

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 692**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2006 E 17154939 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3184630**

54 Título: **Poblaciones de células que tienen actividad inmunorreguladora, método de aislamiento y usos**

30 Prioridad:

23.09.2005 EP 05077186

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

01.04.2020

73 Titular/es:

TIGENIX, S.A.U. (50.0%)
Parque Tecnológico de Madrid, C/ Marconi, 1
28760 Tres Cantos (Madrid), ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)

72 Inventor/es:

BÜSCHER, DIRK;
GONZÁLEZ DE LA PEÑA, MANUEL ÁNGEL y
DELGADO MORA, MARIO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 751 692 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

Poblaciones de células que tienen actividad inmunorreguladora, método de aislamiento y usos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas de trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa utilizando poblaciones de células derivadas de tejidos adultos. En particular, la presente invención proporciona una población de células derivadas de tejido conjuntivo que responden a interferón-gamma (IFN-γ) mediante la expresión de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) para su uso en prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de órganos y tejidos trasplantados.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sistema inmunitario en vertebrados superiores representa la primera línea de defensa contra diversos antígenos que pueden entrar en el organismo vertebrado, incluyendo microorganismos tales como bacterias, hongos y virus que son los agentes causantes de una variedad de enfermedades. Además, el sistema inmunitario también participa en una variedad de otras enfermedades o trastornos, incluyendo enfermedades autoinmunitarias o inmunopatológicas, síndromes de inmunodeficiencia, aterosclerosis y diversas enfermedades neoplásicas. Aunque están disponibles métodos para tratar estas enfermedades, muchos tratamientos actuales proporcionan resultados inferiores a los adecuados. Entre las nuevas estrategias terapéuticas emergentes, las basadas en terapia celular parecen constituir una herramienta potencialmente útil para tratar un gran número de enfermedades. Por tanto, los investigadores están realizando actualmente un gran esfuerzo con el fin de lograr dicho objetivo.

ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

30 Las enfermedades autoinmunitarias se producen cuando el sistema inmunitario del organismo, que está destinado a defender al organismo contra bacterias, virus y cualquier otro producto exógeno, presenta un mal funcionamiento y produce una respuesta patológica contra tejidos, células y órganos sanos. Los anticuerpos, las células T y los macrófagos proporcionan una protección beneficiosa, pero también pueden producir respuestas inmunológicas perjudiciales o mortales.

35 Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser específicas de órgano o sistémicas y están provocadas por diferentes mecanismos patógenos. La autoinmunización específica de órgano se caracteriza por la expresión aberrante de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), mimetismo antigénico y variaciones alélicas en genes del CMH. Las enfermedades autoinmunitarias sistémicas implican la activación de células B policlonales y anomalías de las células T inmunorreguladoras, receptores de células T y genes del CMH. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano son diabetes, hipertiroidismo, insuficiencia suprarrenal autoinmunitaria, anemia pura de glóbulos rojos, esclerosis múltiple y carditis reumática. Enfermedades autoinmunitarias sistémicas representativas son lupus eritematoso sistémico, inflamación crónica, síndrome de Sjogren, polimiositis, dermatomiositis y esclerodermia.

45 El tratamiento actual de enfermedades autoinmunitarias implica administrar agentes inmunosupresores tales como cortisona, derivados de aspirina, hidroxicloquina, metotrexato, azatioprina y ciclofosfamida o combinaciones de los mismos. Sin embargo, el dilema al que hay que enfrentarse cuando se administran agentes inmunosupresores es que cuanto más eficazmente se trata la enfermedad autoinmunitaria, más indefenso se deja al paciente frente al ataque de infecciones, y también más susceptible para desarrollar tumores. Por tanto, existe una gran necesidad de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

TRASTORNOS INFLAMATORIOS

55 La inflamación es un proceso mediante el que los glóbulos blancos y factores secretados del organismo protegen nuestros cuerpos de la infección por sustancias exógenas, tales como bacterias y virus. Los factores secretados conocidos como citocinas y prostaglandinas controlan este proceso, y se liberan en una cascada ordenada y autolimitante en la sangre o los tejidos afectados.

60 *Enfermedad inflamatoria del intestino (EII)*

La EII es una familia de enfermedades crónicas, idiopáticas, recurrentes y destructoras de tejido caracterizadas por la disfunción de las células T de la mucosa, alteración en la producción de citocinas e inflamación celular que en última instancia conduce a lesión del intestino delgado distal y de la mucosa del colon. La EII se subdivide clínicamente en dos fenotipos: enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa. La EC es una enfermedad autoinmunitaria incurable hoy en día con una prevalencia del 0,05 % que conduce a inflamación crónica dando como

5 resultado una gama de síntomas gastrointestinales y extraintestinales, incluyendo dolor abdominal, rectorragia, diarrea, pérdida de peso, trastornos oculares y de la piel, maduración sexual y crecimiento retrasados en niños. Estos síntomas pueden afectar en gran medida al bienestar, la calidad de vida y capacidad de función del paciente. Debido a que la EC es crónica y normalmente tiene una aparición antes de los 30 años de edad, los pacientes

10 Los agentes terapéuticos utilizados actualmente para la EC, que incluyen aminosalicilatos, corticosteroides, azatioprina, 6-mercaptopurina, antibióticos y metotrexato, no son completamente eficaces, son no específicos y tienen múltiples efectos secundarios adversos. En la mayoría de los casos, la extirpación quirúrgica es la última alternativa. Por tanto, la presente estrategia terapéutica es hallar fármacos o agentes que modulen específicamente ambos componentes de la enfermedad, es decir, las respuestas inflamatorias y las dirigidas por células T.

15 Recientemente, se ha aprobado el fármaco infliximab para el tratamiento de la enfermedad de Crohn de moderada a grave que no responde a terapias convencionales y para el tratamiento de fístulas drenantes abiertas. Infliximab, el primer tratamiento aprobado específicamente para la enfermedad de Crohn, es un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral (TNF). El TNF es una proteína producida por el sistema inmunitario que puede producir la inflamación asociada con la enfermedad de Crohn. El anticuerpo anti-TNF elimina el TNF de la circulación sanguínea antes de

20 que alcance los intestinos, evitando de ese modo la inflamación. Sin embargo, dado que tiene un efecto sistémico, y TNF es un factor muy pleotrópico, son relativamente comunes efectos secundarios graves, y todavía está por determinar su seguridad a largo plazo. Además, la eficacia está también limitada porque muchos de los procesos inflamatorios que se producen en los pacientes no dependen de la señalización con TNF.

