

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 076**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2005 E 10011224 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2298862**

54 Título: **Células madre mesenquimales y sus usos**

30 Prioridad:

**22.03.2004 US 555118 P**

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

**21.11.2017**

73 Titular/es:

**MESOBLAST INTERNATIONAL SÀRL (100.0%)  
Route de Pre-Bois 20  
1217 Meyrin , CH**

72 Inventor/es:

**PITTENGER, MARK F. y  
AGGARWAL, SUDEEPTA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 643 076 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Células madre mesenquimales y sus usos

5 Esta invención se refiere a células madre mesenquimales. Más particularmente, esta invención se refiere a células madre mesenquimales para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

10 Las células madre mesenquimales (MSC) son células madre multipotentes que pueden diferenciarse fácilmente en linajes que incluyen osteoblastos, miocitos, condrocitos y adipocitos (Pittenger, et al., Science, vol. 284, pág. 143 (1999); Haynesworth, et al., Bone, vol. 13, pág. 69 (1992); Prockop, Science, vol. 276, pág. 71 (1997)). Estudios *in vitro* han demostrado las capacidades de MSC para diferenciarse en músculo (Wakitani, et al., Muscle Nerve, vol. 18, pág. 1417 (1995)), precursores tipo neuronal (Woodbury, et al., J. Neurosci. Res., vol. 69, pág. 908 (2002); Sanchez-Ramos, et al., Exp. Neurol., vol. 171, pág. 109 (2001)), cardiomiocitos (Toma, et al., Circulation, vol. 105, pág. 93 (2002); Fakuda, Artif. Organs, vol. 25, pág. 187 (2001)), y posiblemente otro tipo de células. Además, se ha demostrado que las MSC proporcionan capas alimentadoras eficaces para la expansión de células madre hematopoyéticas y embrionarias (Eaves, et al., Ann. NY Acad. Sci., vol. 938, pág. 63 (2001); Wagers, et al., Gene Therapy, vol. 9, pág. 606 (2002)). Estudios recientes con una variedad de modelos animales han demostrado que las MSC pueden ser útiles en la reparación o regeneración de tejidos de hueso, cartilago, menisco o miocárdicos dañados (DeKok et al., Clin. Implants Oral Res., vol. 481 (2003)); Wu et al., Transplantation, vol. 75, pág. 679 (2003); Noel et al., Curr. Opin. Investig. Drugs, vol. 3, pág. 1000 (2002); Ballas, et al., J. Cell. Biochem. Suppl., vol. 38, pág. 20 (2002); Mackenzie, et al., Blood Cells Mol. Dis., vol. 27 (2002)). Varios investigadores han utilizado MSC con resultados alentadores para el trasplante en modelos de enfermedades animales incluyendo osteogénesis imperfecta (Pereira, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., vol. 95, pág. 1142 (1998)), parkinsonismo (Schwartz, et al., Hum. Gene Ther., vol. 10, pág. 2539 (1999)), lesión de la médula espinal (Chopp, et al., Neuroreport, vol. 11, pág. 3001 (2000); Wu, et al., J. Neurosci. Res., vol. 72, pág. 393 (2003)) y trastornos cardíacos (Tomita, et al., Circulation, vol. 100, pág. 247 (1999). Shake, et al., Ann. Thorac. Surg., vol. 73, pág. 1919 (2002)). Es importante destacar que también se han publicado resultados prometedores en ensayos clínicos para la osteogénesis imperfecta (Horwitz et al., Blood, vol. 97, pág. 1227 (2001), Horowitz, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., vol. 99, pág. 8932 (2002)) y el injerto mejorado de trasplantes heterólogos de médula ósea (Frasconi, et al., Int. Society for Cell Therapy, SA006 (resumen) (2002); Koc, et al., J. Clin. Oncol., vol. 18, pág. 307 (2000)).

30 Las MSC expresan el antígeno de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie, pero no expresan la clase II del MHC (Le Blanc et al., Exp. Hematol., vol. 31, pág. 890 (2003), Potian, et al., J. Immunol., vol. 171, pág. 3426 (2003)) y ninguna molécula coestimuladora B7 o CD40 (Majumdar et al., J. Biomed. Sci., vol. 10, pág. (2003)), lo que sugiere que estas células tienen un fenotipo de baja inmunogenicidad (Tse, et al., Transplantation, vol. 35 75, pág. 389 (2003)). Las MSC también inhiben las respuestas proliferativas de la célula 1 de una manera independiente del MHC (Bartholomew et al., Exp. Hematol., vol. 30, pág. 42 (2002), Devine et al., Cancer J., vol. 7, pág. 576 (2001), DiNicola, et al., Blood, vol. 99, pág. 3838 (2002)). Estas propiedades inmunológicas de las MSC pueden mejorar su injerto de trasplante y limitar la capacidad del sistema inmunitario receptor para reconocer y rechazar las células alogénicas tras el trasplante. La producción de factores por las MSC, que modulan la respuesta inmune y soportan la 40 hematopoyesis junto con su capacidad para diferenciarse en tipos de células apropiados bajo estímulos locales, las convierten en células madre deseables para estudios de trasplante celular (Majumdar, et al., Hematother. Stem Cell Res., vol. 9, pág. 841 (2000), Haynesworth et al., J. Cell. Physiol., vol. 166, página 585 (1996).

45 Actualmente, los solicitantes han examinado las interacciones de células madre mesenquimales con poblaciones de células inmunes aisladas, incluyendo células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras (Th1 y Th2) y células NK. Con base en tales interacciones, los solicitantes descubrieron que las células madre mesenquimales pueden regular la producción de diversos factores que pueden regular varias etapas en el proceso de respuesta inmune. De este modo, las células madre mesenquimales pueden emplearse en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

50 El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona células madre mesenquimales para uso en un método de tratamiento de enfermedades autoinmunes en un ser humano. El método comprende administrar a las células madre mesenquimales humanas en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad en humanos.

55 Aunque el alcance de este aspecto de la presente invención no se limita a ningún razonamiento teórico, se cree que al menos un mecanismo mediante el cual las células madre mesenquimales suprimen la enfermedad autoinmune es provocando la liberación de interleuquina 10 (IL-10) de células T reguladoras (células T<sub>Reg</sub>) y/o células dendríticas (DC).

60 Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide, uveítis, enfermedad autoinmune de la glándula tiroides, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad linfoproliferativa autoinmune (ALPS) enfermedad desmielinizante, encefalomielititis autoinmune, gastritis autoinmune (AIG) y enfermedades glomerulares autoinmunes. Debe entenderse, sin embargo, que el alcance de la presente invención no se limita al tratamiento de las enfermedades específicas 65 mencionadas en la presente memoria.

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

- 5 Las células madre mesenquimales que se administran pueden ser una composición homogénea o pueden ser una población de células mixtas enriquecida en las MSC. Las composiciones de células madre mesenquimales homogéneas pueden obtenerse cultivando células adherentes de médula o periósticas y las composiciones de células madre mesenquimales pueden ser obtenidas cultivando células adherentes de médula o periósticas y las células madre mesenquimales pueden ser identificadas por marcadores de superficie celular específicos que se identifican con anticuerpos monoclonales únicos. Un método para obtener una población celular enriquecida en células madre mesenquimales se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.486.359. Fuentes alternativas para las células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a, sangre, piel, sangre del cordón umbilical, músculo, grasa, hueso y pericondrio.
- 10
- 15 Las células madre mesenquimales pueden administrarse mediante una diversidad de procedimientos. Las células madre mesenquimales se pueden administrar en forma sistémica, tal como por administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Las células madre mesenquimales pueden ser de un espectro de fuentes incluyendo autólogas, alogénicas o xenogénicas.
- 20 Las células madre mesenquimales se administran en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad autoinmune. Las células madre mesenquimales se pueden administrar en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/kg hasta aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/kg, preferiblemente de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/kg hasta aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/kg. La cantidad de células madre mesenquimales a administrar depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, el peso y el sexo del paciente, la enfermedad autoinmune a tratar, y su extensión y gravedad.
- 25 Las células madre mesenquimales se pueden administrar conjuntamente con un portador farmacéutico aceptable. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden administrarse como una suspensión de células en un medio líquido farmacéuticamente aceptable para inyección.
- 30 Debe entenderse que las células madre mesenquimales, cuando se emplean en las terapias y tratamientos mencionados anteriormente, pueden emplearse en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, factores de crecimiento, citoquinas, fármacos tales como fármacos antiinflamatorios y células distintas de las células madre mesenquimales, tales como células dendríticas, y pueden administrarse con portadores solubles para células tales como ácido hialurónico o en combinación con matrices sólidas tales como colágeno, gelatina, u otros polímeros biocompatibles, según sea apropiado.
- 35

