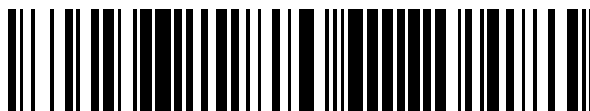


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 627**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2005** **E 14172800 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018** **EP 2824174**

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:

10.04.2019

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 2 708 627 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

Esta invención se refiere a células madre mesenquimales para uso en el tratamiento de insuficiencia coronaria y arteria periférica o para uso en el tratamiento de arterias bloqueadas en un humano promoviendo o induciendo la angiogénesis

- 5 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)).

- 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. 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 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)).

- La publicación de solicitud de patente internacional número WO 03/059272 A2 divulga un agente terapéutico para uso en la inducción de la angiogénesis y la vasculogénesis, incluyendo el agente terapéutico factores que inducen angiogénesis y vasculogénesis aislados de células madre junto con una terapia celular farmacéuticamente aceptable.

- 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, condiciones y trastornos que involucran el sistema inmunológico, o enfermedades, condiciones o trastornos que involucran inflamación o respuestas alérgicas. Tales enfermedades, condiciones y trastornos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes, alergias, artritis, heridas inflamadas, alopecia areata (calvicie), enfermedades periodontales que incluyen gingivitis y periodontitis, y otras enfermedades, condiciones o trastornos que involucran una respuesta inmunitaria.

- Además, se cree que las células madre mesenquimales estimulan las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para producir el factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF, que promueve la angiogénesis al estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos.

- Además, se cree que las células madre mesenquimales estimulan a las células dendríticas (DCs) para producir interferón-Beta (IFN- β), que promueve la supresión de tumores y la inmunidad contra la infección viral.

La presente invención está dirigida a las células madre mesenquimales para uso en el tratamiento de la insuficiencia coronaria y de arteria periférica o para el uso en el tratamiento de arterias bloqueadas en un humano mediante la

promoción o la inducción de la angiogénesis, en donde las células madre mesenquimales son genéticamente no manipuladas y alogénicas, y en donde las células madre mesenquimales estimulan las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para producir el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y, por lo tanto, promueven o inducen la angiogénesis.

- 5 En una realización de la presente invención, las células madre mesenquimales se usan para tratar enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardíaca isquémica y enfermedad de arteria periférica.

En una realización de la presente invención, las arterias bloqueadas están en las extremidades o en el cuello, en donde, por ejemplo, las extremidades se seleccionan entre brazos, piernas, manos y pies.

- 10 En una realización de la presente invención, las células madre mesenquimales son para uso en el tratamiento de arterias bloqueadas que suministran al cerebro, opcionalmente en el que las células madre mesenquimales son para uso en el tratamiento o prevención de apoplejía.

En una realización de la presente invención, las células madre mesenquimales se administran sistémicamente o por administración directa a un tejido u órgano que necesita angiogénesis, opcionalmente en donde la administración sistémica es por administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal.

- 15 En el presente documento también se divulga un método para tratar enfermedades autoinmunes en un animal. El método comprende administrar al animal las células madre mesenquimales animales en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad en el animal.

- 20 Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no está limitada a ningún razonamiento teórico, se cree que al menos un mecanismo por el cual las células madre mesenquimales suprimen la enfermedad autoinmune es causando la liberación de interleuquina-10 (IL-10) de células T reguladoras (células T_{Reg}) y/o células dendríticas (DC).

- 25 Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse de acuerdo con la presente divulgación incluyen, entre otras, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, uveítis, enfermedad tiroidea autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad linfoproliferativa autoinmune (ALPS), enfermedad desmielinizante, encefalomiелitis autoinmune, gastritis autoinmune (AIG) y enfermedades glomerulares autoinmunes. Debe entenderse, sin embargo, que el alcance de la presente divulgación no debe limitarse al tratamiento de las enfermedades específicas mencionadas en este documento.

En una realización, el animal al que se administran las células madre mesenquimales es un mamífero. El mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos.

- 30 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 animales, con o sin manipulación bioquímica o genética.

- 35 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.

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.

- 45 Las células madre mesenquimales se administran en una cantidad efectiva para tratar una enfermedad autoinmune en un animal. Las células madre mesenquimales pueden administrarse en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 5×10^6 células/kg. La cantidad de células madre mesenquimales que se administrarán depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, la enfermedad autoinmune que se va a tratar y la extensión y gravedad de la misma.

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.

También se divulga un método para tratar una respuesta inflamatoria en un animal. El método comprende administrar al

animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar la respuesta inflamatoria en el animal.

Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no está limitado por ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la maduración de células T a las células T reguladoras (T_{Reg}), controlando con ello las respuestas inflamatorias. También se cree que las células madre mesenquimales inhiben las células T auxiliar 1 (células Th1), disminuyendo así la expresión del interferón-γ (IFN-γ) en ciertas reacciones inflamatorias, tales como las asociadas a la psoriasis, por ejemplo.

En una divulgación, las respuestas inflamatorias que pueden tratarse son las asociadas con la psoriasis.

En otra divulgación las células madre mesenquimales pueden administrarse a un animal de tal manera que las células madre mesenquimales entren en contacto con la microglía y/o los astrocitos en el cerebro para reducir la inflamación, por lo que las células madre mesenquimales limitan la neurodegeneración causada por células gliales activadas en enfermedades o trastornos tal como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía o lesiones de las células cerebrales.

En aún otra divulgación, las células madre mesenquimales pueden administrarse a un animal de tal manera que las células madre mesenquimales entren en contacto con los queratinocitos y las células de Langerhans en la epidermis de la piel para reducir la inflamación, como puede ocurrir en la psoriasis, la dermatitis crónica y la dermatitis de contacto. Aunque esta realización no está limitada a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales pueden entrar en contacto con los queratinocitos y las células de Langerhans en la epidermis, y alterar la expresión de los receptores de células T y los perfiles de secreción de citoquinas, lo que conduce a una menor expresión del factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α) y el aumento de la población de células T reguladoras (células T_{Reg}).

En una divulgación adicional, las células madre mesenquimales se pueden usar para reducir la inflamación en el hueso, como ocurre en la artritis y condiciones similares a la artritis, que incluyen, entre otras, osteoartritis y artritis reumatoide y otras enfermedades artríticas enumeradas en el sitio web www.arthritis.org/conditions/diseases. Aunque el alcance de esta realización no pretende limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales pueden inhibir la secreción de interleuquina-17 por las células T de memoria en el líquido sinovial.

En otra divulgación las células madre mesenquimales pueden usarse para limitar la inflamación en el intestino y el hígado durante la enfermedad inflamatoria intestinal y hepatitis crónica, respectivamente. Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no está destinado a limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven una mayor secreción de Interleuquina-10 (IL-10) y la generación de células T reguladoras (células T_{Reg}).