25 *Artritis reumatoide (AR)*

La artritis reumatoide y artritis reumatoide juvenil son tipos de artritis inflamatoria. Artritis es un término general que describe la inflamación en articulaciones. Algunos, pero no todos los tipos de artritis son el resultado de una inflamación mal encauzada. La artritis reumatoide afecta a aproximadamente el 1 % de la población mundial y es esencialmente incapacitante. La artritis reumatoide es un trastorno autoinmunitario en el que el sistema inmunitario del organismo identifica de manera inapropiada las membranas sinoviales que secretan el fluido lubricante en las articulaciones como exógeno. Se produce inflamación, y se dañan o destruyen el cartílago y los tejidos de dentro y alrededor de las articulaciones. El organismo sustituye el tejido dañado con tejido cicatricial, haciendo que se estrechen los espacios normales dentro de las articulaciones y que se unan los huesos.

35 En la artritis reumatoide, existe un ciclo autoinmunitario persistente de presentación de antígenos, estimulación de células T, secreción de citocinas, activación de células sinoviales y destrucción de la articulación.

40 El tratamiento actualmente disponible para la artritis se centra en reducir la inflamación de las articulaciones con medicamentos antiinflamatorios o inmunosupresores. La primera línea de tratamiento de cualquier artritis es normalmente antiinflamatorios, tales como aspirina, ibuprofeno e inhibidores de Cox-2 tales como celecoxib y rofecoxib. También se usan anticuerpos monoclonales humanizados anti-TNF, tales como infliximab; sin embargo, tienen muchos efectos secundarios o efectos adversos y su eficacia es bastante baja. Los "fármacos de segunda línea" incluyen oro, metotrexato y esteroides. Aunque éstos son tratamientos bien establecidos para la artritis, muy pocos pacientes remiten con estas líneas de tratamiento solas, y sigue habiendo aspectos de tratamiento difícil para pacientes con artritis reumatoide.

50 En general, los tratamientos actuales para trastornos inflamatorios crónicos tienen una eficacia muy limitada, y muchos de ellos tienen una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden prevenir completamente la progresión de la enfermedad. Hasta el momento, ningún tratamiento es ideal, y no existe curación para estos tipos de patologías. Por tanto, existe una gran necesidad de nuevas terapias para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

55 INHIBICIÓN DE RESPUESTAS DE CÉLULAS T

Todas las respuestas inmunitarias están controladas por las células T. Las células autorreactivas con el potencial de provocar respuestas autoinmunitarias comprenden una parte del repertorio de células T normales, pero en el estado sano, su activación se evita por las células supresoras. Aunque las células T supresoras se describieron originalmente en la década de 1970, sólo recientemente se ha realizado un progreso significativo en la

60 caracterización de subconjuntos de células T, cuando se les ha dado el nuevo nombre de células T reguladoras.

Hay diferentes subconjuntos de células T CD4⁺, CD8⁺, célula citolítica natural y $\gamma\delta$ con actividad reguladora (supresora). Se han caracterizado dos tipos principales de célula T-reg en la población de CD4⁺, es decir, las células T-reg que se producen de manera natural, generadas en el timo, y las células T-reg secretoras de IL-10 o TGF- β , inducidas periféricamente (células Tr1). Las células T-reg que se producen de manera natural CD4⁺CD25⁺, que expresan Foxp3, generadas en el timo, migran y se mantienen en la periferia. Las señales para su generación en el

timo y mantenimiento en la periferia no están completamente definidas, aunque parece requerirse tanto la estimulación de CD28 como IL-2. El número de células T-reg CD4⁺CD25⁺ en la periferia no disminuye con la edad, aunque estas células son anérgicas y propensas a apoptosis, y su sitio de origen, el timo, experimenta degeneración relacionada con la edad. Esto sugiere que el conjunto de células T-reg CD4⁺CD25⁺ se mantiene periféricamente. Varios modelos experimentales apoyan la idea de la generación periférica de las células T-reg CD4⁺CD25⁺ a partir de células T CD4⁺CD25⁻. Se desconoce la mayoría de los mecanismos y factores endógenos que controlan la expansión periférica de las células T-reg CD4⁺CD25⁺.

Existen pruebas de que la citocina factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) desempeña un papel importante en la expansión de los precursores CD4⁺ CD25⁺ profesionales, derivados del timo, que circulan en la sangre. El TGF-β participa también en la generación de subconjuntos reguladores de CD4⁺ y CD8⁺ inducidos periféricamente.

Sin embargo, datos experimentales recientes sugieren que un mecanismo de inmunotolerancia podría depender del metabolismo del triptófano, y en particular de la actividad de la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), que es una enzima intracelular que contiene hemo que cataliza la etapa inicial limitante de la velocidad en la degradación del triptófano a lo largo de la ruta de la quinurenina.

Existen pruebas considerables que apoyan la hipótesis de que las células que expresan IDO pueden suprimir las respuestas de células T y fomentar la tolerancia (Mellor y Munn, Nat Rev Immunol. octubre de 2004; 4(10):762-74). IDO se expresa en algunos subconjuntos de células dendríticas (CD), que son reguladores clave de la respuesta inmunitaria (CD tolerogénicas). Estas CD pueden suprimir las respuestas de células T *in vivo* mediante la eliminación local de triptófano (patente estadounidense número 2002/0155104). A parte de las CD derivadas de monocitos y los macrófagos, varias líneas tumorales, células intestinales y trofoblastos expresan IDO. La expresión de IDO en los trofoblastos parece ser constitutiva y se ha relacionado fuertemente con la tolerancia del tejido alogénico del feto. Se cree que la IDO induce la apoptosis en las células T y produce tolerancia espontánea a aloinjertos hepáticos.

No se conocen los mecanismos moleculares sobre los que se basa la actividad inmunosupresora de la IDO. Sin embargo, se ha demostrado que las CD que expresan IDO pueden inducir la generación de células T reguladoras. IDO se induce en células humanas mediante varios mediadores inflamatorios, incluyendo interferones y lipopolisacárido (LPS), así como mediante infección vírica. Varios estudios han demostrado que las células tumorales alogénicas que son rechazadas por el sistema inmunitario huésped *in vivo* regulan por incremento la IDO y este efecto está mediado por el IFN-γ.

Experimentos recientes han indicado una capacidad inmunosupresora *in vitro* de las células madre mesenquimatosas derivadas de la médula ósea (CMM) y las células madre derivadas de tejido adiposo (CMA), así como una capacidad inmunosupresora *in vivo* de las CMM. Se ha estudiado esta actividad *in vivo* en trasplantes de médula ósea, en los que la infusión de CMM expandidas parece reducir la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) aguda y crónica. El efecto *in vitro* se caracteriza por una supresión de la proliferación de linfocitos en experimentos en los que los linfocitos se activaron o bien mediante la reacción mixta de linfocitos (RML) o bien la estimulación con fitohemaglutinina (PHA). Sin embargo, no se han identificado claramente los mecanismos moleculares responsables de los efectos inmunosupresores de dichas células.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se basa en el descubrimiento de que ciertas poblaciones de células con potencial de múltiples linajes que están presentes en diferentes tejidos conjuntivos pueden actuar como agentes inmunorreguladores *in vivo* e *in vitro*. Los inventores han aislado una población de células derivadas de tejido conjuntivo que responden a interferón-gamma (IFN-γ) mediante la expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Los efectos inmunorreguladores de dichas células pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de órganos y tejidos trasplantados.

En particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células aisladas de tejido conjuntivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable caracterizada en que las células de dicha población: de células expresan indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) tras la estimulación con interferón gamma (IFN-γ), para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, en la que la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria del intestino, en la que las células de la población celular se prepararan mediante un método que comprende cultivar células sin diferenciación sobre una superficie sólida en presencia de un medio de cultivo adecuado o un suero adecuado e incubar las células en condiciones que permitan a las células adherirse a la superficie sólida y proliferar, y en la que el método comprende seleccionar células que quedan adheridas a la superficie sólida después de al menos dos pases.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra la cinética de crecimiento de las células proporcionadas por la presente invención aisladas de tejido adiposo humano y cultivadas *ex vivo* durante más de 25 duplicaciones de la población de células.

5 La figura 2 muestra histogramas de inmunocitometría de fluorescencia correspondientes al perfil de marcadores de superficie obtenido de las células proporcionadas para el uso de la presente invención aisladas de tejido adiposo humano. Los histogramas correspondientes a los controles de isotipo (controles negativos) se muestran sombreados en gris.

10 La figura 3 muestra el análisis de la expresión de IDO tras incubar las células proporcionadas para el uso de la presente invención aisladas de tejido adiposo humano con diferentes reactivos proinflamatorios durante diferentes periodos de tiempo, detectada por medio de RT-PCR (figura 3A) o inmunotransferencia (figura 3B). IL-1, interleucina 1; TNF- α , factor de necrosis tumoral-alfa; LPS, lipopolisacárido; IFN- γ , interferón-gamma; C-, control negativo; C+, control positivo; n.i., células no inducidas con IFN- γ . Se usa GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como control de carga de la RT-PCR.

15 La figura 4 muestra la detección mediante inmunotransferencia de la expresión de IDO tras 48 horas de tratamiento con IFN- γ de las células proporcionadas para el uso de la presente invención aisladas de diferentes tejidos humanos (adiposo, médula ósea, cartílago y piel). Ctrl-, control negativo (medio de cultivo); Ctrl+, control positivo; (-), células no tratadas con IFN- γ ; (+), células tratadas con IFN- γ durante 48 horas.

20 La figura 5 muestra la pérdida de peso corporal en ratones tratados con administración de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico). La figura muestra una mejora dependiente de la dosis del peso ganado tras la administración de las células proporcionadas para el uso de la presente invención aisladas de tejido adiposo humano. Tras 10 días, los ratones que recibieron 1×10^6 células no mostraron una diferencia de peso significativa en comparación con el grupo control.

25 La figura 6 muestra la tasa de supervivencia de los ratones tratados con TNBS tras la administración de las células proporcionadas para el uso de la presente invención aisladas de tejido adiposo humano. De nuevo, puede observarse una dependencia de la dosis, mostrando 1×10^6 células un efecto más fuerte que $0,3 \times 10^6$ células, aunque en ambos casos las células mejoraron significativamente la tasa de supervivencia de los ratones tratados con TNBS.

30 La figura 7 muestra la comparación del peso corporal en ratones tratados con TNBS tras la administración de 1×10^6 células proporcionadas para el uso de la presente invención aisladas de tejido adiposo humano y 1×10^6 de las mismas células preestimuladas con 30 ng/ml de IFN- γ durante 48 horas. La gráfica muestra la grave pérdida de peso en los ratones tratados con TNBS y una clara mejora tras 3 días en los ratones que recibieron células. Tras 8 días, estos ratones mostraron incluso una ganancia de peso, mientras que los ratones control (ratones tratados con TNBS sin administración de células) mostraban aún una grave pérdida de peso. Además, las células preestimuladas con IFN- γ mostraron una recuperación más rápida y más fuerte del tratamiento con TNBS que las células no preestimuladas.

35 La figura 8 muestra los datos de la figura 7 como "experimento 1" y además los datos de un conjunto de datos adicional "experimento 2" descrito en el ejemplo 5. La gráfica muestra que los ratones tratados con TNBS perdieron peso drásticamente y una clara mejora en los ratones que recibieron células. Esta mejora podía medirse también mediante la gravedad de la colitis

40 La figura 9 muestra que todas las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1b, IL-12, e IFN γ) y quimiocinas (MIP-2 y RANTES) sometidas a prueba, tanto en el colon (respuesta local) como en el suero (respuesta sistémica), eran inferiores en los animales tratados con células en comparación con los ratones no tratados.

45 La figura 10 muestra que la infiltración de neutrófilos, tal como se mide mediante la actividad MPO, era inferior en los animales tratados con CMA, e incluso inferior cuando las células estaban preestimuladas con IFN- γ

50 La figura 11 muestra que las células marcadas con CFSE estaban localizadas en los ganglios linfáticos de drenaje de los animales tratados por medio de citometría celular. Esta es la ubicación esperada si las células administradas estuviesen actuando como CPA.

55 La figura 12 muestra la inducción de marcadores de CPA en CMA humanas mediante tratamiento con IFN- γ . Fila superior: histogramas citométricos de CMA sin tratar; fila inferior, histogramas citométricos de CMA tras el tratamiento con IFN- γ durante 4 días. Los controles de isotipo se muestran sombreados en negro.

60 La figura 13 muestra que las células divulgadas por este documento disminuyen la gravedad e incidencia de AIC. A, gravedad de la artritis, evaluada mediante la puntuación clínica o la medición del grosor de la pata, en ratones con AIC establecida inyectados. Los números entre paréntesis representan la incidencia de artritis (% de ratones con puntuación de artritis > 2 el día 50) en los grupos control, i.p. e i.a. Las imágenes muestran ejemplos representativos de la hinchazón de la pata en ratones de los diferentes grupos experimentales (control y CMA i.p.). n=8-11 ratones

por grupo. $p < 0,001$ frente al control tras el día 32. Actividad mieloperoxidasa (MPO) que mide la infiltración de neutrófilos en las articulaciones. $*p < 0,001$ frente al control.

5 La figura 14 muestra la inhibición de la respuesta inflamatoria. Expresión sistémica y local de los mediadores inflamatorios en ratones sin tratar (control) o ratones con AIC tratados con CMA el día 35 posterior a la inmunización. A, Contenido en citocinas/quimiocinas en las articulaciones. Se analizó una pata de un ratón no inmunizado simultáneamente para evaluar la respuesta basal. B, Niveles de TNF α e IL-1 β en suero. $n=6-8$ ratones/grupo. $*p < 0,001$ frente a los controles.

