

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 018**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2005 E 10011226 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2298864**

54 Título: **Células madre mesenquimales y usos para estas**

30 Prioridad:

**22.03.2004 US 555118 P**

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

**01.12.2017**

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 2 645 018 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Células madre mesenquimales y usos para estas

5 Esta invención se refiere a células madre mesenquimales. Más particularmente, esta invención se refiere a células madre mesenquimales para usar en la promoción de la curación de heridas inflamadas en un ser humano.

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)). Los estudios in vitro demostraron la capacidad de las MSC para diferenciarse a músculo (Wakitani et al., *Muscle Nerve*, vol. 18, pág. 1417 (1995)), precursores similares a neuronas (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 otros tipos de células. Además, se demostró que las MSC proporcionan capas alimentadoras eficaces para la expansión de las 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 demostraron que las MSC pueden ser útiles en la reparación o regeneración de huesos, cartílagos, meniscos o tejidos miocárdicos dañados (DeKok, et al., *Clin Oral Implants Res.*, vol. 14, pág. 481 (2003)); Wu, et al., *Transplantation*, vol. 75, pág. 679 (2003); Noel, et al., *Curr. Opin. Invest. 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 utilizaron MSC con resultados alentadores para el trasplante en modelos de enfermedades animales, que incluyen la osteogénesis imperfecta (Pereira y col., *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)). Significativamente, además, se informaron 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 de médula ósea heterólogos (Frassoni, 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 del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I en su superficie pero no expresan el MHC clase II (Le Blanc, et al., *Exp. Hematol.*, vol. 31, pág. 890 (2003); Potian, et al., *J. Immunol.*, vol. 171, pág. 3426 (2003)) ni las moléculas coestimuladoras CD40 o B7 (Majumdar, et al., *J. Biomed. Sci.*, vol. 10, pág. 228 (2003)), lo que sugiere que estas células tienen un fenotipo poco inmunogénico (Tse, et al., *Transplantation*, vol. 75, pág. 389 (2003)). Las MSC inhiben, además, las respuestas proliferativas de 1 célula 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 por trasplante y limitar la capacidad del sistema inmune receptor para reconocer y rechazar las células alogénicas después del trasplante. La producción de factores por las MSC, que modulan la respuesta inmune y respaldan la hematopoyesis, junto con su capacidad para diferenciarse en tipos celulares apropiados bajo estímulos locales, las convierten en células madre deseables para estudios de trasplante celular (Majumdar, et al., *Hematother. Stem Cell Res.*, vol. 9, pág. 841 (2000); Haynesworth, et al., *J. Cell. Physiol.*, vol. 166, pág. 585 (1996)).

45 Los solicitantes examinaron las interacciones de las células madre mesenquimales con poblaciones de células inmunes aisladas, que incluyen células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras (Th1 y Th2) y células NK. Sobre la base de tales interacciones, los Solicitantes descubrieron que las células madre mesenquimales pueden regular la producción de diversos factores que pueden regular varias etapas en el proceso de respuesta inmune. Así, las células madre mesenquimales pueden emplearse en el tratamiento de heridas inflamadas.

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

En general, la terapia de células madre mesenquimales (MSC) se basa, por ejemplo, en la siguiente secuencia: extraer el tejido que contiene MSC, aislar y expandir las MSC y administrar las MSC al ser humano, con o sin manipulación genética o bioquímica.

55 Las células madre mesenquimales que se administran pueden ser una población de células de composición homogénea o pueden ser una población de células mixtas enriquecida en MSC. Pueden obtenerse composiciones de células madre mesenquimales homogéneas mediante el cultivo de células del periostio o de la médula adherentes, y las composiciones de células madre mesenquimales pueden obtenerse mediante el cultivo de células del periostio o de la médula adherentes, y las células madre mesenquimales pueden identificarse mediante 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 los Estados Unidos núm. 5.486.359. Las fuentes alternativas para las células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a la sangre, piel, sangre del cordón umbilical, músculo, grasa, hueso y pericondrio.

65

Las células madre mesenquimales pueden administrarse mediante una variedad de procedimientos. Las células madre mesenquimales pueden administrarse de manera sistémica, tal como por administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Las células madre mesenquimales pueden ser de un espectro de fuentes que incluyen autólogas, alogénicas o xenogénicas.

5

La presente invención proporciona células madre mesenquimales para usar en un método para promover la curación de heridas inflamadas en un ser humano. El método comprende administrar a las células madre mesenquimales humanas en una cantidad eficaz para promover la cicatrización de las heridas en el ser humano.

10

Aunque el alcance de la presente invención no debe limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales causan que las células Treg y las células dendríticas liberen interleucina 10 (IL-10). La IL-10 limita o controla la inflamación en una herida, y promueve así la cicatrización de una herida.

15

Además, las células madre mesenquimales pueden promover la cicatrización de heridas y la curación de fracturas al inducir factores de secreción por otros tipos de células. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden inducir la liberación mediada por la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), así como la liberación mediada por PGE<sub>2</sub> de la hormona de crecimiento, insulina, factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1), proteína-3 de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP-3) y endotelina-1.

20

Las células madre mesenquimales se administran al ser humano en una cantidad eficaz para promover la curación de heridas en el ser humano. En general, las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente 1x10<sup>5</sup> células/kg a aproximadamente 1x10<sup>7</sup> células/kg, preferentemente, de aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células/kg a aproximadamente 5x10<sup>6</sup> células/kg. La cantidad exacta de células madre mesenquimales a administrar depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, y la extensión y severidad de la herida que a tratar.

25

Las células madre mesenquimales pueden administrarse junto con un portador farmacéutico aceptable, como se describió anteriormente en esta descripción. Las células madre mesenquimales pueden administrarse de manera sistémica, como se describió anteriormente en esta descripción. Alternativamente, las células madre mesenquimales pueden administrarse directamente a una herida, como en un líquido en un apósito o reservorio que contiene las células madre mesenquimales.

30

Las células madre mesenquimales pueden emplearse en el tratamiento de heridas, tanto internas como externas, así como en el tratamiento de las úlceras dérmicas que se encuentran en los pies, manos, piernas o brazos, que incluyen, entre otras, las úlceras dérmicas causadas por enfermedades como la diabetes y la anemia de células falciformes.

35

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

40

La selección de un polinucleótido apropiado que codifica un agente terapéutico depende de diversos factores, que incluyen la enfermedad o el trastorno que se trata, y la extensión y gravedad de esta. Los polinucleótidos que codifican los agentes terapéuticos, y los vehículos de expresión apropiados se describen adicionalmente en la Patente de los Estados Unidos núm. 6.355.239.

45

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, que incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, citocinas, fármacos tales como fármacos antiinflamatorios, y células diferentes a las células madre mesenquimales, tales como células dendríticas, y pueden administrarse con portadores solubles para las células tales como el ácido hialurónico, o en combinación con matrices sólidas, tales como colágeno, gelatina u otros polímeros biocompatibles, según corresponda.

50

Debe entenderse que los métodos que se describen en la presente descripción pueden llevarse a cabo de varias maneras y con diversas modificaciones y permutaciones de estos que se conocen bien en la técnica. Puede apreciarse, además, que cualquier teoría establecida en cuanto a los modos de acción o interacciones entre los tipos de células no debe interpretarse como que limita esta invención de ninguna manera, sino que se presenta de manera tal que los métodos de la invención puedan entenderse más completamente.

55

La invención ahora se describirá con respecto a las figuras, en donde:

Fig. 1 Las MSC modulan las funciones de las células dendríticas. (A) Análisis por citometría de flujo de células DC1 monocíticas maduras mediante el uso de anticuerpos contra HLA-DR y CD11c y de células plasmocitoides DC2 mediante el uso de anticuerpos contra HLA-DR y CD123 (receptor de IL-3). (---): control de isotipo; (-): Anticuerpos conjugados FITC/PE. (B) Las MSC inhiben la secreción de TNF- $\alpha$  (eje y primario) y aumentan la secreción IL-10 (eje y

60

secundario) de células DC1 y DC2 activadas respectivamente. (C) Las MSC que se cultivaron con células DC1 maduras inhiben la secreción de IFN- $\gamma$  (eje y primario) por las células T y aumentan los niveles de IL-4 (eje y secundario) en comparación con las MSC o DC solas. 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 cambio en la población de células T hacia un fenotipo antiinflamatorio.