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

- 40 Figura 1. Las MSC modulan las funciones de las células dendríticas. (A) Análisis de citometría de flujo de células DC1 monocíticas maduras usando anticuerpos contra HLA-DR y CD11c y de células plasmacitoides DC2 usando anticuerpos contra HLA-DR y CD123 (receptor de IL-3). (---): control de isotipo; (-): anticuerpos conjugados con FITC/PE. (B) Las MSC inhiben la secreción de TNF- $\alpha$  (eje y primario) y aumentan la secreción de 1L-10 (eje y secundario) a partir de DC1 y DC2 activadas, respectivamente. (C) MSC cultivadas con células DC1 maduras inhiben la secreción de IFN- $\gamma$  (eje y primario) por células T e incrementan los niveles de IL-4 (eje y secundario) en comparación con MSC o DC solamente. La disminución de la producción de IFN- $\gamma$  proinflamatorio y el aumento de la producción de IL-4 antiinflamatoria en presencia de MSC indicaron un desplazamiento de la población de células T hacia un fenotipo antiinflamatorio.
- 45

- 50 Figura 2. Las MSC inhiben la función de células T efectoras proinflamatorias. (A) Análisis de citometría de flujo de los números de células T<sub>Reg</sub> (en %) mediante tinción de PBMC o fracción no adherente en cultivo de MSC+PBMC (MSC+PBMC) con CD4 conjugadas con FITC (eje x) y anticuerpos CD25 conjugados con PE. Se establecieron puercas con base en anticuerpos de control de isotipo como antecedentes. Los gráficos son representativos de 5 experimentos independientes. (B) Las células T<sub>H1</sub> generadas en presencia de MSC secretaron niveles reducidos de IFN- $\gamma$  (eje Y primario) y las células T<sub>H2</sub> generadas en presencia de MSC secretaron mayores cantidades de IL-4 (eje y secundario) en sobrenadantes de cultivo celular. (C) Las MSC inhiben la secreción de IFN- $\gamma$  a partir de células NK purificadas cultivadas durante 0, 24 u 48 horas en una placa de 24 pozos. Los datos mostrados son la media  $\pm$  DE, de la secreción de citoquina en un experimento y son representativos de tres experimentos independientes.
- 55

- 60 Figura 3. Las MSC conducen a un mayor número en la población de células T<sub>Reg</sub> y mayor expresión del GITR. (A) Se aisló una población de células T<sub>Reg</sub> CD4+ CD25+ de cultivos de PBMC o MSC+PBMC (relación de MSC con respecto a PBMC 1:10) (cultivadas sin ninguna estimulación adicional durante 3 días) usando un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Estas células se irradiaron (para bloquear cualquier proliferación adicional) y se usaron como estimuladores en una reacción de linfocitos mixtos (MLR), en la que los respondedores eran PBMC alogénicas (relación de estimulador con respecto a respondedor 1:100) en presencia de fitohemaglutinina (PHA) (2,5 mg/mL). Las células se cultivaron durante 48 horas, tras lo cual se añadió timidina <sup>3</sup>H, y se hizo recuento de la radiactividad incorporada después de 24 horas. Los resultados mostraron que la población de T<sub>Reg</sub>, generada en presencia de MSC (carril 3) era similar funcionalmente a las células T<sub>Reg</sub> generadas en ausencia de MSC (carril 2). (B) Se cultivaron PBMC durante 3
- 65

días en ausencia (gráfico superior) o presencia (gráfico inferior) de MSC (relación de MSC con respecto a PBMC 1:10), después de lo cual se recogió la fracción no adherente y se inmunotizó con GITR marcado con FITC y CD4 marcada con PE. Los resultados muestran un aumento de más de dos veces en la expresión de GTR en células cultivadas en presencia de MSC.

Figura 4. Las MSC producen PGE<sub>2</sub> y el bloqueo de PGE<sub>2</sub> invierte los efectos inmunomoduladores mediados por MSC. (A) secreción de PGE<sub>2</sub> (media ± DE) en sobrenadantes de cultivo obtenidos a partir de MSC cultivadas en presencia o ausencia de bloqueadores de PGE<sub>2</sub> NS-398 o indometacina (Indomet.) a diversas concentraciones. Las concentraciones de inhibidor están en μM y los datos presentados son valores obtenidos después de cultivo durante 24 horas (B) expresión de COX-1 y COX-2 en MSC y PBMC usando RT-PCR en tiempo real. Las MSC expresaron niveles significativamente más altos de COX-2 en comparación con PBMC, y cuando se cultivaron MSC en presencia de PBMC, hubo un aumento de > 3 veces en la expresión de COX-2 en MSC. Se muestran datos representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Los cultivos de MSC+PBMC se prepararon en una placa de cámara de migración entre pozos donde se colocaron MSC sobre la cámara inferior y PBMC en la cámara superior. (C) La presencia de bloqueadores de PGE<sub>2</sub> indometacina (Ind.) o NS-398 aumenta la secreción de TNF-α de las DC activadas (□) y la secreción de IFN-γ de células T<sub>H1</sub> (□) en comparación con los controles. Los datos se calcularon como el cambio porcentual de los cultivos generados en ausencia de MSC e inhibidores de PGE<sub>2</sub> (D) La presencia de bloqueadores de PGE<sub>2</sub> indometacina (Indo) y NS-398 durante el cocultivo de MSC-PBMC (1:10) invierte los efectos anti-proliferativos mediados por MSC en las PBMC tratadas con PHA. Los datos mostrados son de un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 5. La secreción constitutiva de citoquinas MSC se eleva en presencia de PBMC alogénicas. Utilizando las MSC humanas previamente caracterizadas, se analizaron los niveles de las citoquinas 1L-6 y VEGF, el mediador lipídico PGE<sub>2</sub> y la metaloproteinasa de matriz 1 (pro MMP-1) en el sobrenadante de cultivo de MSC cultivadas durante 24 horas en presencia (barras sombreadas) o ausencia (barras sin color) de PBMC (relación de MSC con respecto a PBMC 1:10). Las MSC produjeron 1L-6, VEGF y PGE<sub>2</sub> constitutivamente, y los niveles de estos factores aumentaron en el cocultivo con PBMC, lo que sugiere que las MSC pueden desempeñar un papel en la modulación de las funciones inmunes en un entorno inflamatorio.

Figura 6. Las MSC inhiben la proliferación de células T inducida por mitógeno de una manera dependiente de la dosis. Se incubaron cantidades crecientes de PBMC alogénicas con un número constante de MSC (2.000 células/pozo) en placas de 96 pozos en presencia o ausencia de PHA (2,5 mg/mL) durante 72 horas, y se determinó la incorporación de timidina <sup>3</sup>H (en recuentos por minuto, o cpm). Hubo una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de PBMC tratadas con PHA en presencia de MSC. Se muestran resultados representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Resultados similares fueron reportados por LeBlanc et al., Scand J. Immunol., vol. 57, pág. 11 (2003).

