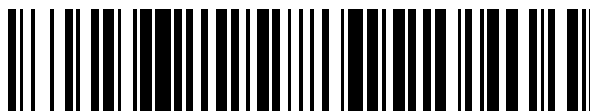


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 030**

51 Int. Cl.:

A61K 38/03 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2011 PCT/KR2011/006109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12026712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2011 E 11820139 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2620156**

54 Título: **Composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias o enfermedades inflamatorias, que contiene células madre tratadas con agonista de NOD2 o un producto cultivado del mismo**

30 Prioridad:

23.08.2010 KR 20100081640

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

11.10.2019

73 Titular/es:

**KANG STEM BIOTECH CO., LTD. (100.0%)
Rm. 402, Biotechnology Incubation Center,
Institute of Molecular Biology and Design,
No.105, Seoul National University, 1 Gwanak-ro,
Gwanak-gu
Seoul, KR**

72 Inventor/es:

**KANG, KYUNG SUN y
KIM, HYUNG SIK**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 727 030 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

Composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inmunitarias o enfermedades inflamatorias, que contiene células madre tratadas con agonista de NOD2 o un producto cultivado del mismo.

[Campo técnico]

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios y enfermedades inflamatorias, que comprende células madre que se generan cultivando células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) con un agonista de NOD2 o un cultivo del mismo. Más en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para inhibir respuestas inmunitarias o respuestas inflamatorias de un sujeto, que comprende la etapa de administrar la composición farmacéutica, las células madre o su cultivo de las mismas al sujeto, un procedimiento para preparar un fármaco inmunosupresor o un fármaco antiinflamatorio que usa las células madre o un cultivo de las mismas, un procedimiento para preparar PGE₂ o TGF-β1 que comprende la etapa de cultivar células madre que expresan NOD2 en medio de cultivo con un agonista NOD2, un injerto que comprende células madre que expresan NOD2 y el agonista de NOD2, un procedimiento para preparar el injerto, un compuesto que comprende células madre que expresan NOD2 y el agonista de NOD2, y un cultivo generado cultivando las células madre que expresan NOD2 con un agonista de NOD2.

[Técnica anterior]

- 20 Las proteínas que pertenecen a una familia de proteínas del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) están compuestas por tres dominios principales: un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) o dominio pirina en el extremo N terminal que está implicado en una interacción proteína-proteína, un dominio NOD central y un dominio LRR en el extremo C terminal. Los tipos de proteínas de NOD se pueden dividir en un grupo NOD1 que tiene un dominio CARD en el extremo N terminal y un grupo NOD2 que tiene dos dominios CARD en el extremo N terminal. Estos dos grupos se denominan juntos receptor de tipo NOD (NLR) y contribuyen significativamente al desarrollo de la respuesta inmunitaria *in vivo*, junto con un receptor de tipo *toll* (TLR). Se sabe que NOD desempeña un papel vital en una respuesta inmunitaria innata al reconocer el resto de PGN de las paredes celulares de la mayoría de las bacterias. NOD1 se expresa en células epiteliales del estómago y colon y en macrófagos y células dendríticas de páncreas, pulmones, riñón y bazo. Se sabe que NOD1 reconoce un péptido madre, dipéptido o tripéptido PGN del tipo ácido diaminopimélico (DAP), que está presente en las bacterias gramnegativas y en algunas bacterias grampositivas, pero está ausente en eucariotas (Hisamatsu T *et al.*, J. Biol. Chem., 278:32962, 2003).

- 30 NOD2 se expresa predominantemente en células mieloides, en particular macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, así como en células de Paneth en el intestino delgado, y su distribución es más restringida que NOD1. Además, la expresión de NOD2 está inducida por las citocinas inflamatorias, es decir, TNF-alfa e IFN-gamma. Como resultado, NOD2 apenas se expresa en los enterocitos normales, sino que se expresa solo cuando los enterocitos están infectados. El agonista (ligando) más ampliamente conocido entre los reconocidos por NOD2 es un dipéptido de muramilo (MDP), que es el motivo peptidoglucano (PGN) común a las bacterias gramnegativas y grampositivas (Girardin SE, *et al.*, J. Biol. Chem., 278:8869, 2003).

- 40 En 2003, Girardin, S.E. *et al.* informaron de que ratones con inactivación de NOD2 pueden crecer normalmente, pero se volvieron altamente sensibles a una infección por la administración oral, pero no intravenosa, de *Listeria monocytogenes*. Este resultado sugiere que NOD2 no está implicado en un mecanismo de crecimiento, sino que sirve como una proteína de reconocimiento de patrones que detecta la presencia de MDP. Sin embargo, en presencia de una cepa de *Listeria* en el intestino, NOD2 induce una respuesta inmunitaria innata de actividad antibacteriana que actúa como una proteína de defensa en el organismo (Girardin SE, *et al.*, J. Biol. Chem., 278:8869, 2003). El MDP se ha utilizado como adyuvante para estimular respuestas inmunitarias, es decir, adyuvante antigénico, y como adyuvante que puede ayudar a un inmunógeno (publicación de solicitud de patente coreana n.º 1019960033469, 1020070031848 y 1020100045473).

Entretanto, la prostaglandina E₂ (a continuación en el presente documento denominada PGE₂) es un compuesto representado por la prostaglandina E₂: ácido (5Z, 11 (alfa), 13E, 15S)-11,15-dihidroxi-9-oxo-prosta-5,13-dien-1-oico, y es la prostaglandina más producida en condiciones fisiológicas y patológicas (Ushikubi F *et al.*, J. Pharmacol. Sci. 83:279, 2000).

- 50 La PGE₂ se usaba tradicionalmente para preparar el cuello uterino para el parto, y en realidad, se ha utilizado en la composición farmacéutica para estimular el parto. Se fabrica en forma de ovulo vaginal con los siguientes nombres de marca: Cervidil (de Forest Laboratories, Inc.), Prostin E2 (de Pfizer Inc.), Propess (de Ferring Pharmaceuticals) y Glandin (de Nabiqasim Pharmaceuticals Pakistan). Recientemente, se ha sugerido la PGE₂ como un candidato convincente para un nuevo modulador inmunosupresor, ya que funciona inhibiendo la liberación de citocinas, tal como la interleucina-1 beta y el TNF alfa que producen los macrófagos y también inhibiendo la diferenciación de linfocitos T1 cooperadores (Harris SG *et al.*, Trends Immunol., 23:144, 2002). Además, un estudio *in vitro* ha informado de que la PGE₂ inhibe la producción de citocinas tales como la interleucina-2 y el IFN-gamma para inhibir la diferenciación de linfocitos T humanos y murinos (Goodwin JS *et al.*, J. clin. Immunol., 3:295, 1983). Estos

estudios sugieren que la PGE₂ es un fármaco inmunomodulador prometedor, y, como resultado, ha habido una gran necesidad de desarrollar un procedimiento de producción simple y rentable del mismo.

Del mismo modo, el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) es conocido como un fármaco inmunosupresor y antiinflamatorio. Se ha sugerido que el TGF-β1, al igual que la PGE₂, es un fármaco inmunomodulador prometedor, y como resultado ha habido una gran necesidad de desarrollar un procedimiento de producción simple y rentable del mismo.

Entretanto, los tipos de fármacos inmunosupresores se pueden dividir en inmunosupresores específicos y no específicos. En teoría, los inmunosupresores específicos son superiores, pero se usan principalmente los inmunosupresores no específicos. La ciclosporina (Neoral, Cipol A), la azatioprina (imuran) y la prednisolona (un corticosteroide) son los fármacos inmunosupresores usados con más frecuencia en la práctica clínica. Se encontró que una combinación de estos tres fármacos mostraba menos efectos secundarios y más efectos inmunosupresores que el uso de un fármaco individual. Recientemente, se han desarrollado y usado en la práctica clínica muchos fármacos inmunosupresores tales como FK 506, RATG, OKT3, Cellcept, etc..

En el proceso desde la estimulación antigénica hasta la producción de anticuerpos, estos fármacos inmunosupresores causan inmunosupresión obstaculizando el procesamiento fagocítico de antígenos por macrófagos, el reconocimiento de antígenos por linfocitos, la división celular, la división de linfocitos T y B, o la producción de anticuerpos. La mayoría de los fármacos tienen una actividad antitumoral, ya que obstaculizan la división celular induciendo lesiones en el ADN, la inhibición de la síntesis del ADN y similares.

Sin embargo, los efectos secundarios representativos de los fármacos son la hipertensión y la nefrotoxicidad (reducción de la función renal). Debido a la alta incidencia de estos efectos secundarios, las afecciones de los pacientes se tenían que controlar adecuadamente para detectar la aparición de los efectos secundarios. Efectos secundarios tales como temblor, convulsión, hepatitis, colestasis, hiperuricemia, debilidad muscular, hipertricosis e hipertrofia gingival surgen raramente. Uno de los supresores usados con frecuencia llamado azatioprina inhibe la función de la médula ósea produciendo un recuento bajo de leucocitos, anemia y un recuento bajo de plaquetas. Además, la azatioprina puede causar complicaciones tales como pancreatitis, hepatitis y colestasis, así como pérdida del cabello y fiebre ocasionalmente. Un fármaco corticosteroide llamado prednisolona es el primer inmunosupresor usado en el mercado y tiene una variedad de actividad inhibidora. Por ejemplo, puede aumentar el apetito, la cantidad de músculo alrededor del hombro y la espalda, y puede causar euforia temporal. Sin embargo, este fármaco corticosteroide se debe usar con cuidado, ya que favorece la progresión de la aterosclerosis, y causa hipertensión, úlcera gástrica, diabetes, retraso del crecimiento, osteoporosis, cataratas o glaucoma.

El trasplante alogénico, tal como el trasplante de órganos y el trasplante de células madre hematopoyéticas, es un logro médico extraordinario del siglo XXI, y se ha aplicado para el tratamiento radical de enfermedades terminales tales como la insuficiencia cardíaca, incluida la miocardiopatía dilatada, la insuficiencia renal crónica y los trastornos hematológicos resistentes al tratamiento. Sin embargo, todavía existe una limitación para superar las complicaciones mortales que surgen después del trasplante alogénico, tal como el fracaso de la incorporación del injerto o la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). En un esfuerzo por minimizar estas respuestas inmunitarias, se ha usado un tratamiento para controlar las respuestas inmunitarias de linfocitos T que están causadas por la inmunidad celular de linfocitos T que reconocen antígenos alogénicos después de un trasplante (Ikehara S, Exp. Hematol., 31:1142, 2003; First MR, Transplantation, 77:88, 2004), es decir, un tratamiento para controlar las respuestas inmunitarias mediante la inhibición de la producción de linfocitos T por la interleucina (IL)-2 usando un fármaco inmunosupresor, ciclosporina o FK506. Sin embargo, todavía existe una alta demanda para el desarrollo de fármacos inmunosupresores económicos sin efectos secundarios.

Entretanto, los mecanismos de regulación inmunitaria de las células madre mesenquimales aún no se han identificado por completo, mientras que solo se ha informado de algunos estudios con respecto a las células madre mesenquimales. El primer hallazgo fue que las células madre mesenquimales parecen inhibir las células presentadoras de antígenos (APC). Los cambios en las respuestas inmunitarias son proporcionales al número de monocitos añadidos durante el proceso de cultivo en determinadas condiciones, lo que sugiere que los monocitos están implicados en la inmunosupresión. El segundo hallazgo fue que las células madre mesenquimales parecen inducir propiedades inmunosupresoras regulando la proliferación de linfocitos T. El cocultivo de linfocitos T con células madre mesenquimales regula por disminución la expresión de ciclina D2 y, posteriormente, detiene los linfocitos T en la fase G0/G1 del ciclo celular para evitar su proliferación. También se informó de que la capacidad de proliferación se reduce continuamente, incluso después de que se retiran las células madre mesenquimales (Glennie S *et al.*, Blood, 105:2821, 2005).

[Divulgación]

[Problema técnico]

En un esfuerzo por desarrollar una forma más eficaz de regular las respuestas inmunitarias o inflamatorias usando células madre, los autores de la presente invención encontraron en primer lugar que el receptor NOD2 se expresa en las células madre, y las células madre regulan las respuestas inmunitarias por medio del receptor NOD2. A

continuación descubrieron que, cuando las células madre se tratan con un agonista de NOD2, es decir, MDP, PGE₂ y TGF-β1 se expresan excesivamente, lo que da lugar a una inhibición más eficaz de la respuesta inmunitaria, demostrando de este modo sus efectos terapéuticos sobre modelos de colitis y dermatitis atópica completados en la presente invención.

5 [Solución técnica]

La presente invención se define en las reivindicaciones.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias, que comprende células madre que se generan cultivando células madre que expresan NOD2 con un agonista de NOD2 o un cultivo de las mismas, que sea económica y que no tenga ningún efecto secundario como alternativa a los fármacos inmunosupresores y los fármacos antiinflamatorios convencionales.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en un procedimiento para tratar trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias, que comprende la etapa de administrar la composición a un sujeto con trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en un procedimiento para inhibir respuestas inmunitarias o respuestas inflamatorias de un sujeto, que comprende la etapa de administrar las células madre o el cultivo de las mismas al sujeto.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar un fármaco inmunosupresor o un fármaco antiinflamatorio.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar prostaglandina E₂ y TGF-β1 que se usen en diversas aplicaciones.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un injerto que comprenda las células madre que expresan NOD2 y el agonista de NOD2, o un injerto preparado retirando las células madre del injerto, y un procedimiento de preparación de los injertos.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto que comprenda las células madre que expresan NOD2 y el agonista de NOD2.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un cultivo que se genere añadiendo el agonista de NOD2 a las células madre que expresan NOD2.

30 [Efectos ventajosos]

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que se puede usar para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios y enfermedades inflamatorias. Además, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar PGE₂ y TGF-β1, que puede producir PGE₂ y TGF-β1 con un alto rendimiento de manera rentable sin realizar un procesamiento químico. La composición farmacéutica de la presente invención es un agente terapéutico celular económico que no tiene efectos secundarios, que se puede usar como una alternativa a los fármacos inmunosupresores y a los fármacos antiinflamatorios conocidos previamente que tienen efectos secundarios. Por lo tanto, se puede usar para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios, tales como enfermedades autoinmunitarias, incluyendo la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide y la dermatitis atópica, y enfermedades inflamatorias.

40 [Descripción de los dibujos]

La FIG. 1a muestra el resultado de la RT-PCR de ARNm que demuestra la expresión de TLR y NLR en hUCB-MSC, y las FIG. 1b a 1e muestran el nivel de expresión de IL-8 y la proliferación de MSC después del tratamiento con cada agonista;

la FIG. 2 es un gráfico que muestra el efecto de hUCB-MSC en la proliferación de MNC después del tratamiento con cada agonista;

la FIG. 3 es un gráfico que muestra el efecto del cultivo de hUCB-MSC en la proliferación de MNC (3a y 3b) y la proliferación de esplenocitos (3c) después del tratamiento con cada agonista;

la FIG. 4 muestra la comparación del efecto inhibitor del cultivo de células madre mesenquimales (hUCB-MSC n.º 618) tratado con MDP solo (A) y el resultado del tratamiento con ARNip (B);

la FIG. 5 muestra la comparación del efecto inhibitor del cultivo de células madre mesenquimales (hUCB-MSC n.º 620) tratado con MDP solo (A) y el resultado del tratamiento con ARNip (B);

la FIG. 6a muestra la cantidad de secreción de PGE₂ después del tratamiento de cada receptor con el agonista correspondiente, la FIG. 6b muestra el nivel de expresión de COX-2 después del tratamiento de cada receptor con el agonista correspondiente, la FIG. 6c muestra los cambios en el nivel de expresión de COX-2 que se incrementa mediante el tratamiento de siNOD2 y siRip2 con MDP, la FIG. 6d muestra los cambios en la cantidad de secreción de PGE₂ que se incrementa mediante el tratamiento de siNOD2, siRip2 e indometacina (indo) con MDP, la FIG. 6e muestra los cambios en el efecto inhibitor sobre la proliferación de MNC, que se incrementa mediante el tratamiento de indometacina (indo) con MDP, y la FIG. 6f muestra la reducción de la cantidad de secreción de PGE₂ que se potencia mediante el tratamiento de siNOD2 e indometacina (indo) con MDP;

la FIG. 7a muestra la cantidad de producción de NO después del tratamiento de cada receptor con el agonista correspondiente, la FIG. 7b muestra la cantidad de secreción de PGE₂ después del tratamiento de cada receptor con el agonista correspondiente, la FIG. 7c muestra la cantidad de secreción de TGF-β1 después del tratamiento de cada receptor con el agonista correspondiente, la FIG. 7d muestra el cambio en el nivel de expresión de COX-2 después del tratamiento de cada receptor con el agonista correspondiente, la FIG. 7e muestra el efecto inhibitor sobre la proliferación de MNC en presencia de PGE₂, la FIG. 7f muestra el efecto inhibitor sobre la proliferación de esplenocitos en presencia de PGE₂, la FIG. 7g muestra un efecto inhibitor sobre la proliferación de MNC, que se potencia mediante el tratamiento de indometacina (indo) con MDP, y la FIG. 7h muestra el efecto inhibitor sobre la proliferación de MNC, que se mejora mediante el tratamiento del anticuerpo neutralizante contra el TGF-β1 (a-TGF-β1) con MDP;

la FIG. 8 demuestra una inhibición extraordinaria de la expresión de los genes y proteínas NOD2 y Rip2 en hUCB-MSC por los respectivos ARNip;

la FIG. 9a muestra la expresión de COX-2 incrementada mediante el tratamiento de siNOD2 y siRip2 con MDP, la FIG. 9b muestra la secreción de PGE₂ incrementada mediante el tratamiento de siNOD2, siRip2 e indometacina (indo) con MDP, la FIG. 9c muestra la secreción de TGF-β1 incrementada mediante el tratamiento de siNOD2 y siRip2 con MDP, y la FIG. 9d es un gráfico que muestra los cambios en el efecto inhibitor sobre la proliferación de MNC mediante el tratamiento de siNOD2 y siRip2 con MDP;

la FIG. 10a muestra la secreción de IL-10 potenciada mediante el tratamiento de siNOD2, siRip2, indometacina (indo) y anticuerpo neutralizante contra TFG-β1 (a-TFG-β1) con MDP, y la FIG. 10b muestra los cambios en las poblaciones de Treg que se potencian mediante el tratamiento de siNOD2, siRip2, indometacina (indo) y anticuerpo neutralizante contra TFG-β1 (a-TFG-β1) con MDP;

la FIG. 11 muestra el resultado de la RT-PCR de ARNm que demuestra expresiones de NOD2, RIP2 y RPL13A en células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical (UCB-MSC), células madre derivadas de tejido adiposo (AD-MSC) y células madre epiteliales amnióticas (AEC);

la FIG. 12a es un gráfico que muestra la reducción del peso corporal en grupos experimentales y grupos de control del modelo de colitis, la FIG. 12b es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia, la FIG. 12c es un gráfico que muestra los cambios en el índice de actividad de la enfermedad, la FIG. 12d muestra la imagen de la longitud del colon, la FIG. 12e es un gráfico que muestra la longitud del colon, la FIG. 12f es una imagen histopatológica que muestra inflamación, edema e infiltración de células inflamatorias, y la FIG. 12g es un gráfico que muestra puntuaciones histopatológicas;

la FIG. 13a es un gráfico que muestra los cambios en la secreción de IL-6, IFN-γ e IL-10 por MDP en el colon del modelo de ratón con colitis inducida por DSS, la FIG. 13b es una imagen microscópica de fluorescencia que muestra la localización de Fox3p+ en el colon de grupos de control y grupos experimentales del modelo de ratón con colitis después del tratamiento con MDP y siNOD2, la FIG. 13c es el resultado de la inmunoelectrotransferencia que muestra el nivel de expresión de la proteína Fox3p en grupos de control y grupos experimentales después del tratamiento con MDP y siNOD2, la FIG. 13d muestra la cuantificación del análisis por inmunoelectrotransferencia, la FIG. 13e es un gráfico que muestra la actividad de MPO y la infiltración de células CD4+ y CD11b+ para analizar la infiltración de células inflamatorias en colon de ratón;

la FIG. 14 es un gráfico que muestra el resultado de un examen macroscópico después de inyecciones intravenosas o subcutáneas de hUCB-MSC tratadas con MDP en ratones a los que se ha inducido dermatitis atópica;

la FIG. 15 es un gráfico que muestra un nivel de inmunoglobulina E en suero, que es un índice de dermatitis atópica;

la FIG. 16 es un gráfico que muestra un nivel de inmunoglobulina G1 en suero, que es un índice de dermatitis atópica;

la FIG. 17 es una imagen de la tinción con H+E después del procesamiento de tejido del tejido cutáneo de ratón; y

la FIG. 18 es una imagen que muestra la desgranulación de los mastocitos, que es uno de los principales síntomas de la dermatitis atópica, después del procesamiento del tejido y la tinción con azul de toluidina del tejido cutáneo de ratón.

[Mejor modo]

En un aspecto para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias, que comprende células madre que se generan cultivando células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) con un agonista de NOD2 o un cultivo del mismo.

En la presente invención, se encontró que el tratamiento de células madre con un agonista de la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) favorece la secreción de PGE_2 y $\text{TGF-}\beta 1$ en las células madre mesenquimales, lo que a su vez regula las respuestas inmunitarias e inflamatorias. En otras palabras, la presente invención confirmó que la actividad reguladora de la inmunidad y la inflamación de las células madre se correlaciona con la función de NOD2, y los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios se potencian cuando se tratan con un agonista de NOD2 y, por tanto, las células madre tratadas con un agonista de NOD2 y un cultivo de las mismas se puede usar como un agente terapéutico celular para la regulación inmunitaria y de la inflamación. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias, que comprende células madre que se generan cultivando células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) con un agonista de NOD2 o un cultivo del mismo. Como se usa en el presente documento, los términos 'NOD2' y 'receptor NOD2' se pueden usar de manera intercambiable.

Como se usa en el presente documento, el término "agonista" se refiere, en general, a una sustancia química que funciona para estimular positivamente un receptor, y también se llama un efector. En otras palabras, un agonista tiene una función positiva, mientras que un antagonista funciona para obstaculizar un ligando o tiene una función negativa. En la presente invención, el agonista se puede usar de manera intercambiable con un "ligando" que se refiere a una sustancia química que se une a un receptor en general. Con respecto a los objetivos de la presente invención, el agonista puede ser un agonista de NOD2.

Como se usa en el presente documento, el término "agonista de NOD2" se refiere a una sustancia que se une a un receptor NOD2 para activar NOD2, y uno de los ejemplos de agonista de NOD2 es el dipéptido de muramilo (MDP), pero no se limita al mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "MDP" es dipéptido de muramilo, y en la presente invención se puede usar como un agonista que activa la vía de NOD2 para favorecer la secreción de PGE_2 en las células madre mesenquimales.

Como se usa en el presente documento, las frases "cultivadas con adición" o "generadas con adición" de agonista se pueden referir al cultivo de células madre mesenquimales en un medio de cultivo al que se añade un agonista, como ejemplo. Preferentemente, el cultivo anterior se puede referir al cultivo con la adición del agonista a una concentración de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 0,1 a 200 horas y, más preferentemente, durante 1 a 72 horas. Además, se puede referir al cultivo de las células en el medio al que se añade el agonista, y al cultivo adicional en el medio reemplazado.

Como se usa en el presente documento, el término "células madre" se refiere a células que tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tejidos, es decir, "células indiferenciadas". El término "células madre mesenquimales" se refiere a células madre pluripotentes derivadas de diversas células adultas, tales como médula ósea, sangre de cordón umbilical, placenta (o tejido placentario) y grasa (tejido adiposo). Por ejemplo, las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea poseen una pluripotencia para diferenciarse en tejido adiposo, tejido óseo/cartilaginoso y tejido muscular, y, por tanto, muchos estudios se han centrado en la investigación de células madre mesenquimales para el desarrollo del tratamiento celular.