10 La figura 15 muestra que las células divulgadas por este documento regulan por disminución la respuesta mediada por Th1 en la AIC. A, Respuesta proliferativa y producción de citocinas de células de ganglios linfáticos de drenaje (GLD) aisladas el día 30 de ratones sin tratar (control) o ratones con AIC tratados con CMA y estimuladas *in vitro* con diferentes concentraciones de CII. La estimulación de células de GLD con anticuerpos anti-CD3 (∇ , para ratones con AIC sin tratar; ∇ , para ratones con AIC tratados con AM) se usa para evaluar la estimulación no específica. Se usó un conjunto células de GLD de 3 ratones DBA/1 no inmunizados para evaluar la respuesta basal. $n=5$ ratones/grupo. B, Número de células T productoras de citocinas específicas de CII. Se reestimularon células de GLD de ratones sin tratar (control) o ratones con AIC tratados con CMA *in vitro* con CII (10 $\mu\text{g/ml}$) y se analizaron para determinar la expresión de citocinas intracelulares y CD4 mediante citometría de flujo (para la expresión de IFN γ /TNF α o IL-4/IL-10 en células T CD4 seleccionadas). Se muestra el número de células T que expresan IFN γ , IL-4 e IL-10 respecto a 10^4 células T CD4. Los datos mostrados representan los valores reunidos de dos experimentos independientes. C, Respuesta proliferativa específica de CII en células de la membrana sinovial aisladas de ratones sin tratar (control) o ratones con AIC tratados con CMA y estimuladas *in vitro* con CII (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 h. Los datos muestran los resultados de células sinoviales reunidas de 3 animales por grupo. D, Niveles de IgG, IgG1 e IgG2a específicas de CII en suero recogido el día 35 de ratones sin tratar (control) o ratones con AIC tratados con CMA (8-12 ratones/grupo). $*p < 0,001$ frente a los controles.

La figura 16.A. muestra que tanto los GLD como la membrana sinovial de ratones con AIC tratados con las células divulgadas por este documento inducen un aumento en los números de células T reguladoras (CD4 $^+$ CD25 $^+$ Foxp3 $^+$), sin ningún aumento en los números de células T efectoras, en comparación con los ratones con AIC sin tratar (control).

La figura 16.B. muestra que los ratones con AIC tratados con las células divulgadas por el documento, pero no los ratones con AIC control (sin tratar), contienen células T reguladoras que inhiben específicamente la respuesta de células T efectoras contra CII.

La figura 17 muestra que el cultivo conjunto de CMA y linfocitos produce una inhibición de la proliferación de linfocitos.

La figura 18 muestra que las CMA sembradas en placa a 5000 células/cm 2 y estimuladas con IFN- γ 3 ng/ml durante hasta 120 horas producenIDO, cuya actividad se mide mediante la metabolización del triptófano y la producción de quinurenina usando HPLC.

La figura 19 muestra que las CMA sembradas en placa a 5000 células/cm 2 y estimuladas con IFN- γ 3 pg/ml durante hasta 120 horas no producenIDO. No pudo detectarse quinurenina.

La figura 20 muestra que las CMA sembradas en placa a 500 células/cm 2 y estimuladas con IFN- γ 3 ng/ml durante hasta 120 horas no producen cantidades significativas deIDO.

La figura 21A muestra células que han fagocitado dextrano-FITC en una imagen en campo claro. La figura 21B muestra la misma población usando microscopía de fluorescencia usando filtros de proteína fluorescente verde.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se ha mencionado previamente, los inventores han encontrado que ciertas poblaciones de células con potencial de múltiples linajes que están presentes en diversos, si no en todos, tejidos conjuntivos y responden a interferón-gamma (IFN- γ) mediante la expresión de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) pueden actuar como agentes inmunorreguladores *in vivo* e *in vitro*. Los efectos inmunorreguladores inmunosupresores de dichas células pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados.

En particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células aisladas de tejido conjuntivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable caracterizada en que las células de dicha población: de células expresan indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) tras la estimulación con interferón gamma (IFN- γ), para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, en la que la enfermedad

inflamatoria es enfermedad inflamatoria del intestino, en la que las células de la población celular se prepararan mediante un método que comprende cultivar células sin diferenciación sobre una superficie sólida en presencia de un medio de cultivo adecuado o un suero adecuado e incubar las células en condiciones que permitan a las células adherirse a la superficie sólida y proliferar, y en la que el método comprende seleccionar células que quedan adheridas a la superficie sólida después de al menos dos pases.

Definiciones

Con el fin de facilitar la comprensión de la presente descripción, a continuación se explicará el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención. A lo largo de la descripción se incluirán definiciones adicionales cuando sea necesario.

La expresión “células presentadoras de antígeno” (CPA) se refiere a una población de células que presenta antígeno exógeno en complejo con CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) sobre su superficie. Aunque casi cada célula del organismo puede presentar antígenos a células T, la expresión “células presentadoras de antígeno” (CPA) se limita en el presente documento a aquellas células especializadas, denominadas también CPA profesionales, que expresan HLAII en su superficie, y se derivan del linaje monocito-macrófago (por ejemplo, células dendríticas).

La expresión “enfermedad autoinmunitaria” se refiere a un estado en un sujeto caracterizado por lesión celular, de tejido y/o de órgano producida por una reacción inmunológica del sujeto hacia sus propias células, tejidos y/u órganos. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes, de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse con la población de células divulgada por este documento incluyen alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ovaritis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampuloso, cardiomiopatía, celiaquía-dermatitis, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (SFCDI), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad por crioglobulina, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o mediada inmunológicamente, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, síndrome de Goodpasture, síndrome de rigidez muscular, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis dermatitis herpetiforme, vitiligo, granulomatosis de Wegener, etc.

La expresión “agente inmunorregulador” se refiere a un agente que inhibe o reduce una o más actividades biológicas del sistema inmunitario. Un agente inmunorregulador es un agente que inhibe o reduce una o más actividades biológicas (por ejemplo, la proliferación, la diferenciación, la sensibilización, la función efectora, la producción de citocinas o la expresión de antígenos) de una o más células inmunitarias (por ejemplo, células T).

La expresión “enfermedad inflamatoria” se refiere a un estado en un sujeto caracterizado por inflamación, por ejemplo, inflamación crónica. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), asma, encefalitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), osteólisis inflamatoria, trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), vasculitis inflamatorias (por ejemplo, poliarteritis nudosa, granulomatosis de Wegner, arteritis de Takayasu, arteritis temporal y granulomatosis linfomatoide), angioplastia vascular postraumática (por ejemplo, reestenosis tras angioplastia), espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, hepatitis crónica e inflamación crónica resultante de infecciones bacterianas o víricas crónicas.

El término “aislada” aplicado a una población de células se refiere a una población de células, aisladas del organismo humano o animal, que está sustancialmente libre de una o más poblaciones de células que están asociadas con dicha población de células *in vivo* o *in vitro*.