En otra divulgación, las células madre mesenquimales se pueden usar para inhibir la activación excesiva de neutrófilos y macrófagos en condiciones patológicas tal como sepsis y traumatismos, incluyendo lesiones por quemaduras, cirugía y trasplantes. Aunque el alcance de esta realización no está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la secreción de citoquinas supresoras tal como la IL-10, e inhiben el factor inhibidor de la migración de macrófagos.

En otra divulgación las células madre mesenquimales pueden usarse para controlar la inflamación en sitios inmunes privilegiados tal como el ojo, incluyendo la córnea, el cristalino, el epitelio pigmentario y la retina, el cerebro, la médula espinal, el útero preñado y la placenta, el ovario, los testículos, la corteza suprarrenal, el hígado y los folículos pilosos. Aunque el alcance de esta realización no está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la secreción de citoquinas supresoras tales como IL-10 y la generación de células T_{Reg}.

En aún otra divulgación, las células madre mesenquimales se pueden usar para controlar las infecciones por enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) durante la diálisis y/o glomerulonefritis. Aunque el alcance de esta realización no está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales inducen a las células mononucleares de sangre periférica a expresar el factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF, que estimula la estructuración glomerular.

En una divulgación adicional, las células madre mesenquimales se pueden usar para controlar infecciones virales tales como influenza, hepatitis C, virus del herpes simple, infecciones por virus de la vacuna y virus de Epstein-Barr. Aunque el alcance de esta realización no está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales promueven la secreción de interferón-beta (IFN-β).

En aún otra divulgación las células madre mesenquimales se pueden usar para controlar infecciones parasitarias tales como infecciones por Leishmania e infecciones por Helicobacter. Aunque el alcance de esta realización está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales median las respuestas de las células T auxiliar 2 (Th2), y de ese modo promueven una mayor producción de inmunoglobulina E (IgE) por las células β.

Las células madre mesenquimales se pueden administrar a un mamífero, incluyendo primates humanos y no humanos, tal como se ha descrito anteriormente.

Las células madre mesenquimales también pueden administrarse sistémicamente, como se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, en el caso de osteoartritis o artritis reumatoide, las células madre mesenquimales se pueden administrar directamente a una articulación artrítica.

Las células madre mesenquimales se administran en una cantidad efectiva para tratar una respuesta inflamatoria en un animal. Las células madre mesenquimales se pueden administrar en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 5×10^6 células/kg. La dosificación exacta de las células madre mesenquimales que se van a administrar depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, el peso y el sexo del paciente, la respuesta inflamatoria que se está tratando y su extensión y gravedad.

Las células madre mesenquimales pueden administrarse conjuntamente con un portador farmacéutico aceptable, como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con aún otra divulgación de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar el cáncer en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el animal.

Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales interactúan con las células dendríticas, lo que conduce a la secreción de IFN- β , que a su vez actúa como un supresor de tumores. Los cánceres que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular, cáncer cervical, cáncer pancreático, cáncer de próstata, fibrosarcoma, meduloblastoma y astrocitoma. Sin embargo, debe entenderse que el alcance de la presente divulgación no está limitado a ningún tipo específico de cáncer.

El animal puede ser un mamífero, incluyendo primates humanos y no humanos, como se describe anteriormente en este documento.

Las células madre mesenquimales se administran al animal en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en el animal. En general, las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 5×10^6 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, el tipo de cáncer que se está tratando y la extensión y gravedad de los mismos.

Las células madre mesenquimales se administran junto con un vehículo farmacéutico aceptable, y pueden administrarse sistémicamente, como se describe anteriormente en este documento. Alternativamente, las células madre mesenquimales se pueden administrar directamente al cáncer que se está tratando.

De acuerdo con todavía otra divulgación de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno alérgico en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno alérgico en el animal.

Aunque el alcance de este aspecto de la presente divulgación no está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales, cuando se administran después de una respuesta alérgica aguda, proporcionan inhibición de la activación y desgranulación de los mastocitos. Además, se cree que las células madre mesenquimales subregulan la activación de los basófilos e inhiben las citoquinas tales como TNF- α , las quimioquinas tales como la interleucina-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos, o MCP-1, los mediadores lipídicos tales como los leucotrienos, e inhiben los mediadores principales tales como histamina, heparina, sulfatos de condroitina y catepsina.

Las enfermedades o trastornos alérgicos que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica y dermatitis de contacto. Sin embargo, debe entenderse que el alcance de la presente divulgación está limitado a ninguna enfermedad o trastorno alérgico específico.

Las células madre mesenquimales se administran al animal en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno alérgico en el animal. El animal puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos. En general, las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 5×10^6 células/kg. La dosificación exacta depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, la enfermedad o trastorno alérgico que se trata y la extensión y gravedad de la misma.

Las células madre mesenquimales pueden administrarse junto con un vehículo farmacéutico aceptable, como se describe anteriormente en este documento. Las células madre mesenquimales pueden administrarse sistémicamente, por ejemplo, por administración intravenosa o intraarterial, por ejemplo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método para promover la curación de heridas en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para promover la cicatrización de heridas en el animal.

Aunque el alcance de la presente divulgación no está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que, como se mencionó aquí anteriormente, las células madre mesenquimales hacen que las células T_{reg} y las células dendríticas liberen interleuquina-10 (IL-10). La IL-10 limita o controla la inflamación en una herida, promoviendo así la cicatrización de una herida.

- 5 Adicionalmente, las células madre mesenquimales pueden promover la cicatrización de heridas y la curación de fracturas mediante la inducción de factores de secreción por otros tipos de células. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden inducir la liberación mediada por prostaglandina E₂ (PGE₂) del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), así como la liberación de la hormona del crecimiento mediada por PGE₂, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3) y endotelina-1.

10 Las células madre mesenquimales se administran al animal en una cantidad efectiva para promover la cicatrización de heridas en el animal. El animal puede ser un mamífero, y el mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos. En general, las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente 1x10⁵ células/kg a aproximadamente 1x10⁷ células/kg, preferiblemente de aproximadamente 1x10⁶ células/kg a aproximadamente 5x10⁶ 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 gravedad de la herida que se está tratando.

15 Las células madre mesenquimales pueden administrarse junto con un vehículo farmacéutico aceptable, como se describe anteriormente en este documento. Las células madre mesenquimales pueden administrarse sistémicamente, como se describe anteriormente en este documento. Alternativamente, las células madre mesenquimales se pueden administrar directamente a una herida, tal como en un fluido en un apósito o reservorio que contiene las células madre mesenquimales.

20 De acuerdo con aún otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar o prevenir la fibrosis en un animal. El método comprende administrar al animal células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la fibrosis en un animal.