Figura 7. Diagrama esquemático del mecanismo de acción propuesto de MSC. Las MSC median sus efectos inmunomoduladores al afectar las células tanto de los sistemas inmunes innatos (rutas 2 y 4 de DC; y ruta 6 de NK) como adaptativos (rutas 1 y 5 de T y ruta 7 de B). En respuesta a un patógeno invasor, las DC inmaduras migran al sitio de entrada potencial, maduran y adquieren la capacidad de cebar células T no alteradas (mediante señales específicas y coestimuladoras de antígenos) para convertirse en células T efectoras protectoras (inmunidad T<sub>H1</sub> mediada por células o T<sub>H2</sub> humoral). Durante la interacción MSC-DC, las MSC, mediante contacto directo célula-célula o a través de un factor secretado, pueden alterar el resultado de la respuesta inmune limitando la capacidad de las DC de montar una respuesta mediada por células (ruta 2) o promoviendo la capacidad para montar una respuesta humoral (ruta 4). Además, cuando las células T efectoras maduras están presentes, las MSC pueden interactuar con ellas para desviar el equilibrio de las respuestas de T<sub>H1</sub> (ruta 1) hacia respuestas de T<sub>H2</sub> (ruta 5), y probablemente hacia un aumento de la actividad de células B productoras de IgE (ruta 7), los resultados deseables para la supresión de GvHD y los síntomas de la enfermedad autoinmune. Las MSC en su capacidad para dar lugar a una mayor generación de población de T<sub>Reg</sub> (ruta 3) puede resultar en un fenotipo tolerante y puede ayudar a un huésped receptor al amortiguar la inflamación de los vecinos en su microambiente local. La línea de puntos (---) representa el mecanismo propuesto.

La invención se describirá ahora con respecto a los siguientes ejemplos; debe entenderse, sin embargo, que el alcance de la presente invención no debe limitarse a los mismos.

#### Ejemplo 1

##### Materiales y métodos

##### Cultivo de las MSC humanas

Las MSC humanas se cultivaron como se describe en Pittenger et al., Science, vol. 284, pág. 143 (1999). En resumen, se recogieron muestras de médula de la cresta ilíaca de donantes anónimos tras el consentimiento informado de Poietics Technologies, Div. de Cambrex Biosciences. Las MSC se cultivaron en una solución de antibiótico-antimicótico al 1% (Invitrogen, Carlsbad, California) con bajo contenido de glucosa - medio completo de Eagle modificado de Dulbecco (Life Technologies, Carlsbad, California) y suero bovino fetal al 10% (FBS, JRH BioSciences, Lenexa,

Kansas). Las MSC crecieron como una monocapa adherente y se separaron con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05% a 37°C durante 3 minutos). Todas las MSC utilizadas se caracterizaron previamente por el potencial de multilineaje y conservaron la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales (condrocíticos, adipogénicos y osteogénicos) (Pittenger, et al., Science, volumen 284, pág. 143 (1999)).

5

#### Aislamiento de células dendríticas

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a través de Poietics Technologies, Div. de Cambrex Biosciences (Walkersville, MD). Los precursores de células dendríticas (DC) de linaje monocítico (CD1c+) se seleccionaron positivamente a partir de PBMC usando un método de separación magnética de 2 etapas según Dzionek et al. al., J. Immunol., vol. 165, pág. 6037 (2000). Brevemente, se agotó magnéticamente la cantidad de células CD19+ en las células B que expresan CD1c usando perlas magnéticas, seguido por la marcación de la fracción agotada en células B con CD1c marcados con biotina (BDCA1+) y anticuerpos anti-biotina y separándolos de la fracción celular no marcada utilizando columnas magnéticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Auburn, California). Los precursores de DC de linaje plasmacitoide se aislaron a partir de PBMC mediante clasificación inmunomagnética de células recubiertas con anticuerpo marcadas positivamente (BDCA2+) (Miltenyi Biotech, Auburn, California).

10

15

#### Cultivo de MSC-DC

En la mayoría de experimentos, las MSC y DC humanas se cultivaron en números iguales durante varios periodos de tiempo y se recogió y almacenó el sobrenadante del cultivo celular a -80°C hasta una evaluación posterior. En experimentos seleccionados, se cultivaron MSC con células DC1 o DC2 maduras (relación de MSC: DC de 1:1) durante 3 días y después se irradiaron los cultivos combinados (MSC y DC) para evitar cualquier proliferación. A continuación, se añadieron células T alogénicas purificadas no alteradas con anticuerpos (CD4+, CD45RA+) a las MSC/DC irradiadas y se cultivaron durante 6 días más. La fracción celular no adherente (células T purificadas) se recogió después de los cultivos, se lavó dos veces y se reestimuló con PHA durante otras 24 horas, después de lo cual se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular y se analizaron para determinar IFN- $\gamma$  secretado y IL-4 por ELISA.

20

25

30

#### Aislamiento de células NK

Se obtuvieron poblaciones purificadas de células NK mediante el agotamiento de células no NK que se marcan magnéticamente con un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (anticuerpos anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD36 y anti-IgE) como reactivo primario y los anticuerpos monoclonales anti-biotina conjugados con microperlas como reactivo de marcación secundario. Las células no NK marcadas magnéticamente se retuvieron en columnas MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, California) en un campo magnético, mientras que las células NK pasaron a través y se recogieron.

35

40

#### Aislamiento de la población de células T<sub>Reg</sub>

La población de células T<sub>Reg</sub> se aisló usando un procedimiento de aislamiento en dos etapas. Primero, se marcaron indirectamente magnéticamente células T no CD4<sup>+</sup> con un cóctel de anticuerpos marcados con biotina y microperlas anti-biotina. Las células marcadas se agotaron después por separación sobre una columna MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, California). A continuación, se marcaron directamente las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con microperlas de CD25 y se aislaron mediante selección positiva a partir de la fracción de células CD4<sup>+</sup> previamente enriquecidas. Se retuvieron las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> marcadas magnéticamente en la columna y se eluyeron después de retirar la columna del campo magnético.

45

50

Con el fin de determinar si el aumento de la población de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> generada en presencia de MSC eran de naturaleza supresora, se aislaron poblaciones de células T<sub>Reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a partir de cultivos de PBMC o MSC+PBMC (relación de MSC con respecto a PBMC de 1:10) (cultivadas sin ninguna estimulación adicional durante 3 días) usando un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Estas células se irradiaron para bloquear cualquier proliferación adicional y se usaron como estimuladores en una reacción de linfocitos mixtos (MLR), en donde los respondedores eran PBMC alogénicas (relación de estimulador con respecto a respondedor de 1:100) en presencia de PHA (2,5  $\mu$ g/mL). El cultivo se llevó a cabo durante 48 horas, tras lo cual se añadió timidina <sup>3</sup>H. La radiactividad incorporada se contó después de 24 horas.

55

Las PBMC se cultivaron en ausencia o presencia de MSC (relación de MSC con respecto a PBMC 1:10), después de lo cual se recogió la fracción no adherente y se inmunotizó con el receptor de TNF inducido por glucocorticoides marcado con FITC, o GITR, y CD4 marcada con PE.

60

#### Generación de células T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub>

Se sembraron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a razón de 2 x 10<sup>6</sup> células/mL durante 45 min a 37°C con el fin de eliminar los monocitos. La fracción no adherente se incubó en presencia de anticuerpos anti-CD3 (5  $\mu$ g/mL) y anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) unidos a la placa bajo condiciones de T<sub>H1</sub> (IL-2 (4 ng/mL) + IL-12 (5 ng/mL) + anti-IL-4 (1  $\mu$ g/mL)

65

o T<sub>H</sub>2 (IL-2 (4 ng/mL) + IL-4 (4 ng/mL) + anti-IFN- $\gamma$  (1  $\mu$ g/mL)) durante 3 días en presencia o ausencia de MSC. Las células se lavaron y luego se estimularon nuevamente con PHA (2,5  $\mu$ g/mL) durante otras 24 o 48 horas, después de lo cual se midieron los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4 en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota).