Fig. 2 Las MSC inhiben la función de las células T efectoras proinflamatorias. (A) Análisis por citometría de flujo del número de células T<sub>Reg</sub> (en %) mediante la tinción de las PBMC o la fracción no adherente en el cultivo de MSC PBMC (MSC PBMC) con anticuerpos CD4 conjugados con FITC (eje x) y CD25 conjugados con PE (eje Y). Las regiones se establecieron en base a los anticuerpos de control de isotipo como fondo. Los gráficos son representativos de 5 experimentos independientes. (B) Las células T<sub>H1</sub> que se generaron en presencia de MSC secretaron niveles reducidos de IFN- $\gamma$  (eje Y primario) y las células T<sub>H2</sub> que se generaron en presencia de MSC secretaron cantidades mayores de IL-4 (eje y secundario) en los sobrenadantes del cultivo celular. (C) Las MSC inhiben la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK purificadas que se cultivaron durante 0, 24 o 48 horas en una placa de 24 pocillos. Los datos que se muestran son la media  $\pm$  SD de la secreción de citocinas en un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

Fig. 3 Las MSC conducen a un mayor número de poblaciones de células T<sub>Reg</sub> y una mayor expresión de GITR. (A) Se aisló una población de células T<sub>Reg</sub> CD4+ CD25+ a partir de cultivos de PBMC o MSC + PBMC (relación MSC a PBMC 1:10) (que se cultivaron sin estimulación adicional durante 3 días) mediante el uso de un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Estas células se irradiaron (para bloquear cualquier proliferación adicional) y se usaron como estimuladoras en una reacción de linfocitos mixtos (MLR), donde los respondedores fueron PBMC alogénicas (relación estimuladoras a respondedores 1:100) en presencia de fitohemaglutinina (PHA) (2,5 mg/ml). Las células se cultivaron durante 48 horas, después de lo cual se añadió timidina <sup>3</sup>H, y se contó la radiactividad incorporada después de 24 horas. Los resultados mostraron que la población T<sub>Reg</sub>, que se generó en presencia de MSC (línea 3), era funcionalmente similar a las células T<sub>Reg</sub> que se generaron en ausencia de MSC (línea 2). (B) Se cultivaron PBMC durante 3 días en ausencia (gráfico superior) o presencia (gráfico inferior) de MSC (relación MSC a PBMC 1:10), después de lo cual se recolectó la fracción no adherente y se inmunotizó con GITR marcado con FITC y CD4 marcado con PE. Los resultados muestran un aumento mayor del doble en la expresión de GITR en las células que se cultivaron en presencia de MSC.

Fig. 4 Las MSC producen PGE<sub>2</sub> y el bloqueo de PGE<sub>2</sub> invierte los efectos inmunomoduladores mediados por las MSC. (A) Secreción de PGE<sub>2</sub> (media  $\pm$  SD) en sobrenadantes de cultivo que se obtuvieron a partir de MSC que se cultivaron en presencia o ausencia de bloqueadores de PGE<sub>2</sub> NS-398 o indometacina (Indometh.) a diversas concentraciones. Las concentraciones del inhibidor están en  $\mu$ M y los datos que se presentan son valores que se obtuvieron después de 24 horas de cultivo (B) Expresión de COX-1 y COX-2 en MSC y PBMC mediante el uso de RT-PCR en tiempo real. Las MSC expresaron niveles significativamente más altos de COX-2 en comparación con las PBMC, y cuando se cultivaron las MSC en presencia de las PBMC, hubo un aumento >3 veces en la expresión de COX-2 en las MSC. Se muestran los datos representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Los cultivos MSC + PBMC se configuraron en una placa de cámara de transpocillo donde se colocaron las MSC en la cámara inferior y las PBMC en la cámara superior. (C) La presencia de los bloqueadores de PGE<sub>2</sub> indometacina (Ind.) o NS-398 aumenta la secreción de TNF- $\alpha$  de las DC activadas ( $\square$ ) y la secreción de IFN- $\gamma$  de las células T<sub>H1</sub> ( $\square$ ) en comparación con los controles. Los datos se calcularon como % de cambio de los cultivos que se generaron en ausencia de MSC e inhibidores de PGE<sub>2</sub> (D) La presencia de los bloqueadores de PGE<sub>2</sub> indometacina (Indo) y NS-398 durante el cocultivo MSC+PBMC (1:10) invierte los efectos antiproliferativos mediados por las MSC sobre las PBMC que se trataron con PHA. Los datos que se muestran son de un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

Fig. 5 La secreción de citocinas de MSC constitutiva se eleva en presencia de PBMC alogénicas. Mediante el uso de MSC humanas que se caracterizaron previamente, se analizaron los niveles de las citocinas IL-6 y VEGF, mediador lipídico PGE<sub>2</sub> y metaloproteinasa de matriz 1 (pro MMP-1) en el sobrenadante del cultivo de MSC que se cultivaron durante 24 horas en presencia (barras rayadas) o ausencia (barras abiertas) de PBMC (relación MSC a PBMC 1:10). Las MSC produjeron constitutivamente IL-6, VEGF y PGE<sub>2</sub>, y los niveles de estos factores aumentaron con el cocultivo con PBMC, lo que sugiere que las MSC pueden desempeñar una función en la modulación de las funciones inmunes en un entorno inflamatorio.

Fig. 6 Las MSC inhiben la proliferación de las células T inducida por mitógenos de una manera dependiente de la dosis. Se incubaron cantidades crecientes de PBMC alogénicas con números constantes de MSC (2.000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos 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 las PBMC que se trataron con PHA en presencia de MSC. Se muestran los resultados representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Resultados similares se informaron por LeBlanc, et al., Scand J. Immunol., vol. 57, pág. 11 (2003).

Fig. 7 Diagrama esquemático del mecanismo de acción de las MSC propuesto. Las MSC median sus efectos inmunomoduladores al afectar a las células tanto del sistema inmune innato (vías 2-4 de las DC y vía 6 de las NK) como adaptativo (vías 1 y 5 de las células T y vía 7 de las células B). En respuesta a un patógeno invasor, las DC inmaduras

migran al sitio de entrada potencial, maduran y adquieren la capacidad de cebar las células T vírgenes (por medio de señales específicas coestimuladoras y específicas del antígeno) para convertirse en células T efectoras de protección (inmunidad  $T_H1$  mediada por células u  $T_H2$  humoral). Durante la interacción MSC-DC, las MSC, por medio del contacto directo célula a célula o por medio del factor secretado, pueden alterar el resultado de la respuesta inmune al limitar la capacidad de las DC para inducir una respuesta mediada por células (vía 2) o al promover la capacidad para inducir una respuesta humoral (vía 4). Además, cuando las células T efectoras maduras están presentes, las MSC pueden interactuar con ellas para desviar el equilibrio de las respuestas  $T_H1$  (vía 1) hacia las respuestas  $T_H2$  (vía 5), y probablemente hacia un aumento de la actividad de las células B que producen IgE (vía 7), resultados deseables para la supresión de la GvHD y de los síntomas de enfermedades autoinmunes. Las MSC en su capacidad para dar como resultado una mayor generación de la población de  $T_{Reg}$  (vía 3) pueden dar como resultado un fenotipo tolerante y pueden ayudar a un huésped receptor al amortiguar la inflamación inespecífica en su microambiente local. La línea discontinua (----) representa el mecanismo propuesto.