25 Las células madre mesenquimales se pueden administrar al animal con el fin de tratar o prevenir la fibrosis en el animal, que incluyen, pero no se limitan a, cirrosis hepática, fibrosis de los riñones asociada con enfermedad renal en etapa terminal y fibrosis de los pulmones. Debe entenderse que el alcance de la presente divulgación no está limitado a ningún tipo específico de fibrosis.

30 Las células madre mesenquimales se administran al animal en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la fibrosis en el animal. El animal puede ser un mamífero, y el mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos. En general, las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente 1x10⁵ células/kg a aproximadamente 1x10⁷ células/kg, preferiblemente de aproximadamente 1x10⁶ células/kg a aproximadamente 5x10⁶ células/kg. La cantidad exacta de células madre mesenquimales que se administrará depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, y la extensión y gravedad de la fibrosis que se está tratando o previniendo.

35 Las células madre mesenquimales pueden administrarse junto con un vehículo farmacéutico aceptable, como se describe anteriormente en este documento. Las células madre mesenquimales pueden administrarse sistémicamente, también como se describe anteriormente en este documento.

40 Otro objeto de la presente invención es promover la angiogénesis en un tejido u órgano de un animal, en el que tal tejido u órgano está en necesidad de angiogénesis.

De este modo, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para promover la angiogénesis en un órgano o tejido de un animal. El método comprende administrar al animal las células madre mesenquimales en una cantidad efectiva para promover la angiogénesis en un órgano o tejido del animal.

45 La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de un lecho microvascular preexistente.

La inducción de la angiogénesis se usa para tratar la insuficiencia de la arteria coronaria y periférica, y por lo tanto puede ser un enfoque no invasivo y curativo para el tratamiento de la enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardíaca isquémica y enfermedad de arteria periférica. La angiogénesis puede desempeñar un papel en el tratamiento de enfermedades y trastornos en tejidos y órganos distintos del corazón, así como en el desarrollo y/o mantenimiento de órganos distintos del corazón. La angiogénesis puede proporcionar un papel en el tratamiento de heridas internas y externas, así como úlceras dérmicas. La angiogénesis también desempeña un papel en la implantación de embriones y el crecimiento placentario, así como en el desarrollo de la vasculatura embrionaria. La angiogénesis también es esencial para el acoplamiento de la reabsorción del cartílago con formación de hueso, y es esencial para la correcta morfogénesis de la placa de crecimiento.

55 Adicionalmente, la angiogénesis es necesaria para la ingeniería exitosa y el mantenimiento de órganos altamente metabólicos, tales como el hígado, donde se necesita una densa red vascular para proporcionar suficiente transporte de

nutrientes y gases.

Las células madre mesenquimales se pueden administrar al tejido u órgano en necesidad de angiogénesis mediante una variedad de procedimientos. Las células madre mesenquimales pueden administrarse sistémicamente, tal como la administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal, o las células madre mesenquimales pueden administrarse directamente al tejido u órgano en necesidad de angiogénesis, tal como mediante inyección directa en el tejido u órgano en necesidad de angiogénesis.

Las células madre mesenquimales pueden ser de un espectro de fuentes que incluyen autólogas, alogénicas o xenogénicas.

Aunque el alcance de la presente divulgación no está limitado a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales, cuando se administran a un animal, estimulan las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para producir factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF, que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos.

En una realización, el animal es un mamífero. El mamífero puede ser un primate, incluyendo primates humanos y no humanos.

Las células madre mesenquimales, de acuerdo con la presente divulgación, pueden emplearse en el tratamiento, alivio o prevención de cualquier enfermedad o trastorno que pueda aliviarse, tratarse o prevenirse mediante angiogénesis. Así, por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden administrar a un animal para tratar arterias bloqueadas, incluyendo las de las extremidades, es decir, brazos, piernas, manos y pies, así como el cuello o en diversos órganos. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden usar para tratar las arterias bloqueadas que suministran al cerebro, para tratar o prevenir la apoplejía. Además, las células madre mesenquimales se pueden usar para tratar vasos sanguíneos en corneas embrionarias y postnatales y se pueden usar para proporcionar una estructuración glomerular. En otra realización, las células madre mesenquimales se pueden emplear 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, incluidas, pero no limitadas a, úlceras dérmicas causada por enfermedades tales como la diabetes y la anemia de células falciformes.

Adicionalmente, debido a que la angiogénesis está involucrada en la implantación de embriones y la formación de placenta, las células madre mesenquimales pueden emplearse para promover la implantación de embriones y prevenir el aborto espontáneo.

Además, las células madre mesenquimales se pueden administrar a un animal nonato, incluidos los humanos, para promover el desarrollo de la vasculatura en el animal nonato.

En otra realización, las células madre mesenquimales se pueden administrar a un animal, nacido o no nacido, con el fin de promover la reabsorción de cartílago y la formación de hueso, así como promover la morfogénesis correcta de la placa de crecimiento.

Las células madre mesenquimales se administran en una cantidad efectiva para promover la angiogénesis en un animal. Las células madre mesenquimales se pueden administrar en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^7 células/kg, preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 5×10^6 células/kg. La cantidad de células madre mesenquimales que se administrarán depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, la enfermedad o trastorno a tratar, aliviar o prevenir, y la extensión y gravedad de la misma.

Las células madre mesenquimales pueden administrarse junto con un vehículo farmacéutico aceptable. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden administrar como una suspensión celular en un medio líquido farmacéuticamente aceptable para inyección. La inyección puede ser local, es decir, directamente en el tejido u órgano que necesita angiogénesis, o sistémica.

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

La selección de un polinucleótido apropiado que codifica un agente terapéutico depende de diversos factores, incluida la enfermedad o trastorno que se está tratando, y la extensión y gravedad de la misma. Los polinucleótidos que codifican los agentes terapéuticos y los vehículos de expresión apropiados se describen además en la patente U.S. No. 6,355,239.

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.

Debe entenderse que los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo de varias maneras y con diversas modificaciones y permutaciones de los mismos que son bien conocidas en la técnica. También se puede apreciar que cualquier teoría expuesta en cuanto a los modos de acción o interacciones entre tipos de células no debe interpretarse como limitante de esta divulgación de ninguna manera, sino que se presenta de manera de tal manera que los métodos de la divulgación se puedan entender más completamente.

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

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- α (eje y primario) y aumentan la secreción de IL-10 (eje y secundario) a partir de DC1 y DC2 activadas, respectivamente. (C) MSC cultivadas con células DC1 maduras inhiben la secreción de IFN- γ (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- γ 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.

Figura 2. Las MSC inhiben la función de células T efectoras proinflamatorias. (A) Análisis de citometría de flujo de los números de células T_{Reg} (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 puertas con base en anticuerpos de control de isotipo como antecedentes. Los gráficos son representativos de 5 experimentos independientes. (B) Las células T_{H1} generadas en presencia de MSC secretaron niveles reducidos de IFN- γ (eje Y primario) y las células T_{H2} 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- γ 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.