En la presente invención, las células madre pueden ser células madre adultas humanas, células madre pluripotentes humanas, células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias de animales o células madre adultas de animales. Entretanto, las células madre adultas pueden ser células madre mesenquimales, células estromales mesenquimales derivadas de tejido humano, células madre mesenquimales derivadas de tejido humano, células madre pluripotentes o células epiteliales amnióticas, y las células madre mesenquimales pueden ser células madre mesenquimales derivadas de una fuente seleccionada del grupo que consiste en cordón umbilical, sangre cordón umbilical, médula ósea, grasa, músculo, nervio, piel, amnios y placenta, y preferentemente aquellas derivadas de humanos, y más preferentemente células madre mesenquimales (hUCB-MS) derivadas de sangre de cordón

umbilical humana. La obtención de células madre de cada fuente se puede realizar siguiendo el procedimiento conocido en la técnica, y no se limita al procedimiento descrito en los ejemplos de la presente invención.

Preferentemente, se usan células madre mesenquimales preparadas mediante el tratamiento de células madre mesenquimales derivadas de un humano con MDP a una concentración de 1 a 100 µg/ml durante 0,1-200 horas. Si las células se cultivan con MDP durante 0,1 hora o menos, la vía de NOD2 no se puede activar suficientemente. Si las células se cultivan con MDP durante 200 horas o más, no existen beneficios económicos. Por tanto, las células madre mesenquimales se tratan con MDP, más preferentemente durante 0,1~200 horas, mucho más preferentemente durante 1~72 horas, y lo más preferentemente durante 24 horas.

Para cultivar las células madre mesenquimales, se puede usar cualquier medio convencional conocido en la técnica que sea conocido por ser adecuado para el cultivo de células madre. Por ejemplo, se puede usar el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o medio sin suero de queratinocitos (Keratinocyte-SFM). Lo más preferentemente, se puede usar medio D (Gibco).

El medio para el cultivo de células madre mesenquimales se puede complementar con aditivos. En general, el medio puede contener un tampón neutro (por ejemplo, fosfato y/o bicarbonato de alta concentración) en solución isotónica y un nutriente proteico (por ejemplo, suero, tal como como FBS, reemplazo de suero, albúmina o aminoácidos esenciales y no esenciales, tal como glutamina). Además, puede contener lípidos (ácidos grasos, colesterol, un extracto de suero de HDL o LDL) y otros ingredientes que se encuentran en la mayoría de los medios concentrados de este tipo (por ejemplo, insulina o transferrina, nucleósidos o nucleótidos, piruvato, una fuente glucídica tal como glucosa, selenio en cualquier forma ionizada o sal, un glucocorticoide tal como hidrocortisona y/o un agente reductor tal como β-mercaptoetanol).

Además, con vistas a proteger las células evitando que se adhieran entre sí o a la pared de un vaso, o que formen grandes agregaciones, puede ser beneficioso incluir un agente antiaglomerante en el medio, por ejemplo, los vendidos por Invitrogen (n.º de cat. 0010057AE).

En un modo de realización de la presente invención, se encontró que el cultivo de células madre que se cultivaron con la adición de uno de los agonistas de NOD2, el dipéptido de muramilo (MDP) inhibe la proliferación de células mononucleares (MNC).

Las células mononucleares que circulan en la circulación sanguínea migran a los tejidos donde maduran hasta convertirse en macrófagos. Las células mononucleares, los macrófagos y las células dendríticas son las más importantes en el sistema de defensa del organismo, y tienen un papel principal en el inicio de respuestas inmunitarias adaptativas que tienen la capacidad de presentar antígenos y regular la función de los linfocitos T. Por otra parte, las células mononucleares y los macrófagos actúan como las principales barreras de defensa en el sistema inmunitario. Además, las células mononucleares funcionan como células accesorias en las etapas de reconocimiento y activación de las respuestas inmunitarias adaptativas. Funcionan como células presentadoras de antígenos (APC) para el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T, y producen proteínas de membrana y proteínas secretoras que funcionan como señales secundarias para la activación de linfocitos T. Algunos de los fagocitos mononucleares se pueden diferenciar en células dendríticas, que desempeñan un papel importante en la estimulación de las respuestas de los linfocitos T contra los antígenos proteicos. Cuando se produce el rechazo de un trasplante de células y órganos, la célula/órgano trasplantado en el organismo es reconocida como un objeto exógeno y, por lo tanto, se incrementa el número de células mononucleares, macrófagos y células dendríticas. Por tanto, es evidente para los expertos en la técnica que la inhibición de la proliferación de células mononucleares usando el cultivo de células madre generadas con la adición de dipéptido de muramilo (MDP) da lugar a la inhibición de las respuestas inmunitarias en el organismo.

Como se usa en el presente documento, el término "célula mononuclear" se refiere a un leucocito fagocítico mononuclear derivado de las células de la médula ósea y de la sangre periférica.

Además, en otro modo de realización de la presente invención, se encontró que las células madre cultivadas con la adición de dipéptido de muramilo (MDP) favorecen la secreción de PGE₂ y TGF-β1, dando lugar a una inhibición de MNC que es inducida por la PGE₂ y el TGF-β1. Se ha informado de que la PGE₂ funciona para inhibir la secreción de citocinas inflamatorias tales como la interleucina-1 beta y las citocinas TNF alfa. El TGF-β1 se considera una citocina antiinflamatoria.

Todavía en otro modo de realización de la presente invención, se sugirió que las células madre tratadas con MDP producen una citocina antiinflamatoria IL-10 con alto rendimiento y, además, forman una población de linfocitos T reguladores.

Por lo tanto, las células madre de la presente invención y el cultivo de las mismas son útiles para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios y enfermedades inflamatorias. A este respecto, los trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias pueden ser enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, artritis, infección bacteriana, sepsis, inflamación o similares. Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser enfermedad de Crohn, eritema, dermatitis atópica, artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes de tipo 1, lupus, síndrome de fatiga crónica,

fibromialgia, hipotiroidismo e hipertiroidismo, esclerodermia, enfermedad de Behcet, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Ménière, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Sjögren, vitiligo, endometriosis, psoriasis, vitiligo, esclerodermia sistémica, asma, colitis ulcerosa o similares.

5 Como se usa en el presente documento, el término "enfermedades inflamatorias" significa conjuntamente las lesiones causadas por inflamación, y puede ser, pero no se limita a, preferentemente edema, dermatitis, alergia, dermatitis atópica, asma, conjuntivitis, periodontitis, rinitis, timpanitis, faringolaringitis, amigdalitis, neumonía, úlcera gástrica, gastritis, enfermedad de Crohn, colitis, hemorroides, gota, espondilitis anquilosante, fiebre reumática, lupus, fibromialgia, artritis psoriásica, artrosis, artritis reumatoide, periartrosis de hombro, tendinitis, tenosinovitis, miositis, hepatitis, cistitis, nefritis, síndrome de Sjögren o esclerosis múltiple.

10 Como se usa en el presente documento, el término "trastornos inmunitarios" se refiere a los trastornos que se asocian con el desarrollo de respuestas inmunitarias particulares, y pueden ser, pero no se limitan a, preferentemente enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped. Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser enfermedad de Crohn, eritema, dermatitis atópica, artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes de tipo 1, lupus, síndrome de fatiga
15 crónica, fibromialgia, hipotiroidismo e hipertiroidismo, esclerodermia, enfermedad de Behcet, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Ménière, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Sjögren, vitiligo, endometriosis, psoriasis, vitiligo, esclerodermia sistémica, asma, colitis ulcerosa o similares.

20 En los modos de realización de la presente invención, se confirmó que las células madre de la presente invención o el cultivo de las mismas podían tratar las enfermedades inflamatorias tal como colitis y las enfermedades inmunitarias tal como dermatitis atópica en modelos animales de colitis y modelos de dermatitis atópica, lo que sugiere sus efectos terapéuticos sobre los trastornos inmunitarios y enfermedades inflamatorias.

25 Como se usa en el presente documento, el término "prevención" significa todas las acciones en las que los trastornos inmunitarios o las enfermedades inflamatorias se contienen o retardan mediante la administración de la composición. Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" significa todas las acciones en las que los síntomas de los trastornos inmunitarios o las enfermedades inflamatorias se alivian o se mejoran mediante la administración de la composición.

Además, la composición de la presente invención puede incluir de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^9$, preferentemente de $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^8$, más preferentemente $1,0 \times 10^7$ células por 1 ml.

30 La composición de la presente invención se puede usar descongelada, o congelada para su uso posterior. Si la población de células se va a congelar, se añade un crioprotector estándar (por ejemplo, DMSO, glicerol, medio de congelación de células Epilife® (Cascade Biologics)) a la población enriquecida de células antes de que se congele.

35 Además, la composición se puede administrar formulando una dosificación unitaria adecuada para su administración a un paciente por procedimientos convencionales en el campo farmacéutico, conteniendo la formulación una cantidad eficaz para una dosis única o para dosis fraccionadas. Para este propósito, una formulación para administración parenteral incluye preferentemente una formulación inyectable tal como una ampolla para inyección, una formulación para infusión tal como una bolsa de infusión, y una formulación para pulverización tal como un aerosol. La ampolla para inyección se puede mezclar con una solución inyectable tal como solución salina, glucosa,
40 manitol y solución de Ringer inmediatamente antes de la administración de la formulación. Además, la bolsa de infusión se puede texturizar con poli(cloruro de vinilo) o polietileno, por ejemplo, un producto de Baxter, Becton Dickinson, Medcep, National Hospital Products o Terumo.

45 La formulación farmacéutica puede comprender además uno o más vehículos inactivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, un conservante, un controlador analgésico, un solubilizante o un estabilizante para formulación inyectable, y una base, un excipiente, un lubricante o un conservante para formulación tópica, además del ingrediente activo.

50 La composición o formulación farmacéutica preparada de la presente invención se puede administrar de acuerdo con cualquier procedimiento convencional en la técnica conjuntamente con otras células madre usadas para trasplante y otros propósitos, o en forma de una mezcla con las mismas. Es preferente la incorporación del injerto o el trasplante directos a la lesión de un paciente que necesita tratamiento, o el trasplante o la inyección directos en la cavidad peritoneal, pero no se limita a los mismos. Además, son posibles tanto una administración no quirúrgica usando un catéter como una administración quirúrgica tal como inyección o trasplante después de una incisión, pero la administración no quirúrgica usando un catéter es más preferente. Además, la composición también se puede administrar por vía parenteral, por ejemplo, inyección intravenosa, que es uno de los procedimientos convencionales
55 para el trasplante de células madre del sistema hematopoyético, además de la administración directa a la lesión.

Las células madre se pueden administrar en una cantidad de $1,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^{10}$ células/kg (peso corporal), preferentemente de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^9$ células/kg (peso corporal) al día en una sola dosis o en dosis fraccionadas. Sin embargo, debe entenderse que la cantidad del ingrediente activo realmente administrada se debería determinar

en vista de diversos factores pertinentes, incluyendo la enfermedad que se va a tratar, la afección que se va a tratar, la intensidad del síntoma del paciente, la ruta de administración elegida, y el peso corporal, la edad y el sexo del paciente individual; y, por lo tanto, la dosis anterior no debería limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para su uso en un procedimiento para tratar trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias, que comprende la etapa de administrar la composición un sujeto con un trastorno inmunitario o enfermedad inflamatoria.

10 Todavía en otro aspecto, se pueden inhibir respuestas inmunitarias o se puede regular la inflamación mediante la administración de las células madre tratadas con un agonista de NOD2 de acuerdo con la presente invención y el cultivo de las mismas, y por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células madre que se generan mediante el cultivo de células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) con un agonista de NOD2 o un cultivo de las mismas, para su uso en un procedimiento para inhibir respuestas inmunitarias o respuestas inflamatorias de un sujeto, lo que implica la etapa de administrar al sujeto las células madre generadas añadiendo el agonista de NOD2 a células madre que expresan NOD2 o el cultivo de las mismas.

15 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa un mamífero, incluyendo ganado bovino, perros, cerdos, pollos, ovejas, caballos y humanos, pero no se limita a los mismos. A este respecto, el procedimiento para inhibir respuestas inmunitarias o respuestas inflamatorias se puede limitar a animales excluyendo a humanos. Preferentemente, la administración de las células madre cultivadas con la adición de un agonista de NOD2 o el cultivo de las mismas se puede realizar mediante inyección intraabdominal o intravenosa, inyección directa en la lesión o inyección en la cavidad sinovial.

20 El uso de la composición de la invención para la inhibición de respuestas inmunitarias o respuestas inflamatorias es para la prevención o el tratamiento de trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias.

25 Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un fármaco inmunosupresor o un fármaco antiinflamatorio, que implica la etapa de cultivar células madre añadiendo un agonista de NOD2 a células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2).

30 Como se usa en el presente documento, el término "fármaco inmunosupresor", como se describe anteriormente, significa un fármaco que comprende células madre generadas mediante el cultivo de células madre que expresan NOD2 con el agonista de NOD2 o el cultivo de las mismas, que puede tratar trastornos inmunitarios inhibiendo respuestas inmunitarias.

Como se usa en el presente documento, el término "fármaco antiinflamatorio", como se describe anteriormente, significa un fármaco que comprende células madre generadas mediante el cultivo de células madre que expresan NOD2 con el agonista de NOD2 o el cultivo de las mismas, que puede tratar enfermedades inflamatorias inhibiendo la inflamación.

35 Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar PGE₂ o TGF-β1, que implica la etapa de cultivar células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) en un medio tratado con agonista de NOD2, en el que se secreta prostaglandina E₂ (PGE₂) o factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) a partir de las células madre durante el cultivo.

40 En los modos de realización de la presente invención, se encontró que las células madre mesenquimales tratadas con MDP favorecen la secreción de PGE₂ y TGF-β1 que son conocidas por ser aplicables en diversos campos, en comparación con las células madre mesenquimales no tratadas con MDP y las células madre mesenquimales tratadas con otros agonistas de receptores (DAP, LPS, Pam3CSK4, etc.).

45 En la presente invención, para la recuperación de PGE₂ y TGF-β1, se recoge el medio de cultivo de las células madre y las células y los desechos se eliminan por centrifugación y filtración, dejando de este modo el sobrenadante solo.

Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un injerto que comprende las células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) y el agonista de NOD2.

50 Como se usa en el presente documento, el término "injerto" significa un material que se puede trasplantar a un humano o mamífero, que protege el tejido dañado desde el exterior o soporta una célula trasplantada o una sustancia terapéutica secretada para que permanezca en el mismo lugar. El injerto se usa como soporte para la ingeniería de tejidos e implica polímeros sintéticos biodegradables y materiales naturales que se usan en la técnica pero no se limitada a los mismos. Dado que el injerto de la presente invención comprende las células madre que expresan NOD2 y el agonista de NOD2, existe la ventaja de que no causa rechazo del trasplante ni respuestas inflamatorias. Por lo tanto, sin ningún agente inmunosupresor o fármaco antiinflamatorio adicional necesario para suprimir el rechazo del trasplante o las respuestas inflamatorias causadas por el trasplante de diversos injertos, el

injerto trasplantado se puede injertar de manera estable en el organismo sin que se produzca rechazo del trasplante o respuestas inflamatorias.

Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un injerto que se prepara cultivando las células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) en el injerto con un agonista de NOD2 y, a continuación, retirando las células madre del mismo.

Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar el injerto, que comprende la etapa de cultivar las células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) en el injerto con un agonista de NOD2.

Preferentemente, el procedimiento puede comprender además la etapa de retirar células madre después de la etapa de cultivo.

Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que comprende las células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) y el agonista de NOD2.

Preferentemente, el agonista de NOD se puede unir a NOD2 de las células madre en el compuesto. Más preferentemente, NOD2 se puede activar mediante la unión del agonista de NOD2 a NOD2 de las células madre en el compuesto. En última instancia, el compuesto se puede usar para tratamiento celular.

Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un cultivo que se genera cultivando células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) con un agonista de NOD2.

El cultivo puede comprender componentes tales como PGE_2 y/o $\text{TGF-}\beta 1$, que presentan los efectos profilácticos o terapéuticos sobre trastornos inmunitarios o enfermedades inflamatorias.

[Modo de la invención]

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

En los siguientes ejemplos, solo se ejemplifica el uso de células madre mesenquimales derivadas de sangre del cordón umbilical, pero es evidente para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior que las células madre mesenquimales y las células madre que tienen otros receptores de NOD2 se pueden tratar con agonistas de NOD2 para inducir un incremento extraordinario en el nivel de producción de PGE_2 para obtener efectos inmunosupresores o antiinflamatorios.

Además, se usó MDP como agonista de NOD2 en los presentes ejemplos. Sin embargo, como se muestra en los siguientes ejemplos, las células madre en las que los receptores de NOD2 están inhibidos no tienen actividad inmunorreguladora y, por tanto, será evidente para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior que, incluso cuando se usan otros agonistas de NOD2, se pueden lograr los efectos inmunosupresores o antiinflamatorios de la presente invención.

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical humano (a continuación en el presente documento denominadas hUCB-MS) y células mononucleares derivadas de sangre de cordón umbilical humana (a continuación en el presente documento denominadas hUCB-MNC)

Las muestras de sangre del cordón umbilical (UCB) se obtuvieron de la vena umbilical inmediatamente después del parto, con el consentimiento por escrito de la madre aprobado por el Hospital Boramae y el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Nacional de Seúl (CEI n.º 0603/001-002-07C1). Las muestras de UCB se mezclaron con la solución Hetasep (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) en una proporción de 5:1 y después se incubaron a temperatura ambiente para retirar los eritrocitos. Las células mononucleares se recogieron cuidadosamente añadiendo solución de Ficoll a la muestra y centrifugando la mezcla a 2500 rpm durante 20 minutos, separándola del sobrenadante. A continuación, las células sedimentadas se lavaron dos veces con PBS.

Las células mononucleares derivadas de hUCB (hUCB-MNC) se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.) complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %.

Las células madre mesenquimales derivadas de hUCB (hUCB-MS) se cultivaron a una densidad de $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ células/cm² en medios D (fórmula n.º 78-5470EF, Gibco BRL) que contiene EGM-2 SingleQuot y FBS al 10 % (Gibco BRL). Después de 3 días de cultivo, se retiraron las células no adheridas. Se observó que las células adheridas formaban colonias y crecían rápidamente, mostrando una morfología con una conformación en huso. Las células madre mesenquimales aisladas de cada una de las muestras de UCB se designaron como n.º 618 y n.º 620, respectivamente.

Ejemplo 2: Identificación de los receptores expresados en hUCB-MS

2-1: Identificación de la expresión de TLR2, TLR4, NOD1 y NOD2 funcionales en hUCB-MSC

Se realizó RT-PCR para determinar si el receptor de tipo *tol* 2 (TLR2) funcional, el receptor de tipo *tol* 4 (TLR4), las proteínas del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 1 (NOD1) y las proteínas del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 2 (NOD2) se expresan en hUCB-MSC.

- 5 Para ser específicos, se extrajo ARN total de hUCB-MSC usando un kit de extracción de ARN total Easy-spin (Intron Biotechnology, Seongnam, Corea). El ADNc se preparó a partir de 1 µg de ARN total usando retrotranscriptasa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y cebadores oligo (dT) (Invitrogen). Los conjuntos de cebadores usados son como sigue (F: directos, R: inversos).

TLR2 F (SEQ ID NO. 1): 5'-GATGCCTACTGGGTGGAGAA-3'

10 TLR2 R (SEQ ID NO. 2): 5'-CGCAGCTCTCAGATTTACCC-3'

TLR4 F (SEQ ID NO. 3): 5'-ACAGAAGCTGGTGGCTGTG-3'

TLR4 R (SEQ ID NO. 4): 5'-TCTTTAAATGCACCTGGTTGG-3'

NOD1 F (SEQ ID NO. 5): 5'-CCACTTCACAGCTGGAGACA-3'

NOD1 R (SEQ ID NO. 6): 5'-TGAGTGAAGCAGCATTTTG-3'

15 NOD2 F (SEQ ID NO. 7): 5'-GAATGTTGGGCACCTCAAGT-3'

NOD2 R (SEQ ID NO. 8): 5'-CAAGGAGCTTAGCCATGGAG-3'

Rip2 F (SEQ ID NO. 9): 5'-CCATTGAGATTTTCGCATCCT-3'

Rip2 R (SEQ ID NO. 10): 5'-ATGCGCCACTTTGATAAAC-3'

RPL13A F (SEQ ID NO. 11): 5'-CATCGTGGCTAACAGGTAC-3'

20 RPL13A R (SEQ ID NO. 12): 5'-GCACGACCTTGAGGGCAGCC-3'

La condición de PCR se estableció para tener una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min; 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min; una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,5 %, se visualizaron, y la imagen del gel se fotografió usando un sistema de documentación en gel.

- 25 Como se muestra en la FIG. 1a, en un grupo de control positivo que contiene una línea celular de leucemia monocítica humana, es decir, células THP-1, todos los receptores de interés se expresaron tanto en células THP-1 como en hUCB-MSC. TLR4 se expresó a un nivel más alto en hUCB-MSC que en células THP-1, mientras que los niveles de expresión génica de TLR2, NOD1 y NOD2 fueron mayores en las células THP-1. Entretanto, también se observó la expresión de Rip2 en hUCB-MSC.

30 **2-2: Análisis de la producción de citocinas en respuesta a la estimulación por agonistas de los receptores de interés**

Después de confirmar la expresión de los receptores de interés en hUCB-MSC en el ejemplo 2-1, se investigó la funcionalidad de los receptores monitorizando la producción de IL-8 después de la estimulación por agonistas. Para este experimento, se cultivaron hUCB-MSC a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en medio KSFM complementado con FBS al 2 % en una placa de 96 pocillos. Después de 24 horas de cultivo, las células se trataron con los siguientes agonistas correspondientes a cada uno de los receptores, es decir, Pam3CSK4 (agonista de TLR2, Pam3), LPS (agonista de TLR4), Tri-DAP (agonista de NOD1, T-DAP) y MDP (agonista de NOD2). A continuación, las muestras se incubaron durante 24 horas adicionales. El sobrenadante de cada cultivo se recogió, se centrifugó y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. A continuación, se midieron las concentraciones de IL-8 y PGE₂ usando un kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). Se compararon LPS ultrapuro (*E. coli* 0111: B4), Pam3CSK4 y Tri-DAP a Invivogen (San Diego, CA, EE. UU.). Se compró MDP [Ac-(6-0-estearoil)-muramyl-Ala-D-Glu-NH₂; dipéptido de muramilo] a Bachem (Bubendorf, Suiza). Se compró interferón-γ humano recombinante a Peprotech (Rockyhill, NJ, EE. UU.).

- 45 Como se muestra en las FIG. 1b y 1c, la estimulación por Pam3CSK4 (péptido triacilado; agonista de TLR2), LPS (lipopolisacárido, agonista de TLR4), Tri-DAP (ácido tridiaminopimérico, agonista de NOD1) y MDP (agonista de NOD2) dio lugar a un incremento de la producción de IL-8 en hUCB-MSC de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados sugieren que NOD1, NOD2, TLR2 y TLR4 se expresan y responden activamente a la estimulación por agonistas en hUCB-MSC.

50 **2-3: Análisis de los efectos de la estimulación de TLR y NLR por agonistas sobre la proliferación de hUCB-MSC (1)**

En base al hallazgo anterior según el cual un determinado tipo de MSC se ve afectado por la estimulación por TLR (Pavšner-Fischer *et al.*, Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions, Blood, 109:1422, 2007), el efecto de los agonistas en la proliferación de hUCB-MSC se investigó tratando las células con cada uno de los agonistas y cultivándolas durante 4 días.

Más en particular, se cultivaron células a una densidad de 2×10^3 células/pocillo en medio MSC complementado con FBS al 2 % en una placa de 96 pocillos. Después de 24 horas de cultivo, las células se trataron con Pam3CSK4 (agonista de TLR2), LPS (agonista de TLR4), Tri-DAP (agonista de NOD1) y MDP (agonista de NOD2) a una concentración de 10 µg/ml cada una y después se cultivaron durante 4 días más. La proliferación celular se monitorizó usando el kit de recuento celular 8 (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, EE. UU.). La diferencia en los resultados para cada tipo de grupos experimentales se representó por la desviación estándar ($\pm$ DE). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa MS Excel, y los valores de pruebas de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos (a continuación en el presente documento, el mismo).