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

#### Ejemplo 1

##### Materiales y Métodos

##### Cultivo de MSC humanas

Las MSC humanas se cultivaron como se describe por Pittenger et al., Science, vol. 284, pág. 143 (1999). Brevemente, se recolectaron muestras de médula ósea de la cresta ilíaca de donantes anónimos tras el consentimiento informado por Poietics Technologies, Div de Cambrex Biosciences. Las MSC se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa (Life Technologies, Carlsbad, California) que contenía un 1 % de solución antibiótica antimicótica (Invitrogen, 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 que se usaron se caracterizaron previamente en cuanto a su potencial multilineaje y retuvieron la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales (condrocítico, adipogénico y osteogénico) (Pittenger, et al., Science, vol. 284, pág. 143 (1999)).

##### Aislamiento de células dendríticas

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) 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 mediante el uso de un método de separación magnética de 2 etapas de conformidad con Dzionek, et al., J. Immunol., vol. 165, pág. 6037 (2000). Brevemente, las células B que expresan CD1c se separaron magnéticamente de las células CD19 mediante el uso de perlas magnéticas, seguido por el marcado de la fracción separada de células B con anticuerpos CD1c (BDCA1+) marcados con biotina y anticuerpos antibiotina y se separaron de la fracción celular no marcada mediante el uso de columnas magnéticas de conformidad con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Auburn, California). Los precursores de las DC de linaje plasmocitoide se aislaron a partir de PBMC mediante separación inmunomagnética de las células recubiertas con anticuerpo marcadas positivamente (BDCA2+) (Miltenyi Biotech, Auburn, California).

##### Cultivo de MSC-DC

En la mayoría de los experimentos, se cultivaron MSC y DC humanas en igual número durante varios períodos de tiempo, y el sobrenadante del cultivo celular se recolectó y almacenó a -80 °C hasta una evaluación adicional. En experimentos seleccionados, las MSC se cultivaron con células maduras DC1 o DC2 (relación MSC:DC 1:1) durante 3 días, y después los cultivos combinados (MSC y DC) se irradiaron para evitar cualquier proliferación. A continuación, se adicionaron células T alogénicas (CD4+, CD45RA+) purificadas por anticuerpos, vírgenes a las MSC/DC irradiadas y se cultivaron durante 6 días adicionales. La fracción celular no adherente (células T purificadas) se recolectó de los cultivos, se lavó dos veces y se reestimuló con PHA durante otras 24 horas, después de lo cual se recolectaron los sobrenadantes del cultivo celular y se analizaron en cuanto a la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-4 por ELISA.

##### Aislamiento de células NK

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

Aislamiento de la población de células  $T_{Reg}$

La población de células T<sub>Reg</sub> se aisló mediante el uso de un procedimiento de aislamiento de 2 etapas. Primero las células T no CD4<sup>+</sup> se marcaron de manera indirecta magnéticamente con un cóctel de anticuerpos marcados con biotina y microperlas antibiotina. Las células marcadas se separaron después por separación en una columna MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, California). A continuación, las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> se marcaron directamente con microperlas CD25 y se aislaron por selección positiva a partir de las CD4<sup>+</sup> preenriquecidas. Fracción de células T. Las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> marcadas magnéticamente se retuvieron en la columna y se eluyeron después de separar la columna del campo magnético.

Con el fin de determinar si el aumento de la población de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> que se generó en presencia de las MSC era de naturaleza supresora, las poblaciones de células T<sub>Reg</sub> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> se aislaron partir de cultivos de PBMC o MSC PBMC (relación MSC a PBMC 1:10) (cultivados sin ninguna estimulación adicional durante 3 días) mediante el uso de un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Estas células se irradiaron para bloquear cualquier proliferación adicional y se usaron como estimuladoras en una reacción de linfocitos mixtos (MLR), en la que los respondedores eran PBMC alogénicas (relación estimulador a respondedor 1:100) en presencia de PHA (2,5 µg/ml). El cultivo se llevó a cabo durante 48 horas, después de lo cual se añadió timidina <sup>3</sup>H. La radioactividad incorporada se contó después de 24 horas.

Se cultivaron las PBMC en ausencia o presencia de MSC (relación MSC a PBMC 1:10), después de lo cual se recolectó la fracción no adherente y se inmunotizó con el receptor de TNF inducido por glucocorticoide marcado con FITC, o GTR, y CD4 marcado con PE.

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

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se sembraron a 2x10<sup>6</sup> células/ml durante 45 min a 37 °C para eliminar los monocitos. La fracción no adherente se incubó en presencia de anticuerpos anti-CD3 (5 µg/ml) y anti-CD28 (1 mg/ml) unidos a la placa bajo condiciones T<sub>H1</sub> (IL-2 (4 ng/ml) IL-12 (5 ng/ml) + anti IL-4 (1 µg/ml)) o T<sub>H2</sub> (IL-2 (4 ng/ml) + IL-4 (4 ng/ml) + anti-IFN-γ (1 µg/ml)) durante 3 días en presencia o ausencia de MSC. Las células se lavaron y después se reestimularon con PHA (2,5 µg/ml) durante otras 24 o 48 horas, después de lo cual se midieron los niveles de IFN-γ e IL-4 en los sobrenadantes del cultivo por ELISA (RD Systems, Minneapolis, Minnesota).

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

Mediante el uso de MSC humanas que se caracterizaron previamente, se analizaron los niveles de interleucina-6 (IL-6), VEGF, prostaglandina mediadora de lípidos E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y metaloproteinasas de la matriz 1 (pro-MMP-1) en el sobrenadante del cultivo de MSC que se cultivaron durante 24 horas en presencia o ausencia de PBMC (relación MSC a PBMC 1:10).

#### Proliferación de PBMC

Las PBMC purificadas se prepararon mediante la centrifugación del paquete leucocitario (Cambrex, Walkersville, Maryland) en 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 su sedimentación) durante 48 horas en presencia del mitógeno PHA (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri). En experimentos seleccionados, las PBMC se resuspendieron en medio que contenía los 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 µl en un cultivo de 200 µl) y las células se recolectaron después de un cultivo adicional durante 24 h mediante el uso de un recolector automático. Los efectos de las MSC o de los bloqueadores de PGE<sub>2</sub> se calcularon como el porcentaje de la respuesta de control (100 %) en presencia de PHA.

#### RT-PCR cuantitativa

El RNA total de los sedimentos celulares se preparó mediante el uso de un estuche disponible en el mercado (Qiagen, Valencia, California) y de conformidad con las instrucciones del fabricante. El DNA genómico contaminante se eliminó con el estuche libre de ADN (Ambion, Austin, Texas). La RT-PCR cuantitativa se realizó en un sistema de detección MJ Research Opticon (South San Francisco, California) con el estuche QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen, Valencia, California) con iniciadores a una concentración de 0,5 µM. Los cambios relativos en los niveles de expresión en las células cultivadas en diferentes condiciones se calcularon mediante la diferencia en los valores de Ct (punto de cruce) mediante el uso de β-actina como control interno. La secuencia para los iniciadores específicos de COX-1 y COX-2 fueron: COX-1: 5'-CCG GAT GCC AGT CAG GAT GAT G-3' (hacia adelante), 5'-CTA GAC AGC CAG ATG CTG ACA G-3' (inverso); COX-2: 5'-ATC TAC CCT CCT CAA GTC CC-3' (adelante), 5'-TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG-3' (inverso).

Se incubaron cantidades crecientes de PBMC alogénicas con números constantes de MSC (2.000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos en presencia de PHA (2,5 µg/ml) durante 72 horas, y se determinó la incorporación de timidina <sup>3</sup>H (conteos por minuto, cpm). Las PBMC y las MSC se cultivaron en relaciones de MSC:PBMC de 1:1, 1:3, 1:10, 1:30 y 1:81.