Figura 3. Las MSC conducen a un mayor número en la población de células T_{Reg} y mayor expresión del GTR. (A) Se aisló una población de células T_{Reg} 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 ³H, y se hizo recuento de la radiactividad incorporada después de 24 horas. Los resultados mostraron que la población de T_{Reg}, generada en presencia de MSC (carril 3) era similar funcionalmente a las células T_{Reg} generadas en ausencia de MSC (carril 2). (B) Se cultivaron PBMC durante 3 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 GTR 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 PGE₂ y el bloqueo de PGE₂ invierte los efectos inmunomoduladores mediados por MSC. (A) secreción de PGE₂ (media $\pm$ DE) en sobrenadantes de cultivo obtenidos a partir de MSC cultivadas en presencia o ausencia de bloqueadores de PGE₂ NS-398 o indometacina (Indomet.) a diversas concentraciones. Las concentraciones de inhibidor están en μ M 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 PGE₂ indometacina (Ind.) o NS-398 aumenta la secreción de TNF- α de las DC activadas ($\square$) y la secreción de IFN- γ de células T_{H1} ($\square$) en comparación con los controles. Los datos se calcularon como el cambio porcentual de los cultivos generados en ausencia de MSC e inhibidores de PGE₂ (D) La presencia de bloqueadores de PGE₂ 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 IL-6 y VEGF, el mediador lipídico PGE₂ y la metaloproteína 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 PGE₂ 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 ³H (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_H1 mediada por células o T_H2 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_H1 (ruta 1) hacia respuestas de T_H2 (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_{Reg} (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)).

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).

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-γ secretado y IL-4 por ELISA.

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.

Aislamiento de la población de células T_{Reg}

La población de células T_{Reg} se aisló usando un procedimiento de aislamiento en dos etapas. Primero, se marcaron indirectamente magnéticamente células T no CD4⁺ 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⁺CD25⁺ con microperlas de CD25 y se aislaron mediante selección positiva a partir de la fracción de células CD4⁺ previamente enriquecidas. Se retuvieron las células T CD4⁺CD25⁺ marcadas magnéticamente en la columna y se eluyeron después de retirar la columna del campo magnético.

Con el fin de determinar si el aumento de la población de CD4⁺CD25⁺ generada en presencia de MSC eran de naturaleza supresora, se aislaron poblaciones de células T_{Reg} CD4⁺CD25⁺ 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 µg/mL). El cultivo se llevó a cabo durante 48 horas, tras lo cual se añadió timidina ³H. La radiactividad incorporada se contó después de 24 horas.

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 inmunotifó con el receptor de TNF inducido por glucocorticoides marcado con FITC, o GITR, y CD4 marcada con PE.

Generación de células T_{H1}/T_{H2}

Se sembraron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a razón de 2 x 10⁶ 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 µg/mL) y anti-CD28 (1 µg/mL) unidos a la placa bajo condiciones de T_{H1} (IL-2 (4 ng/mL) + IL-12 (5 ng/mL) + anti-IL-4 (1 µg/mL) o T_{H2} (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 luego se estimularon nuevamente 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 sobrenadantes de cultivo mediante ELISA (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota).

Análisis de los niveles de VEGF, PGE₂ 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 E₂ (PGE₂) y metaloproteinas 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

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 PGE₂ Indometacina (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) o NS-938 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan). Se añadió (³H)-timidina (20 µL en un cultivo de 200 µL) y se recolectaron las células después de un cultivo adicional de 24 horas utilizando un recolector automático. Los efectos de MSC o bloqueadores de PGE₂ se calcularon como el porcentaje de la respuesta de control (100%) en presencia de PHA.

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 µM. 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 β -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).

- 5 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 μ g/mL) durante 72 horas, y se determinó la incorporación de timidina 3 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

- 10 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_H1 y T_H2) 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.
- 15 Se aislaron células dendríticas precursoras mieloides (DC1) y plasmacitoides (DC2) mediante clasificación inmunomagnética de células BDCA1⁺ y BDCA2⁺ respectivamente y maduraron mediante incubación con GM-CSF e IL-4 (1 x 10³ IU/mL y 1 x 10³ 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⁺ y CD11c⁺, mientras que las células DC2 fueron HLA-DR⁺ y CD123⁺ (Figura 1A). En presencia del lipopolisacárido bacteriano del agente inflamatorio (LPS, 1 ng/mL), las células DC1 produjeron niveles moderados de TNF- α , pero cuando estaban presentes MSC (relaciones examinadas 1:1 y 1:10), hubo una reducción de > 50% en la secreción de TNF- α (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- γ y aumentar los niveles de IL-4 secretados por células T CD4⁺ sin alterar (Figura 1C), lo que sugiere un desplazamiento mediado por MSC del fenotipo de células T proinflamatorias a anti-inflamatorias.

- 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_{Reg}) 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_{Reg} 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- γ 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- γ 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- γ 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 efectoras 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- γ en el sobrenadante de cultivo (Figura 2C), lo que sugiere que las MSC pueden modular también las funciones de las células NK.

