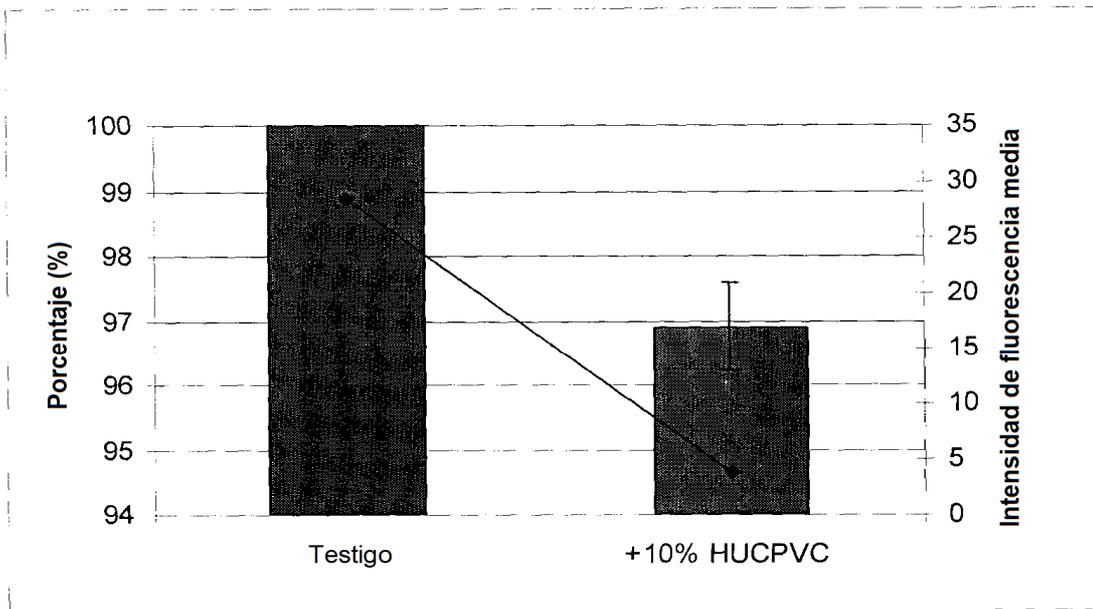


Figura 10

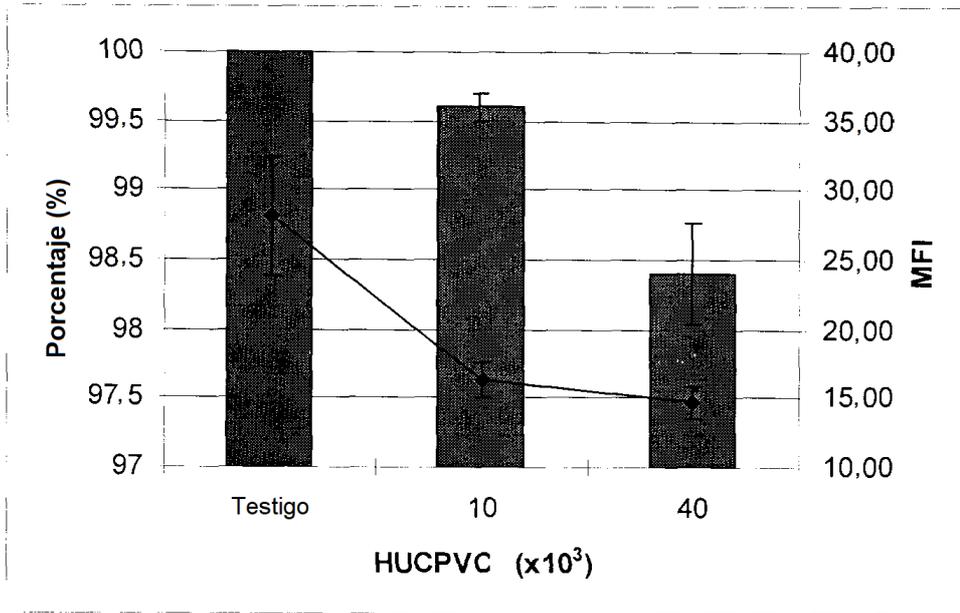