## Resultados

- 5 En los estudios presentes, se examinó la interacción de las MSC humanas con poblaciones de células inmunes aisladas, que incluyen células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras ( $T_H1$  y  $T_H2$ ) y células NK. La interacción de las MSC con cada tipo de célula inmune tuvo consecuencias específicas, lo que sugiere que las MSC pueden modular varias etapas en el proceso de la respuesta inmune. La producción de factor(es) secretado(s) que modula y puede ser responsable de los efectos inmunomoduladores de las MSC se evaluó y se implicó la síntesis de prostaglandinas.
- 10 Las células dendríticas precursoras mieloides (DC1) y plasmocitoides (DC2) se aislaron mediante separación inmunomagnética de las células BDCA1<sup>+</sup> y BDCA2<sup>+</sup> respectivamente y se maduraron mediante incubación con GM-CSF e IL-4 ( $1 \times 10^3$  IU/ml y  $1 \times 10^3$  IU/ml, respectivamente) para las células DC1, o IL-3 (10 ng/ml) para las células DC2. Mediante el uso de la 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> (Fig. 1A). En presencia del agente inflamatorio lipopolisacárido bacteriano (LPS, 1 ng/ml), las células DC1 produjeron niveles moderados de TNF- $\alpha$  pero cuando estaban presentes las MSC (relaciones examinadas 1:1 y 1:10), hubo una reducción de > 50 % en la secreción de TNF- $\alpha$  (Fig. 1B). Por otro lado, las células DC2 produjeron IL-10 en presencia de LPS y sus niveles aumentaron más de 2 veces con el cocultivo MSC:DC2 (1:1) (Fig. 1B). Por lo tanto, las MSC modificaron el perfil de citocinas de las DC activadas en cultivo hacia un fenotipo más tolerogénico. Adicionalmente, las DC activadas, cuando se cultivaron con MSC, fueron capaces de reducir los niveles de IFN- $\gamma$  y aumentar los de IL-4 secretados por las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes (Fig. 1C) lo que sugiere un cambio mediado por las MSC del fenotipo de las células T de proinflamatorias a antiinflamatorias.
- 20 Como el aumento de la secreción de IL-10 desempeña una función en la generación de células reguladoras (Kingsley, et al., J. Immunol., vol. 168, pág. 1080 (2002)), las células reguladoras T ( $T_{Reg}$ ) se cuantificaron mediante citometría de flujo en cocultivos de PBMC y MSC. Después del cultivo de las PBMC con las MSC durante 3-5 días, hubo un aumento en el número de células  $T_{Reg}$  según se determinó por la tinción de las PBMC con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 (Fig. 2A), lo que apoya adicionalmente una respuesta tolerogénica inducida por las MSC. La población de células  $T_{Reg}$  CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, que se generó en presencia de MSC expresó niveles aumentados del receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR), un receptor de superficie celular expresado en poblaciones de células  $T_{Reg}$ , y fue de naturaleza supresora al suprimir la proliferación de células T alogénicas (Fig. 3A, B). A continuación, se investigaron las MSC en cuanto a su capacidad directa para afectar la diferenciación de células T. Mediante el uso de células T purificadas seleccionadas por anticuerpos (células Th CD4<sup>+</sup>), 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 estuvieron presentes durante la diferenciación, hubo una disminución de la secreción de IFN- $\gamma$  por las células  $T_H1$  y un aumento de la secreción de IL-4 por las células  $T_H2$  (Fig. 2B). No se observaron cambios significativos en los niveles de IFN- $\gamma$  o IL-4 cuando se agregaron MSC al cultivo después de que las células Th se diferenciaron (a los 3 días) en los tipos  $T_H1$  o  $T_H2$  efectoros (datos no mostrados). Estos experimentos sugieren que las MSC pueden afectar directamente la diferenciación de las células T efectoras y alterar la secreción de citocinas por las células T hacia un fenotipo humoral.
- 30 Similarmente, cuando se cultivaron las MSC con células NK purificadas (CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD36<sup>-</sup>) en una relación 1:1 durante diferentes períodos de tiempo (0-48 h), hubo una disminución de la secreción de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del cultivo (Fig. 2C), lo que sugiere que las MSC pueden modular, además, las funciones de las células NK.
- 40 El trabajo anterior indicó que las MSC modifican las funciones de las células T por factor(es) soluble(s) (LeBlanc, et al., Exp. Hematol., vol. 31, pág. 890 (2003); Tse, et al., Transplantation, vol. 75, pág. 389 (2003). Se observó que las MSC secretaron varios factores, que incluyen IL-6, prostaglandina E<sub>2</sub>, VEGF y proMMP-1 constitutivamente, y los niveles de cada uno aumentaron tras el cultivo con PBMC (Fig. 5). Con el fin de investigar los factores derivados de las MSC que conducen a la inhibición de TNF- $\alpha$  y al aumento de la producción de IL-10 por las DC, se investigó la posible función de la prostaglandina E<sub>2</sub>, ya que se demostró que inhibe la producción de TNF- $\alpha$  por las DC activas (Vassiliou, et al., Cell. Immunol., vol. 223, página 120 (2003)). Los medios acondicionados del cultivo de las MSC (cultivo de 24 horas de  $0,5 \times 10^6$  células/ml) contenían aprox. 1000 pg/ml de PGE<sub>2</sub> (Fig. 4A). No hubo presencia detectable de inductores conocidos de la secreción de PGE<sub>2</sub>, p. ej., TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-1 $\beta$  (datos no mostrados) en el sobrenadante del cultivo lo que indica una secreción constitutiva de PGE<sub>2</sub> por las MSC. La secreción de PGE<sub>2</sub> por las hMSCs se inhibió al 60-90 % en presencia de los inhibidores conocidos de la producción de PGE<sub>2</sub>, NS-398 (5  $\mu$ M) e indometacina (4  $\mu$ M) (Fig. 4A).
- 50 Como la liberación de la secreción de PGE<sub>2</sub> se produce como resultado de la actividad enzimática de la enzima ciclooxigenasa 1 constitutivamente activa (COX-1) y de la enzima ciclooxigenasa 2 inducible (COX-2) (Harris, et al., Trends Immunol., vol. 23, pág. 144 (2002)) se analizó la expresión de mRNA para COX-1 y COX-2 en MSC y PBMC mediante el uso del sistema de cultivo por transpocillo. Las MSC expresaron niveles significativamente más altos de COX-2 en comparación con las PBMC y los niveles de expresión aumentaron más de 3 veces después del cocultivo de MSC y PBMC (relación MSC a PBMC 1:10) durante 24 horas (Fig. 4B). Se observaron cambios modestos en los niveles de COX-1, lo que sugiere que el aumento de la secreción de PGE<sub>2</sub> tras el cocultivo MSC-PBMC (Fig. 5) está mediado por la regulación positiva de COX-2. Para investigar si los efectos inmunomoduladores de las MSC en las DC y células T estuvieron mediados por la PGE<sub>2</sub>, se cultivaron MSC con células dendríticas activadas (DC1) o células  $T_H1$  en presencia de los inhibidores de PGE<sub>2</sub> NS-398 o indometacina. La presencia de NS-398 o indometacina aumentó la secreción de TNF- $\alpha$  por las DC1 y la secreción de IFN- $\gamma$  por las células  $T_H1$  (Fig. 4C), respectivamente, lo que sugiere que los efectos de las MSC en los tipos de células inmunes pueden estar mediados por la PGE<sub>2</sub> secretada. Estudios

recientes demostraron que las MSC inhiben la proliferación de células T inducida por diversos estímulos (DeNicola, et al., Blood, vol. 99, pág. 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 (Fig. 6) y cuando los inhibidores de PGE<sub>2</sub> NS-398 (5 μM) o indometacina (4 μM) estuvieron presentes, hubo un aumento de >70 % en la incorporación de timidina (<sup>3</sup>H) por las PBMC que se trataron con PHA en cultivos que contienen MSC en comparación con los controles sin inhibidores (Fig. 4D).