Como se muestra en las FIG. 1d y 1e, no se encontró que ninguno de los agonistas tuviera un efecto sobre la proliferación de hUCB-MSC.

2-4: Análisis de los efectos de la estimulación de TLR y NLR por agonistas sobre la actividad inhibidora de hUCB-MSC contra la proliferación de MNC humanas (2)

En el presente experimento, los autores de la invención investigaron si los agonistas de TLR y NLR potencian la actividad inhibidora de hUCB-MSC contra la proliferación de MNC humanas.

En base al estudio que identificó la importancia de una interacción directa entre las MSC y los linfocitos en la inhibición de la proliferación de linfocitos por las MSC, los autores de la presente invención investigaron si MDP tiene un efecto sobre la capacidad inhibidora de las hUCB-MSC contra la proliferación de MNC en las condiciones en las que dos grupos células están en contacto entre sí.

Como se muestra en la FIG. 2, las hUCB-MSC (n.º 618) inhibieron drásticamente la proliferación de MNC humanas con interacción directa de célula a célula. Sin embargo, los agonistas de TLR (Pam3CSK4 y LPS) y los agonistas de NLR (Tri-DAP y MDP) no afectaron a la actividad inhibidora de hUCB-MSC contra la proliferación de MNC en la misma condición (FIG. 2).

Ejemplo 3: Identificación de la actividad inmunosupresora potenciada de hUCB-MSC por MDP a través de la vía dependiente de NOD2-Rip2 (1)

3-1: Determinación del efecto del factor secretor generado a partir de hUCB-MSC tratadas con MDP sobre la proliferación de MNC

También se sabe que los factores solubles median la inmunosupresión por MSC. Por tanto, los autores de la presente invención examinaron si los factores secretores generados por UCB-MSC tienen un efecto sobre la proliferación de MNC humanas. Se preparó medio de cultivo (CM) y se cocultivaron hUCB-MSC con el agonista durante 24 horas. Después del lavado, las células se cultivaron en medio fresco durante 4 días adicionales. A continuación, se prepararon un grupo de control que contenía medio de cultivo (CM) y una muestra de hUCB-MSC tratadas con agonista (n.º 618), y las MNC se cultivaron en CM que contenía hUCB-MSC durante 3 días.

Los resultados experimentales demostraron que la proliferación de MNC estaba ligeramente inhibida en el grupo de control que contenía medio de cultivo de hUCB-MSC (UCM) (FIG. 3a). Sorprendentemente, cuando las MNC se cultivaron en UCM tratado previamente con MDP (MDP-UCM), la proliferación de MNC se inhibió a un nivel mayor, pero este efecto estuvo ausente cuando se usaron otros agonistas para tratar el UCM (Pam3CSK4, LPS, Tri-DAP) (FIG. 3a). Los resultados similares se observaron cuando se usó UCM preparado a partir de otra muestra de hUCB-MSC (n.º 620) (FIG. 3b). Además, la proliferación de esplenocitos de ratón xenogénicos también se inhibió cuando se cultivaron en presencia de UCM, y este efecto inhibidor se vio potenciado por la estimulación con MDP (FIG. 3c). Estos resultados sugieren que los factores secretores de las hUCB-MSC tratadas con MDP desempeñan un papel importante en la inmunosupresión de MNC.

3-2: Identificación de la actividad inmunosupresora potenciada de hUCB-MSC mediante tratamiento con MDP

Para determinar si MDP potencia la actividad inmunosupresora de hUCB-MSC, se realizó el siguiente experimento. Se preparó un grupo de control que contenía medio de cultivo (CM) de hUCB-MSC y se recogieron las hUCB-MSC tratadas con el agonista el 5.º día de cultivo. A continuación, se cocultivó MNC en CM de hUCB-MSC durante 3 días más y, después del cultivo, se controló el nivel de proliferación de MNC.

Como se muestra en la FIG. 4A, la proliferación de MNC se inhibió significativamente en el sobrenadante de células madre mesenquimales que se trataron con el agonista MDP (UCB-MSC n.º 618 + MDP) en comparación con el sobrenadante de UCB-MSC no tratado (UCB-MSC n.º 618).

Por otra parte, la tasa de inhibición de MNC fue similar entre los sobrenadantes de células madre mesenquimales que se trataron con otros agonistas (LPS, etc.) (UCB-MSC n.º 618 + Pam3; UCB-MSC n.º 618 + LPS; UCB-MSC n.º 618 + T-DAP) y el sobrenadante de UCB-MSC no tratado (UCB-MSC n.º 618). Es decir, en comparación con el grupo de control negativo no tratado, la proliferación del grupo de MNC solo se inhibió ligeramente cuando se trató con otro agonista.

Estos resultados sugieren que la proliferación de MNC está notablemente inhibida por factores solubles secretados por las células madre mesenquimales tratadas con MDP.

3-3: Investigación de la correlación entre NOD2, Rip2 y MDP en la inhibición de MNC usando ARNip de NOD2 y Rip2

Adicionalmente, para investigar la correlación entre NOD2, Rip2 y MDP en la inhibición de MNC, se realizó el siguiente experimento usando ARNip de NOD2 y Rip2 y un grupo de control (siCTL). Cuando la densidad celular alcanzó un 60 %, los ARNip se transfectaron en las células. El siRIPK2 (M-003602-02) que es el ARNip de la serina-treonina cinasa 2 que interactúa con el receptor (RIPK2 o proteína cinasa 2 que interactúa con el receptor (Rip2), que es el adaptador de NOD1 y NOD2 y el tipo de cinasa llamada RICK o CARDIAK (Bertin *et al*, 1999; Inohara *et al*, 1999; Ogura *et al*, 2001b)), siNOD2 (J-011388-07) que es el ARNip de NOD2 y un control no dirigido (siControl n.º 1, D-001810-01) se compararon a Dharmacon (Chicago, IL, EE. UU.). Se usó DharmaFECT1 (Dharmacon) como reactivo de transfección y el ARNip se transfectó a una concentración de 100 nmol/l. Aproximadamente 48 horas después, el medio se reemplazó con el nuevo y las células se trataron con 10 µg/ml de MDP (agonista de NOD2) durante 24 horas, excepto por un control negativo (solo medio de cultivo de MNC) y un control positivo (medio al que se añadió sobrenadante de UCB-MSC (UMS) sin agonista).

Es decir, se prepararon un medio donde se cultivó MNC solo (i) y un medio al que se añadió sobrenadante de UCB-MSC (UMS) sin agonista (ii) como grupos de control, y se prepararon un medio tratado con MDP y UMS (iii), un medio tratado con MDP, UMS y ARNip de control (siCTL) (iv), un medio tratado con MDP, UMS y siNOD2 (v), y un medio tratado con MDP, UMS y siRip2 (vi). Después de esto, se midió la proliferación de MNC por densidad óptica en la longitud de onda de 450 nm.

Como se muestra en la FIG. 4B, la tasa de inhibición de la proliferación de MNC fue similar en el medio (iv) y en el medio (iii), mientras que la tasa de inhibición de la proliferación de MNC en los medios (v) y (vi) fue similar a la del medio (ii). En otras palabras, los ARNip de NOD2 y Rip2 podían contrarrestar el efecto de MDP al potenciar la inhibición de la proliferación de MNC, pero el ARNip de control no mostró el efecto anterior. Estos resultados indican que NOD2 y Rip2 regulan positivamente las respuestas inmunitarias inducidas por MDP. Por lo tanto, se sugiere que NOD2 y Rip2 se requieren para la inhibición de UCB-MNC regulada por MDP.

Ejemplo 4: Identificación de la actividad inmunosupresora potenciada de hUCB-MSC por MDP a través de la vía dependiente de NOD2-Rip2 (2)

Para verificar los resultados experimentales en el ejemplo 3, la línea de células madre mesenquimales n.º 620 obtenida del ejemplo 1 se usó para realizar el experimento siguiendo el mismo procedimiento descrito en los ejemplos 3-2 y 3-3.

Como se muestra en la FIG. 5A, en el agonista del sobrenadante de células madre mesenquimales tratadas con MDP (UCB-MSC n.º 618 + MDP) la proliferación de MNC se inhibió extraordinariamente en comparación con el sobrenadante de UCB-MSC cultivado con otros agonistas de receptores o cultivado sin ningún agonista (UCB-MSC n.º 620), que son resultados similares a los observados en el ejemplo 3-1. Como se muestra en la FIG. 5B, el efecto de MDP en la potenciación de la inhibición de MNC se contrarrestó por los ARNip de NOD2 y Rip2, pero no por el ARNip de control, lo que también es similar a los resultados del ejemplo 3-3. Estos resultados indican que MDP potencia la actividad inhibidora de las células madre mesenquimales contra la proliferación de MNC por medio de la vía dependiente de NOD2-Rip2.

Conjuntamente con los resultados del ejemplo 3, los resultados anteriores sugieren que las células madre tratadas con MDP de la presente invención y el cultivo de las mismas demuestran potentes efectos inmunosupresores y, por tanto, se pueden usar como una composición inmunorreguladora para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn o trastornos inmunitarios tales como la dermatitis atópica.

Ejemplo 5: Análisis de la correlación entre la producción de PGE₂ inducida por MDP y la inhibición de MNC por UMS (sobrenadante de UCB-MSC; UMS)

5-1: Incremento de la secreción de PG₂ desde MSC por estimulación de MDP

Las hUCB-MSC (2 × 10⁴ células/pocillo) se cultivaron en medio de MSC complementado con FBS al 2 % en una placa de 96 pocillos. Después de 24 h de cultivo, las células se trataron con 1 µg/ml de Pam3CSK4 (agonista de TLR2), 1 µg/ml de LPS (agonista de TLR4), 10 µg/ml de Tri-DAP (agonista de NOD1) o 10 µg/ml de MDP (agonista de NOD2) y se cultivaron durante 24 horas adicionales; a continuación, se recogió el sobrenadante de cultivo de

cada muestra. Después de la centrifugación, los sobrenadantes de cultivo se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm. A continuación, se midió la concentración de PGE₂ usando un kit de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante.

- 5 Como se muestra en la FIG. 6a, el tratamiento de hUCB-MSC con el agonista de NOD2, MDP, potenció significativamente la secreción de PGE₂, en comparación con las tratadas con los agonistas de otros receptores.

5-2: Análisis de la correlación entre la expresión de COX-2 y el tratamiento con MDP

- 10 Se trataron células con 1 µg/ml de Pam3CSK4 (agonista de TLR2), 1 µg/ml de LPS (agonista de TLR4), 10 µg/ml de Tri-DAP (agonista de NOD1) o 10 µg/ml de MDP (agonista de NOD2) y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células recogidas se lisaron usando un tampón Nonidet-P40 al 1 % que contenía ditiotreitolo 2 mM y cóctel de proteasas (Roche, EE. UU.). Los lisados celulares se resolvieron por SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, se realizó inmunotinción usando anticuerpos primarios (COX-2, GAPDH (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.)). Después de esto, se realizó inmunotinción usando anticuerpos secundarios y se detectaron proteínas usando un reactivo de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Intron Biotechnology).

- 15 Como se muestra en la FIG. 6b, las hUCB-MSC tratadas con el agonista NOD2, MDP, mostraron una expresión potenciada de COX-2, en comparación con las tratadas con los agonistas de otros receptores.

5-3: Análisis de la correlación entre la expresión de COX-2 y la actividad de NOD2 y Rip2 estimulada por tratamiento con MDP

- 20 Para investigar una correlación entre la expresión de COX-2 y la función de NOD2 y Rip2, en primer lugar se trataron células con MDP y luego se trataron con siNOD2 y siRip2. A continuación se examinó el nivel de expresión de COX-2. El nivel de expresión de la proteína se midió usando el procedimiento descrito en el ejemplo 5-2, y el procedimiento para el tratamiento del ARNip fue el mismo que el descrito en el ejemplo 3-3.

Como se muestra en la FIG. 6c, el nivel de expresión de COX-2 se redujo por inhibición de NOD2 y Rip2. Este resultado sugiere que la expresión de COX-2 depende de la actividad de NOD2 y Rip2.

25 5-4: Investigación de los efectos de NOD2, Rip2 y COX-2 en la expresión de PGE₂

- Para determinar el tiempo de sostenimiento de los efectos del tratamiento con MDP, la cantidad de PEG₂ producida se monitorizó después de 1 día de tratamiento de hUCB-MSC con MDP. En este experimento, el MDP se retiró después de 1 día de cultivo retirando el medio de cultivo y lavando las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 5 veces. A continuación se midió la cantidad de PEG₂ producida. Entretanto, se trataron células con MDP mediante el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 5-1, y se midió la concentración de PGE₂. También, para determinar los efectos de NOD2, Rip2 y COX-2 en la expresión de PGE₂, las células se trataron con cada uno del grupo de control del ejemplo 3-3, es decir, ARNip (siCTL), siNOD2, siRip2 y el inhibidor de COX-2 llamado indometacina (Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.)).

- 35 Como se muestra en la FIG. 6d, incluso cuando se retiró el MDP después de 1 día de tratamiento, el nivel de producción de PGE₂ en las hUCB-MSC estimuladas con MDP fue mayor que en el grupo de control en el 5.º día de cultivo. Además, la producción de PGE₂ potenciada con MDP se inhibió mediante transfección con los ARNip de NOD2 y Rip2 o mediante inhibición de la COX-2 por adición de indometacina. Estos resultados indican que NOD2, Rip2 y COX-2 tienen un papel importante en la producción de PGE₂ inducida por MDP en hUCB-MSC.

5-5: Investigación del papel de la PGE₂ en la inhibición de MNC por hUCB-MSC

- 40 Para investigar el papel de la PGE₂ en la inhibición de MNC por hUCB-MSC, se examinó la proliferación de MNC cuando se trató con el sobrenadante de MSC, el sobrenadante de MSC tratado con MDP y el sobrenadante de MSC tratado con MDP e indometacina (inhibidor de la COX-2). El experimento se realizó por el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 3.

- 45 Como se muestra en la FIG. 6e, el tratamiento de las células con el medio de cultivo de MSC tratado con MDP inhibió significativamente la proliferación de MNC, pero el tratamiento conjunto con indometacina (Indo) mostró una tasa de proliferación de MNC similar a la del grupo de control negativo. Estos resultados indican que la PGE₂ tiene un papel importante en la inhibición de MNC por hUCB-MSC, lo que es consecuente con el resultado del ejemplo 5-4.

- 50 Estos resultados sugieren que las células madre tratadas con MDP de la presente invención y el cultivo de las mismas producen PGE₂, que se puede usar como una composición inmunorreguladora. Como se ha mencionado anteriormente, puesto que es conocido que la PGE₂ inhibe la secreción de citocinas tales como la interleucina-1 beta y el TNF alfa, las células madre tratadas con MDP de la presente invención y el cultivo de las mismas también se pueden usar como una composición antiinflamatoria.

5-6: Investigación del efecto de NOD2 y COX-2 en la producción inducida por MDP de la citocina antiinflamatoria interleucina-10 (IL-10)

Para determinar el nivel de producción de IL-10, se cultivaron hUCB-MSC (1×10^5 células/pocillo) en medio de MSC complementado con FBS al 2 % en una placa de 24 pocillos. Aproximadamente 24 horas después, las células se trataron con siNOD2 o indometacina (Indo), y se cultivaron posteriormente durante 24 horas. A continuación, las células se lavaron cinco veces y se añadió RPMI fresco. Después de 5 días de cultivo, se obtuvo el sobrenadante de UCB-MSC (UMS). Se cultivaron MNC (1×10^6 /pocillo) con UMS y ConA (Sigma (St. Louis MO, EE. UU.)). Después de 3 días de cultivo, se recogió el sobrenadante celular, se centrifugó y se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m. A continuación, se midió la concentración de IL-10 usando un kit de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.).

Como se muestra en la FIG. 6f, la producción de la citocina antiinflamatoria, IL-10, se incrementó extraordinariamente por el tratamiento con MDP. Sin embargo, la producción de IL-10 se inhibió por inhibición del tratamiento con NOD2 o indometacina. Estos resultados sugieren que el tratamiento con MDP incrementa la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 actuando sobre la vía NOD2-Rip2, que es la misma vía implicada en la producción de PGE₂.

En otras palabras, las células madre tratadas con MDP de la presente invención producen la citocina antiinflamatoria IL-10 con un alto rendimiento y, por tanto, las células madre tratadas con MDP o el cultivo de las mismas se pueden usar como una composición antiinflamatoria, en particular, para el tratamiento de la artritis o similares.

Ejemplo 6: Análisis de la correlación entre la inhibición de MNC y la producción de PGE₂ y TGF- β inducida por MDP en hUCB-MSC

6-1: Investigación del efecto de MDP en la producción de PGE₂ y TGF- β 1 en MSC y la expresión de COX-2

Factores solubles tales como el factor de crecimiento de hepatocitos, el TGF- β , la indoleamina 2,3 dioxigenasa-1 (IDO-1), el óxido nítrico (NO) y la prostaglandina E₂ (PGE₂) son potentes candidatos para regular la inmunosupresión por MSC. Para determinar si los agonistas de TLR y NLR inducen la producción de factores solubles, incluyendo NO, PGE₂ y TGF- β 1, en hUCB-MSC, las células se cultivaron con Pam3CSK4, LPS, Tri-DAP y MDP durante 24 horas, y se recogieron los sobrenadantes de cultivo. La secreción de los factores solubles se monitorizó mediante el procedimiento descrito en los ejemplos 5-1 y 5-2.

Los resultados demuestran que el tratamiento único con TLR y agonistas NOD no indujo la producción de NO en hUCB-MSC, aunque LPS indujo la producción de NO en macrófagos (FIG. 7a). De forma interesante, la producción de PGE₂ y TGF- β 1 se potenció solo por la adición de MDP en hUCB-MSC pero no por otros agonistas (FIG. 7b y 7c). Además, la expresión de COX-2, la enzima que produce PGE₂, se incrementó en hUCB-MSC después de 24 horas de tratamiento con MDP (FIG. 7d).

6-2: Investigación del efecto de PGE₂ y TGF- β en la proliferación de MNC

Para investigar el efecto de PGE₂ sobre la proliferación de células mononucleares (MNC), se cultivaron hMNC y esplenocitos de ratón con diversas concentraciones de PGE₂. El experimento se realizó por el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 5-5.

Los resultados mostraron que la proliferación de hMNC y esplenocitos de ratón se inhibió extraordinariamente cuando se cultivaron con PGE₂ a una concentración de 10 ng/ml o más alta (FIG. 7e y 7f).

Después, los autores de la presente invención examinaron si la inhibición de hMNC por UCM pretratado con MDP se atribuye a PGE₂ y TGF- β 1. El experimento se realizó por el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 5-5.

Los resultados mostraron que el efecto inhibitorio de MDP-UCM sobre la proliferación de hMNC se contrarrestó mediante un inhibidor de la COX, indometacina (FIG. 7g). Además, cuando se trata conjuntamente con el anticuerpo neutralizante contra TGF- β 1, MDP-UCM no inhibió la proliferación de hMNC (FIG. 7h). Estos resultados sugieren que MDP induce la producción de PGE₂ y TGF- β 1 en hUCB-MSC, que media la actividad inmunosupresora de hUCB-MSC.

Ejemplo 7: Análisis de la correlación entre la expresión de COX-2 inducida por MDP y la producción de PGE₂ y TGF- β 1 en hUCB-MSC y la actividad de NOD2 y Rip2

NOD2 y Rip2 son los factores importantes en las respuestas inmunitarias inducidas por MDP. Por lo tanto, los autores de la presente invención examinaron si NOD2 y Rip2 se requieren en la expresión de COX-2 inducida por MDP y la producción de PGE₂ y TGF- β 1 en hUCB-MSC. El experimento se realizó por el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 5-4.

Los resultados demostraron que los ARNip inhiben extraordinariamente expresión génica y proteica tanto de NOD2 como de Rip2 en hUCB-MSC (FIG. 8). La regulación por disminución de NOD2 y Rip2 por el ARNip inhibió aún más la expresión de COX-2 inducida por MDP en hUCB-MSC (FIG. 9a). El tratamiento con ARNip de NOD2 y Rip2 redujo las producciones de PGE₂ y TGF- β 1 en MDP-UCM, en comparación con el ARNip de control (FIG. 9b y 9c).

Además, el experimento con MLR mostró que la regulación por disminución de NOD2 y Rip2 restauraba el efecto inhibidor incrementado de MDP-UCM contra la proliferación de hMNC (FIG. 9d). Estos resultados sugieren que MDP induce el incremento de la producción de PGE₂ y TGF-β1 en hUCB-MSC por medio de la vía NOD2-Rip2, lo que indica una potenciación de la capacidad inmunosupresora de UCM-MSC.

5 **Ejemplo 8: Análisis del efecto de MDP-UCM en la producción de IL-10 y la población de linfocitos T reguladores en hMNC**

8-1: Investigación del efecto de MDP-UCM en la producción de IL-10 en hMNC

Es conocido que la PGE₂ producida en células estromales de médula ósea desempeña un papel importante en la producción de IL-10 por los macrófagos del huésped (Nemeth, K., A. *et al.*, Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. Nat Med 15:42-49, 2009). MDP induce la producción de PGE₂ en hUCB-MSC y, por tanto, los autores de la presente invención examinaron si la producción de IL-10 en hMNC se incrementa en presencia de MDP-UCM. El experimento se realizó por el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 5-6.

Los resultados demostraron que UCB-MSC solas no produjeron IL-10, independientemente de la estimulación con MDP (datos no mostrados). Aunque las hMNC solas no produjeron IL-10, la producción de IL-10 se reguló por incremento en presencia de UCM (FIG. 10a). Además, la producción de IL-10 por hMNC se incrementó más en presencia de MDP-UCM que en presencia de UCM no tratado (FIG. 10a). Sin embargo, el incremento de la producción de IL-10 en hMNC por MDP-UCM se invirtió mediante un tratamiento único con indometacina o anticuerpo neutralizante contra el TGF-β1, y el efecto anterior se aceleró tratando la célula con una combinación de indometacina y anticuerpo neutralizante contra el TGF-β1 (FIG. 10a). Cuando la actividad de NOD2 se inhibió por el ARNip en hUCB-MSC, la producción de IL-10 en hMNC no se incrementó siquiera en presencia de MDP-UCM, en comparación con el UCM no tratado (FIG. 10a).

8-2: Investigación del efecto de MDP-UCM en la población de linfocitos T en hMNC

Después, los autores de la presente invención investigaron el efecto de UCM en la diferenciación de hMNC en linfocitos T reguladores (Treg). Para esto, se cultivaron hMNC con UCM durante 5 días, y se determinó la coexpresión de CD4, CD25 y Foxp3 en hMNC por citometría de flujo.

Los resultados demostraron que la población de Treg en hMNC se incrementó en un 50 % o más en presencia de UCM, y el incremento en la población de Treg fue mayor en hMNC cultivadas con MDP-UCM que en los cultivados con UCM no tratado (FIG. 10b). De forma similar, el incremento en la población de Treg por MDP-UCM se revirtió mediante el tratamiento con indometacina y anticuerpo neutralizante contra TGF-β1 o mediante la inhibición de NOD2 con ARNip (FIG. 10b). Estos resultados indican que la producción de PGE₂ y TGF-β1 inducida por MDP en UCM es importante en la producción de IL-10 por hMNC y la diferenciación de hMNC en Treg.

Ejemplo 9: Determinación de la expresión de NOD2 en otros tipos de células madre.