5 Análisis de los niveles de VEGF, PGE<sub>2</sub> y pro-MMP-1 en sobrenadante de cultivo de MSC.

Usando las MSC humanas previamente caracterizadas, se analizaron los niveles de interleuquina 6 (IL-6), VEGF, mediador lipídico de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y metaloproteinasa de matriz 1 (pro-MMP-1) en sobrenadante de cultivo de MSC cultivadas durante 24 horas en presencia o ausencia de PBMC (relación de MSC con respecto a PBMC de 1:10).

Proliferación de PBMC

15 Las PBMC purificadas se prepararon por centrifugación de leukopack (Cambrex, Walkersville, Maryland) sobre Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Oslo, Noruega). Las células separadas se cultivaron (por triplicado) en presencia o ausencia de MSC (sembradas 3-4 horas antes de la adición de PBMC para permitir que se asentaran) durante 48 horas en presencia del mitógeno PHA (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri). En experimentos seleccionados, las PBMC se resuspendieron en medio que contenía inhibidores de PGE<sub>2</sub> Indometacina (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) o NS-938 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan). Se añadió (<sup>3</sup>H)-timidina (20  $\mu$ L en un cultivo de 200  $\mu$ L) y se recolectaron las células después de un cultivo adicional de 24 horas utilizando un recolector automático. Los efectos de MSC o bloqueadores de PGE<sub>2</sub> se calcularon como el porcentaje de la respuesta de control (100%) en presencia de PHA.

25 RT-PCR cuantitativa

Se preparó ARN total de sedimentos celulares usando un kit comercialmente disponible (Qiagen, Valencia, California) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se eliminó el ADN genómico contaminante usando el kit libre de ADN (Ambion, Austin, Texas). La RT-PCR cuantitativa se realizó en un sistema de detección MJ Research Opticon (South San Francisco, California) utilizando el kit de RT-PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Valencia, California) con cebadores a una concentración de 0,5  $\mu$ M. Los cambios relativos en los niveles de expresión en células cultivadas bajo diferentes condiciones se calcularon mediante la diferencia en los valores de Ct (punto de cruce) usando  $\beta$ -actina como control interno. Las secuencias para cebadores específicos de COX-1 y COX-2 fueron: COX-1: 5'-CCG GAT GCC AGT CAG GAT GAT G-3' (directo), 5'-CTA GAC AGC CAG ATG CTG ACA G-3' (inverso); COX-2: 5'-ATC TAC CCT CCT CAA GTC CC-3' (directo), 5'-TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG-3' (inverso).

Se incubaron cantidades crecientes de PBMC alogénicas con un número constante de MSC (2.000 células/pozo) sembradas en placas de 96 pozos en presencia de PHA (2,5  $\mu$ g/mL) durante 72 horas, y se determinó la incorporación de timidina <sup>3</sup>H (recuentos por minuto, cpm). Las PBMC y MSC se cultivaron en relaciones de MSC:PBMC de 1:1, 1:3, 1:10, 1:30 y 1:81.

Resultados

45 En los presentes estudios, se examinó la interacción de MSC humanas con poblaciones de células inmunes aisladas, incluyendo células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras (T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2) y células NK. La interacción de MSC con cada tipo de células inmunes tenía consecuencias específicas, lo que sugiere que las MSC pueden modular varias etapas en el proceso de respuesta inmune. Se evaluó la producción del factor o factores secretado que modulan y puede ser responsables de los efectos inmunomoduladores de MSC y se implicó la síntesis de prostaglandinas.

50 Se aislaron células dendríticas precursoras mieloides (DC1) y plasmacitoides (DC2) mediante clasificación inmunomagnética de células BDCA1<sup>+</sup> y BDCA2<sup>+</sup> respectivamente y maduraron mediante incubación con GM-CSF e IL-4 (1 x 10<sup>3</sup> IU/mL y 1 x 10<sup>3</sup> UI/mL, respectivamente) para células DC1, o IL-3 (10 ng/mL) para células DC2. Utilizando citometría de flujo, las células DC1 fueron HLA-DR<sup>+</sup> y CD11c<sup>+</sup>, mientras que las células DC2 fueron HLA-DR<sup>+</sup> y CD123<sup>+</sup> (Figura 1A). En presencia del lipopolisacárido bacteriano del agente inflamatorio (LPS, 1 ng/mL), las células DC1 produjeron niveles moderados de TNF- $\alpha$ , pero cuando estaban presentes MSC (relaciones examinadas 1:1 y 1:10), hubo una reducción de > 50% en la secreción de TNF- $\alpha$  (Figura 1B). Por otra parte, las células DC2 produjeron IL-10 en presencia de LPS y sus niveles aumentaron más de 2 veces tras el cocultivo de MSC:DC2 (1:1) (Figura 1B). Por lo tanto, las MSC modificaron el perfil de citoquinas de las DC activadas en cultivo hacia un fenotipo más tolerogénico. Además, las DC activadas, cuando se cultivaron con MSC, fueron capaces de reducir el IFN- $\gamma$  y aumentar los niveles de IL-4 secretados por células T CD4<sup>+</sup> sin alterar (Figura 1C), lo que sugiere un desplazamiento mediado por MSC del fenotipo de células T proinflamatorias a anti-inflamatorias.

65 Como el aumento de la secreción de IL-10 desempeña un papel en la generación de células reguladoras (Kingsley et al., J. Immunol., vol. 168, pág. 1080 (2002)), se cuantificaron las células T reguladoras (T<sub>Reg</sub>) por citometría de flujo en cocultivos de PBMC y MSC. Tras el cultivo de PBMC con MSC durante 3-5 días, hubo un aumento en el número de células T<sub>Reg</sub> determinado por tinción de las PBMC con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 (Figura 2A), soportando

además una respuesta tolerogénica inducida por MSC. La población de células  $T_{Reg}$   $CD4^+CD25^+$ , generada en presencia de MSC expresó mayores niveles del receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR), un receptor de superficie celular expresado en poblaciones de células  $T_{Reg}$ , y era de naturaleza supresora, ya que suprimió la proliferación de células T alogénicas (Figura 3A, B). A continuación, se investigaron las MSC en cuanto a su capacidad directa para afectar la diferenciación de células T. Utilizando células T purificadas seleccionadas de anticuerpo (células  $Th$   $CD4^+$ ), se generaron células  $T_{H1}$  productoras de IFN- $\gamma$  y  $T_{H2}$  productoras de IL-4 en presencia o ausencia de MSC. Cuando las MSC estaban presentes durante la diferenciación, hubo una secreción reducida de IFN- $\gamma$  por células  $T_{H1}$  y un aumento de la secreción de IL-4 por células  $T_{H2}$  (Figura 2B). No se observaron cambios significativos en los niveles de IFN- $\gamma$  o IL-4 cuando se añadieron las MSC al cultivo después de que las células  $Th$  se habían diferenciado (a los 3 días) en los tipos efectores  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$  (datos no mostrados). Estos experimentos sugieren que las MSC pueden afectar la diferenciación de células T efectoras directamente y alterar la secreción de citoquinas de células T hacia un fenotipo humoral.

De forma similar, cuando se cultivaron las MSC con células NK purificadas (CD3-, CD14-, CD19-, CD36-) en una relación 1:1 para diferentes períodos de tiempo (0-48 horas), se redujo la secreción de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo (Figura 2C), lo que sugiere que las MSC pueden modular también las funciones de las células NK.