El término “CMH” (complejo mayor de histocompatibilidad) se refiere a un subconjunto de genes que codifican proteínas presentadoras de antígeno de superficie celular. En los seres humanos, estos genes se denominan genes de antígeno leucocitario humano (HLA). En el presente documento, las abreviaturas CMH o HLA se usan de manera intercambiable.

El término “sujeto” se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un caballo, un gato, una rata o un ratón) y un primate (por ejemplo, un mono o un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

La expresión "célula T" se refiere a células del sistema inmunitario que son un subconjunto de linfocitos que expresan el receptor de células T (RCT).

5 La expresión "células T reguladoras" (células T-reg) se refiere a subconjuntos de células T que suprimen de manera activa la activación del sistema inmunitario y evitan la autorreactividad patológica, es decir una enfermedad autoinmunitaria.

10 Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno incluyendo, pero sin limitarse a, un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad mediada inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados, que resulta de la administración de la población de células divulgadas en el documento, la población de células T-reg divulgadas en el documento, o la población de células preestimuladas con IFN- γ divulgadas en el documento, o una composición farmacéutica que comprende las mismas, a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

15 La expresión "terapia de combinación" se refiere al uso de las poblaciones de células divulgadas por el presente documento con otros agentes activos o modalidades de tratamiento, de la manera del presente documento para la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno incluyendo, pero sin limitarse a, un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad mediada inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados. Estos otros agentes o tratamientos pueden incluir terapias y fármacos conocidos para el tratamiento de tales trastornos. Las poblaciones de células divulgadas por este documento también pueden combinarse con corticosteroides, compuestos antiinflamatorios no esteroideos, u otros agentes útiles para tratar la inflamación. El uso combinado de los agentes del presente documento con estas otras terapias o modalidades de tratamiento puede ser simultáneo, o administrarse secuencialmente, es decir, los dos tratamientos pueden dividirse de modo que una población de células o una composición farmacéutica que comprende la misma del presente documento puede administrarse antes o después de la otra terapia o modalidad de tratamiento. El médico responsable del paciente puede decidir sobre la secuencia apropiada de administración de la población de células, o una composición farmacéutica que comprende la misma, en combinación con otros agentes, terapia o modalidad de tratamiento.

30 **Células divulgadas por el presente documento**

La población de células aisladas que forma parte de la composición farmacéutica para el uso de la presente invención se caracteriza porque las células de dicha población de células:

- 35 a) no expresan marcadores específicos para células presentadoras de antígeno (CPA),
- b) no expresan indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) de manera constitutiva, en donde se entiende que de manera constitutiva significa la expresión de un gen sin ninguna inducción específica.
- 40 c) expresan IDO tras la estimulación con interferón-gamma (IFN- γ) y,
- d) presentan capacidad para diferenciarse en al menos dos linajes celulares.

45 Las células de la población de células que forman parte de la composición farmacéutica para el uso de la presente invención, denominadas a continuación en el presente documento las "células divulgadas por este documento" derivan de tejido conjuntivo. La expresión "tejido conjuntivo" se refiere a un tejido derivado de mesénquima e incluye varios tejidos que se caracterizan porque sus células están incluidas en la matriz extracelular. Entre los diferentes tipos de tejidos conjuntivos, se incluyen los tejidos adiposo y cartilaginoso. En una realización particular, las células divulgadas por este documento son de la fracción del estroma del tejido adiposo. En otra realización particular, las células divulgadas por este documento se obtienen de condrocitos, las únicas células que se encuentran en el cartílago hialino. En otra realización particular, las células divulgadas por este documento se obtienen de la piel. También, en otra realización particular, las células divulgadas por este documento se obtienen de la médula ósea.

55 Las células divulgadas por este documento pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada de tejido conjuntivo de cualquier animal adecuado, incluyendo seres humanos. En general, dichas células se obtienen de tejidos conjuntivos de mamífero postnatales no patológicos. En una realización preferida, las células divulgadas por este documento se obtienen de una fuente de tejido conjuntivo, tal como la fracción del estroma de tejido adiposo, cartílago hialino, médula ósea, piel etc. También, en una realización particular, las células de la población de células divulgadas por este documento son de un mamífero, por ejemplo, un roedor, primate, etc., preferiblemente, de un ser humano.

60 Tal como se mencionó anteriormente, las células divulgadas por este documento se caracterizan porque (i) no expresan marcadores específicos de CPA; (ii) no expresan IDO de manera constitutiva; (iii) expresan IDO tras la estimulación con IFN- γ ; y (iv) presentan capacidad para diferenciarse en al menos dos linajes celulares.

65

Marcadores

Las células divulgadas por este documento son negativas para al menos uno, dos, tres, cuatro o preferiblemente todos los siguientes marcadores CD11b, CD11c, CD14, CD45 y HLAII, que son marcadores específicos para los linajes de CPA. Por tanto, las células divulgadas por este documento no constituyen una subpoblación descrita previamente de CPA especializadas.

Además, las células divulgadas por este documento son negativas para al menos uno, dos de, o preferiblemente todos los siguientes marcadores de superficie celular: CD31, CD34 y CD133.

Tal como se usa en el presente documento, "negativo" con respecto a los marcadores de superficie celular significa que, en una población de células que comprende las células divulgadas por este documento, menos del 10 %, preferiblemente el 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o ninguna de las células muestran una señal para un marcador de superficie celular específico en citometría de flujo por encima de la señal de fondo, usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo un sistema FACS Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos disponibles comercialmente y protocolos convencionales conocidos en la técnica). En una realización particular, las células divulgadas por este documento se caracterizan porque expresan al menos uno, dos, tres, cuatro de o preferiblemente todos los siguientes marcadores de superficie celular: CD9, CD44, CD54, CD90 y CD105; es decir, las células divulgadas por el presente documento son positivas para al menos uno, dos, tres, cuatro de y preferiblemente todos los dichos marcadores de superficie celular (CD9, CD44, CD54, CD90 y CD105). Preferiblemente, las células divulgadas por el presente documento se caracterizan porque tienen niveles de expresión significativos de al menos uno, dos, tres, cuatro de y preferiblemente todos los dichos marcadores de superficie celular (CD9, CD44, CD54, CD90 y CD105). Tal como se usa en el presente documento, el término "expresión significativa" significa que, en una población de células que comprende las células divulgadas por el presente documento, más del 10 %, preferiblemente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o todas las células muestran una señal para un marcador de superficie celular específico en citometría de flujo por encima de la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo un sistema FACS Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos disponibles comercialmente y protocolos convencionales conocidos en la técnica). La señal de fondo se define como la intensidad de señal proporcionada por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico utilizado para detectar cada marcador de superficie en análisis FACS convencional. Por tanto, para que un marcador se considere positivo, la señal específica observada es más fuerte del 10 %, preferiblemente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 500 %, 1000 %, 5000 %, 10 000 % o superior, que la intensidad de la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema FACS Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos comercialmente disponibles y protocolos convencionales conocidos en la técnica).