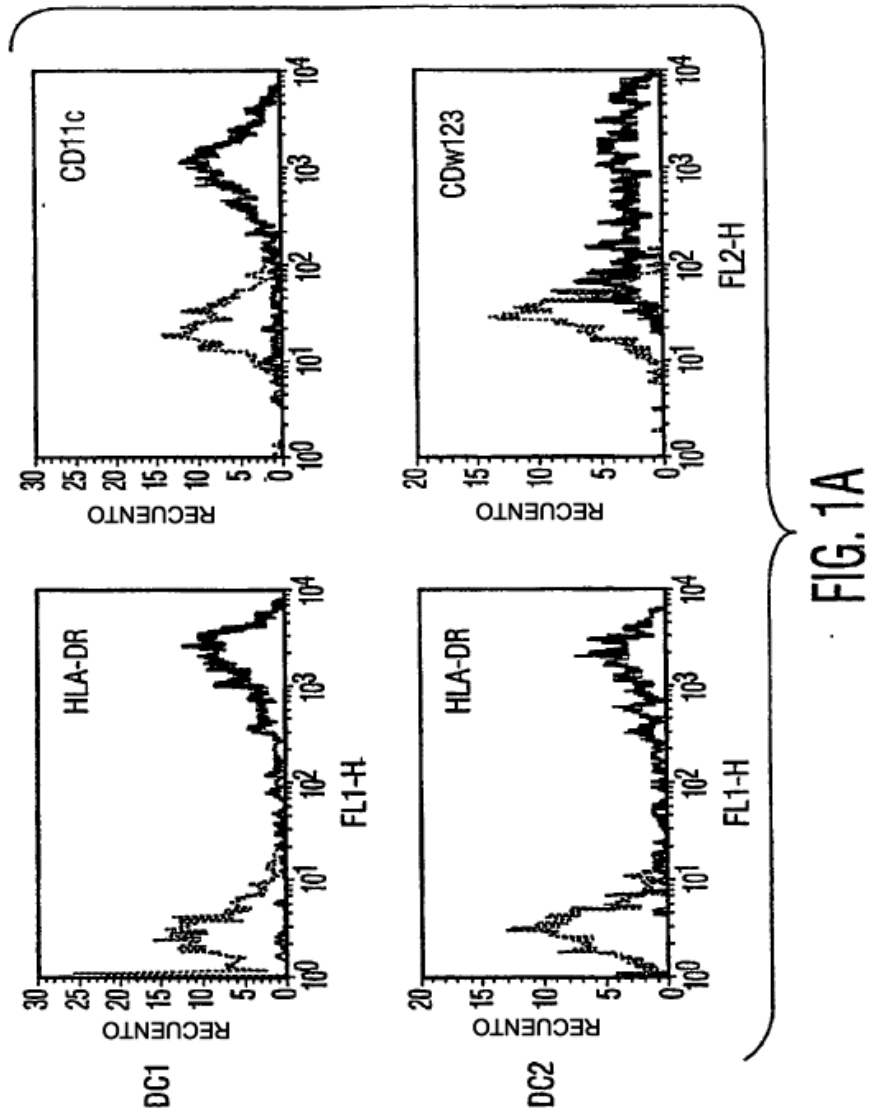
- Los trabajos previos han indicado que las MSC modifican las funciones de las células T por un factor o factores solubles (LeBlanc et al., Exp. Hematol., vol. 31, pág. 890 (2003), Tse et al., Transplantation, vol. 75, pág. 389 (2003)). Se observó que las MSC segregaban varios factores, incluyendo IL-6, prostaglandina E₂, 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- α y el aumento de la producción de IL-10 por las DC, se investigó el papel potencial de la prostaglandina E₂, ya que se ha demostrado que inhibe la producción de TNF- α 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 x 10⁶ células/mL) contenían aproximadamente 1.000 pg/mL de PGE₂ (Figura 4A). No hubo presencia detectable de inductores conocidos de la secreción de PGE₂, por ejemplo, TNF- α , IFN- γ o IL-1 β (datos no mostrados) en el sobrenadante del cultivo indicando una secreción constitutiva de PGE₂ por las MSC. La secreción de PGE₂ por las hMSC se inhibió 60-90% en presencia de inhibidores conocidos de la producción de PGE₂, NS-398 (5 μ M) e indometacina (4 μ M) (Figura 4A). Como la liberación de la secreción de PGE₂ 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 PGE₂ 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 PGE₂, se cultivaron MSC con células dendríticas activadas (DC1) o células T_{H1} en presencia de inhibidores de PGE₂ NS-398 o indometacina. La presencia de NS-398 o indometacina aumentó la secreción de TNF- α por DC1 y la secreción de IFN- γ 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 PGE₂ 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 PGE₂ NS-398 (5 μ M) o indometacina (4 μ 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- γ 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 PGE₂, 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 T_{H2}, 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- γ 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 para uso en el tratamiento de la insuficiencia coronaria y arteria periférica o para el uso en el tratamiento de arterias bloqueadas en un humano mediante la promoción o la inducción de la angiogénesis, en donde las células madre mesenquimales son genéticamente no manipuladas y alogénicas, y en donde las células madre mesenquimales estimulan las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para producir el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y, por lo tanto, promueven o inducen la angiogénesis.
2. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales son para uso en el tratamiento de enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardíaca isquémica y enfermedad de arteria periférica.
- 10 3. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las arterias bloqueadas están en las extremidades o en el cuello.
4. Las células madre mesenquimales para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las extremidades se seleccionan entre brazos, piernas, manos y pies.
- 15 5. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales son para uso en el tratamiento de arterias bloqueadas que suministran al cerebro.
6. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las células madre mesenquimales son para uso en el tratamiento o prevención de apoplejía.
- 20 7. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las células madre mesenquimales se administran sistémicamente o por administración directa a un tejido u órgano en necesidad de angiogénesis.
8. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la administración sistémica es por administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal.