Los trabajos previos han indicado que las MSC modifican las funciones de las células T por un factor o factores solubles (LeBlanc et al., Exp. Hematol., vol. 31, pág. 890 (2003), Tse et al., Transplantation, vol. 75, pág. 389 (2003)). Se observó que las MSC segregaban varios factores, incluyendo IL-6, prostaglandina  $E_2$ , VEGF y proMMP-1 constitutivamente, y los niveles de cada uno aumentaron tras el cultivo con PBMC (Figura 5). Con el fin de investigar los factores derivados de MSC que conducen a la inhibición del TNF- $\alpha$  y el aumento de la producción de IL-10 por las DC, se investigó el papel potencial de la prostaglandina  $E_2$ , ya que se ha demostrado que inhibe la producción de TNF- $\alpha$  por las DC activadas. (Vassiliou, et al., Cell. Immunol., vol. 223, pág. 120 (2003)). Los medios acondicionados del cultivo de MSC (cultivo de 24 horas de  $0,5 \times 10^6$  células/mL) contenían aproximadamente 1.000 pg/mL de  $PGE_2$  (Figura 4A). No hubo presencia detectable de inductores conocidos de la secreción de  $PGE_2$ , por ejemplo, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-1 $\beta$  (datos no mostrados) en el sobrenadante del cultivo indicando una secreción constitutiva de  $PGE_2$  por las MSC. La secreción de  $PGE_2$  por las hMSC se inhibió 60-90% en presencia de inhibidores conocidos de la producción de  $PGE_2$ , NS-398 (5  $\mu$ M) e indometacina (4  $\mu$ M) (Figura 4A). Como la liberación de la secreción de  $PGE_2$  se produce como resultado de la actividad enzimática de la enzima 1 de ciclooxigenasa constitutivamente activa (COX-1) y de la enzima 2 de ciclooxigenasa inducible (COX-2) (Harris, et al., Trends Immunol., vol. 23, pág. 144 (2002)) se analizó la expresión de ARNm para COX-1 y COX-2 en MSC y PBMC utilizando un sistema de cultivo de migración entre pozos. Las MSC expresaron niveles significativamente más altos de COX-2 en comparación con PBMC y los niveles de expresión aumentan > 3 veces tras el cocultivo de MSC y PBMC (relación de MSC con respecto a PBMC de 1:10) durante 24 horas (Figura 4B). Se observaron cambios modestos en los niveles de COX-1, lo que sugiere que el incremento en la secreción de  $PGE_2$  tras el cocultivo de MSC-PBMC (Figura 5) está mediado por la sobreexpresión de COX-2. Para investigar si los efectos inmunomoduladores de MSC en DC y células T fueron mediados por  $PGE_2$ , se cultivaron MSC con células dendríticas activadas (DC1) o células  $T_{H1}$  en presencia de inhibidores de  $PGE_2$  NS-398 o indometacina. La presencia de NS-398 o indometacina aumentó la secreción de TNF- $\alpha$  por DC1 y la secreción de IFN- $\gamma$  de células  $T_{H1}$  (Figura 4C), respectivamente, lo que sugiere que los efectos de MSC en los tipos de células inmunitarias pueden estar mediados por  $PGE_2$  secretada. Estudios recientes han demostrado que las MSC inhiben la proliferación de células T inducida por diversos estímulos (DeNicola et al., Blood, vol. 99, página 3838 (2002), LeBlanc et al., Scand. J. Immunol., vol. 57, pág. 11 (2003)). Se observó que las MSC inhiben la proliferación de células T inducida por mitógenos de una manera dependiente de la dosis (Figura 6) y cuando estaban presentes los inhibidores de  $PGE_2$  NS-398 (5  $\mu$ M) o indometacina (4  $\mu$ M), hubo un aumento > 70% en la incorporación de ( $^3H$ ) timidina por PBMC tratadas con PHA en cultivos que contienen MSC en comparación con controles sin inhibidores (Figura 4D).

En resumen, se propone un modelo de interacción de MSC con otros tipos de células inmunes (Figura 7). Cuando las células T maduras están presentes, las MSC pueden interactuar con ellas directamente e inhibir la producción de IFN- $\gamma$  proinflamatoria (ruta 1) y promover el fenotipo de células T reguladoras (ruta 3) y células  $T_{H2}$  antiinflamatorias (ruta 5). Además, las MSC pueden alterar el resultado de la respuesta inmunitaria de las células T a través de las DC segregando  $PGE_2$ , inhibiendo las células DC1 proinflamatorias (ruta 2) y promoviendo las células DC2 antiinflamatorias (ruta 4) o las DC reguladoras (ruta 3). Un cambio hacia la inmunidad de  $TH_2$ , a su vez, sugiere un cambio en la actividad de las células B hacia el aumento de la generación de anticuerpos del subtipo IgE/IgG1 (ruta 7). Las MSC, por su capacidad para inhibir la secreción de IFN- $\gamma$  de las células NK probablemente modifican la función de las células NK (ruta 6). Este modelo de interacciones de células MSC : inmunes es coherente con la experimentación realizada en otros laboratorios (LeBlanc et al., Exp. Hematol., vol. 31, pág. 890 (2003), Tse et al., Transplantation, vol. 75, pág. 389 (2003), DiNicola et al., Blood, vol. 99, pág. 3838 (2002)). Se está llevando a cabo un examen más detallado de los mecanismos propuestos y ahora se necesitan estudios en animales para examinar los efectos *in vivo* de la administración de MSC.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes en humanos.
- 10 2. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para uso según la reivindicación 1, en las que la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, uveítis, enfermedad autoinmune de la glándula tiroides, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad linfoproliferativa autoinmune (ALPS), enfermedad desmielinizante, encefalomielititis autoinmune, gastritis autoinmune (AIG), o enfermedades glomerulares autoinmunes.
- 15 3. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso según la reivindicación 1 o 2, que han de administrarse en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células por kilogramo de peso corporal hasta aproximadamente  $1 \times 10^7$  células por kilogramo de peso corporal.
- 20 4. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso según la reivindicación 1 o 2, que han de administrarse en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por kilogramo de peso corporal hasta aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células por kilogramo de peso corporal.
- 25 5. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente son alogénicas.
- 30 6. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente son autólogas.
- 35 7. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se han de administrar mediante administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal.
- 40 8. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se han de administrar como una suspensión de células en un medio líquido farmacéuticamente aceptable.
- 45 9. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente se recogen de un tejido que contiene células madre mesenquimales, se aíslan y se expanden en cultivo.
10. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso según la reivindicación 9, en las que el tejido que contiene células madre mesenquimales es de sangre, piel, sangre de cordón umbilical, músculo, grasa, pericondrio, médula ósea o periostio.
11. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se han de administrar en combinación con un agente terapéutico.
12. Las células madre mesenquimales no manipuladas genéticamente para el uso según la reivindicación 11, en las que el agente terapéutico es un fármaco antiinflamatorio.