Opcionalmente, las células divulgadas por este documento también son negativas para el marcador de superficie celular CD106 (VCAM-1). Ejemplos de tales células son ciertas poblaciones de células madre del estroma derivadas de tejido adiposo tal como se describe en el presente documento.

Pueden usarse anticuerpos monoclonales conocidos y disponibles comercialmente contra dichos marcadores de superficie celular (por ejemplo, receptores celulares y proteínas transmembrana) para identificar las células divulgadas por este documento.

Expresión de IDO

Las células divulgadas por este documento no expresan IDO de manera constitutiva, pero expresan IDO tras la estimulación con IFN-γ. Los experimentos llevados a cabo por los inventores han demostrado que dichas células, tras la estimulación con otros mediadores proinflamatorios por sí mismos, tales como interleucina-1 (IL-1) utilizada a una concentración de 3 ng/ml, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α) utilizado a una concentración de 50 ng/ml o la endotoxina LPS utilizada a una concentración de 100 ng/ml, no inducían la expresión de IDO, tal como se mide mediante RT-PCR y análisis de inmunotransferencia convencionales. La estimulación con IFN-γ por ejemplo a 3 ng/ml o superior también puede inducir la expresión de HLAII en las células divulgadas por este documento para dar una señal positiva tal como se define en el presente documento para un marcador de superficie celular. Dicha expresión puede detectarse por los expertos en la materia usando cualquier técnica conocida que permita la detección de la expresión de proteínas específicas. Preferiblemente, dichas técnicas son técnicas de citometría celular.

Diferenciación

Las células divulgadas por este documento presentan la capacidad de proliferar y diferenciarse en al menos dos, más preferiblemente tres, cuatro, cinco, seis, siete o más linajes celulares. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes de linajes celulares en los que las células divulgadas por este documento pueden diferenciarse incluyen osteocitos, adipocitos, condrocitos, tenocitos, miocitos, cardiomiocitos, células del estroma que mantienen la hematopoyesis, células endoteliales, neuronas, astrocitos y hepatocitos.

Las células divulgadas por este documento pueden proliferar y diferenciarse a células de otros linajes mediante métodos convencionales. Los métodos de identificación y posteriormente aislamiento de células diferenciadas de sus homólogas no diferenciadas también pueden llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

5 Las células divulgadas por este documento también pueden expandirse *ex vivo*. Es decir, tras el aislamiento, las células divulgadas por este documento pueden mantenerse y dejarse proliferar *ex vivo* en medio de cultivo. Tal medio está compuesto de, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con antibióticos (por ejemplo, penicilina 100 unidades/ml y estreptomina 100 µg/ml) o sin antibióticos, y glutamina 2 mM, y complementado con suero bovino fetal (FBS) al 2-20 %. Está dentro del conocimiento de un experto en la materia
 10 modificar o modular las concentraciones de los medios y/o complementos de los medios según sea necesario para las células utilizadas. Los sueros contienen con frecuencia factores celulares y no celulares y componentes que son necesarios para la viabilidad y la expansión. Los ejemplos de sueros incluyen FBS, suero bovino (BS), suero de ternero (CS), suero de ternero fetal (FCS), suero de ternero recién nacido (NCS), suero de cabra (GS), suero de caballo (HS), suero porcino, suero de oveja, suero de conejo, suero de rata (RS), etc. También se contempla, si las células divulgadas por este documento son de origen humano, complementar el medio de cultivo celular con un suero humano, preferiblemente de origen autólogo. Se entiende que los sueros pueden inactivarse por calor a 55-65 °C si se considera necesario para inactivar los componentes de la cascada del complemento. La modulación de las concentraciones de suero, la retirada del suero del medio de cultivo también puede usarse para fomentar la supervivencia de uno o más tipos celulares deseados. Preferiblemente, las células divulgadas por este documento
 20 se beneficiarán de concentraciones de FBS de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 25 %. En otra realización, las células divulgadas por este documento pueden expandirse en un medio de cultivo de composición definida, en el que el suero se sustituye por una combinación de seroalbúmina, transferrina de suero, selenio y proteínas recombinantes incluyendo, pero sin limitarse a: insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) tal como se conoce en la técnica.

25 Muchos medios de cultivo celular ya contienen aminoácidos; sin embargo, algunos requieren complementación antes del cultivo de células. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, L-alanina, L-arginina, ácido L-aspártico, L-asparragina, L-cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-glicina y similares.

30 También se usan normalmente agentes antimicrobianos en el cultivo celular para mitigar la contaminación bacteriana, micoplásmica y fúngica. Normalmente, los antibióticos o compuestos antimicóticos utilizados son mezclas de penicilina/estreptomina, pero también pueden incluir, pero no se limitan a anfotericina (Fungizone®), ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, etc.

35 También pueden usarse hormonas de manera ventajosa en el cultivo celular e incluyen, pero no se limitan a, D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona, b-estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, somatostatina/hormona del crecimiento humana (HGH), etc.

40 Las condiciones de mantenimiento de las células divulgadas por este documento también pueden contener factores celulares que permitan a las células permanecer en una forma no diferenciada. Es evidente para los expertos en la materia que antes de la diferenciación, los complementos que inhiben la diferenciación celular deben eliminarse del medio de cultivo. También es evidente que no todas las células requerirán estos factores. De hecho, estos factores pueden provocar efectos indeseados, dependiendo del tipo celular.

45 De manera ventajosa, las células divulgadas por este documento carecen de actividad tumorigénica *in vivo*. Por tanto, dichas células se caracterizan porque no presentan actividad tumorigénica, es decir, no presentan un comportamiento alterado o un fenotipo proliferativo que dé lugar a una célula tumoral.

50 En una realización, las células divulgadas por este documento pueden administrarse a un sujeto que padece enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias o enfermedades mediadas inmunológicamente, tales como rechazo de tejidos y órganos trasplantados, para suprimir la respuesta inmunitaria. Por tanto, es necesario que las células divulgadas por este documento no presenten actividad tumorigénica.

55 La actividad tumorigénica de las células divulgadas por este documento puede someterse a prueba realizando estudios en animales usando cepas de ratones inmunodeficientes. En estos experimentos, se implantan varios millones de células por vía subcutánea en los animales receptores, que se mantienen durante varias semanas y se analizan para detectar la formación de tumores. En el ejemplo 3 se divulga un ensayo particular.