Para determinar si las respuestas inmunitarias e inflamatorias se pueden regular por la interacción entre el receptor NOD2 y el agonista para otros tipos de células madre mediante la adición del agonista de la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2), se examinaron las expresiones de NOD2 en células madre derivadas de tejido adiposo (AD-MSC) y las células madre epiteliales amnióticas (AEC) usando una línea celular de leucemia monocítica humana, es decir, THP-1, como grupo de control positivo. Se realizó RT-PCR en las mismas condiciones descritas en el ejemplo 2. Se obtuvieron células madre epiteliales amnióticas humanas después del parto, con el consentimiento informado por escrito del paciente aprobado por el Hospital Guro (el CEI de la Universidad Nacional de Seúl (CEI n.º 0611/001-002), y se aislaron células madre epiteliales amnióticas de tejido del amnios. Las células madre derivadas de tejido adiposo se obtuvieron, con el consentimiento informado por escrito del paciente aprobado por el Hospital Boramae (SNU CEI n.º 0600/001-001), y las células madre derivadas de tejido adiposo se aislaron y se cultivaron.

Como se muestra en la FIG. 11, la expresión de NOD2 fue mayor en las células madre derivadas de tejido adiposo y en las células madre epiteliales amnióticas que en el control positivo, es decir, las células THP-1. En otras palabras, se observó expresión del receptor NOD2 en otros tipos de células madre, así como en células madre mesenquimales, lo que sugiere que también se pueden usar otros tipos de células madre para regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias por medio de la interacción receptor NOD2-agonista.

50 **Ejemplo 10: Investigación de los efectos terapéuticos de las células madre que expresan NOD2 usando un modelo animal de colitis**

10-1: Investigación de los efectos terapéuticos de las células madre que expresan NOD2 usando un modelo animal de colitis

Los autores de la presente invención examinaron si el tratamiento con hUCB-MSC es eficaz para el tratamiento del ratón con colitis y si la estimulación con MDP favorece efectos protectores de hUCB-MSC en la colitis inducida por

DSS. Para la administración de hUCB-MSC, se cultivaron células en presencia o ausencia de MDP durante 24 horas y, a continuación, se lavaron con PBS para retirar el MDP. Para ser específicos, para investigar los efectos terapéuticos de las células madre tratadas con MDP en modelos animales de colitis, se indujo colitis en ratones (Central Lab. Animal Inc., C57BL/6N) por tratamiento con DSS al 3 % (dextrano sulfato sódico). Después de 2 días de tratamiento, se inyectaron intraperitonealmente hUCB-MSC tratadas con MDP, hUCB-MSC no tratadas y hUCB-MSC con inhibición por NOD2 mediante tratamiento con ARNip. En este momento, se administró DSS al 3 % en agua potable durante 7 días.

Los resultados demostraron que la inyección intraperitoneal de hUCB-MSC no tratadas alivió la reducción de peso corporal y también mejoró la tasa de supervivencia del ratón con colitis inducida por DSS, en comparación con el ratón tratado con PBS o fibroblastos (FIG. 12a y 12b). Además, la inyección de hUCB-MSC estimuladas por MDP (MDP-MSC) dio lugar a la recuperación del peso corporal en un 90 % del grupo de control que estaba libre de colitis, y ninguno de los ratones murió a causa de la colitis (FIG. 12a y 12Bb). El índice de actividad de la enfermedad se redujo ligeramente por la inyección de hUCB-MSC, pero difirió significativamente del índice del grupo tratado con PBS o fibroblastos. Por otra parte, la inyección de MDP-MSC redujo significativamente el índice de actividad de la enfermedad (FIG. 12c). Cuando NOD2 se reguló por disminución por ARNip, las MDP-MSC no aliviaron la reducción de peso corporal, ni incrementaron la tasa de supervivencia y el índice de actividad de la enfermedad.

Los ratones se sacrificaron el día 14 para medirles la longitud del colon, y se realizó un análisis histopatológico. Los resultados del examen macroscópico mostraron que la reducción de la longitud del colon por la inflamación se alivió ligeramente con el tratamiento con hUCB-MSC, que se potenció mediante la adición de MDP (FIG. 12d y 12e). Los resultados del estudio histopatológico mostraron que se observaron erosiones mucosas en el colon, lesiones graves de edema e infiltración de células inflamatorias en la lámina propia y la capa submucosa en ratones tratados con DSS (FIG. 12f). Las erosiones mucosas de la capa submucosa y el edema confinado a una parte del colon se observaron en ratones tratados con hUCB-MSC (FIG. 12f). Sin embargo, los daños patológicos en el colon se trataron completamente y las puntuaciones histopatológicas se redujeron extraordinariamente con el tratamiento con MDP-MSC (FIG. 12f y 12g). Como se esperaba, la inyección de hUCB-MSC tratadas con siNOD2 no alivió la intensidad patológica ni redujo las puntuaciones histopatológicas en la colitis inducida por DSS (FIG. 12f y 12g). Estos resultados sugieren que el MDP potencia el efecto protector de hUCB-MSC en la colitis, lo que indica un papel crítico de NOD2.

10-2: Investigación del efecto de MDP en la producción de citocinas inflamatorias y poblaciones de linfocitos T en el modelo animal de colitis

Además, los autores de la presente invención investigaron el efecto de MDP en la regulación de la producción de citocinas inflamatorias inducida por hUCB-MSC en ratones con colitis.

Los resultados mostraron que las hUCB-MSC redujeron las producciones de IL-6 e IFN- γ e incrementaron la producción de IL-10 en el colon de ratón tratado con DSS (FIG. 13a). Además, MDP-MSC bloqueó casi por completo las producciones de IL-6 e IFN- γ y favoreció la producción de IL-10 en el colon de ratón tratado con DSS, pero este efecto fue contrarrestado por la regulación por disminución de NOD2 (FIG. 13a).

Para determinar si las hUCB-MSC tienen un efecto sobre las poblaciones de Treg en el colon de ratón, se monitorizó la infiltración de células Foxp3 + en el colon con un microscopio de fluorescencia.

Los resultados demostraron que la localización de las células Foxp3 + en el colon fue mayor en los ratones con colitis tratados con hUCB-MSC que en los ratones con colitis tratados con PBS (FIG. 13b). Además, la localización de las células Foxp3 + en el colon se incrementó aún más mediante el tratamiento con MDP-MSC, lo que se contrarrestó mediante la inhibición de NOD2 en hUCB-MSC (FIG. 13b). La expresión de Foxp3 en el colon se cuantificó por inmunoelectrotransferencia. La expresión de la proteína Foxp3 fue mayor en ratones tratados con hUCB-MSC que en ratones con colitis tratados con PBS (FIG. 13c y 13d). De forma similar, el nivel de Foxp3 en el colon se incrementó aún más por el tratamiento con MDP-MSC, los que también se contrarrestó mediante la reducción de NOD2 (FIG. 13c y 13d).

10-3: Análisis de infiltración de células inflamatorias en un modelo animal de colitis

Finalmente, los autores de la presente invención examinaron la infiltración de células inflamatorias en el colon de ratón. Se monitorizó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) para determinar la infiltración neutrofílica.

Los resultados demostraron que las hUCB-MSC inhibían la actividad de la MPO y la infiltración de células CD4+ y CD11b+ en el colon de ratones tratados con DSS (FIG. 13e). Del mismo modo, las MDP-MSC inhibían la actividad de la MPO y la infiltración de células CD4+ y CD11b+ en mayor medida, lo que se contrarrestó mediante la inhibición de NOD2 por ARNip (FIG. 13e).

Estos resultados respaldan que las hUCB-MSC inducen antiinflamación al tiempo que inhiben una respuesta proinflamatoria, lo que se puede potenciar mediante el tratamiento con MDP de una manera dependiente de NOD2.

Además, estos resultados sugieren que las células madre tratadas con MDP de la presente invención o el cultivo de las mismas se pueden usar en la práctica para el tratamiento de la inflamación en modelos animales que tienen colitis.

Ejemplo 11: Investigación del efecto terapéutico de hUCB-MSC tratadas con MDP en un modelo animal inducido por dermatitis atópica

11-1: Inducción de dermatitis atópica y tratamiento con inyección de hUCB-MSC

Un día antes de realizar el presente experimento, se rasuró el pelo del lomo de un ratón hembra NC/Nga de 8 semanas de edad, y el resto del pelo en la piel del lomo se eliminó por completo aplicando una crema de depilación. A continuación, al día siguiente, se aplicaron 150 µl de solución acuosa de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 4 % a la piel rasurada para eliminar la grasa de la piel. La piel se secó completamente durante aproximadamente 3 a 4 horas y a continuación se aplicó uniformemente 100 mg de extracto de *Dermatophagoides farina* (Df) en el lomo y las orejas. La aplicación de extracto de Df se realizó dos veces por semana durante 3 semanas durante un total de 6 veces (la aplicación de una solución acuosa de SDS es esencial para cada aplicación de extracto de Df) para inducir la dermatitis atópica. A continuación, se suspendieron 2×10^6 hUCB-MSC preparadas en el ejemplo 1 en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se inyectaron por vía intravenosa o subcutánea al ratón NC/Nga una vez a la semana durante 3 semanas durante la aplicación de Df y 1 semana después de la inducción de dermatitis atópica, es decir, un total de 4 veces durante 4 semanas. Las hUCB-MSC tratadas con MDP se prepararon cultivando hUCB-MSC en un medio complementado con 10 µl/ml de MDP durante 24 horas y, a continuación, lavando las células con PBS 5 veces antes de la inyección.

11-2: Investigación del efecto terapéutico de hUCB-MSC tratadas con MDP mediante examen macroscópico de la lesión

Para investigar el efecto terapéutico de las hUCB-MSC tratadas con MDP en la dermatitis atópica, se realizó una autopsia después de 24 horas de la 4.^a inyección de hUCB-MSC, y se evaluó la intensidad de la lesión mediante examen macroscópico. El examen macroscópico se realizó de acuerdo con sequedad, excoriación, eritema y edema dando una puntuación de 0 a 3, y la puntuación total se usó para la evaluación.

Como se muestra en la FIG. 14, la inyección intravenosa de hUCB-MSC en el grupo inducido por dermatitis atópica indujo un ligero alivio de las lesiones, no teniendo una gran diferencia con el grupo inducido de dermatitis atópica no tratado. Por el contrario, se observó un alivio significativo de las lesiones en los grupos que recibieron una inyección intravenosa o subcutánea de hUCB-MSC tratadas con MDP.

Estos resultados sugieren que las células madre tratadas con MDP de la presente invención o el cultivo de las mismas se pueden usar para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias como la dermatitis atópica.

11-3: Investigación del efecto terapéutico de hUCB-MSC tratadas con MDP mediante análisis de IgE sérica

Para investigar el efecto terapéutico de las hUCB-MSC tratadas con MDP en la dermatitis atópica, se realizó una autopsia después de 24 horas de la 4.^a inyección de hUCB-MSC, y se midió el nivel de IgE en el suero recogido de la autopsia usando un conjunto para ratón Opt EIA (BD Bioscience, Mississauga, Canadá).

Como se muestra en la FIG. 15, se observó una inhibición significativa de la IgE en los grupos que recibieron inyecciones intravenosas de hUCB-MSC o hUCB-MSC tratadas con MDP, mientras que se observó una tasa de inhibición más alta en el grupo que recibió una inyección intravenosa de hUCB-MSC tratadas con MDP. Sin embargo, la inyección subcutánea de hUCB-MSC tratadas con MDP no indujo una gran diferencia con respecto al grupo inducido de dermatitis atópica.

11-4: Investigación del efecto terapéutico de hUCB-MSC tratadas con MDP mediante análisis de IgG1 sérica

Para investigar el efecto terapéutico de las hUCB-MSC tratadas con MDP en la dermatitis atópica, se realizó una autopsia después de 24 horas de la 4.^a inyección de hUCB-MSC, y el nivel de IgG1, que es un índice representativo de una respuesta inmunitaria de Th2 de dermatitis atópica se midió en el suero recogido de la autopsia usando un kit de ELISA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, EE. UU.).

Como se muestra en la FIG. 16, se observó una inhibición significativa de IgG1 en todos los grupos tratados con hUCB-MSC.

11-5: Investigación del efecto terapéutico de hUCB-MSC tratadas con MDP mediante examen histopatológico de tejido cutáneo

Para investigar el efecto terapéutico de las hUCB-MSC tratadas con MDP en la dermatitis atópica, se realizó una autopsia después de 24 horas de la 4.^a inyección de hUCB-MSC, y los tejidos cutáneos se recogieron y se fijaron con una solución de formol neutra al 10 %. A continuación, se procesaron los cortes de tejido, se fijaron en parafina y se cortaron en secciones de 3 a 4 µm. A continuación, se realizó la tinción con hematoxilina y eosina (H+E) para el estudio histopatológico.

Como se muestra en la FIG. 17, se observó hiperplasia epidérmica e infiltración excesiva de células inflamatorias en el grupo inducido de dermatitis atópica. Se observaron reducciones en el espesor epidérmico e infiltración de células inflamatorias en la inyección intravenosa de hUCB-MSC, y en la inyección intravenosa o subcutánea de hUCB-MSC tratadas con MDP. La mayor tasa de alivio de las lesiones se observó en la inyección subcutánea de hUCB-MSC tratadas con MDP, la inyección intravenosa de hUCB-MSC tratadas con MDP y la inyección intravenosa de hUCB-MSC en ese orden.

11-6: Investigación del efecto terapéutico de hUCB-MSC tratadas con MDP mediante examen histopatológico de tejido cutáneo

Para investigar el efecto terapéutico de las hUCB-MSC tratadas con MDP en la dermatitis atópica, se realizó una autopsia después de 24 horas de la 4.^a inyección de hUCB-MSC, y los tejidos cutáneos se recogieron y se fijaron con una solución de formol neutra al 10 %. A continuación, se procesaron los cortes de tejido, se fijaron en parafina y se cortaron en secciones de 3-4 µm. A continuación, se realizó una tinción con azul de toluidina para examinar la desgranulación de los mastocitos, que es uno de los principales síntomas de la dermatitis atópica.

Como se muestra en la FIG. 18, se observó una gran cantidad de mastocitos desgranulados en el grupo inducido de dermatitis atópica y se observó una reducción de la desgranulación de los mastocitos en todos los otros grupos.

Estos resultados sugieren que las células madre tratadas con MDP de la presente invención o el cultivo de las mismas se pueden usar en la práctica para el tratamiento de trastornos inmunitarios en modelos animales tales como la dermatitis atópica.

A menos que se especifique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica, a los que pertenece la presente invención. La nomenclatura usada en el presente documento también se conoce bien y se usa comúnmente en la técnica.

<110> KANG STEM HOLDINGS CO., LTD

<120> Composición farmacéutica que comprende células madre tratadas con agonistas de NOD2 o cultivo de las mismas para la prevención y tratamiento de enfermedades inmunitarias y enfermedades inflamatorias

<130> OPA11006PCT

<150> KR10-2010-0081640

<151> 2010-08-23

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo TLR2

<400> 1

gatgcctact gggtggagaa 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso TLR2

<400> 2

cgcagctctc agattaccc 20

<210> 3

<211> 19

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Cebador directo TLR4

 <400> 3
 acagaagctg gtggctgtg 19

 10 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador inverso TLR4

 <400> 4
 tctttaaagtg cacctggttg g 21
 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador directo NOD1

 <400> 5
 30 ccacttcaca gctggagaca 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso NOD1

 <400> 6
 40 tgagtgaag cagcatttg 20

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo NOD2
 50
 <400> 7
 gaatgttggg cacctcaagt 20

 <210> 8
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Cebador inverso NOD2

 <400> 8
 caaggagctt agccatggag 20

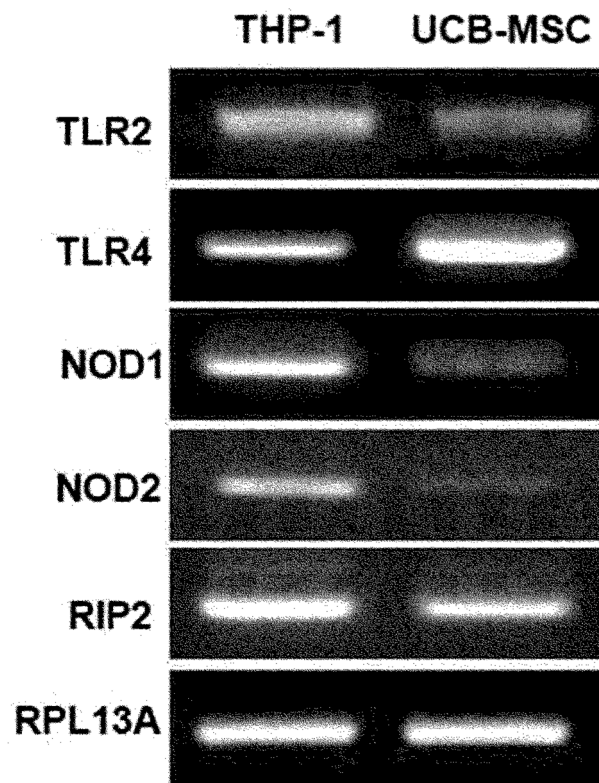
 65 <210> 9
 <211> 20

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador directo Rip2	
	<400> 9	
	ccattgagat ttcgcatcct	20
10	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso Rip2	
	<400> 10	
20	atgcgccact ttgataaacc	20
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo RPL13A	
	<400> 11	
30	catcggtgct aaacaggtac	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso RPL13A	
40	<400> 12	
	gcacgacctt gagggcagcc	20

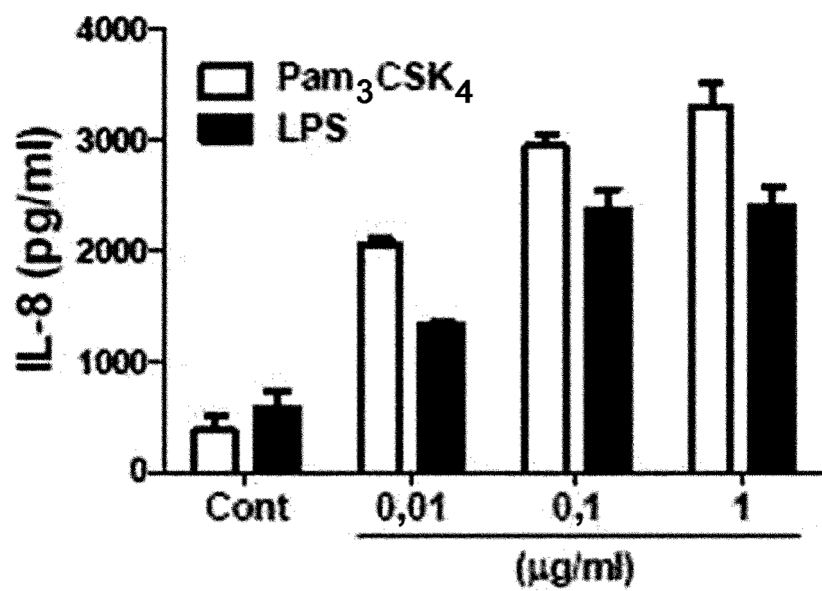
REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades inmunitarias o enfermedades inflamatorias, que comprende células madre que se generan cultivando células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) con un agonista de NOD2 o un cultivo de las mismas.
- 2.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células madre son células madre adultas humanas, células madre pluripotentes humanas, células madre pluripotentes inducidas, células madre embrionarias animales o células madre adultas animales.
- 10 **3.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que las células madre adultas son células madre mesenquimales, células estromales mesenquimales derivadas de tejido humano, células madre mesenquimales derivadas de tejido humano, células madre pluripotentes o células epiteliales amnióticas, en la que las células madre adultas son opcionalmente células madre mesenquimales seleccionadas del grupo que consiste en células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical, células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, células madre mesenquimales derivadas de músculo, células madre mesenquimales derivadas de nervios, células madre mesenquimales derivadas de la piel, células madre mesenquimales derivadas de amnios y células madre mesenquimales derivadas de placenta.
- 15 **4.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplante, artritis, enfermedad de injerto contra huésped, infección bacteriana, sepsis e inflamación.
- 20 **5.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que las enfermedades autoinmunitarias se seleccionan del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, eritema, dermatitis atópica, artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes de tipo 1, lupus, síndrome de fatiga crónica, fibromialgia, hipotiroidismo e hipertiroidismo, esclerodermia, enfermedad de Behcet, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Ménière, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Sjögren, vitiligo, endometriosis, psoriasis, vitiligo, esclerodermia sistémica, asma y colitis ulcerosa.
- 25 **6.** Un procedimiento para preparar PGE2 o TGF- β 1, que comprende la etapa de cultivar células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) en un medio de cultivo que comprende un agonista de NOD2, en el que la prostaglandina E2 (PGE2) o el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) se secreta de las células madre durante el cultivo.
- 30 **7.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el agonista de NOD2 es dipéptido de muramilo (MDP).
- 8.** Un injerto para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades inmunitarias o enfermedades inflamatorias que comprende células madre que se generan cultivando células madre que expresan la proteína 2 del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD2) con un agonista de NOD2 o un cultivo de las mismas.
- 35 **9.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agonista de NOD2 es dipéptido de muramilo (MDP).