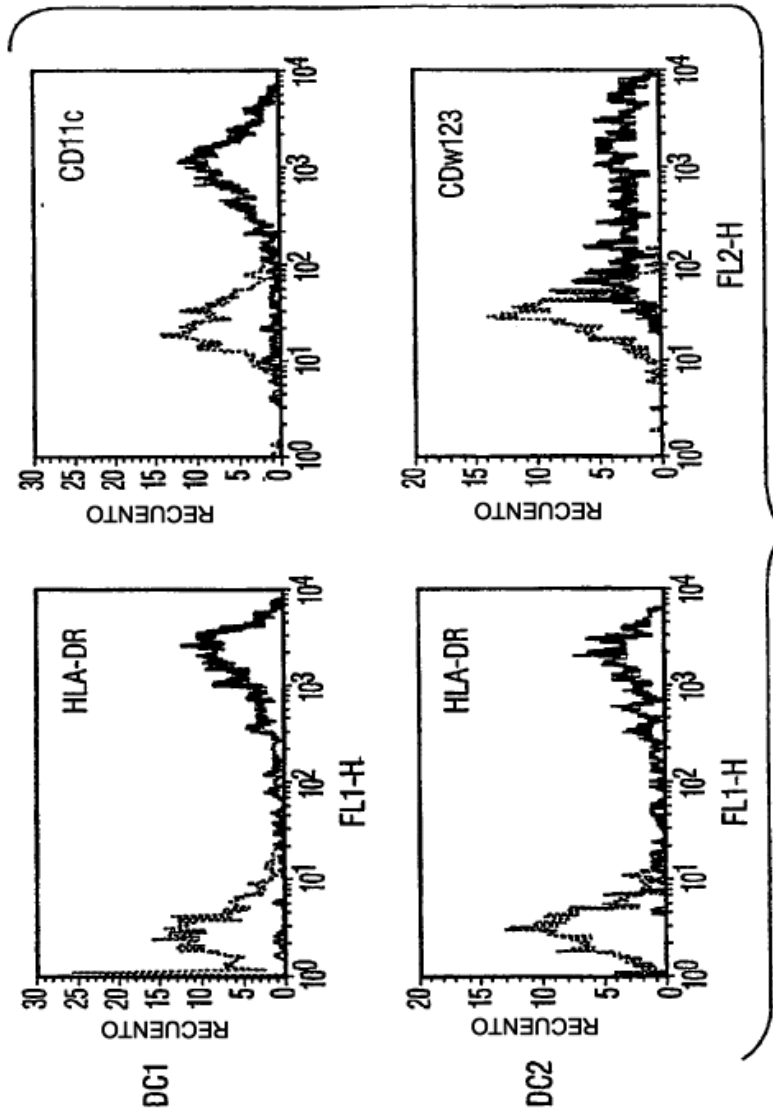


FIG. 1A

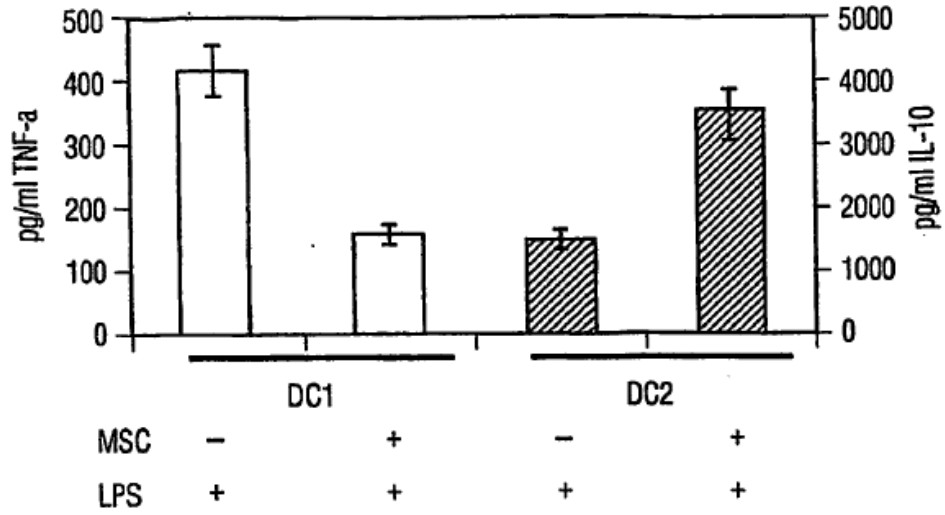


FIG. 1B

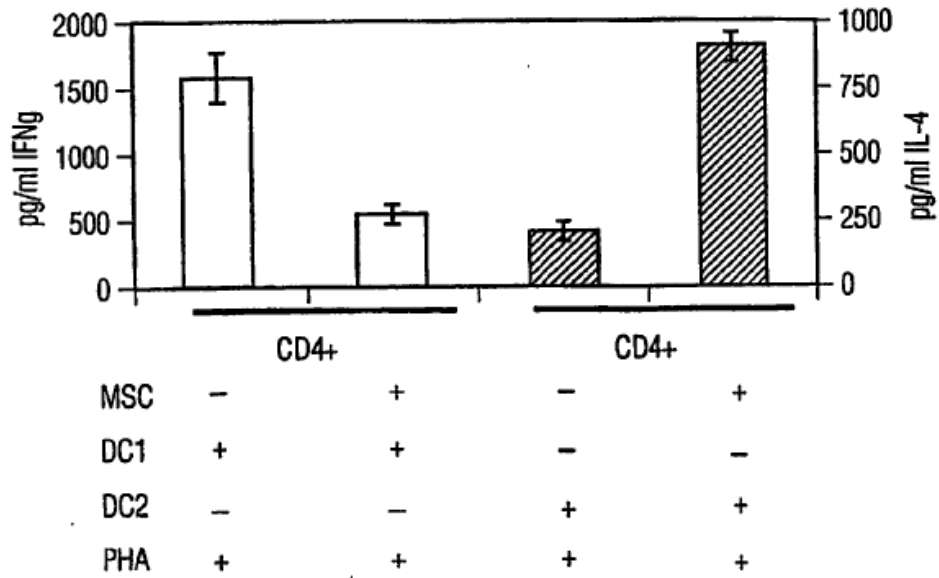


FIG. 1C

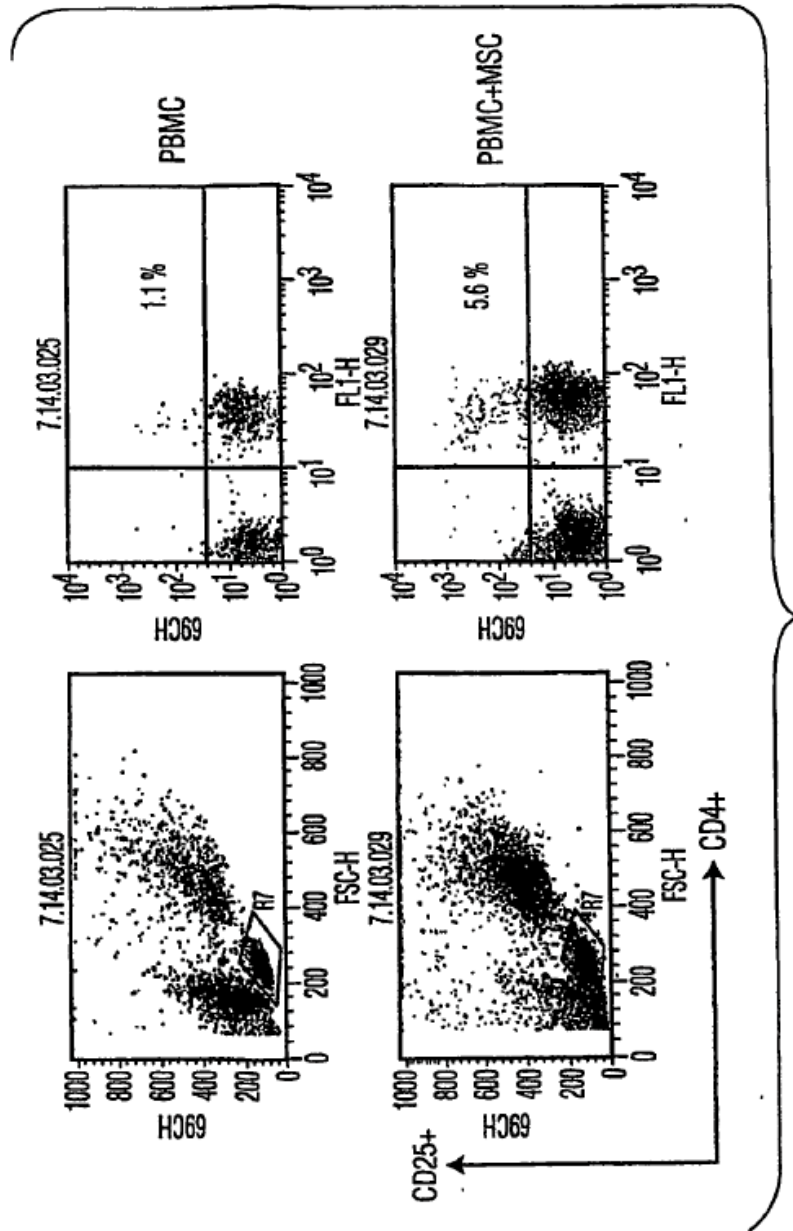


FIG. 2A

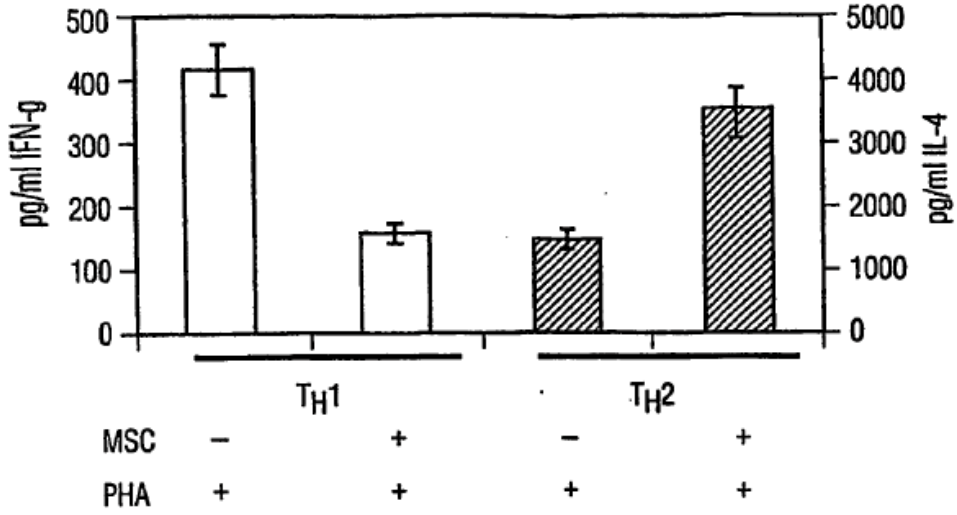


FIG. 2B