En resumen, se propone un modelo de interacción de las MSC con otros tipos de células inmunes (Fig. 7). Cuando las células T maduras están presentes, las MSC pueden interactuar con ellas directamente e inhibir la producción proinflamatoria de IFN-γ (vía 1) y promover el fenotipo regulador de las células T (vía 3) y las células T<sub>H</sub>2 antiinflamatorias (vía 5). Además, las MSC pueden alterar el resultado de la respuesta inmune de las células T a través de las DC mediante la secreción de PGE<sub>2</sub>, que inhibe las células DC1 proinflamatorias (vía 2) y promueve las células DC2 antiinflamatorias (vía 4) o DC reguladoras (vía 3). Un cambio hacia la inmunidad T<sub>H</sub>2 a su vez, sugiere un cambio en la actividad de las células B hacia una mayor generación de anticuerpos de subtipo IgE/IgG1 (vía 7). Las MSC, por su capacidad para inhibir la secreción de IFN-γ de las células NK, probablemente modifiquen la función celular de las NK (vía 6). Este modelo de las interacciones MSC:células inmunes es consistente con la experimentación que se realizó en varios 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 examinan más a fondo los mecanismos propuestos y ahora son necesarios estudios en animales para examinar los efectos in vivo de la administración de MSC.

Reivindicaciones

1. Células madre mesenquimales para usar en la promoción de la curación de heridas inflamadas en humanos.
- 5 2. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde la herida es interna o externa.
3. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde la herida es una  
10 úlcera dérmica.
4. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con la reivindicación 3, en donde la úlcera dérmica tiene como causa la diabetes o anemia de células falciformes.
5. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con las reivindicaciones 1 o 3, las cuales deben  
15 administrarse directamente a la herida.
6. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con las reivindicaciones 1 o 3, las cuales deben administrarse como una suspensión de células en un medio líquido farmacéuticamente aceptable o en un apósito o reservorio.  
20
7. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células madre mesenquimales son alogénicas.
8. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores,  
25 en donde las células madre mesenquimales son autólogas.
9. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células madre mesenquimales se recolectan a partir de un tejido que contiene células madre mesenquimales, se aíslan, y se expanden en cultivo.  
30
10. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con la reivindicación 9, en donde el tejido que contiene células madre mesenquimales es sangre, piel, sangre del cordón umbilical, músculo, grasa, pericondrio, médula ósea o periostio.
- 35 11. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células madre mesenquimales no se manipulan genéticamente.
12. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, las cuales deben administrarse en combinación con un agente terapéutico.  
40
13. Las células madre mesenquimales para usar de conformidad con la reivindicación 12, en donde el agente terapéutico es un fármaco antiinflamatorio.