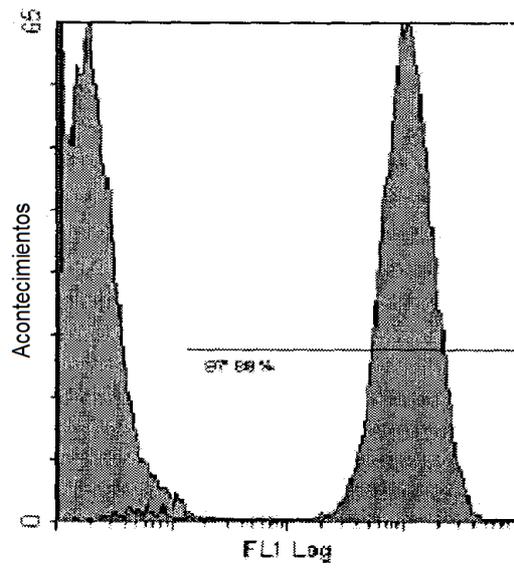
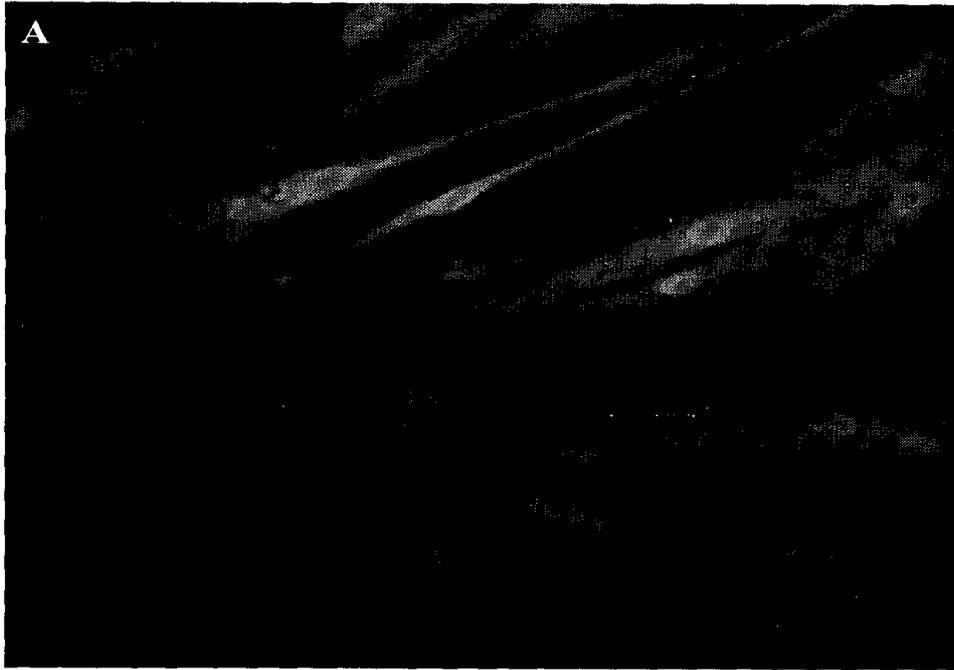