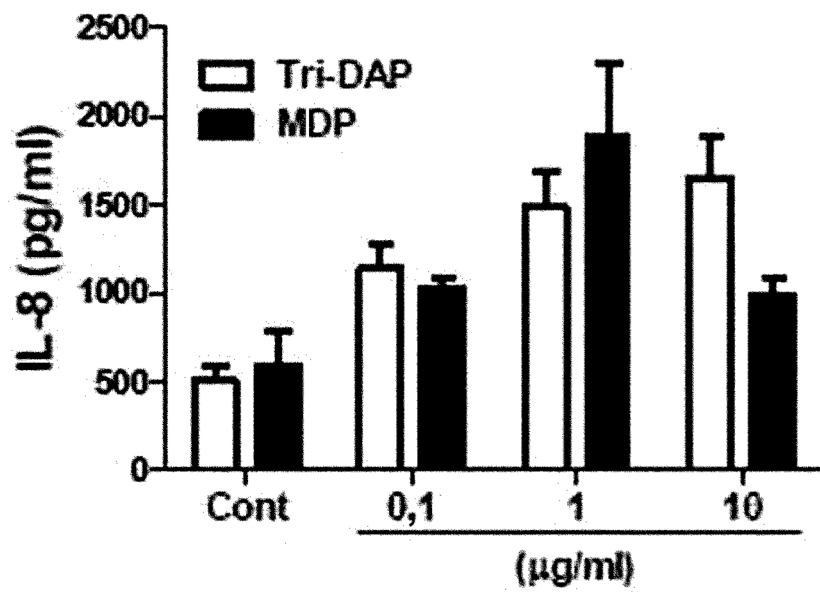
[FIG. 1a]



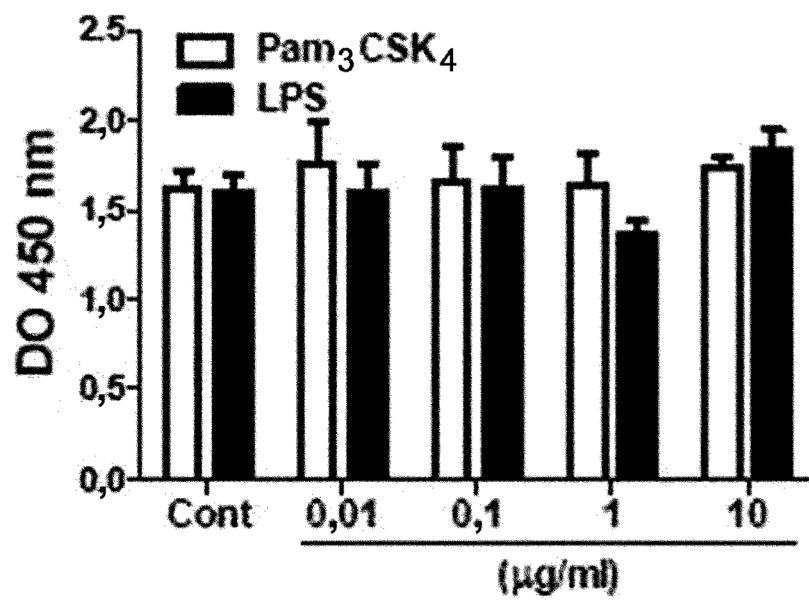
[FIG. 1b]



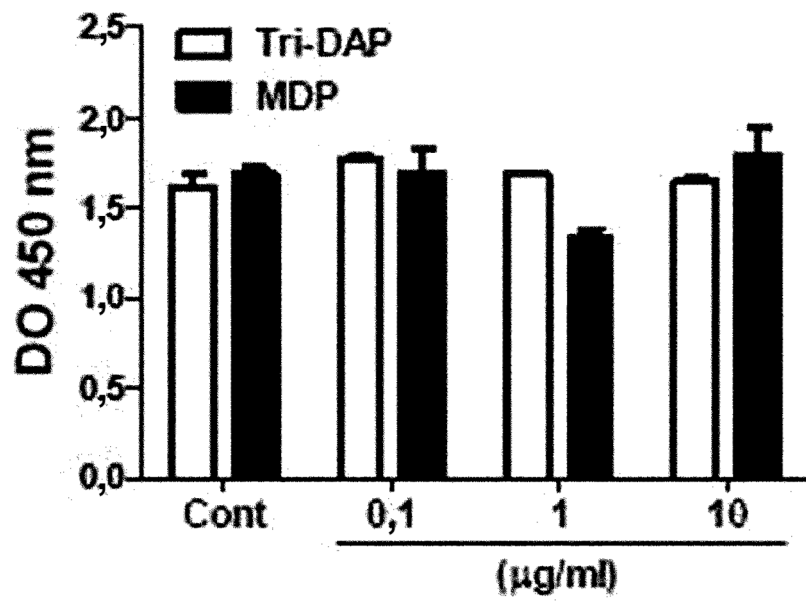
[FIG. 1c]



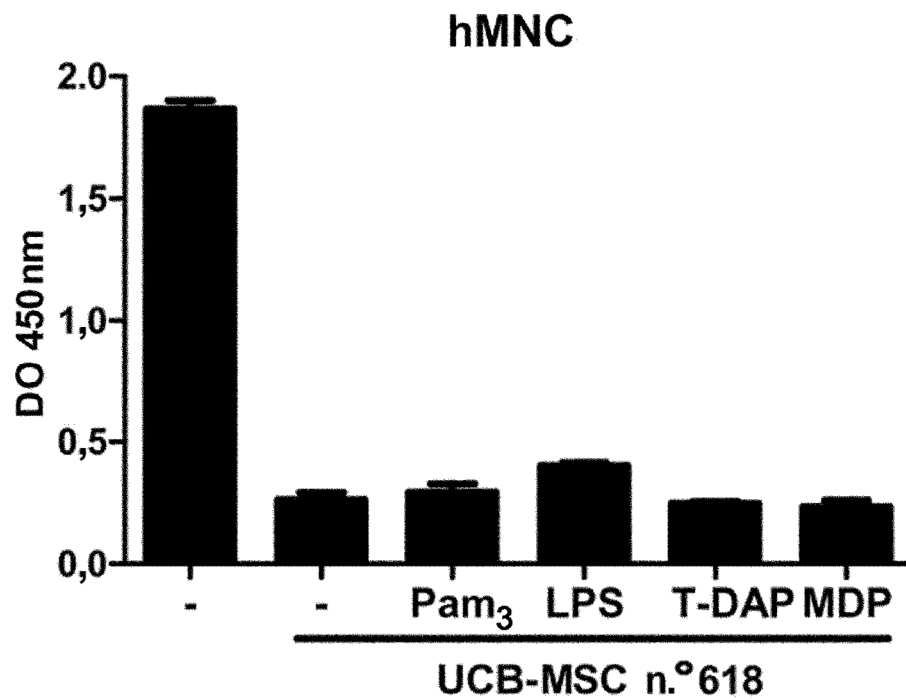
[FIG. 1d]



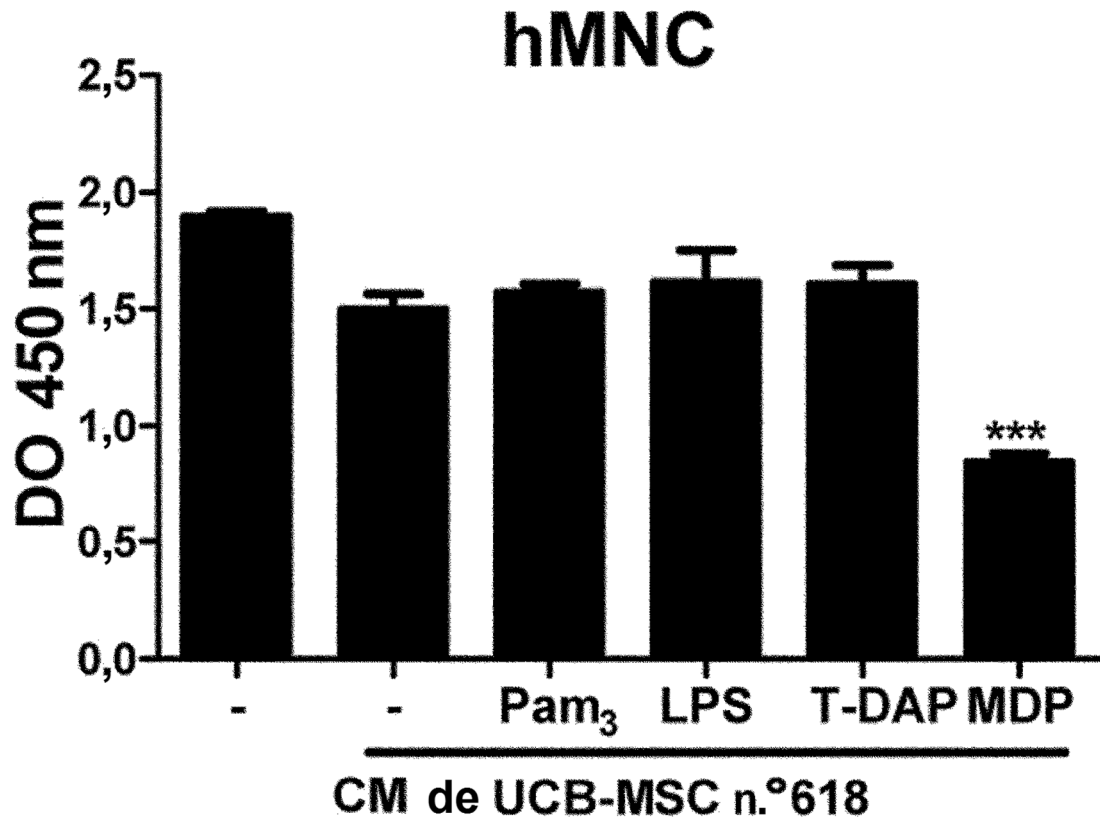
[FIG. 1e]



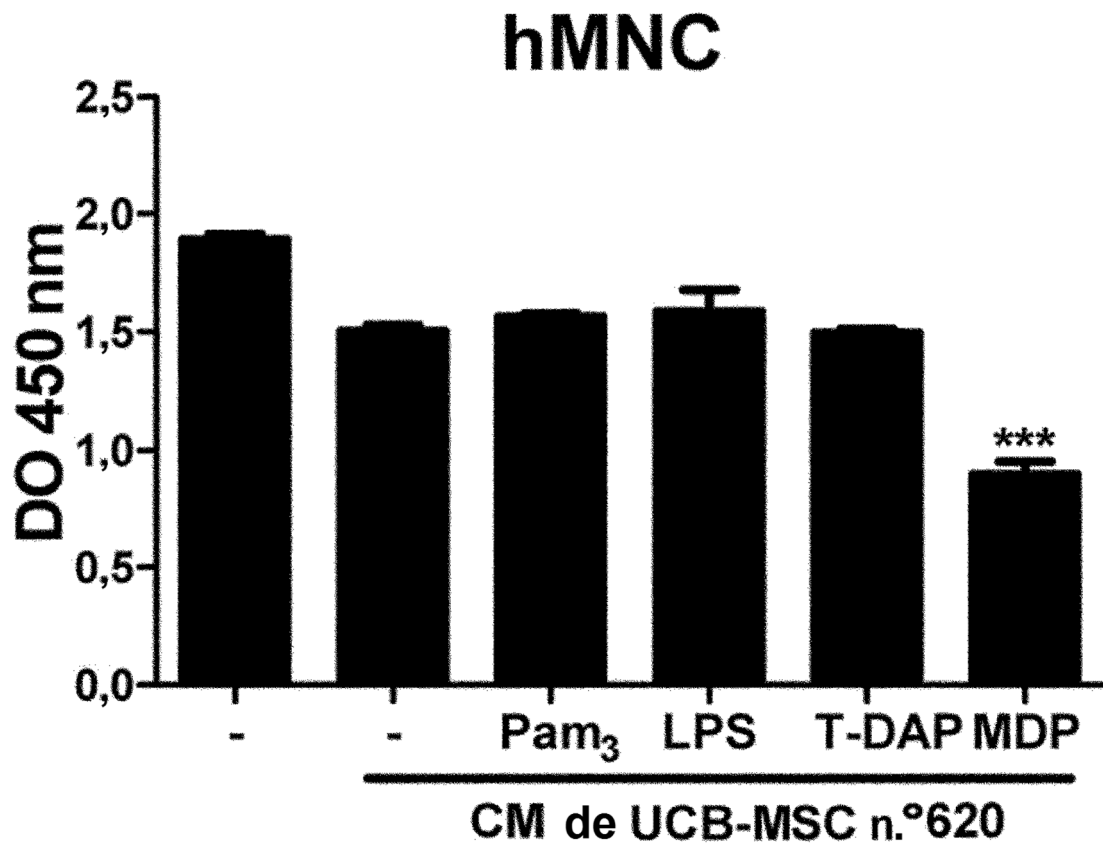
[FIG. 2]



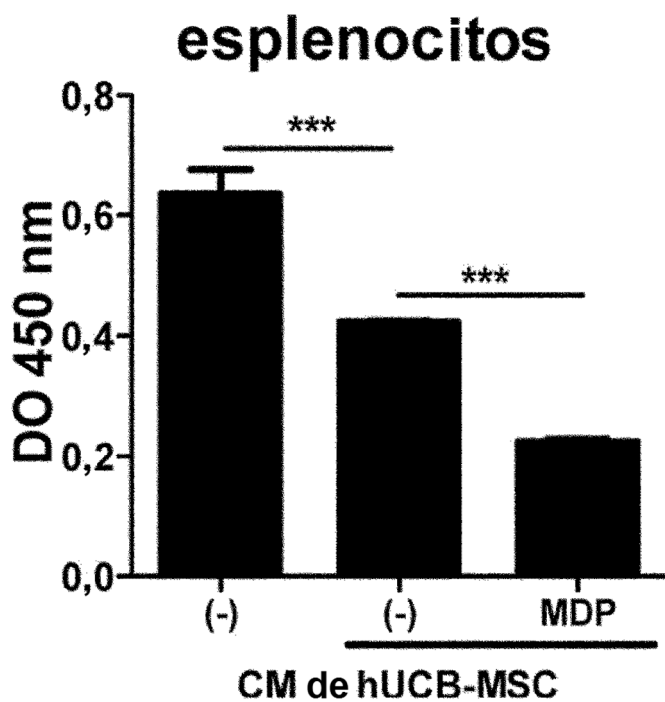
[FIG. 3a]



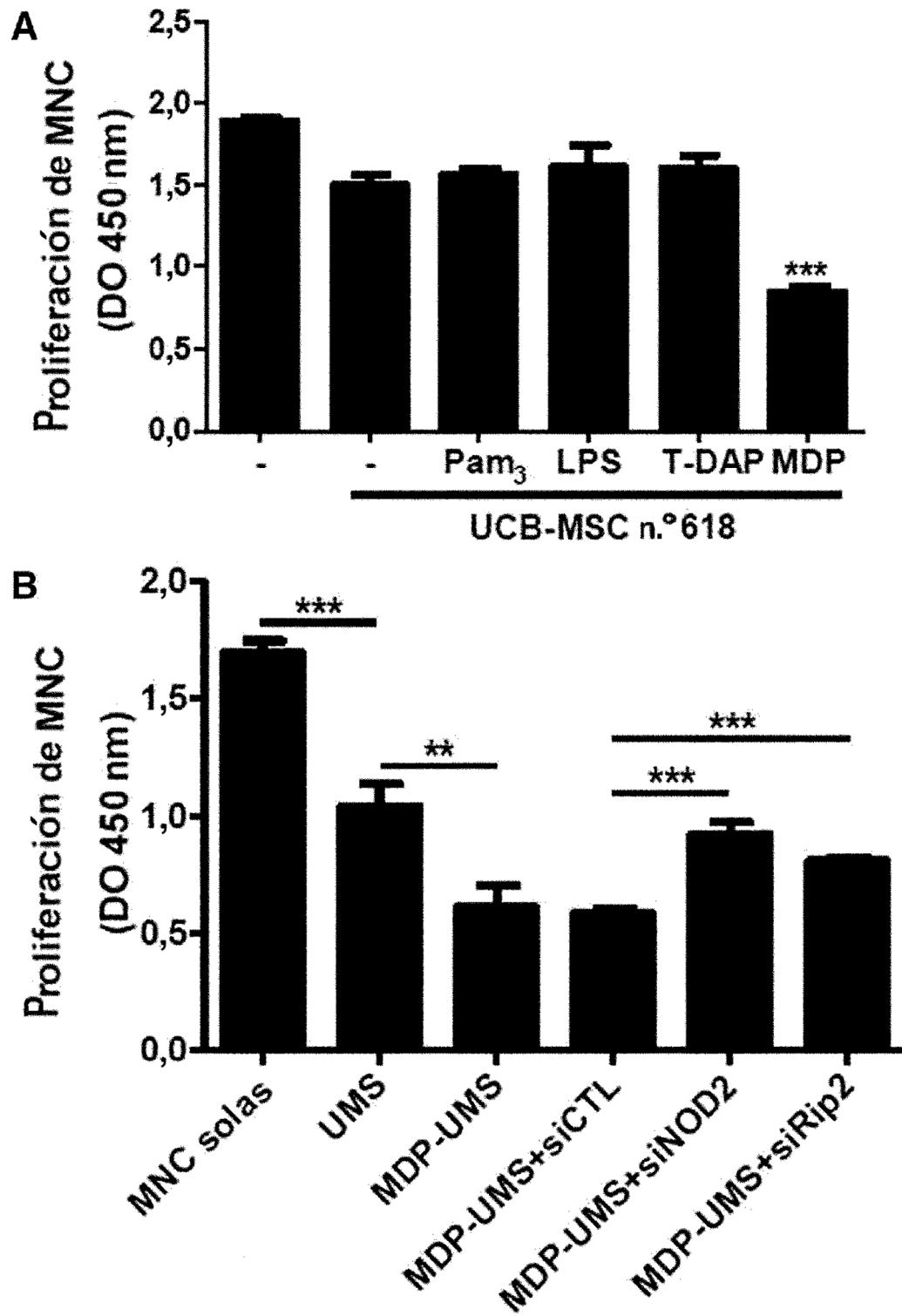
[FIG. 3b]



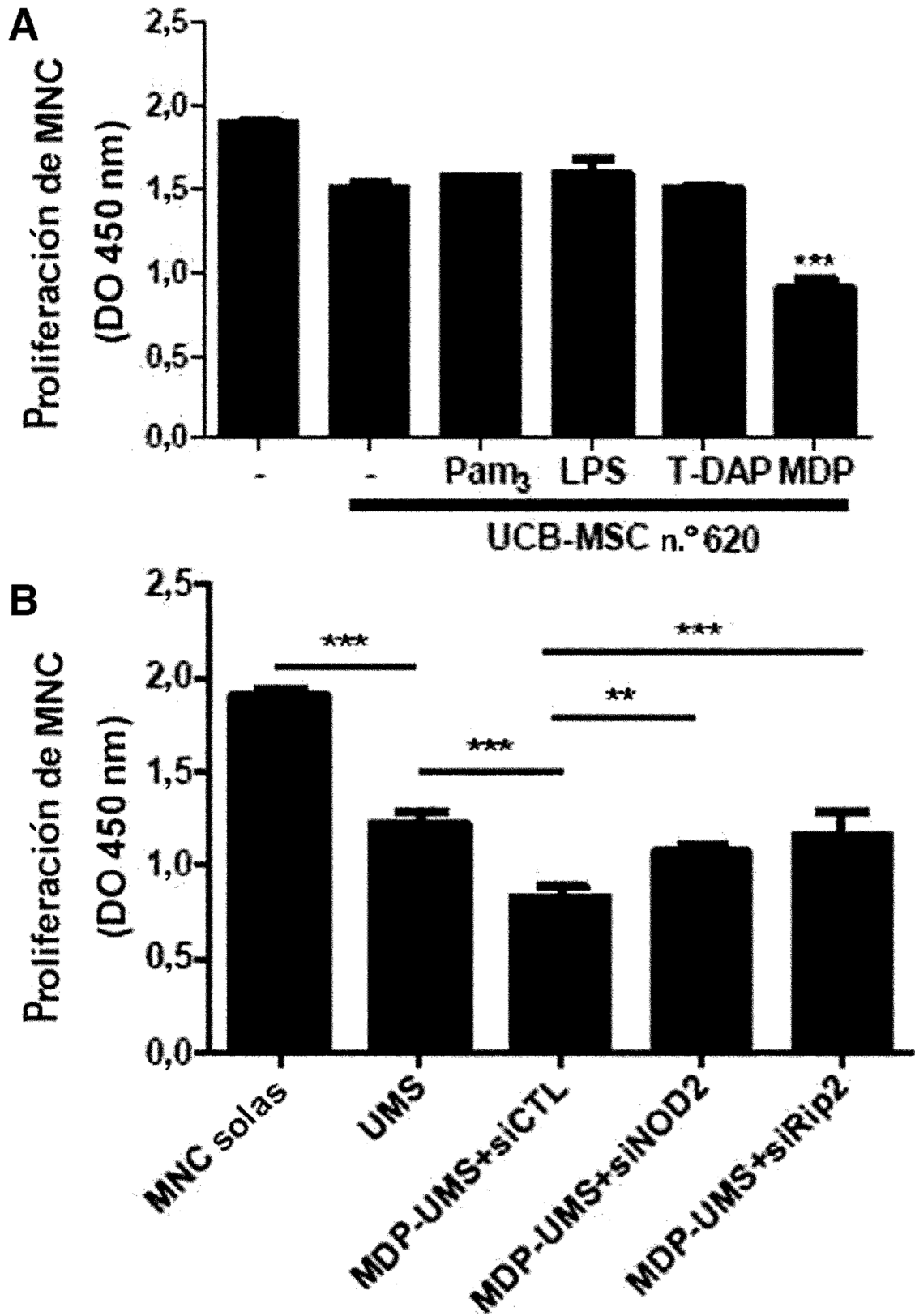
[FIG. 3c]



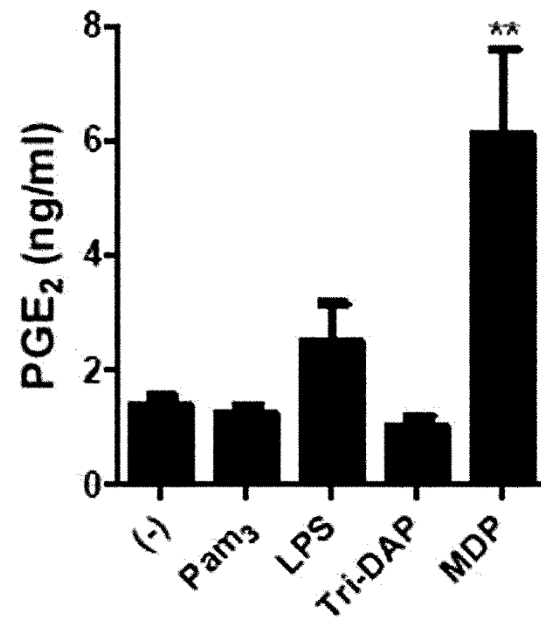
[FIG. 4]



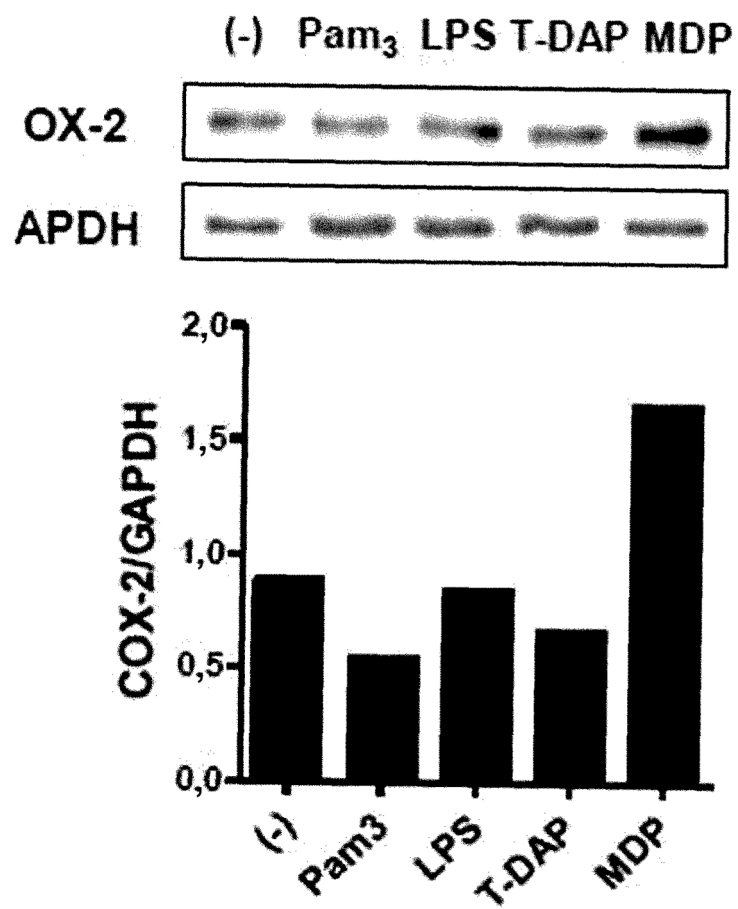
[FIG. 5]



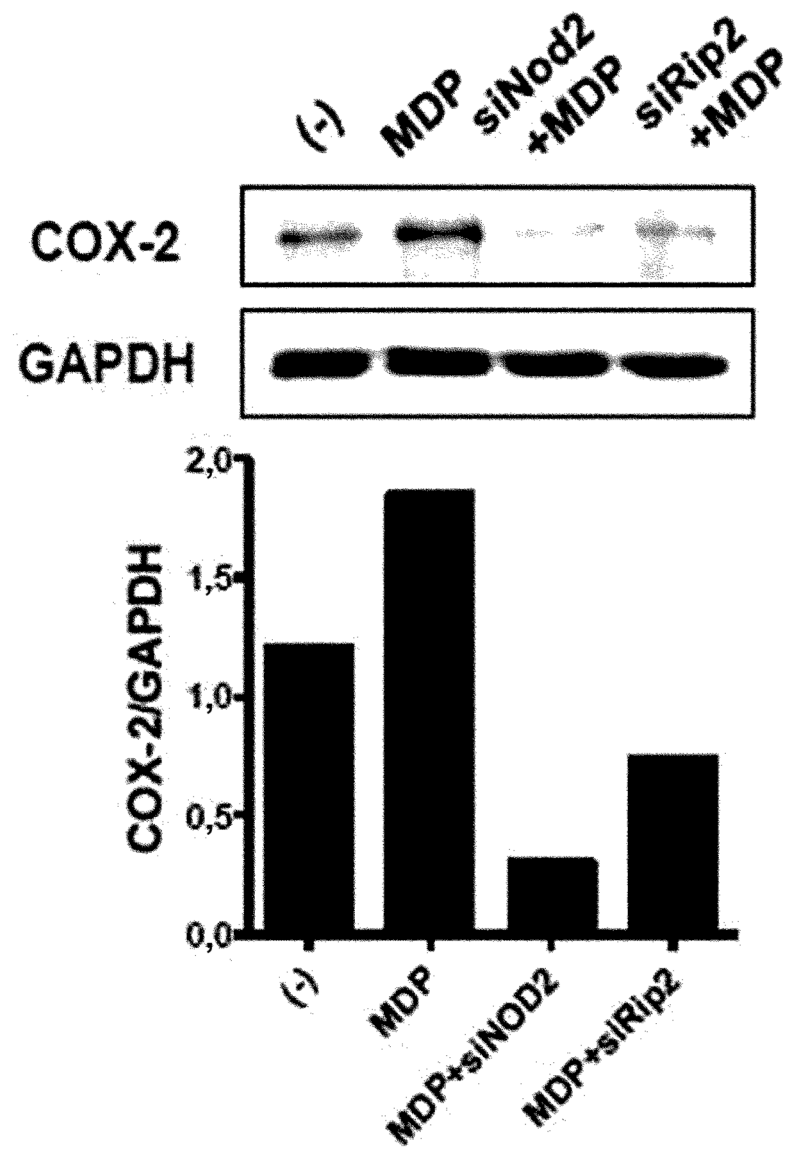
[FIG. 6a]