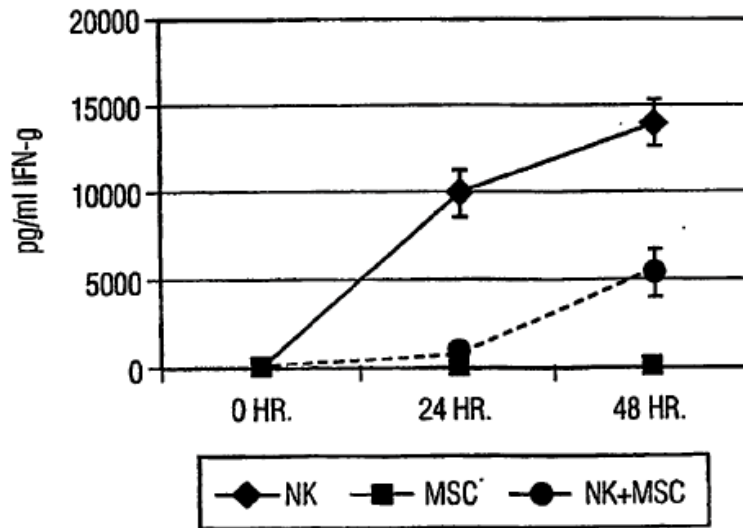


FIG. 2C

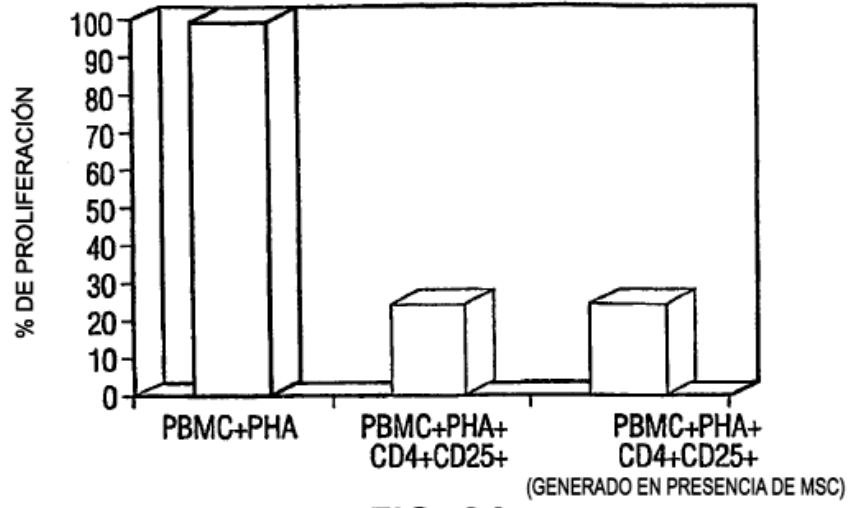


FIG. 3A

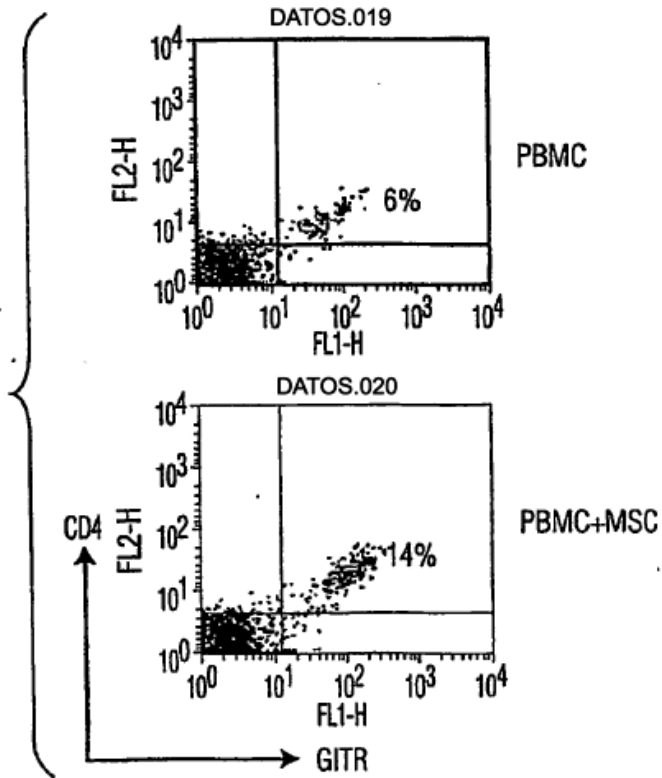


FIG. 3B

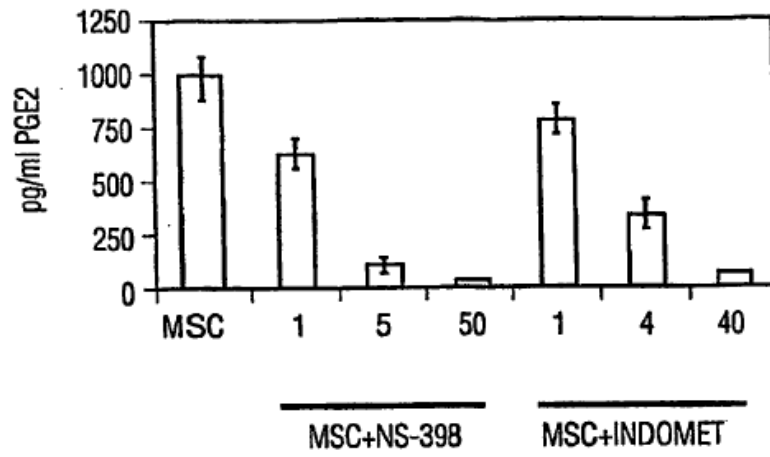


FIG. 4A

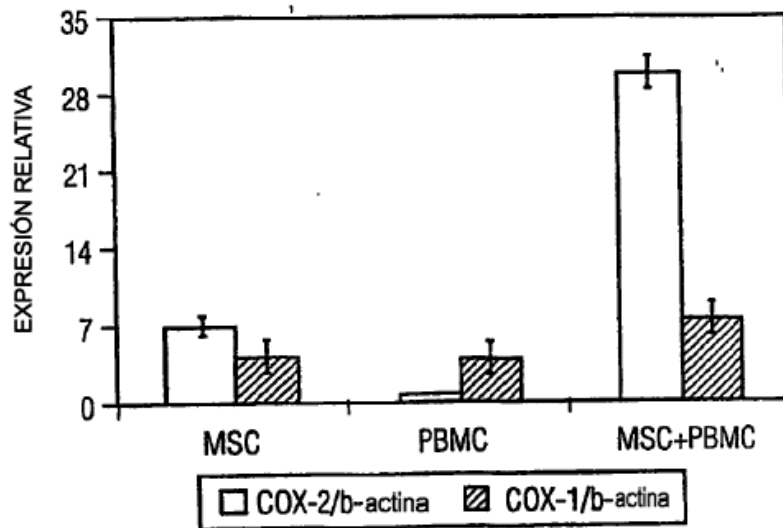


FIG. 4B