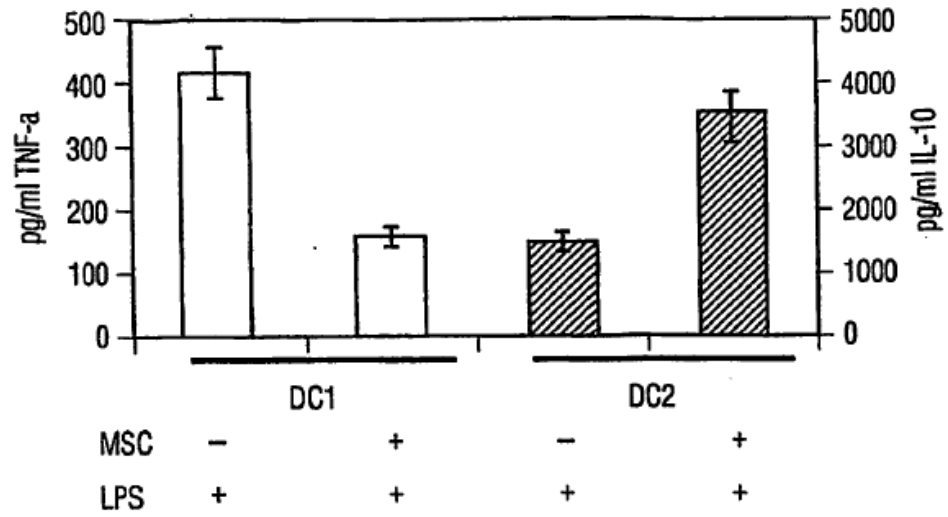


FIG. 1B

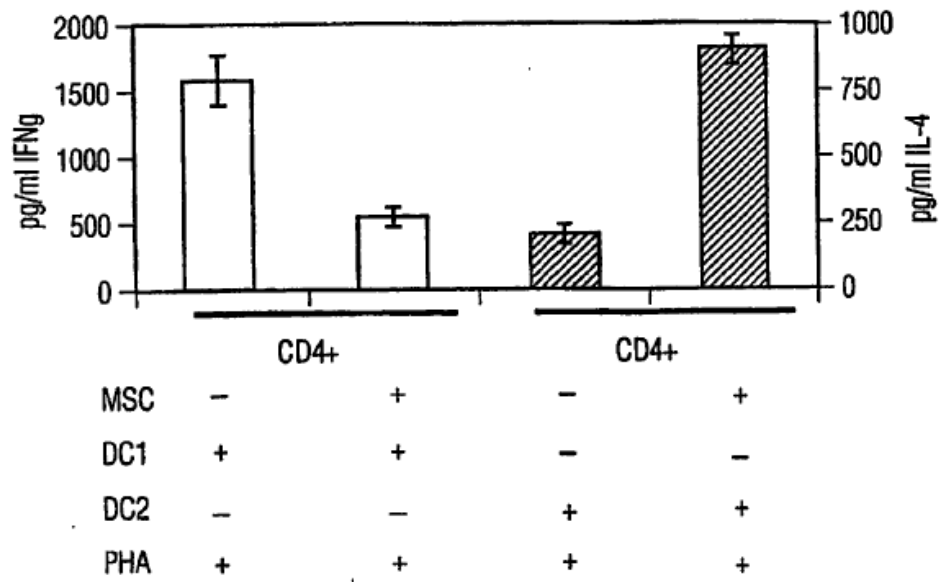


FIG. 1C

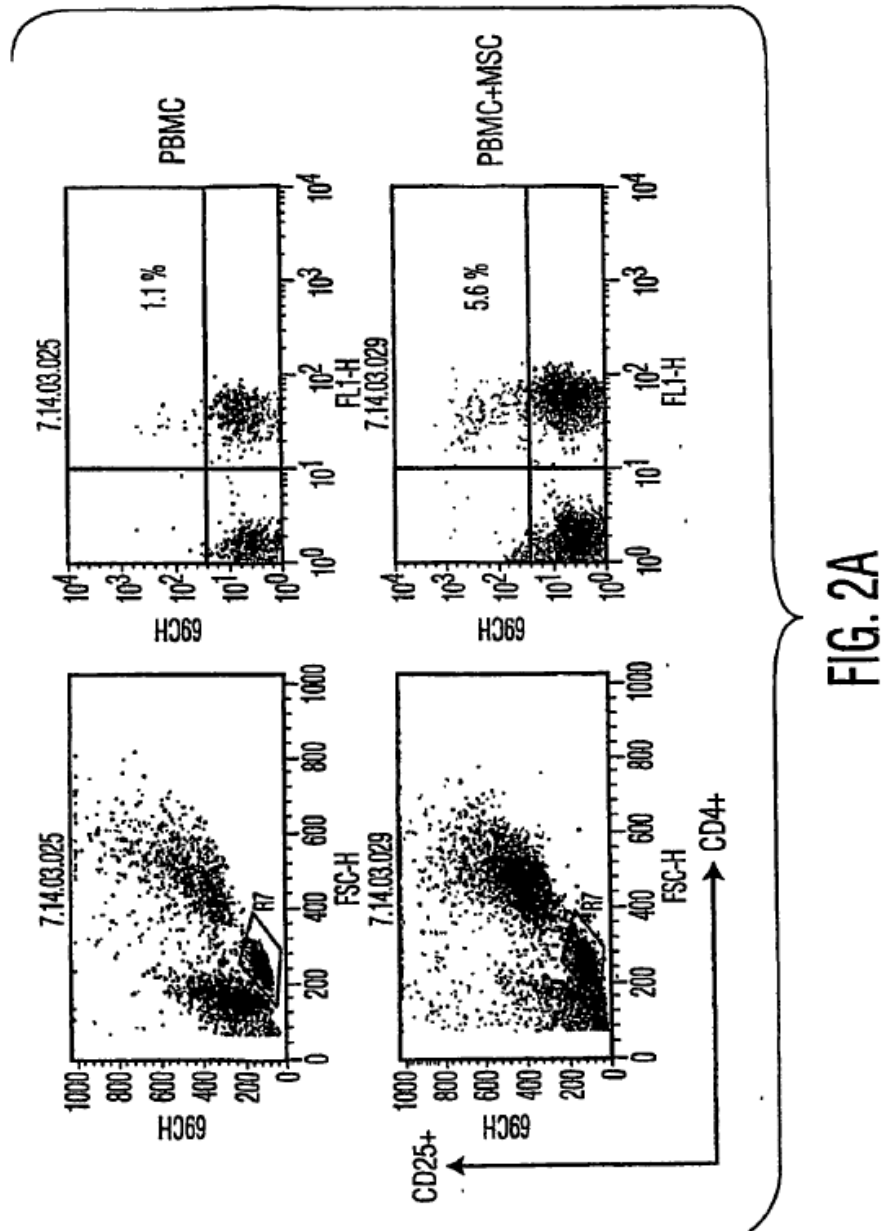


FIG. 2A

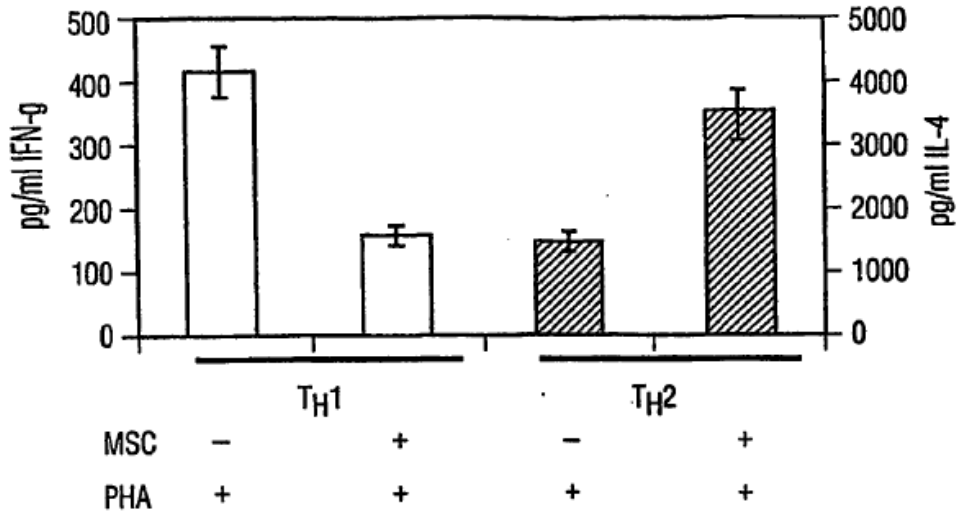


FIG. 2B

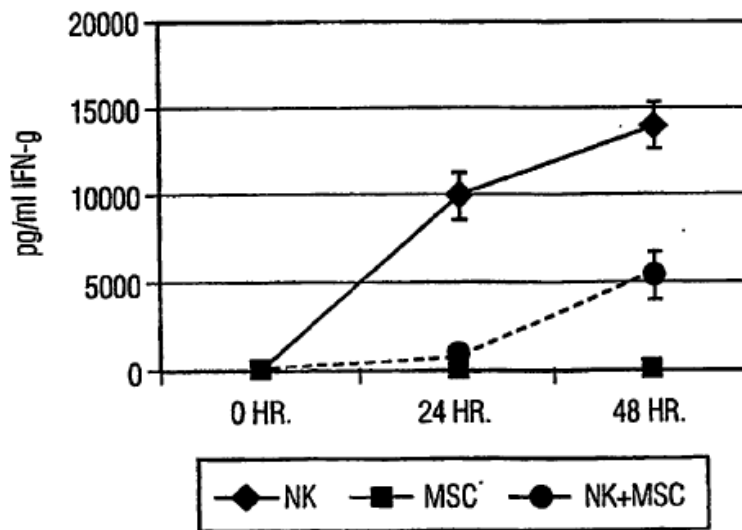