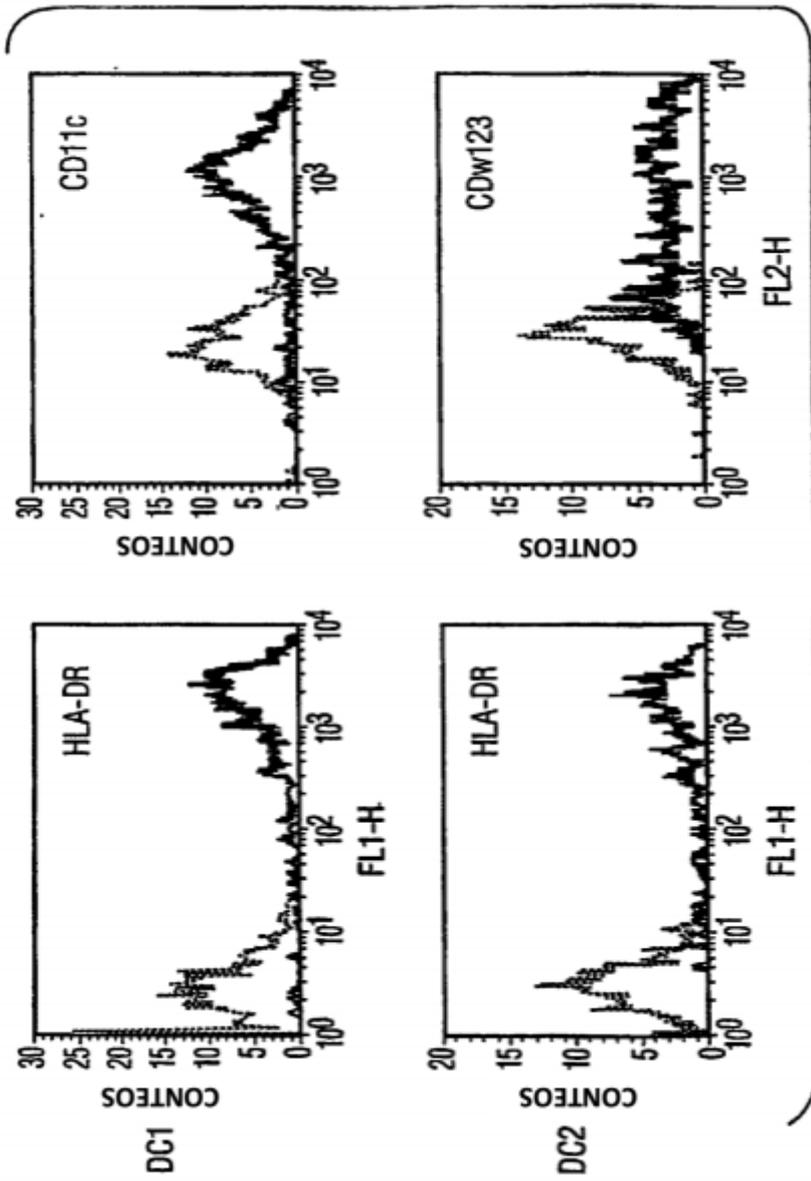


FIG. 1A

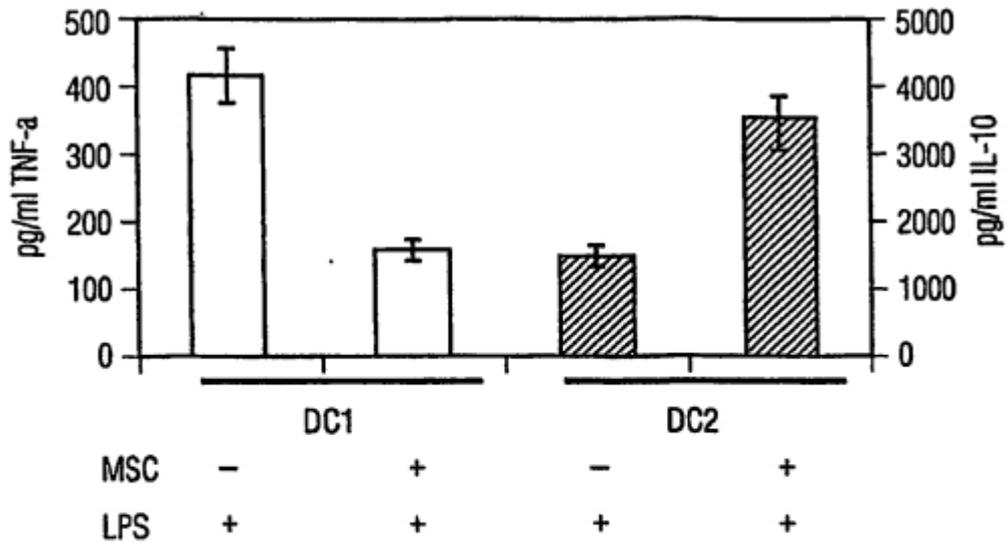


FIG. 1B

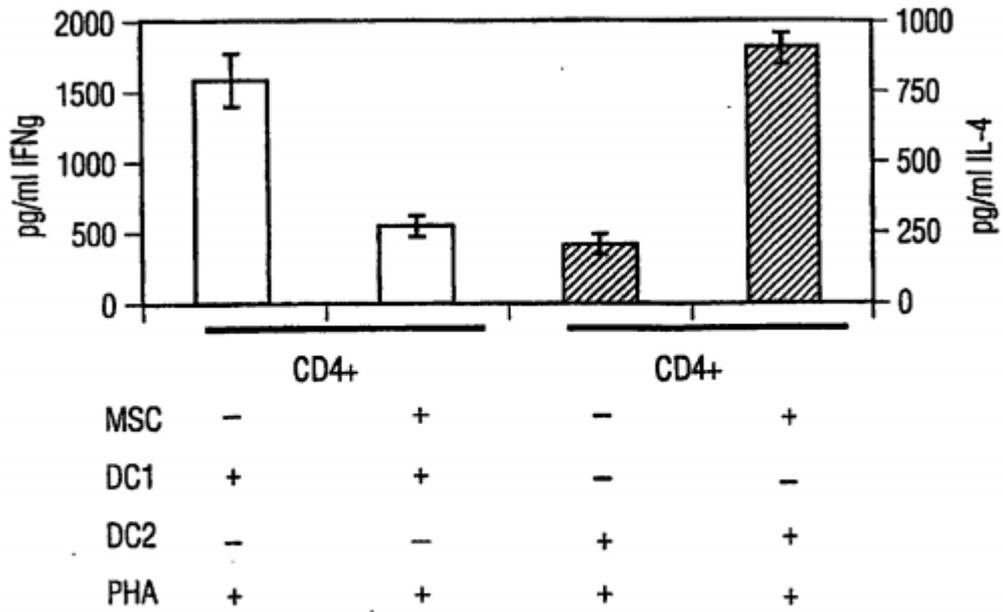


FIG. 1C

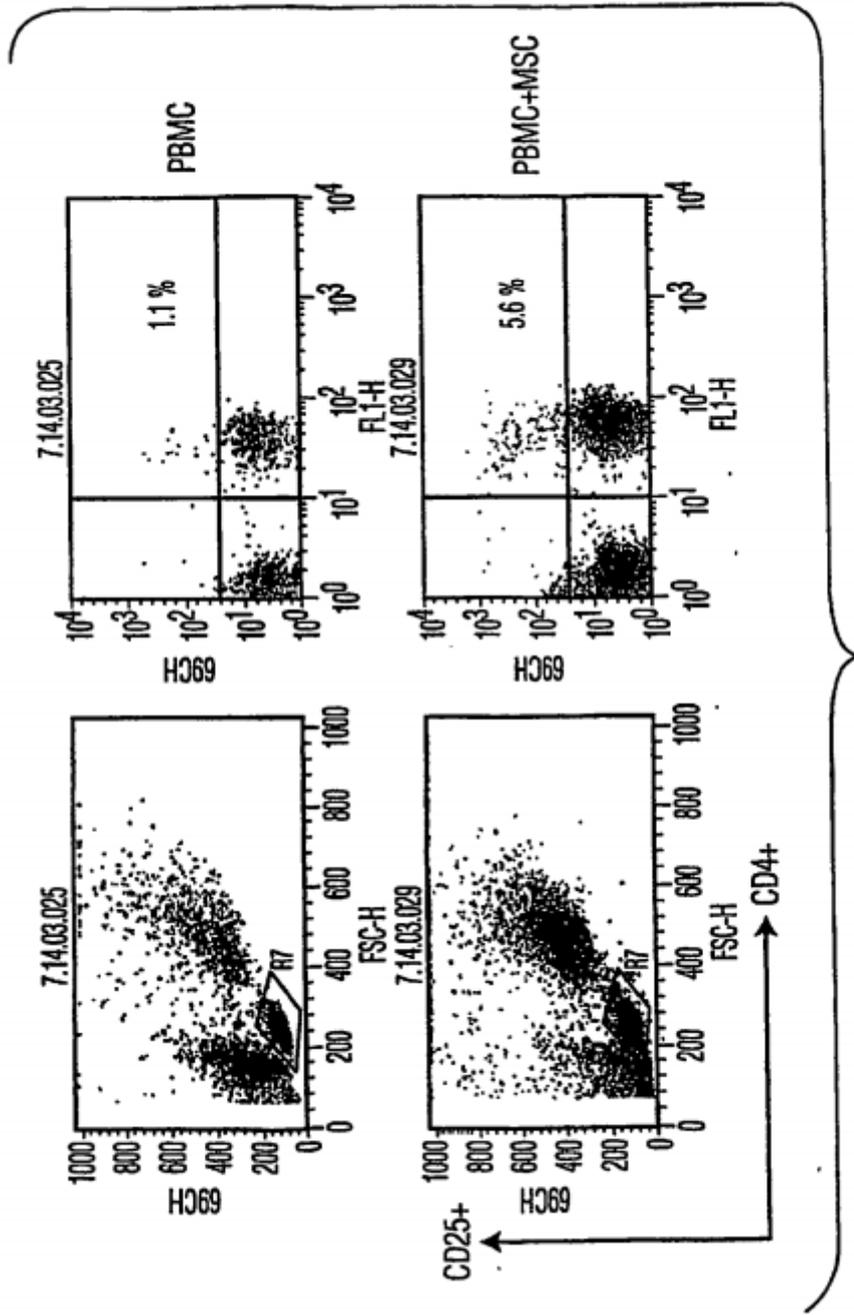


FIG. 2A

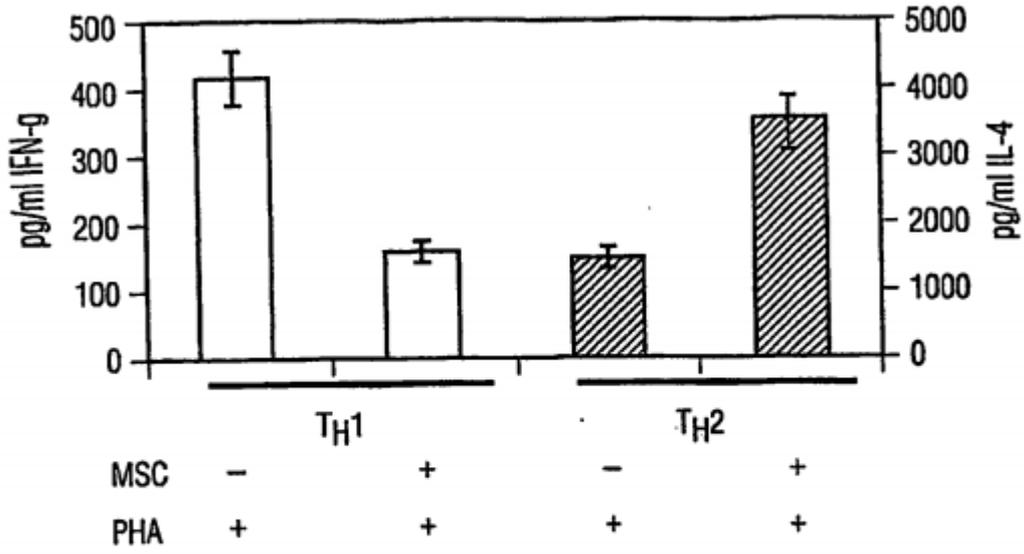


FIG. 2B