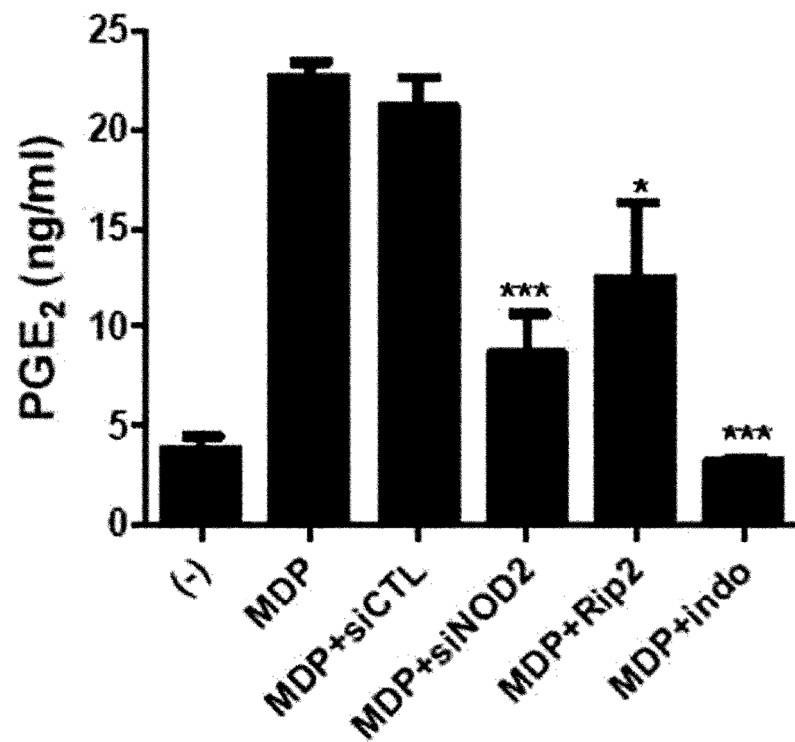
[FIG. 6b]



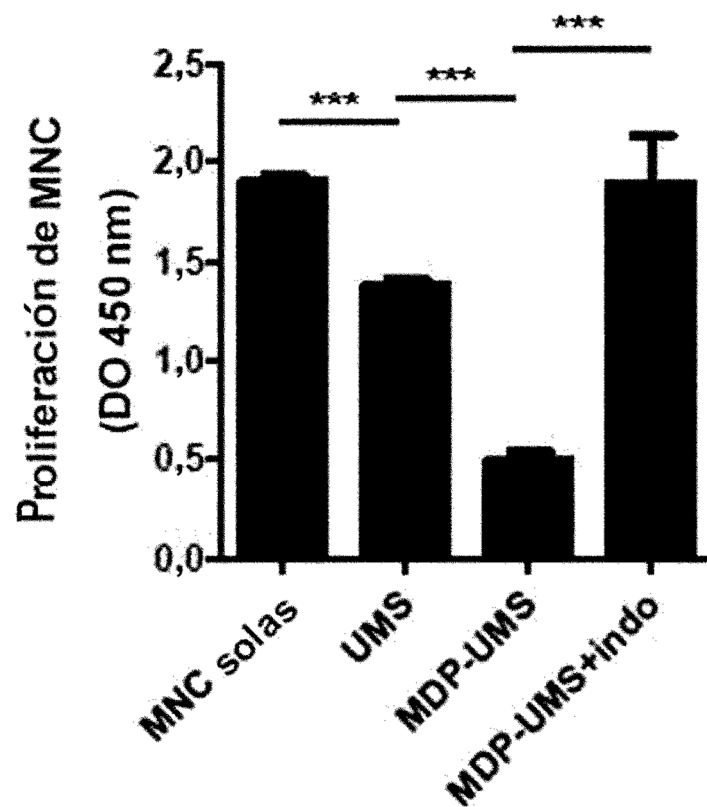
[FIG. 6c]



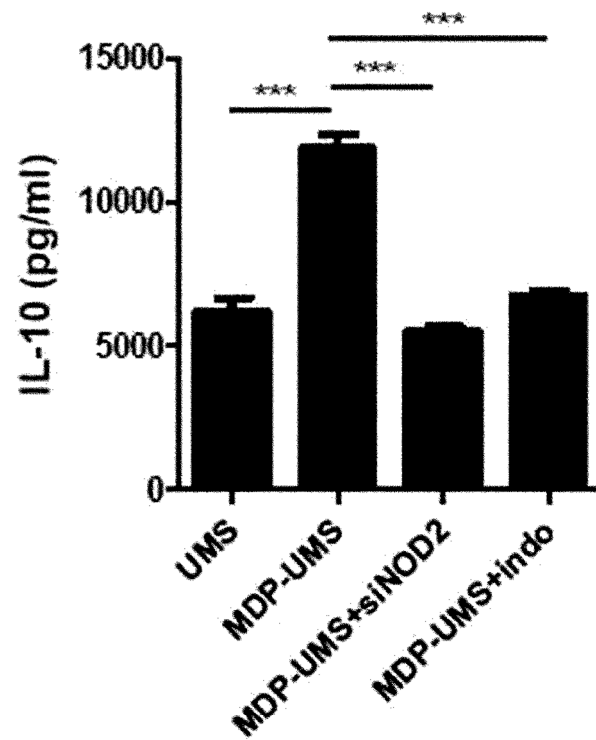
[FIG. 6d]



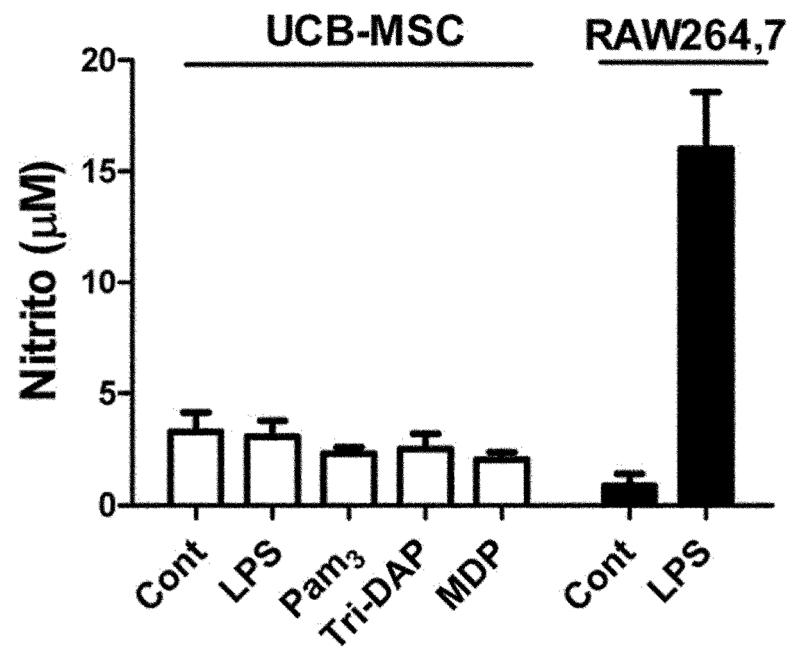
[FIG. 6e]



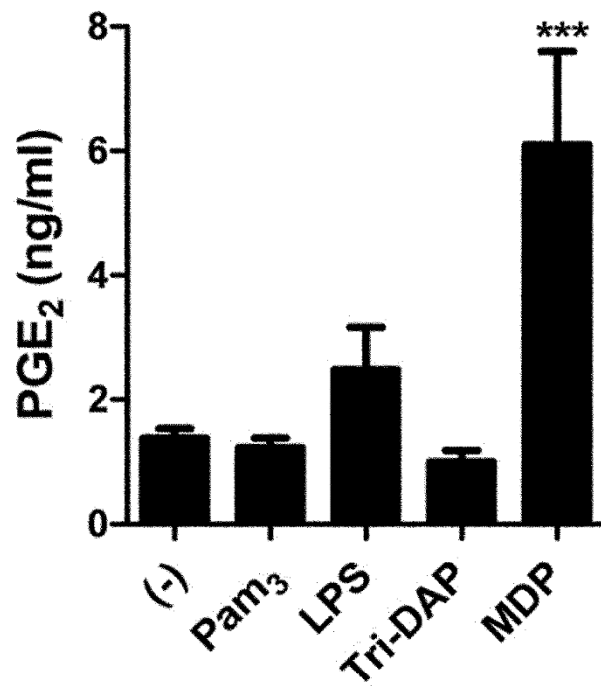
[FIG. 6f]



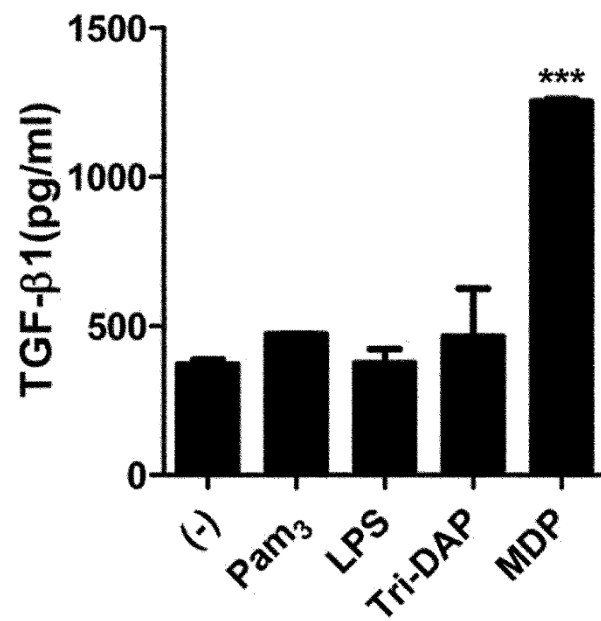
[FIG. 7a]



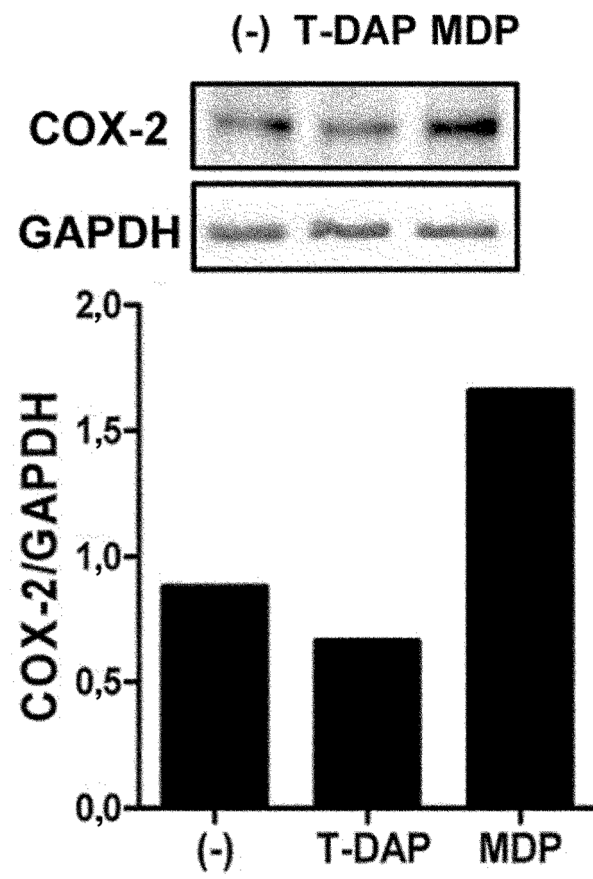
[FIG. 7b]



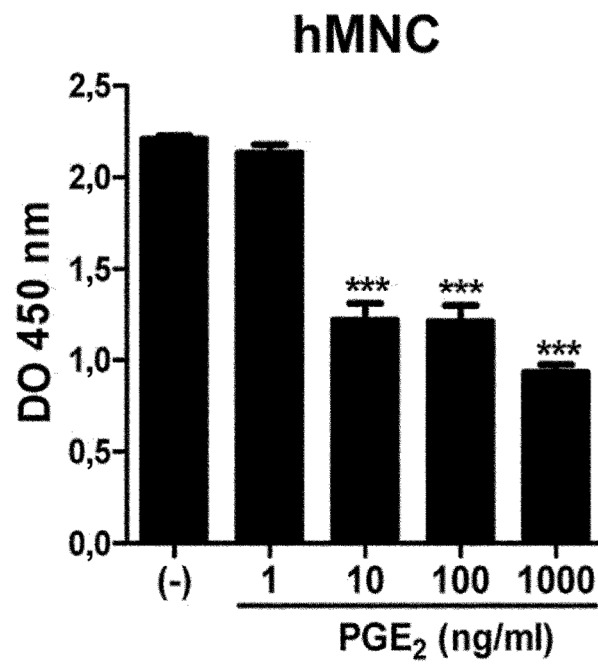
[FIG. 7c]



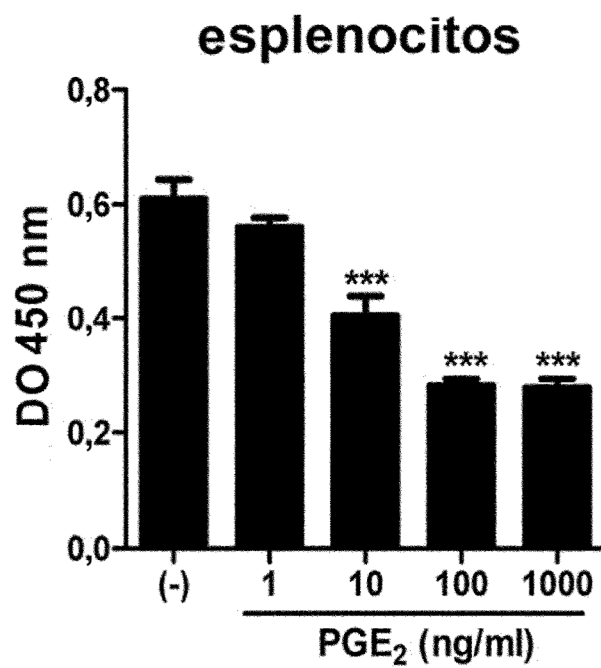
[FIG. 7d]



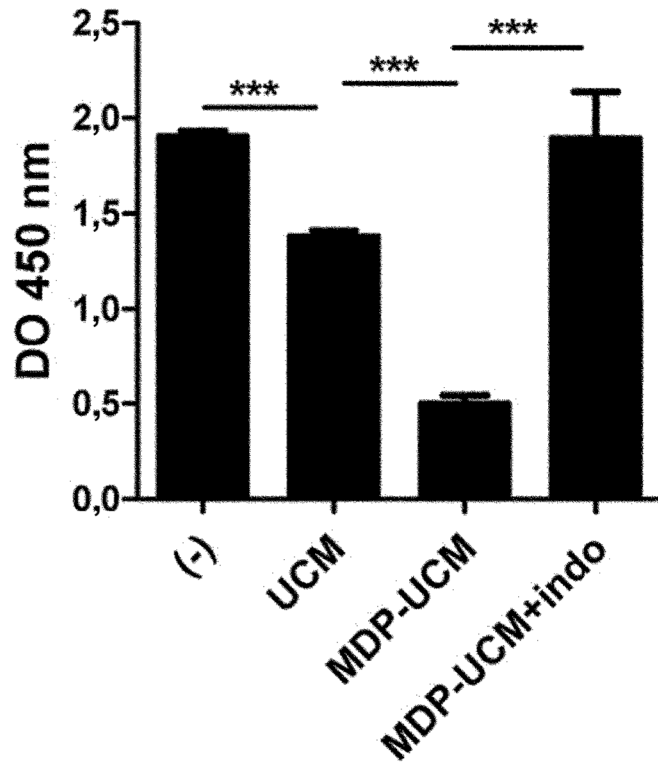
[FIG. 7e]



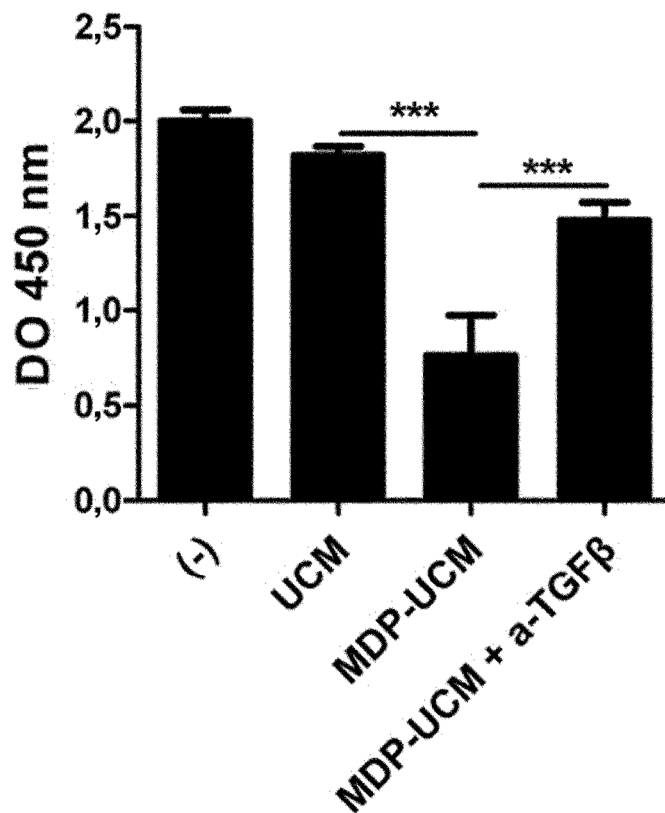
[FIG. 7f]



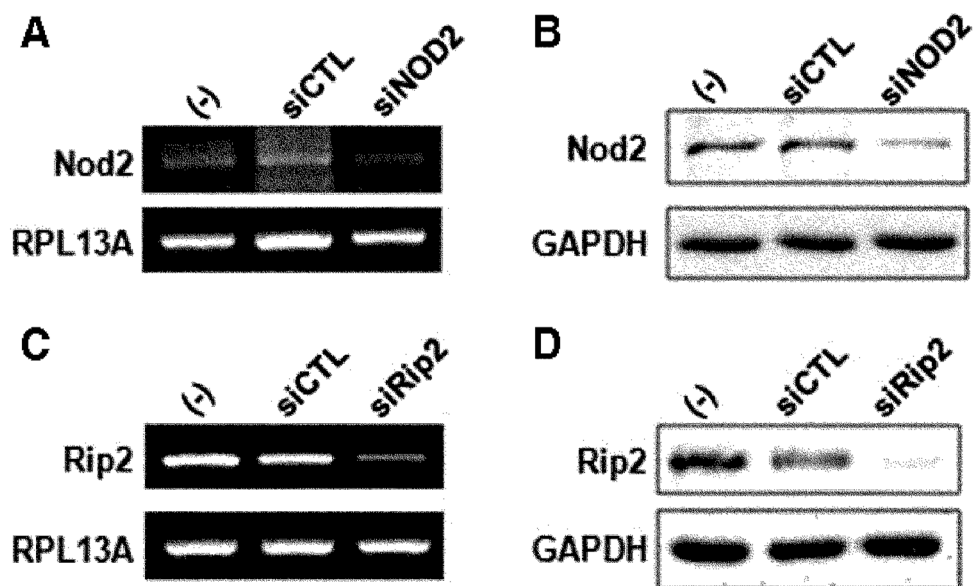
[FIG. 7g]



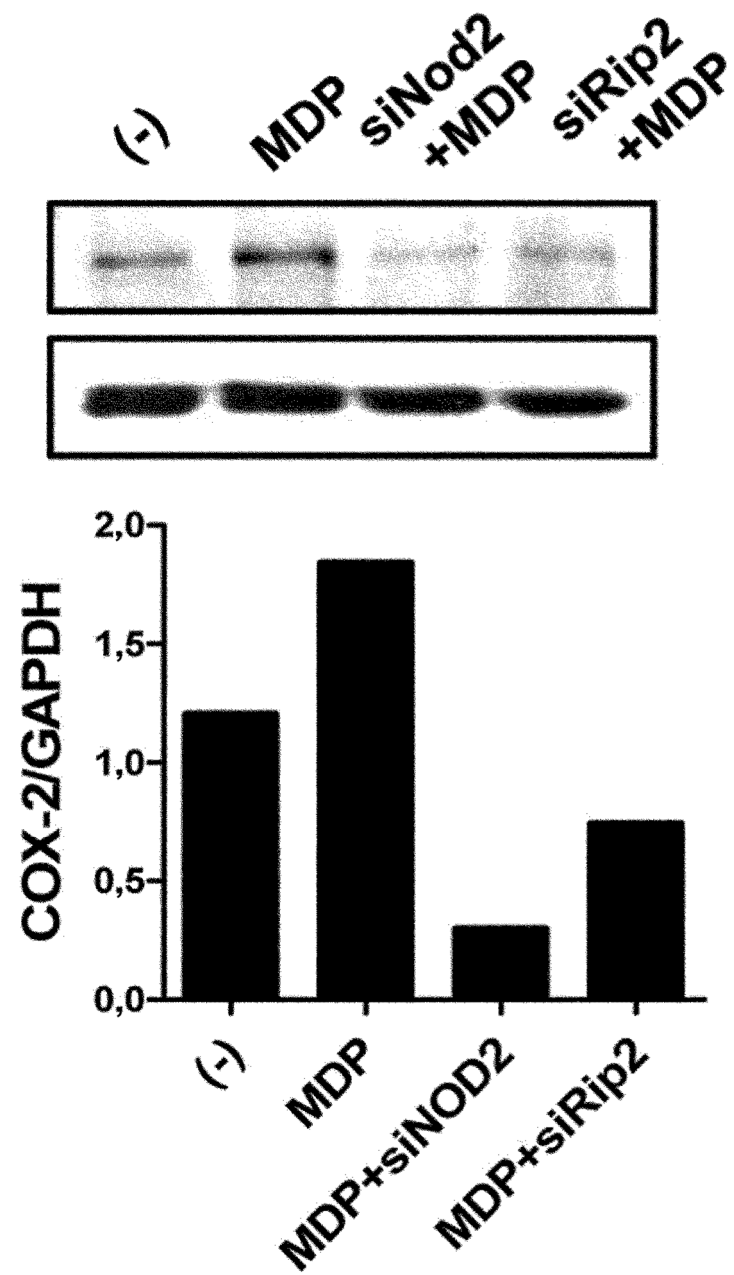
[FIG. 7h]



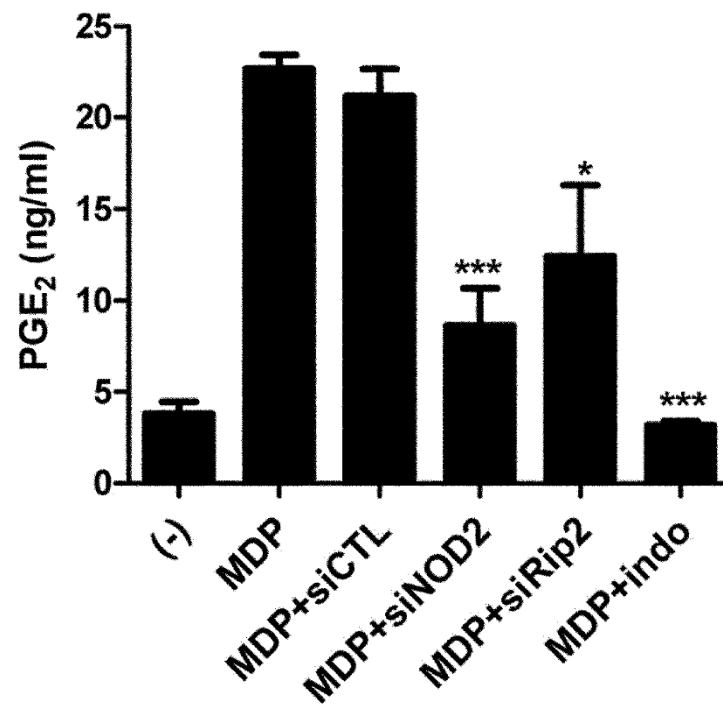
[FIG. 8]