FIG. 2C

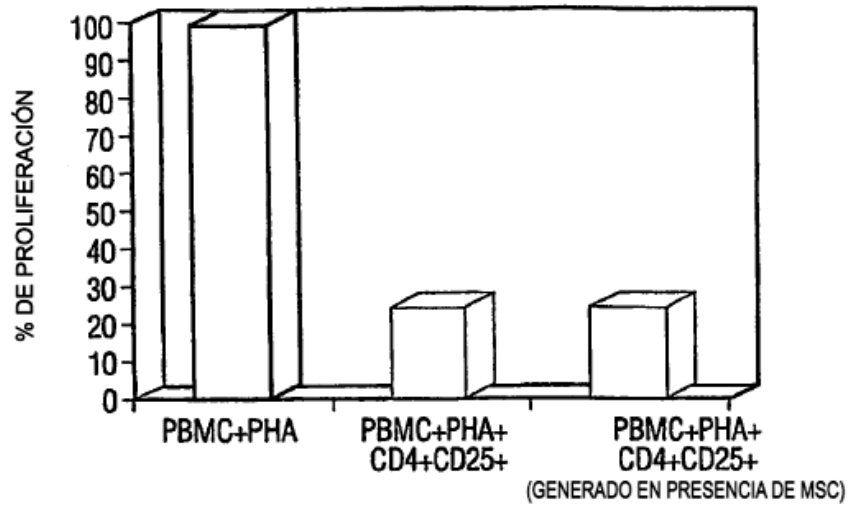


FIG. 3A

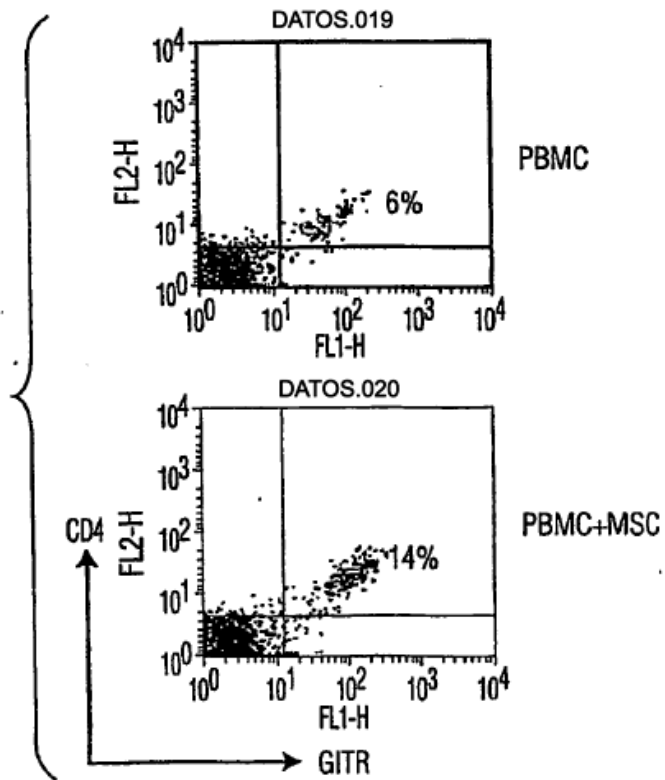


FIG. 3B

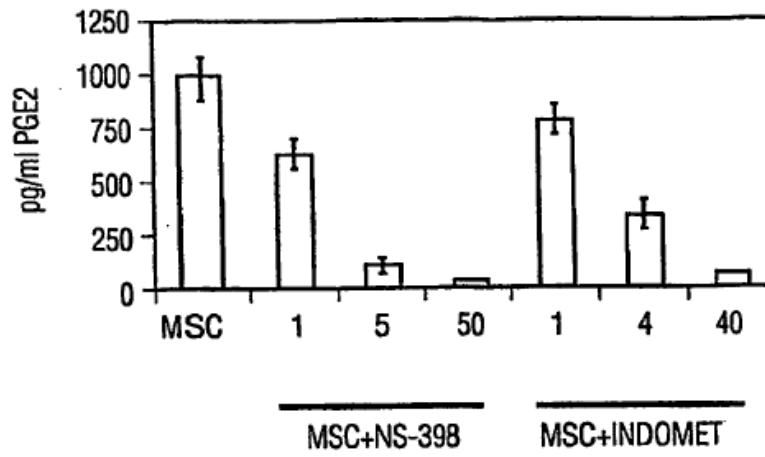


FIG. 4A

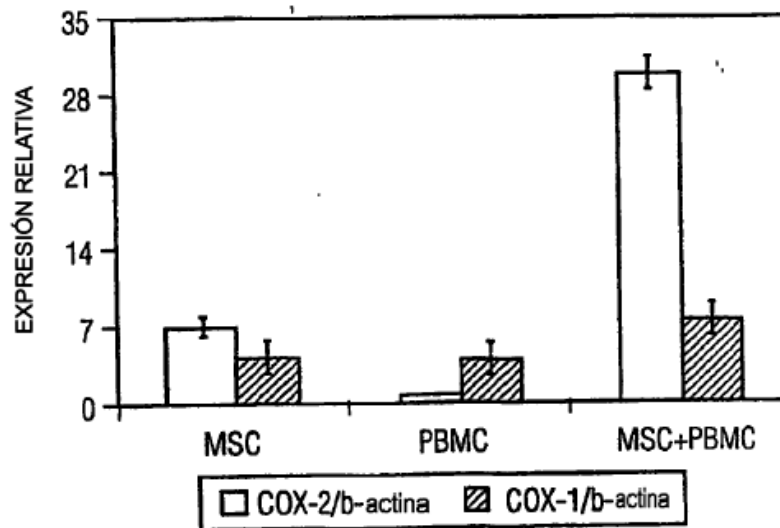


FIG. 4B