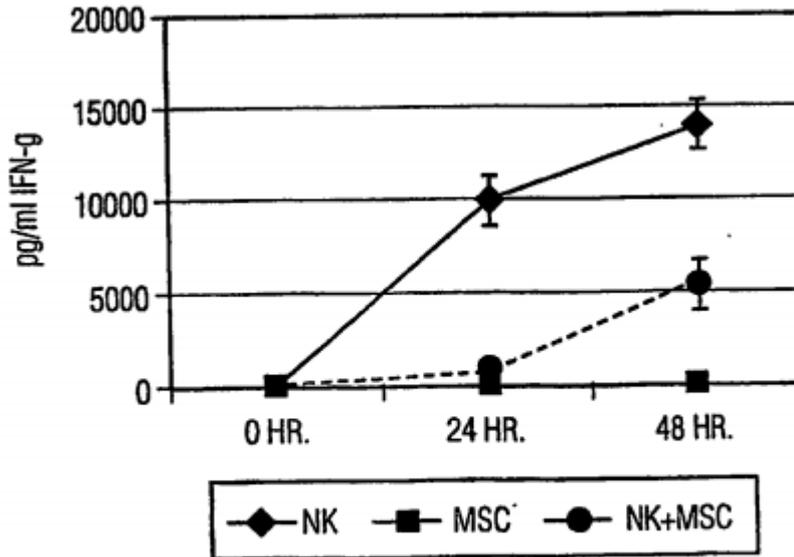


FIG. 2C

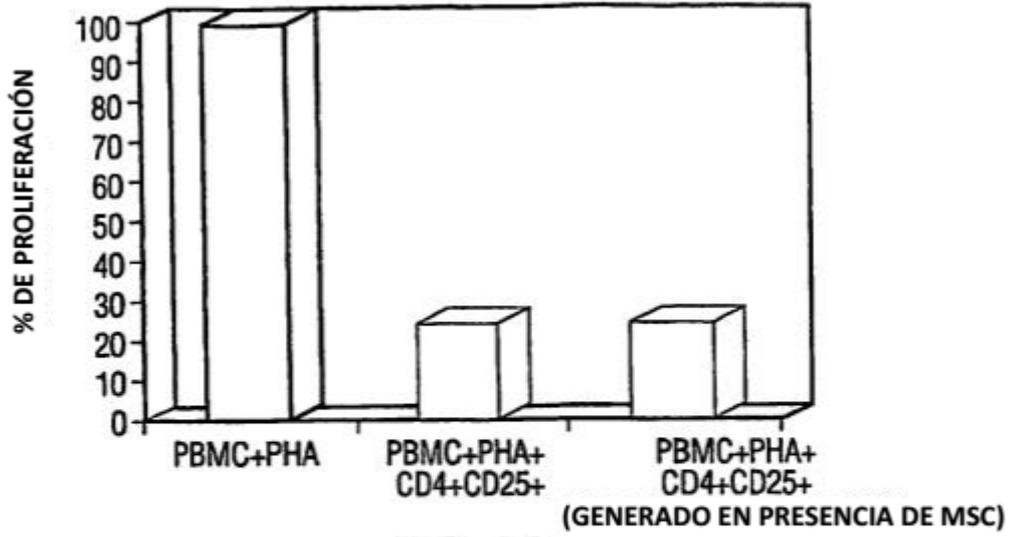


FIG. 3A

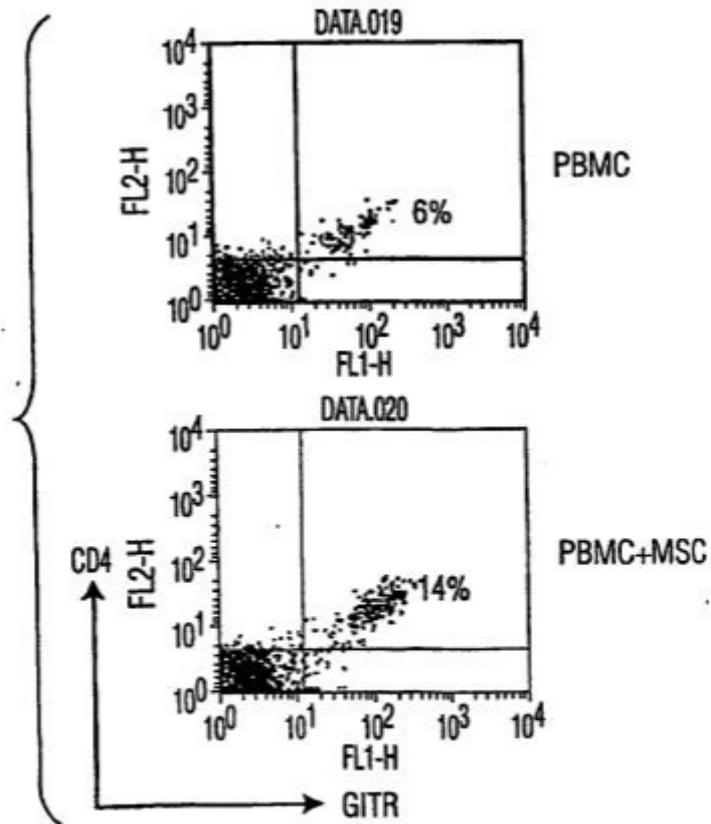


FIG. 3B

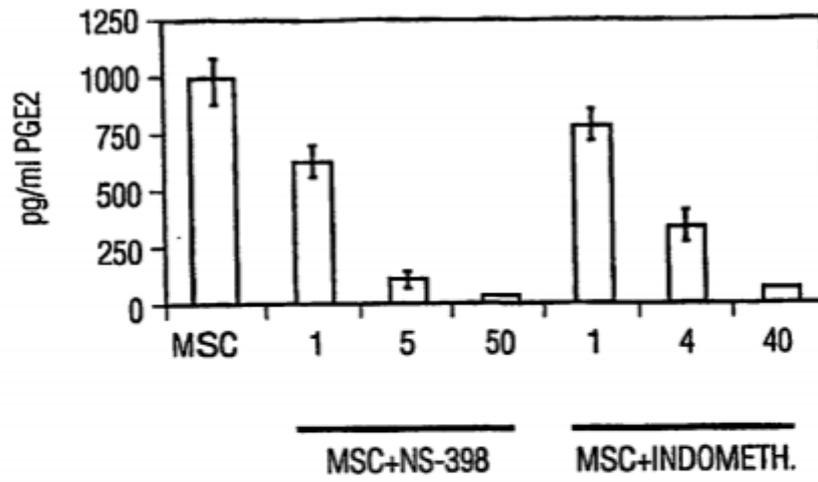


FIG. 4A

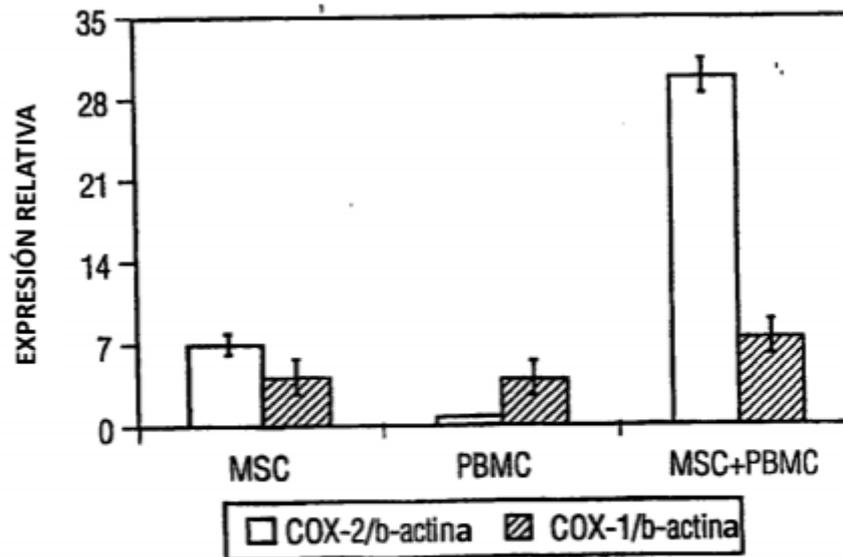


FIG. 4B