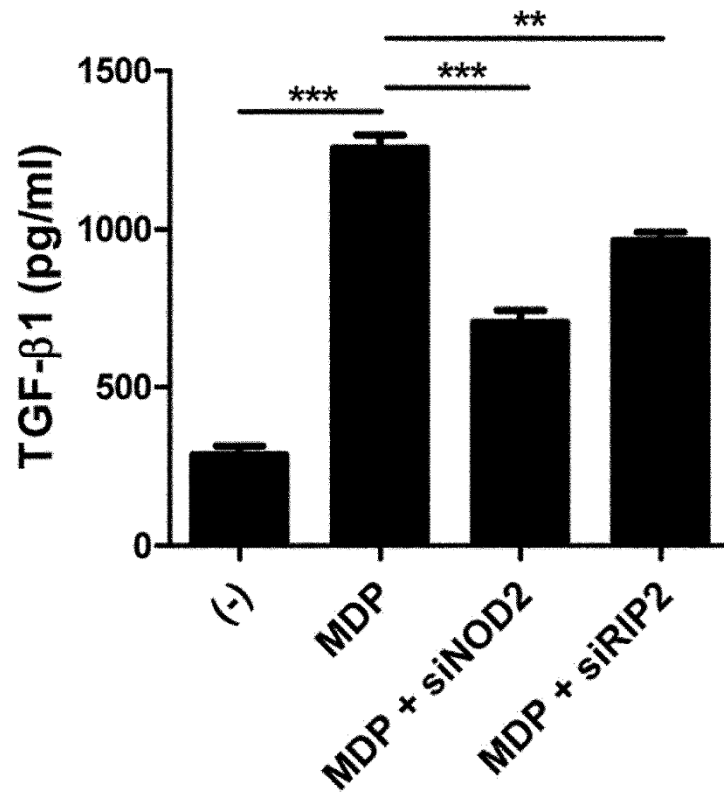
[FIG. 9a]



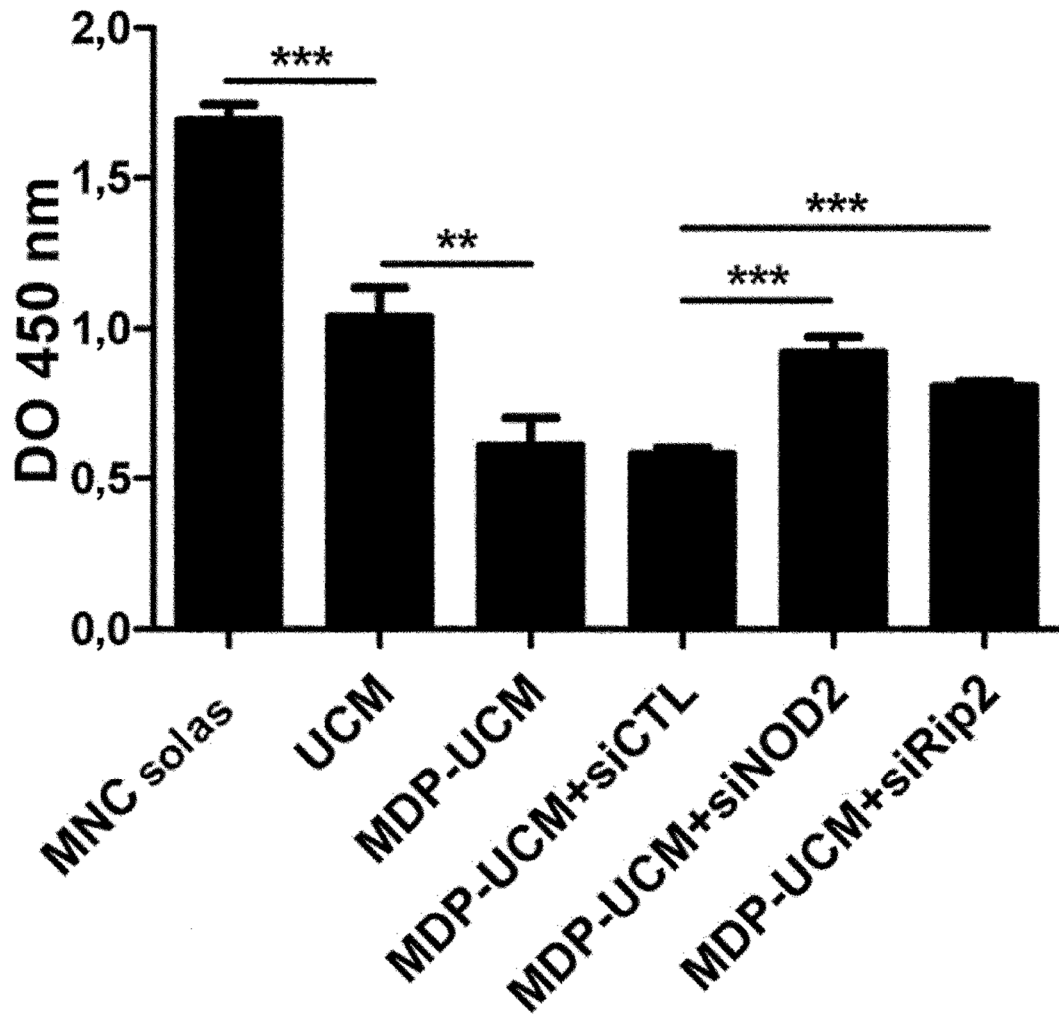
[FIG. 9b]



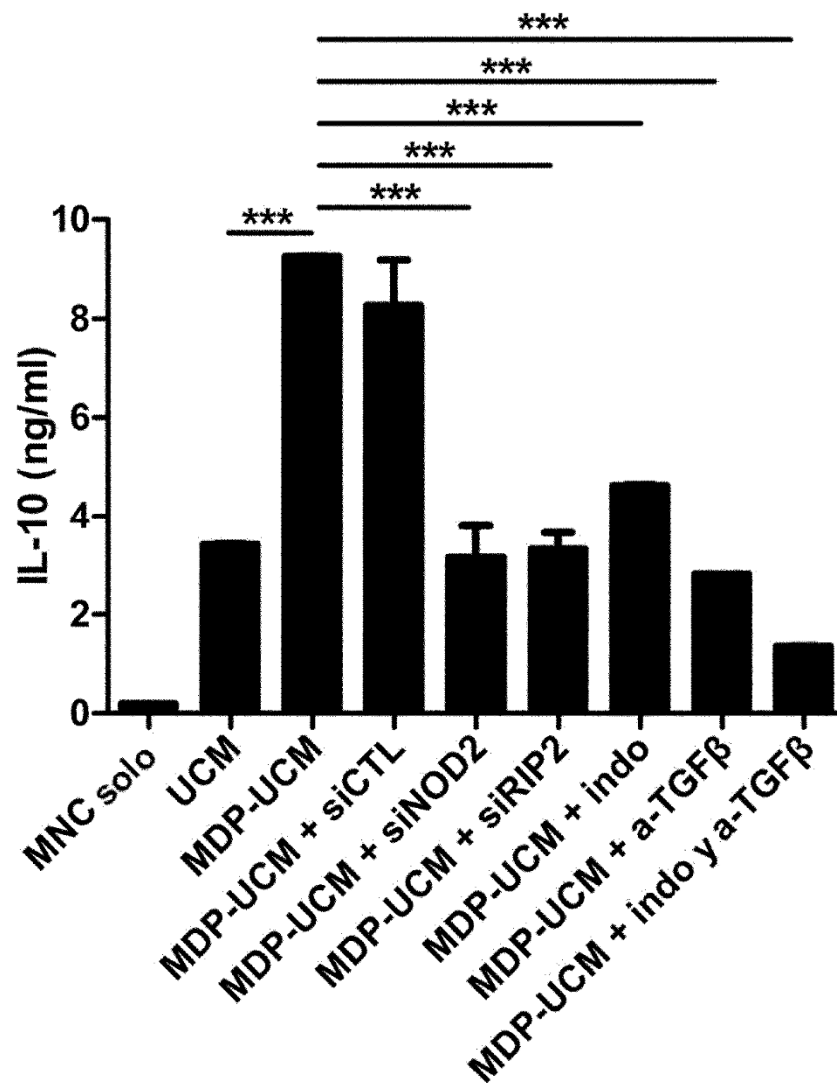
[FIG. 9c]



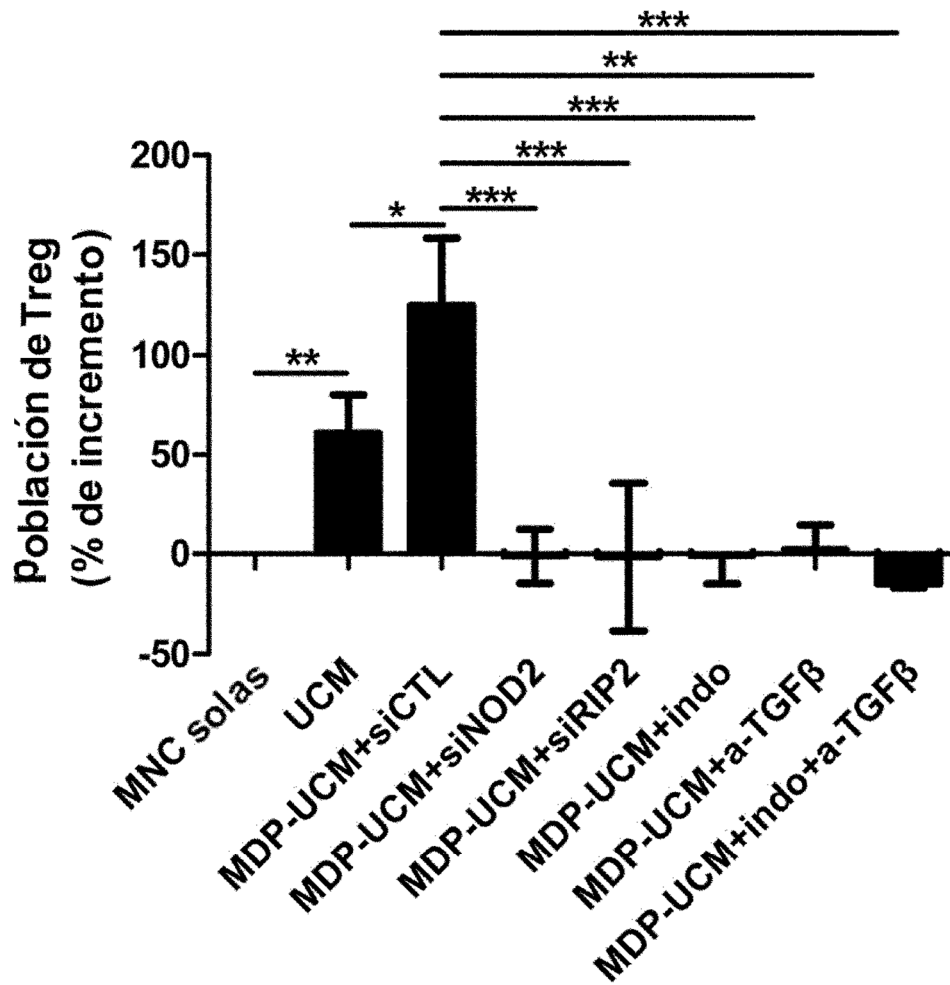
[FIG. 9d]



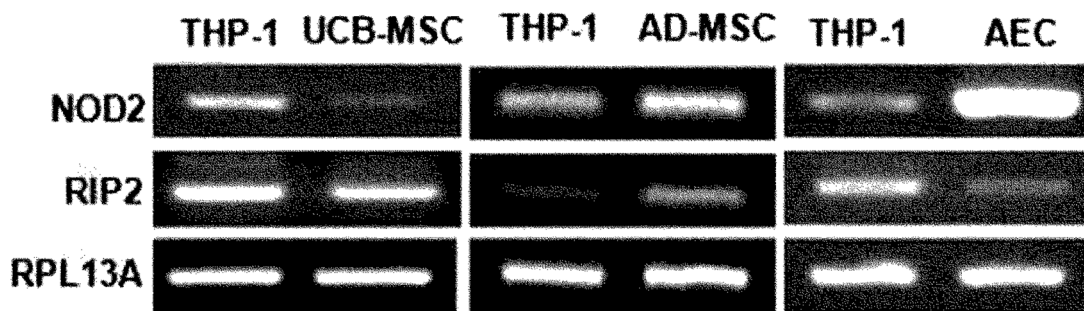
[FIG. 10a]



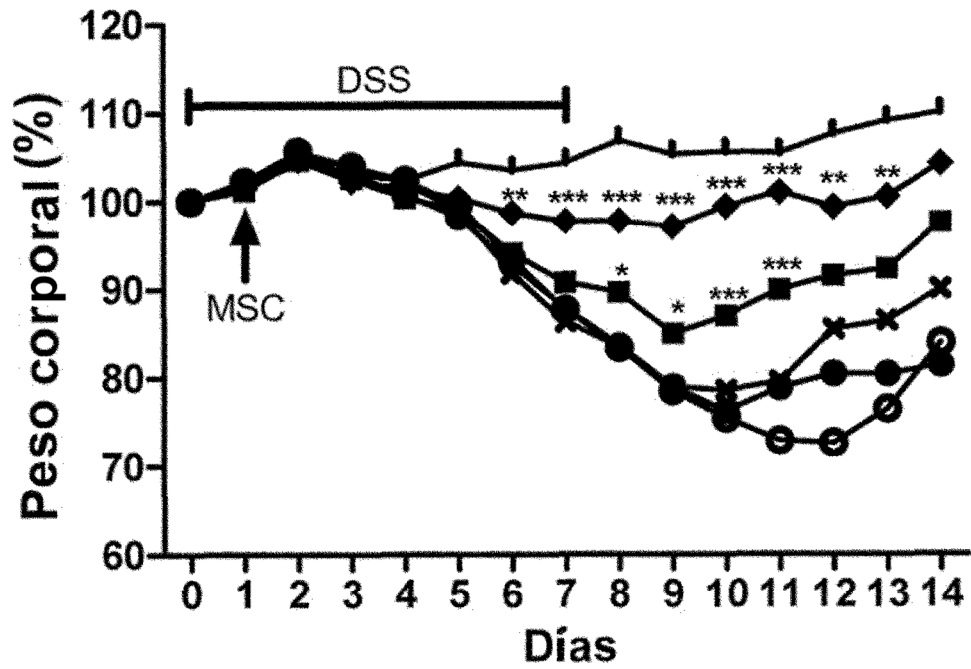
[FIG. 10b]



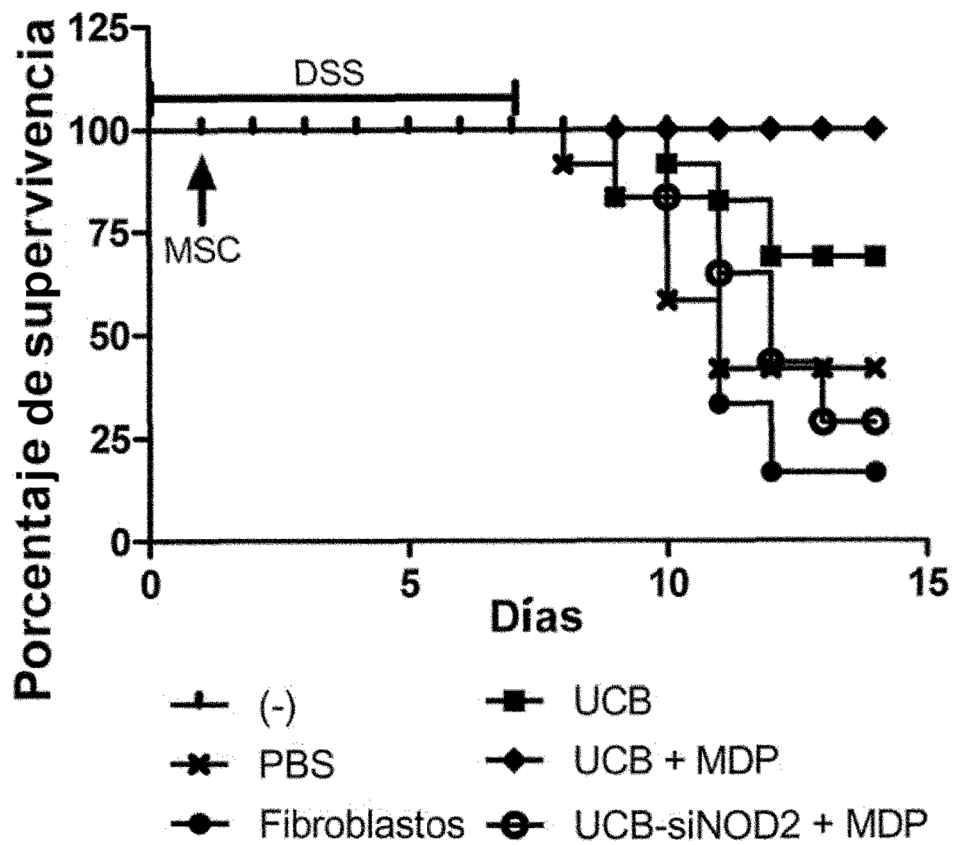
[FIG. 11]



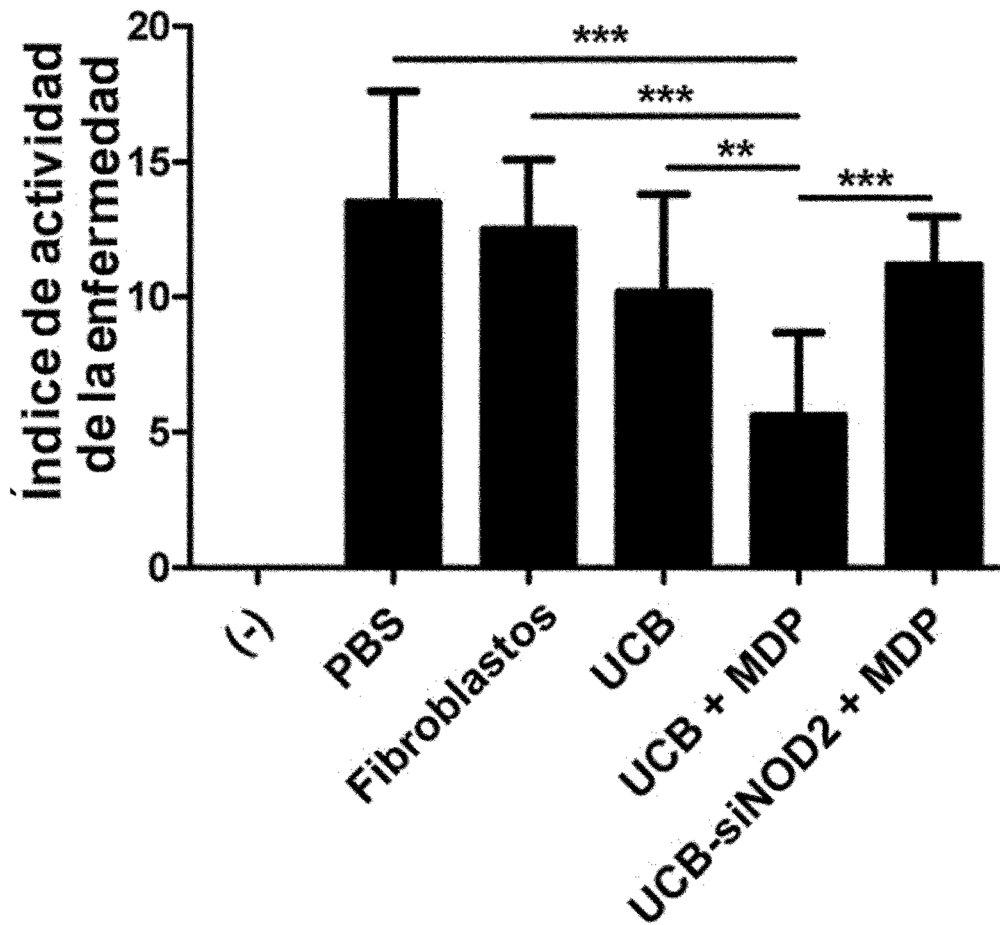
[FIG. 12a]



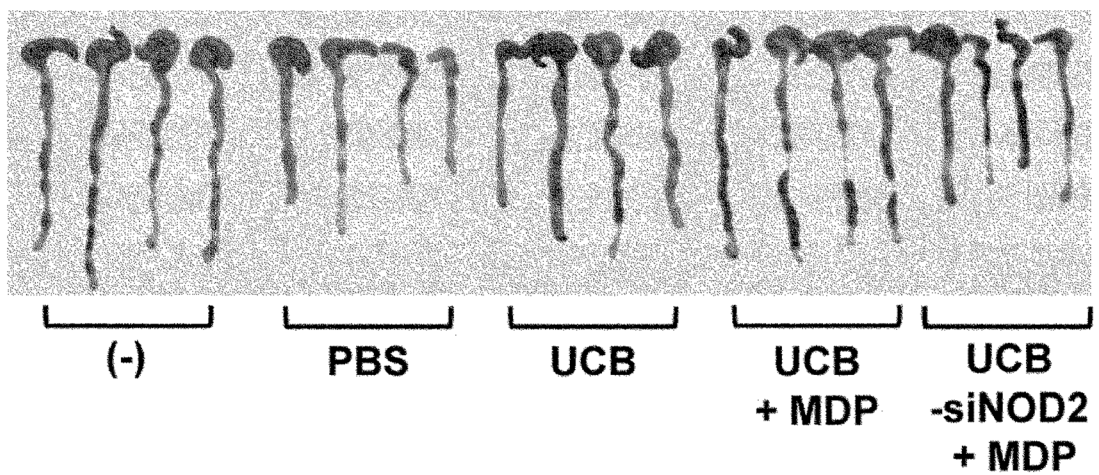
[FIG. 12b]



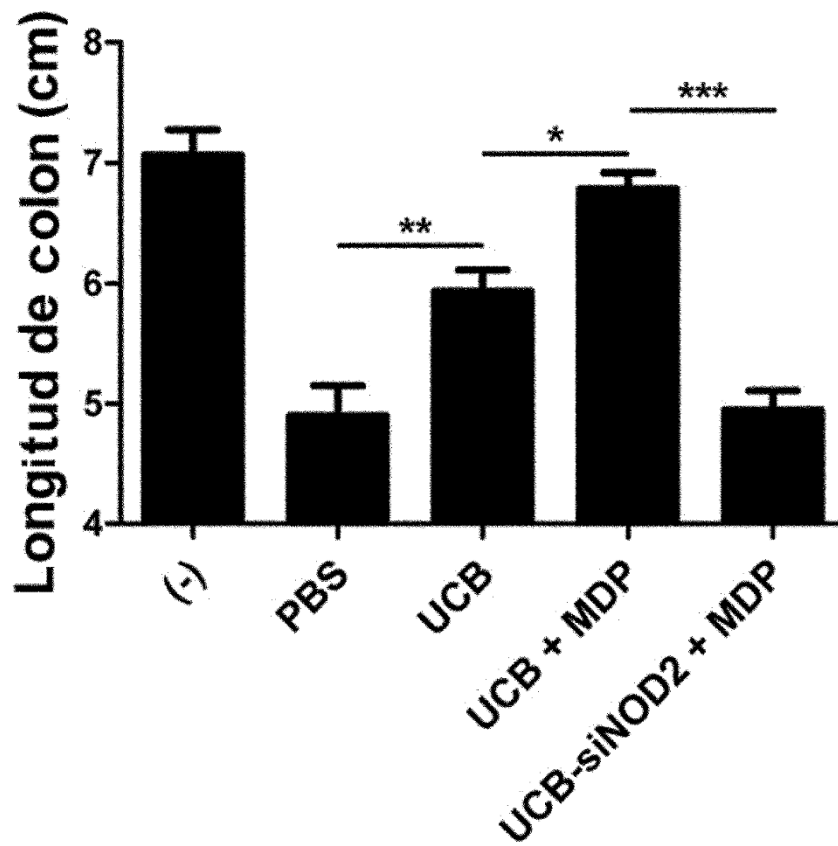
[FIG. 12c]