60 Las células divulgadas por este documento pueden transfectarse o modificarse mediante ingeniería genética para expresar, al menos, un polipéptido antigénico. En una realización, el antígeno comprende un polipéptido purificado o sintético o recombinante que representa un antígeno específico frente al que se desea inducir tolerancia, o un fragmento polipeptídico sintético corto derivado de la secuencia de aminoácidos de un antígeno de este tipo. Preferiblemente, la fuente de antígeno comprende antígenos expresados por un injerto de tejido donante. También preferiblemente, la fuente de antígeno comprende una proteína frente a la que un paciente tiene un trastorno autoinmunitario.
 65

Método para aislar células que expresan IDO

En un aspecto, el presente documento divulga un método para aislar una población de células de tejido conjuntivo, en el que las células de dicha población de células presentan un fenotipo caracterizado porque (i) no expresan marcadores específicos de CPA; (ii) no expresan IDO de manera constitutiva; (iii) expresan IDO tras la estimulación con IFN- γ ; y (iv) presentan capacidad para diferenciarse en al menos dos linajes celulares, dicho método comprende las etapas de:

- (i) preparar una suspensión celular de una muestra de un tejido conjuntivo;
- (ii) recuperar las células de dicha suspensión celular;
- (iii) incubar dichas células en un medio de cultivo celular adecuado sobre una superficie sólida en condiciones que permitan a las células adherirse a la superficie sólida y proliferar;
- (iv) lavar dicha superficie sólida tras la incubación para eliminar las células no adheridas;
- (v) seleccionar las células que tras pasarse al menos dos veces en tal medio permanecen adheridas a dicha superficie sólida; y
- (vi) confirmar que la población de células seleccionada presenta el fenotipo de interés.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "superficie sólida" se refiere a cualquier material que permita a las células divulgadas por este documento adherirse. En una realización particular, dicho material es un material plástico tratado para fomentar la adhesión de células de mamífero a su superficie, por ejemplo, placas de poliestireno disponibles comercialmente recubiertas opcionalmente con poli-D-lisina u otros reactivos.

Las etapas (i)-(vi) pueden llevarse a cabo mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. En resumen, las células divulgadas por este documento pueden obtenerse por medios convencionales de cualquier fuente adecuada de tejido conjuntivo de cualquier animal adecuado, incluyendo seres humanos, por ejemplo, de tejido adiposo o tejido cartilaginoso humano. El animal puede estar vivo o muerto, siempre que las células de tejido conjuntivo del animal sean viables. Normalmente, las células de tejido adiposo humanas se obtienen de donantes vivos, usando protocolos bien reconocidos tales como lipectomía quirúrgica o de succión. De hecho, debido a que los procedimientos de liposucción son tan comunes, el efluente de liposucción es una fuente particularmente preferida de la que pueden derivarse las células divulgadas por este documento. Por tanto, en una realización particular, las células divulgadas por este documento son de la fracción del estroma de tejido adiposo humano obtenido mediante liposucción. En otra realización particular, las células divulgadas por este documento son de cartílago articular hialino humano obtenido mediante técnicas artroscópicas. En otra realización particular, las células divulgadas por este documento son de piel humana obtenida mediante técnicas de biopsia. También en otra realización particular, las células divulgadas por este documento son de médula ósea humana obtenida mediante aspiración.

La muestra de tejido conjuntivo se lava, preferiblemente, antes de procesarse para separar las células divulgadas por este documento del material restante. En un protocolo, la muestra de tejido conjuntivo se lava con solución salina fisiológicamente compatible (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS)) y luego se agita vigorosamente y se deja sedimentar, una etapa que elimina la materia suelta (por ejemplo, tejido dañado, sangre, eritrocitos, etc.) del tejido. Por tanto, las etapas de lavado y de sedimentación se repiten generalmente hasta que el sobrenadante está relativamente libre de desechos. Las células restantes estarán presentes normalmente en grupos de diversos tamaños, y el protocolo continúa usando etapas calibradas para degradar la estructura macroscópica mientras que minimiza el daño a las propias células. Un método para lograr este fin es tratar los grumos lavados de células con una enzima que debilita o destruya enlaces entre las células (por ejemplo, colagenasa, dispasa, tripsina, etc.). La cantidad y duración de tal tratamiento enzimático variarán, dependiendo de las condiciones empleadas, pero el uso de tales enzimas se conoce generalmente en la técnica. Alternativamente o junto con tal tratamiento enzimático, los grumos de células pueden degradarse usando otros tratamientos, tales como agitación mecánica, energía acústica, energía térmica, etc. Si la degradación se consigue mediante métodos enzimáticos, es deseable neutralizar la enzima tras un periodo adecuado, para minimizar los efectos perjudiciales sobre las células.

La etapa de degradación produce normalmente una mezcla espesa o suspensión de células agregadas y una fracción fluida que contiene generalmente células del estroma libres (por ejemplo, glóbulos rojos, células de músculo liso, células endoteliales, fibroblastos y células madre). La siguiente fase en el procedimiento de separación es separar las células agregadas de las células divulgadas por este documento. Esto puede lograrse mediante centrifugación, que provoca que las células formen un sedimento cubierto por un sobrenadante. El sobrenadante puede entonces desecharse y resuspenderse el sedimento en un líquido fisiológicamente compatible. Además, las células resuspendidas incluyen normalmente eritrocitos, y en la mayoría de los protocolos es deseable lisarlos. En la técnica se conocen métodos para lisar selectivamente eritrocitos, y puede emplearse cualquier protocolo adecuado (por ejemplo, incubación en un medio hiper o hipotónico, mediante lisis usando cloruro de amonio, etc.). Por

supuesto, si se lisan los eritrocitos, deben separarse entonces las células restantes del lisado, por ejemplo, mediante filtración, sedimentación o fraccionamiento por densidad.

Independientemente de si se lisan los eritrocitos, las células resuspendidas pueden lavarse, volverse a centrifugar y resuspenderse una o más veces sucesivas para lograr una pureza mayor. Alternativamente, las células pueden separarse basándose en el perfil de marcador de superficie celular o basándose en la granularidad y el tamaño celular.