Figura 11



■ M1: 97.88%

Figura 12

Figura 13

A. MSC derivadas de BMSC

RPS27A	(AKT1)	(ANGPT1)	(ANGPT2)	(APAF1)	(ATM)	(BAD)	(BAI1)
(BAX)	(BCL2)	(BCL2L1)	(BIRC5)	(BRCA1)	(BRCA2)	(CASP8)	(CASP9)
(CND1)	(CCNE1)	(CD44)	(CDC25A)	(CDH1)	(CDK2)	CDK4	CDKN1A
(CDKN1B)	(CDKN2A)	(CFLAR)	(CHEK2)	(COL18A1)	(CTNNB1)	(E2F1)	(EGF)
(EGFR)	(ERBB2)	(ETS2)	(FGF2)	(FGFR2)	(FLT1)	FOS	(GZMA)
(HGF)	(HTATIP2)	(ICAM1)	(IFNA1)	(IFNB1)	IGF1	IL8	(ITGA1)
(ITGA2)	(ITGA3)	(ITGA4)	(ITGA5)	(ITGA6)	(ITGAV)	ITGB1	(ITGB3)
ITGB5	(JUN)	(KAI1)	(KISS1)	(MAP2K1)	(MAPK14)	(MCM2)	(MDM2)
(MET)	(MICA)	(MMP1)	(MMP2)	(MMP9)	(MTA1)	(MTA2)	(MTSS1)
MYC	(NCAM1)	NFKB1	NFKBIA	NME1	(NME4)	(PDGFA)	(PDGFB)
(PIK3CB)	(PIK3R1)	PLAU	PLAUR	(PNN)	(PTEN)	(RAF1)	(RAF1)
(RASA1)	RB1	S100A4	(SERPINB2)	(SERPINB5)	(SERPINE1)	SNGG	(SRC)
(SYK)	(TEK)	(TERT)	(TGFB1)	(TGFB1)	THBS1	THBS2	TIMP1
TIMP3	(TNF)	TNFRSF10B	TNFRSF1A	(TNFRSF25)	(FAS)	(TP53)	(TWIST1)
(UCC1)	(VEGF)	(PUC18)	(Blanco)	Blanco	AS1R2	AS1R1	AS1
GAPDH	B2M	HSPCB	HSPCB	ACTB	ACTB	BAS2C	BAS2C

B. HUCPVC

RPS27A	AKT1	(ANGPT1)	(ANGPT2)	(APAF1)	(ATM)	(BAD)	(BAI1)
(BAX)	(BCL2)	(BCL2L1)	(BIRC5)	(BRCA1)	(BRCA2)	(CASP8)	(CASP9)
(CND1)	(CCNE1)	(CD44)	(CDC25A)	(CDH1)	(CDK2)	CDK4	CDKN1A
(CDKN1B)	(CDKN2A)	(CFLAR)	(CHEK2)	(COL18A1)	(CTNNB1)	(E2F1)	(EGF)
(EGFR)	(ERBB2)	(ETS2)	(FGF2)	(FGFR2)	(FLT1)	FOS	(GZMA)
(HGF)	(HTATIP2)	(ICAM1)	(IFNA1)	(IFNB1)	IGF1	IL8	(ITGA1)
(ITGA2)	ITGA3	(ITGA4)	(ITGA5)	(ITGA6)	(ITGAV)	ITGB1	(ITGB3)
ITGB5	(JUN)	(KAI1)	(KISS1)	(MAP2K1)	(MAPK14)	(MCM2)	(MDM2)
(MET)	(MICA)	(MMP1)	(MMP2)	(MMP9)	(MTA1)	(MTA2)	(MTSS1)
MYC	(NCAM1)	NFKB1	NFKBIA	NME1	(NME4)	(PDGFA)	(PDGFB)
(PIK3CB)	(PIK3R1)	PLAU	PLAUR	PNN	(PRKDC)	PTEN	(RAF1)
(RASA1)	RB1	S100A4	(SERPINB2)	(SERPINB5)	(SERPINE1)	SNGG	(SRC)
(SYK)	(TEK)	(TERT)	(TGFB1)	(TGFB1)	THBS1	THBS2	TIMP1
TIMP3	(TNF)	TNFRSF10B	TNFRSF1A	(TNFRSF25)	(FAS)	(TP53)	(TWIST1)
(UCC1)	(VEGF)	(PUC18)	(Blanco)	Blanco	AS1R2	AS1R1	(AS1)
GAPDH	B2M	HSPCB	HSPCB	ACTB	ACTB	BAS2C	BAS2C