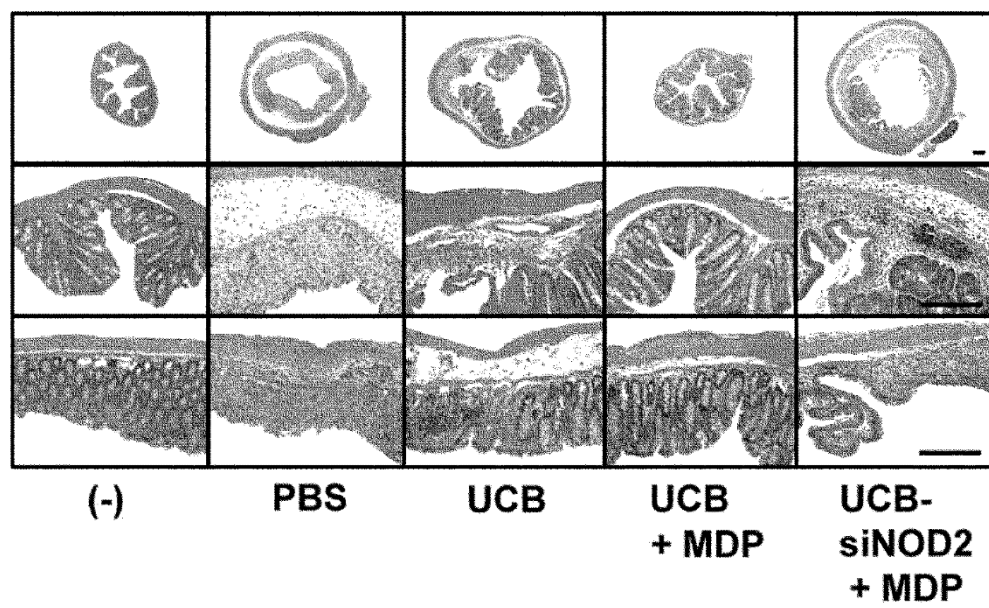
[FIG. 12d]



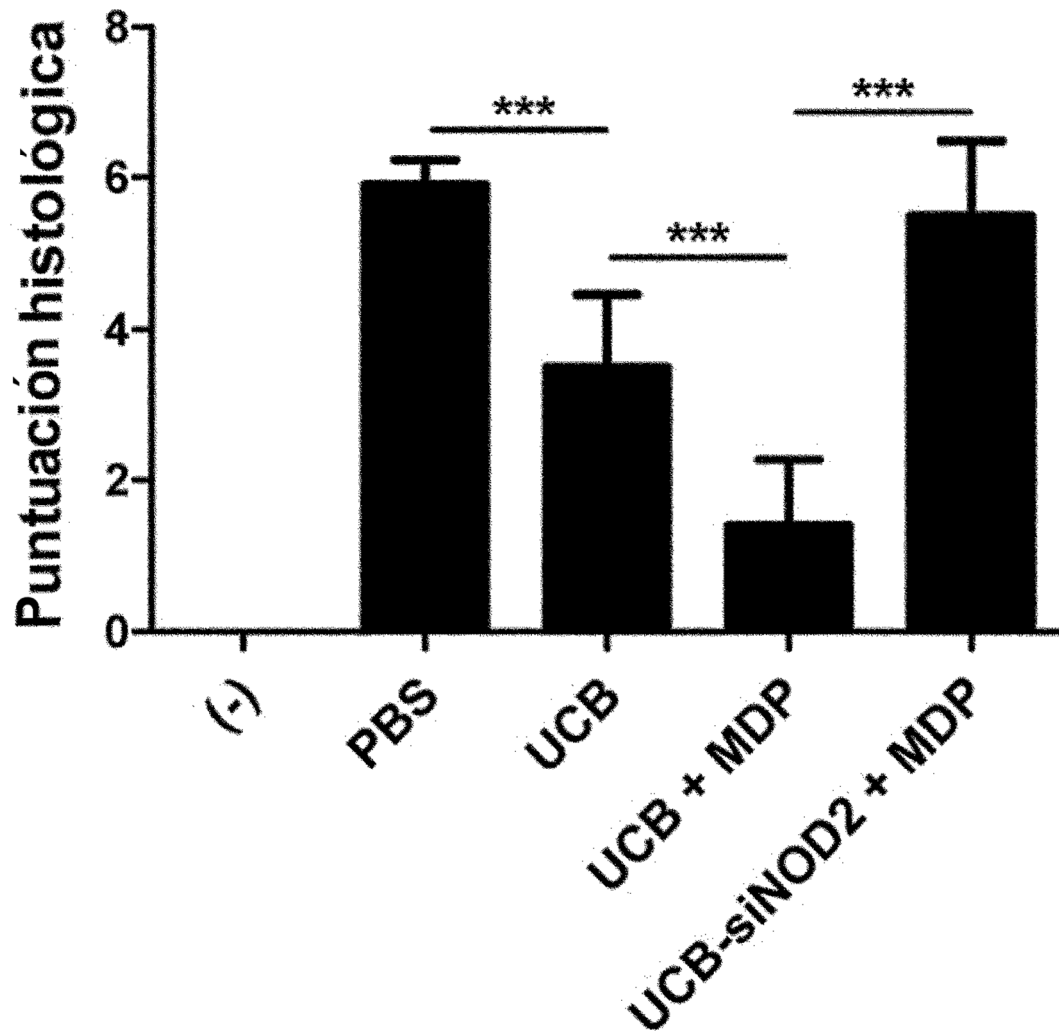
[FIG. 12e]



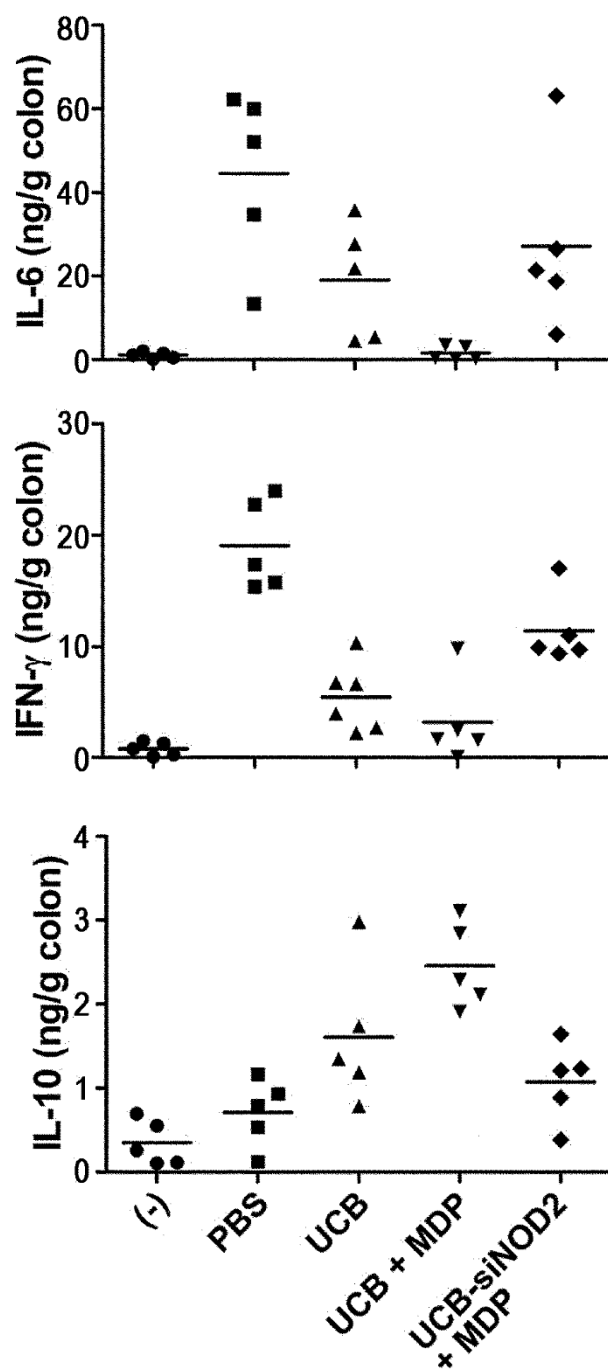
[FIG. 12f]



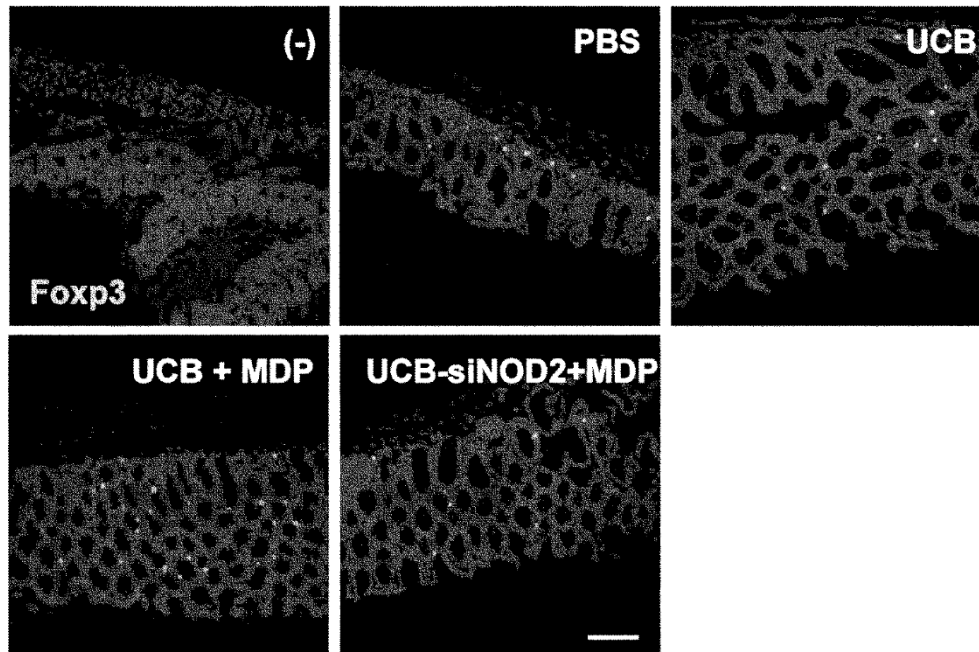
[FIG. 12g]



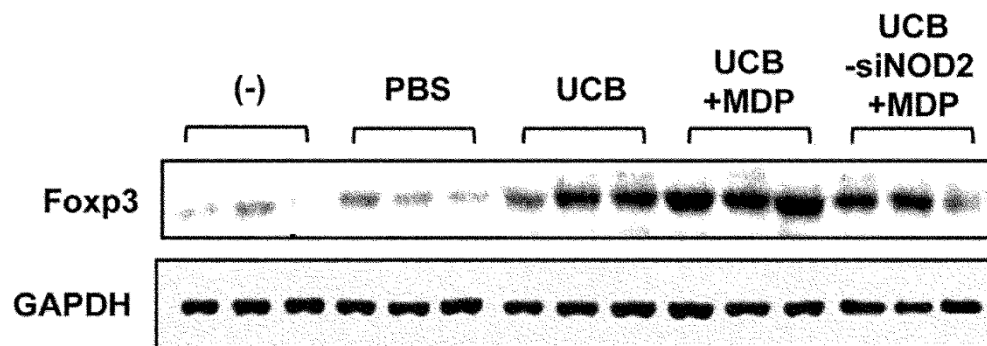
[FIG. 13a]



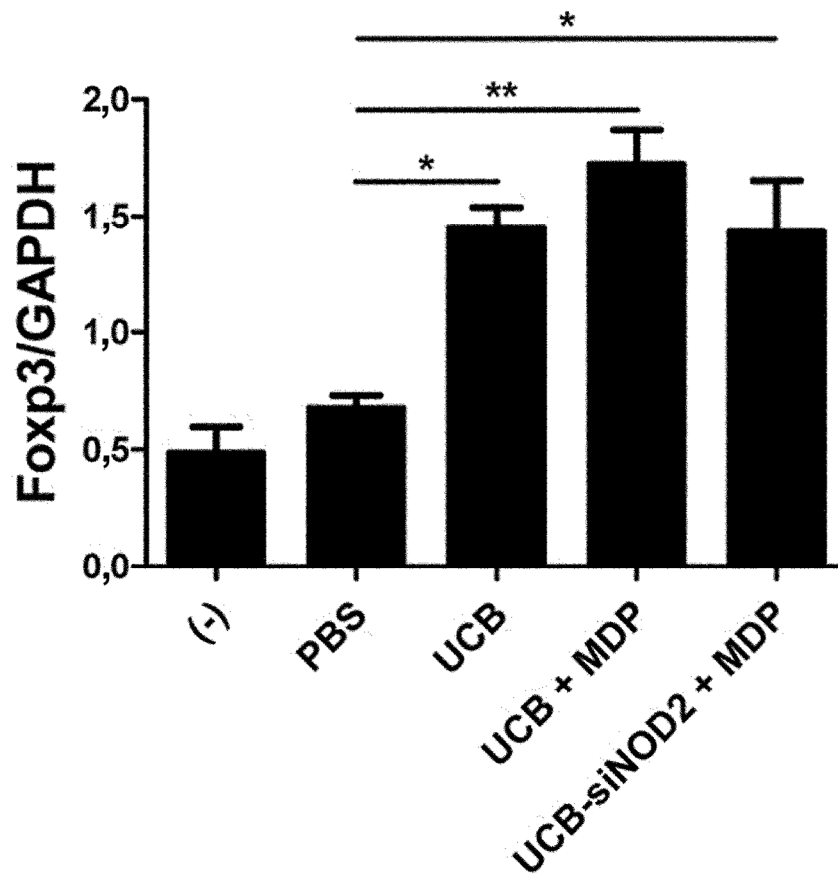
[FIG. 13b]



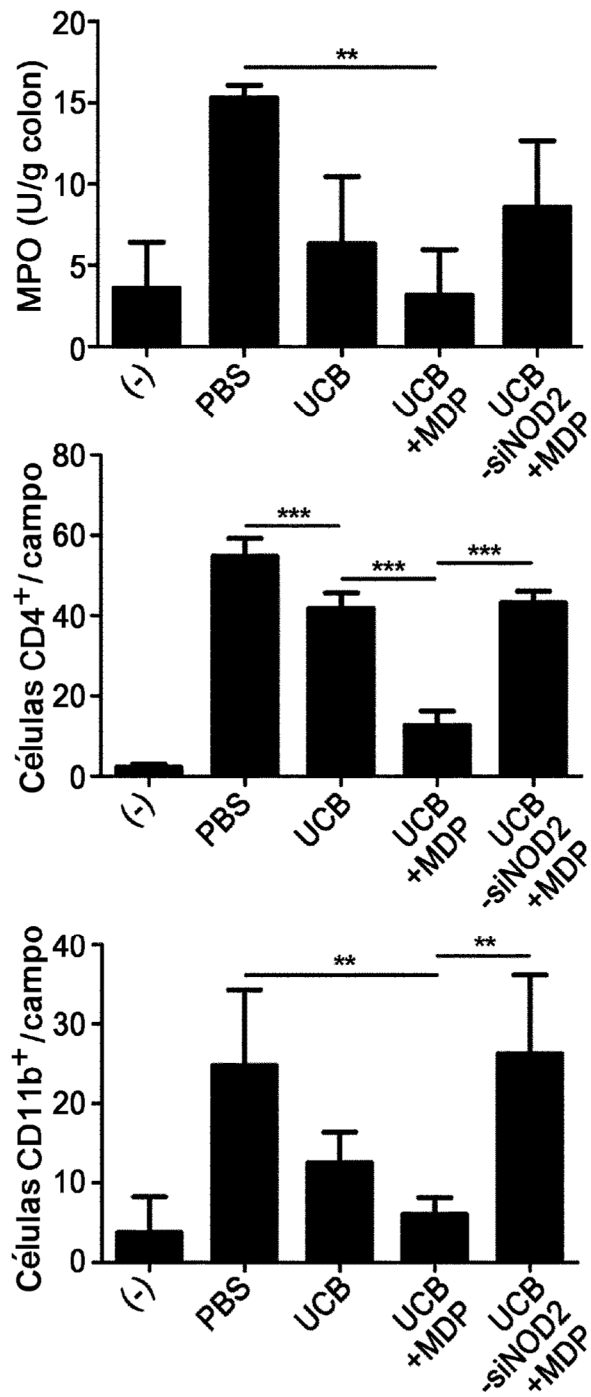
[FIG. 13c]



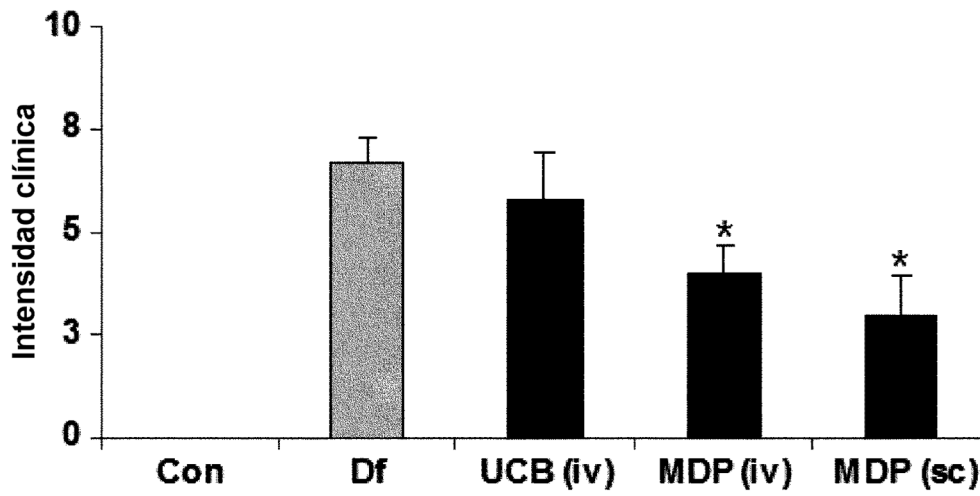
[FIG. 13d]



[FIG. 13e]

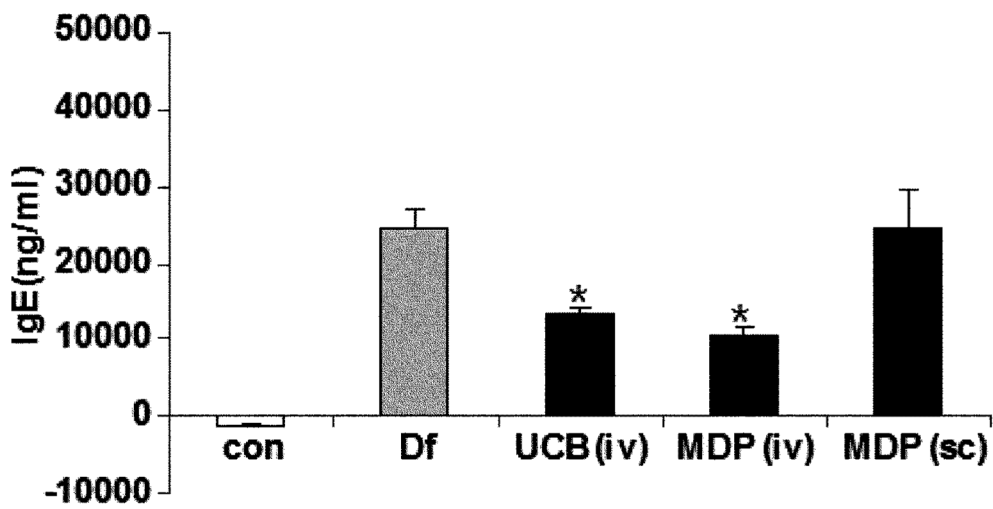


[FIG. 14]



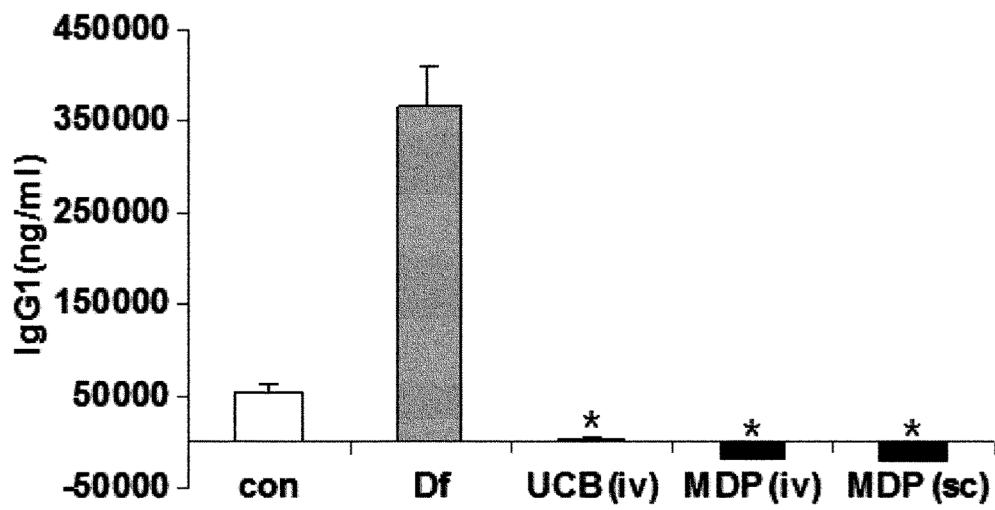
*, significativamente diferente del grupo de Df ($p < 0,05$).

[FIG. 15]



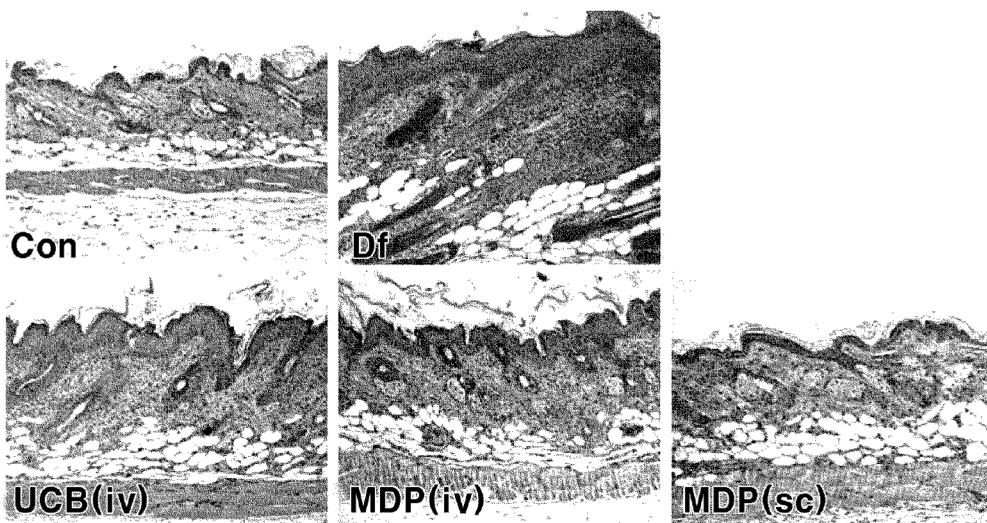
*, significativamente diferente del grupo de Df ($p < 0,05$).

[FIG. 16]



*, significativamente diferente del grupo de Df ($p < 0,05$).

[FIG. 17]



[FIG. 18]