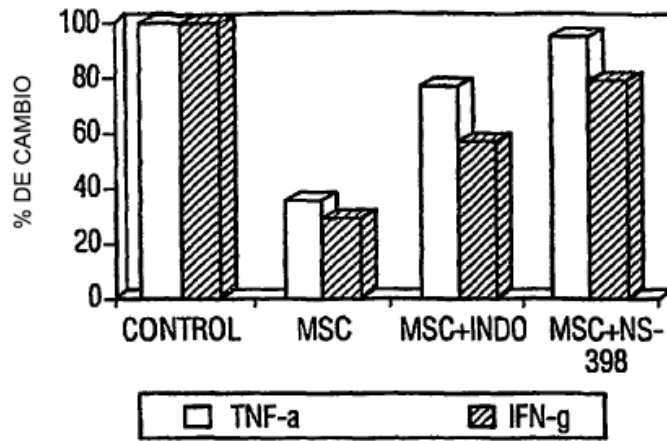


FIG. 4C

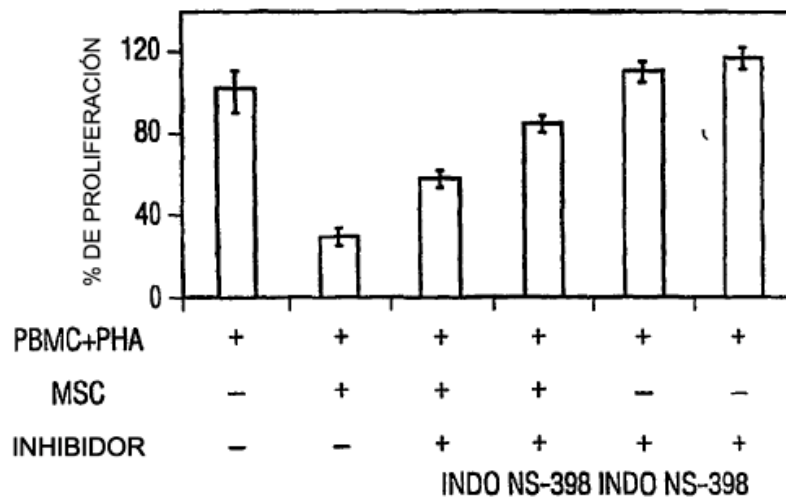
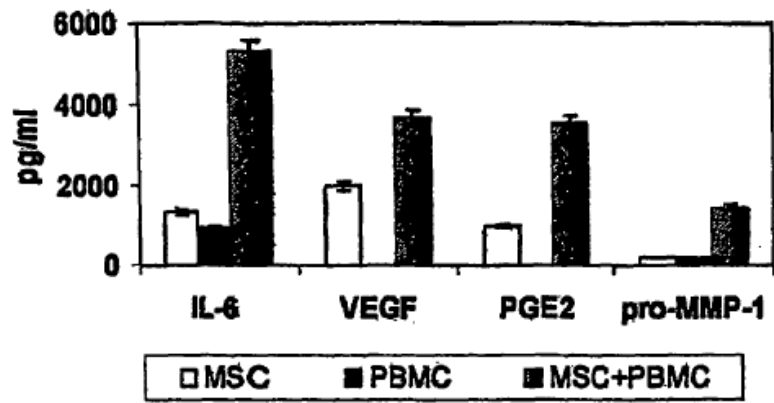
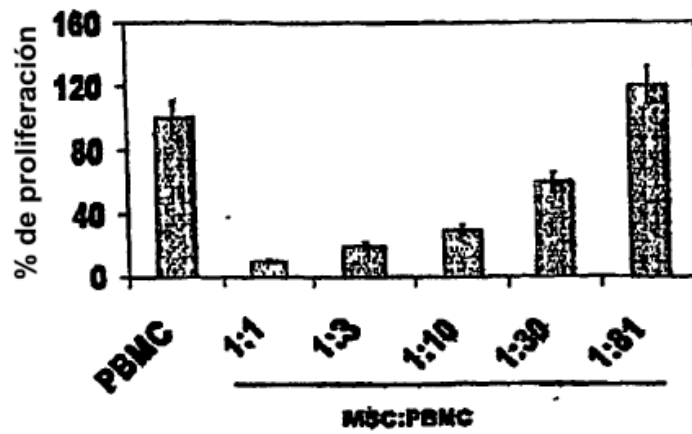


FIG. 4D

**Fig. 5**



**Fig. 6**





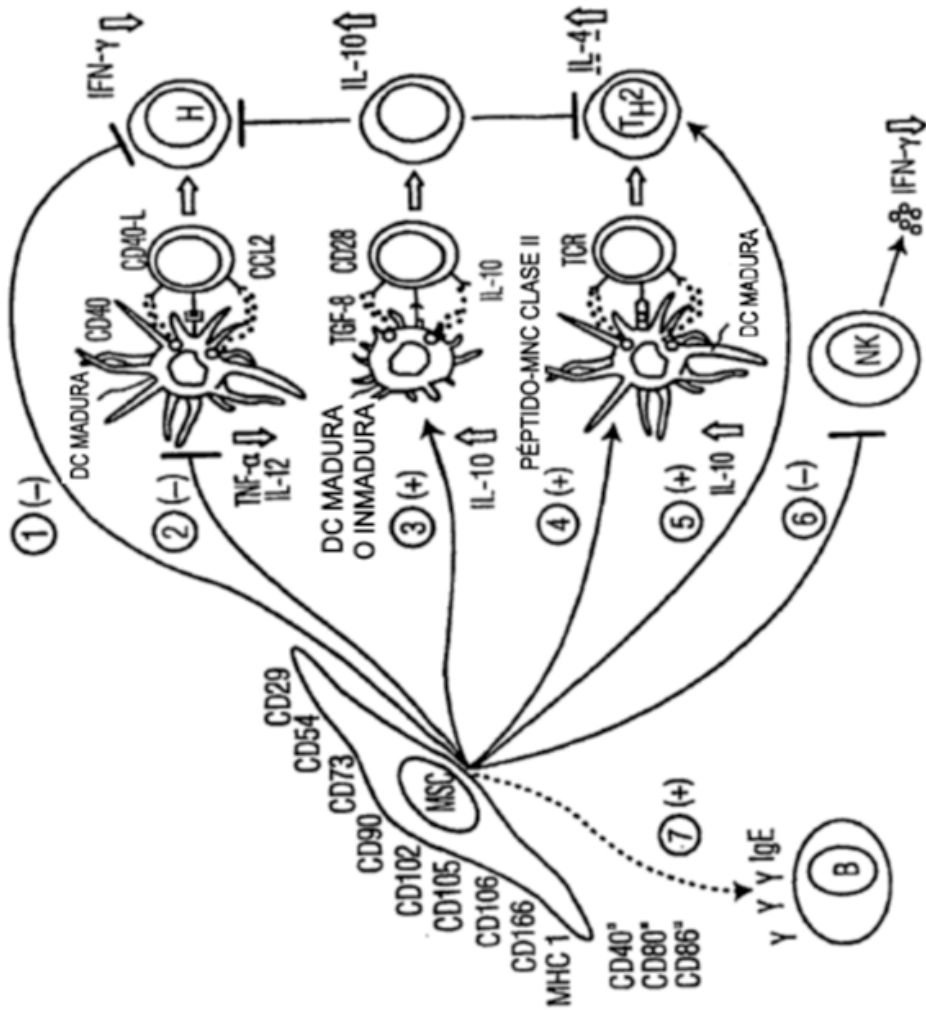


FIG. 7