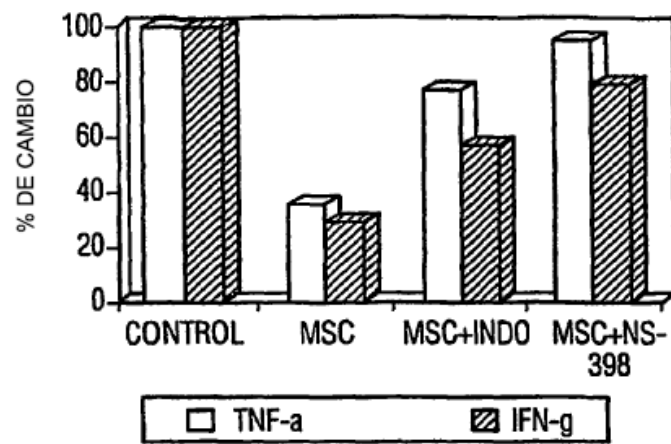


FIG. 4C

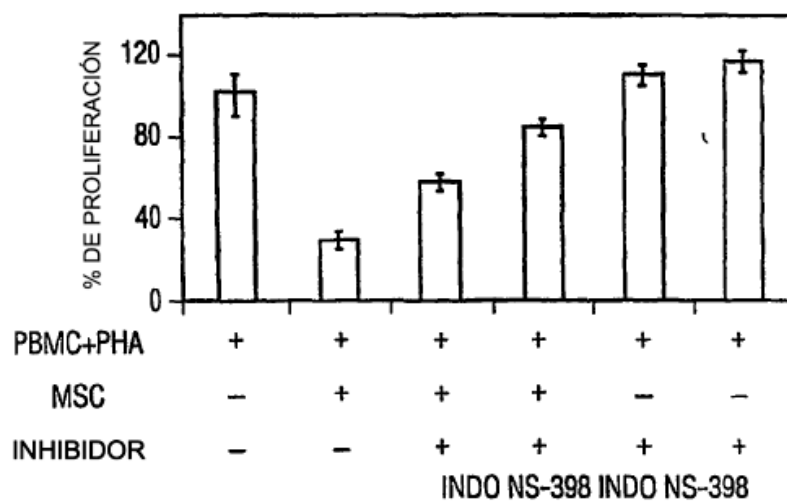


FIG. 4D

Fig. 5

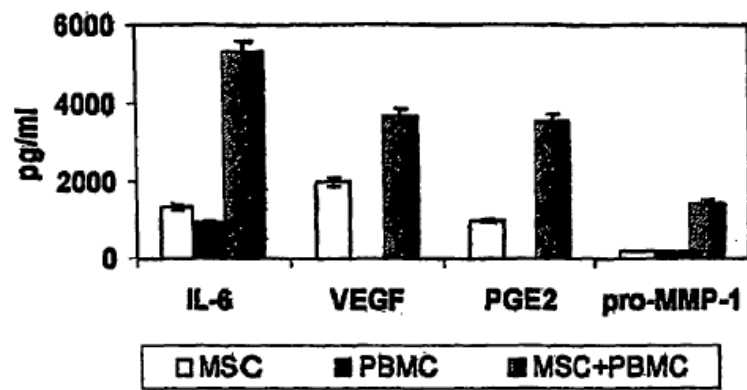
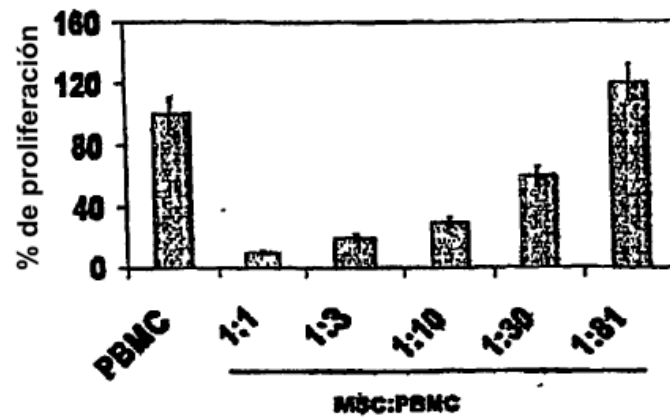


Fig. 6



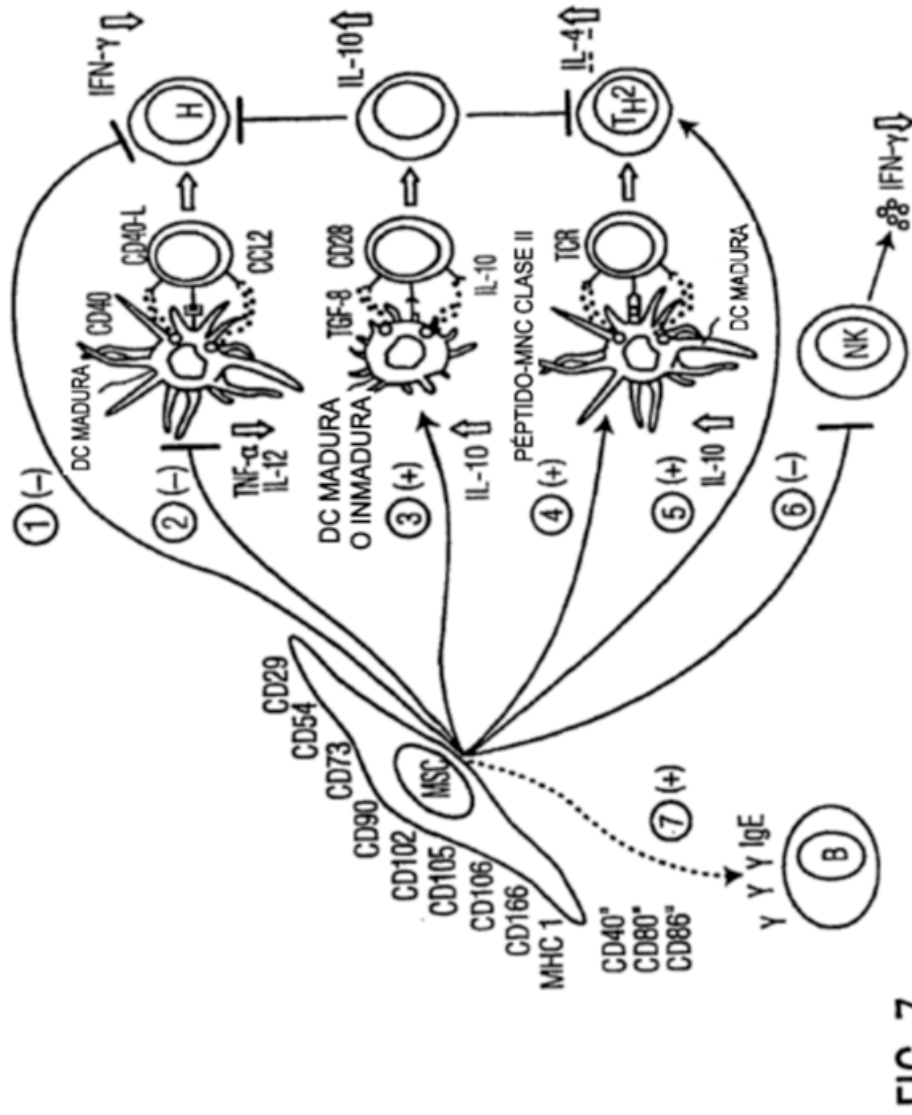


FIG. 7