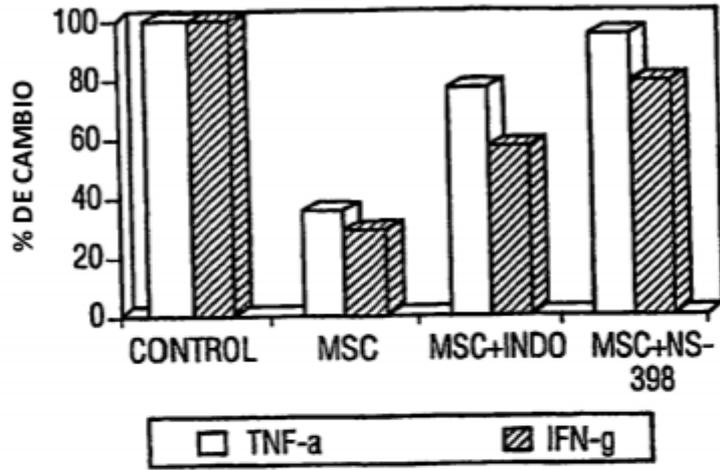


FIG. 4C

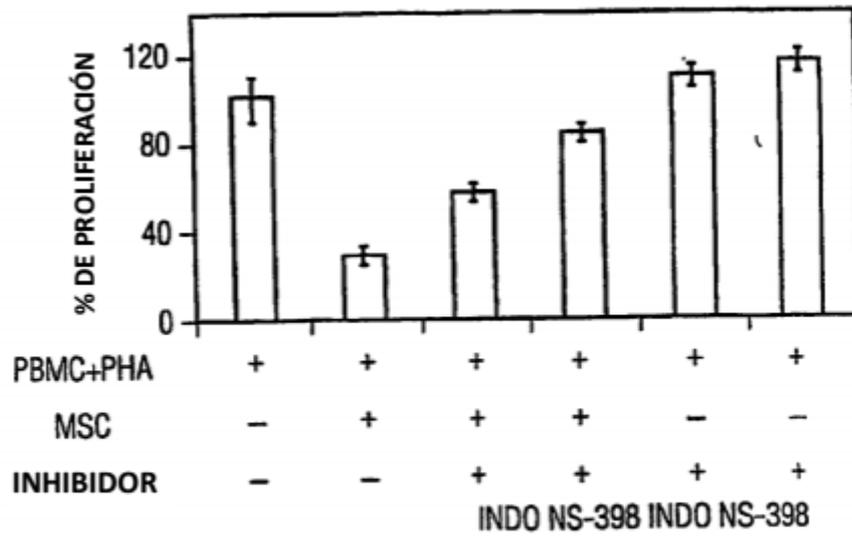
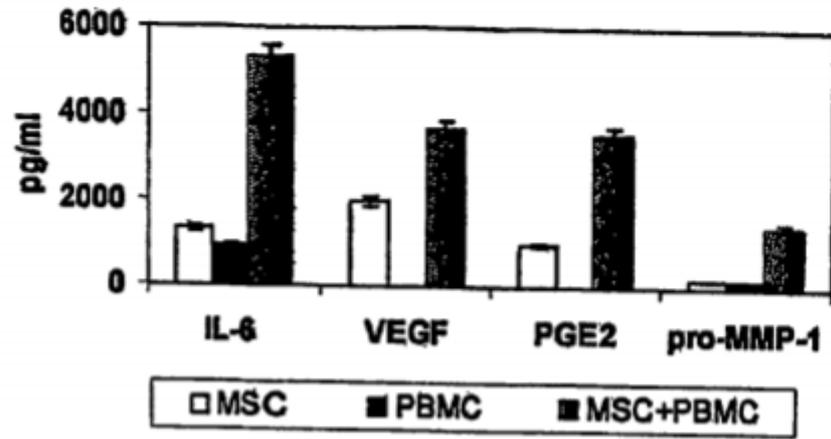
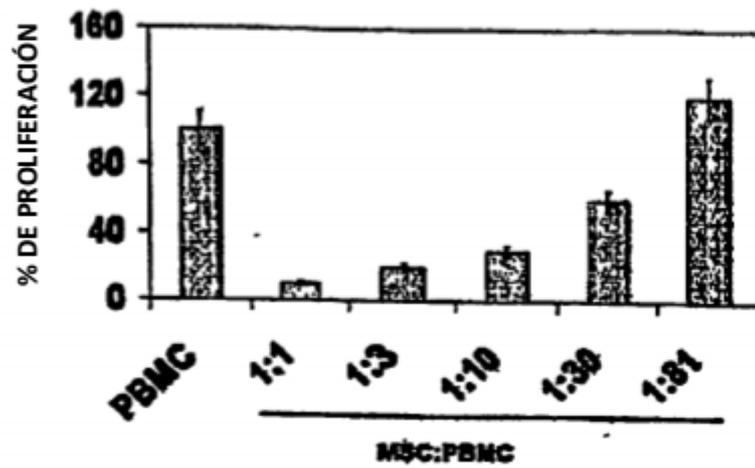


FIG. 4D

**Fig. 5**



**Fig. 6**



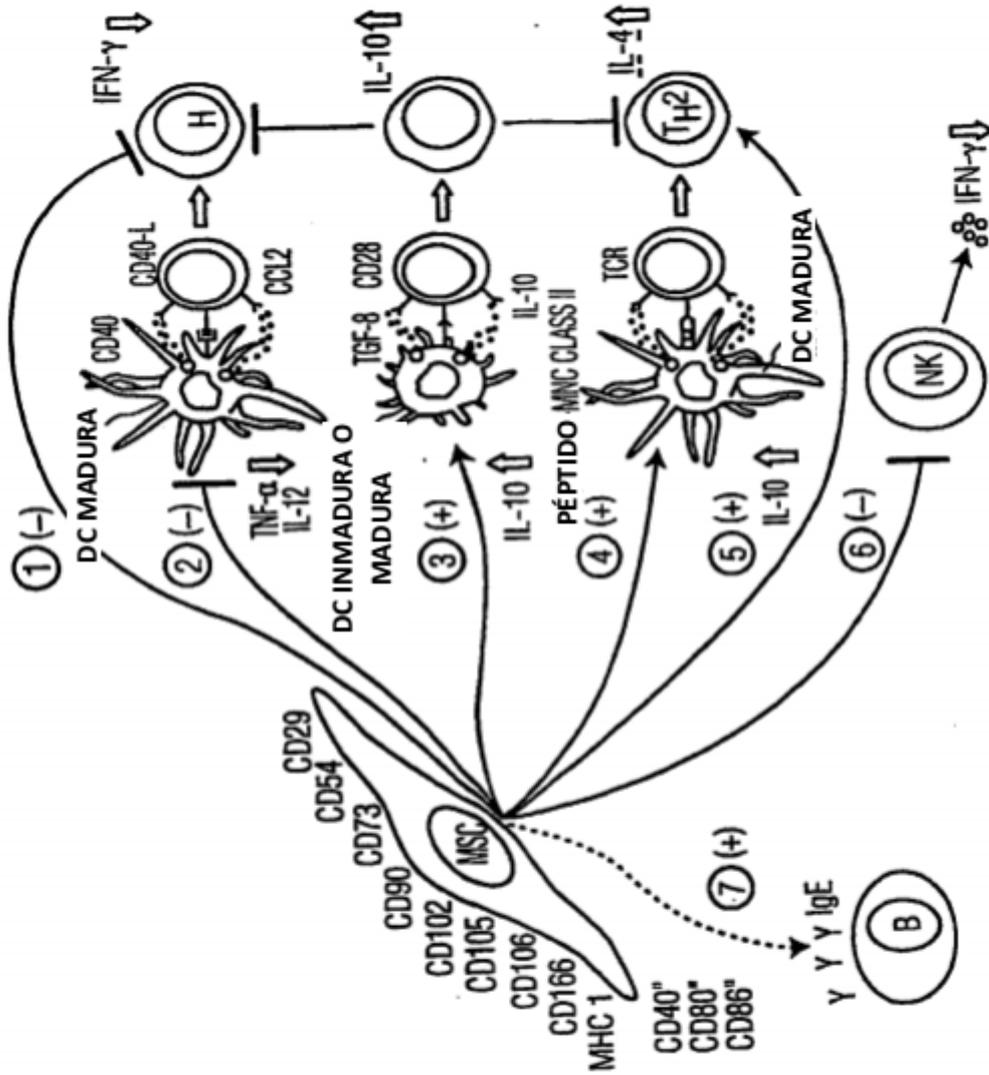


FIG. 7