Tras el aislamiento y la resuspensión finales, las células pueden cultivarse y, si se desea, someterse a ensayo para determinar su número y viabilidad para evaluar el rendimiento. De manera deseable, las células se cultivarán sin diferenciación, sobre una superficie sólida, usando un medio de cultivo celular adecuado, a las densidades celulares y condiciones de cultivo apropiadas. Por tanto, en una realización particular, las células se cultivan sin diferenciación sobre una superficie sólida, fabricada habitualmente de un material plástico, tal como placas Petri o botellas de cultivo celular, en presencia de un medio de cultivo celular adecuado [por ejemplo, DMEM, normalmente complementado con el 5-15 % (por ejemplo, el 10 %) de un suero adecuado, tal como suero bovino fetal o suero humano], e incubado en condiciones que permitan a las células adherirse a la superficie sólida y proliferar. Tras la incubación, las células se lavan con el fin de eliminar las células no adheridas y los fragmentos celulares. Las células se mantienen en cultivo y en las mismas condiciones hasta que alcanzan la confluencia adecuada, normalmente, aproximadamente el 80 % de confluencia celular, con sustitución del medio de cultivo celular cuando sea necesario. Tras alcanzar la confluencia celular deseada, las células pueden expandirse por medio de pases consecutivos usando un agente de separación tal como tripsina y sembrando sobre una superficie de cultivo celular más grande a la densidad celular apropiada (habitualmente 2.000-10.000 células/cm²). Por tanto, las células se pasan entonces al menos dos veces en tal medio sin diferenciación, mientras que conservan aún su fenotipo de desarrollo, y más preferiblemente, las células pueden pasarse al menos 10 veces (por ejemplo, al menos 15 veces o incluso al menos 20 veces) sin perder el fenotipo de desarrollo. Normalmente, las células se siembran en placa a una densidad deseada tal como entre aproximadamente 100 células/cm² y aproximadamente 100.000 células/cm² (tal como de aproximadamente 500 células/cm² a aproximadamente 50.000 células/cm², o, más particularmente, entre aproximadamente 1.000 células/cm² y aproximadamente 20.000 células/cm²). Si se siembran en placa a densidades inferiores (por ejemplo, de aproximadamente 300 células/cm²), las células pueden aislarse clonalmente de manera más sencilla. Por ejemplo, después de algunos días, las células sembradas en placa a tales densidades proliferarán en una población homogénea. En una realización particular, la densidad celular está entre 2.000-10.000 células/cm².

Se seleccionan las células que permanecen adheridas a la superficie sólida tras tal tratamiento que comprende al menos dos pases y se analiza el fenotipo de interés mediante métodos convencionales con el fin de confirmar la identidad de las células divulgadas por este documento tal como se mencionará a continuación. Las células que permanecen adheridas a la superficie sólida tras el primer pase son de origen heterogéneo; por tanto, dichas células deben someterse a al menos otro pase. Como resultado del método anterior, se obtiene una población de células homogénea que tiene el fenotipo de interés. El ejemplo 1 describe de manera detallada el aislamiento de las células divulgadas por este documento de tejido adiposo humano y de tejido cartilaginoso humano.

Habitualmente, las células que permanecen adheridas a la superficie sólida tras el segundo pase muestran el fenotipo de interés, aunque ha de confirmarse de modo que las células puedan usarse según la invención. Por tanto, la adhesión de las células a la superficie sólida tras al menos dos pases constituye una realización preferida de la invención para seleccionar las células divulgadas por este documento. La confirmación del fenotipo de interés puede llevarse a cabo usando medios convencionales.

Pueden identificarse marcadores de superficie celular mediante cualquier técnica convencional adecuada, habitualmente basada en una selección positiva/negativa; por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales frente a marcadores de superficie celular, cuya presencia/ausencia en las células ha de confirmarse; aunque también pueden usarse otras técnicas. Por tanto, en una realización particular, se usan anticuerpos monoclonales frente a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete de, o preferiblemente todos de CD11b, CD11c, CD14, CD45, HLAII, CD31, CD34 y CD133 con el fin de confirmar la ausencia de dichos marcadores en las células seleccionadas; y se usan anticuerpos monoclonales frente a uno, dos, tres, cuatro de, o preferiblemente todos de CD9, CD44, CD54, CD90 y CD105 con el fin de confirmar la presencia de los mismos o los niveles de expresión detectable de, al menos uno de y preferiblemente todos de, dichos marcadores. Dichos anticuerpos monoclonales se conocen, están comercialmente disponibles o pueden obtenerse por un experto en la materia mediante métodos convencionales.

La actividad deIDO inducible por IFN- γ en las células seleccionadas puede determinarse mediante cualquier ensayo convencional adecuado. Por ejemplo, las células seleccionadas pueden estimularse con IFN- γ y someterse a ensayo para determinar la expresión deIDO; entonces puede realizarse análisis de inmunotransferencia convencional para detectar la expresión de proteínaIDO y puede medirse la actividad de la enzimaIDO tras la estimulación con IFN- γ de las células seleccionadas mediante la conversión de triptófano a quinurenina con, por ejemplo, análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y determinación fotométrica de la concentración de quinurenina en el sobrenadante como la lectura. Dado que las células divulgadas por este documento expresanIDO en ciertas condiciones, puede usarse cualquier técnica adecuada que permita la detección de la actividadIDO tras la estimulación con IFN- γ para seleccionar las células divulgadas por este documento. En el ejemplo 2 se divulga un

ensayo adecuado para determinar la actividad IDO inducible por IFN- γ en las células seleccionadas. La cantidad de IDO producida depende del número de células por centímetro cuadrado, que está preferiblemente a un nivel de 5000 células/cm² o más, pero no se limita a esta concentración, y de la concentración de IFN- γ , que idealmente es de 3 ng/ml o más, pero no se limita a esta concentración. La actividad de IDO producida en las condiciones descritas dará como resultado una producción detectable de quinurenina en el intervalo μ M tras 24 horas o más.

La capacidad de las células seleccionadas para diferenciarse en al menos dos linajes celulares puede someterse a ensayo mediante métodos convencionales tal como se conoce en la técnica.

Las células y poblaciones de células descritas por el presente documento pueden expandirse clonalmente, si se desea, usando un método adecuado para clonar poblaciones de células. Por ejemplo, una población de células proliferada puede recogerse físicamente y sembrarse en una placa separada (o el pocillo de una placa de múltiples pocillos). Alternativamente, las células pueden subclonarse en una placa de múltiples pocillos a una razón estadística para facilitar la colocación de una única célula en cada pocillo (por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1 células/pocillo o incluso de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,5 células/pocillo, tal como 0,5 células/pocillo). Por supuesto, las células pueden clonarse sembrándolas en placa a baja densidad (por ejemplo, en una placa Petri u otro sustrato adecuado) y aislándolas de las otras células usando dispositivos tales como anillos de clonación. La producción de una población clonal puede expandirse en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas pueden cultivarse hasta un punto adecuado en el que pueda evaluarse su fenotipo de desarrollo.

Investigaciones adicionales llevadas a cabo por los inventores han demostrado que puede lograrse la expansión *ex vivo* de las células divulgadas por este documento sin inducir diferenciación durante periodos de tiempo prolongados por ejemplo usando lotes especialmente seleccionados de suero adecuado (tal como suero bovino fetal o suero humano). En la técnica se conocen métodos para medir la viabilidad y el rendimiento (por ejemplo, exclusión de azul tripano).

Cualquiera de las etapas y los procedimientos para aislar las células de la población de células divulgada por este documento puede realizarse manualmente, si se desea. Alternativamente, el procedimiento de aislamiento de tales células puede facilitarse y/o automatizarse a través de uno o más dispositivos adecuados, de los que se conocen ejemplos en la técnica.

Usos de las células de la invención

En un aspecto particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células aisladas de tejido conjuntivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable caracterizada en que las células de dicha población: de células expresan indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) tras la estimulación con interferón gamma (IFN- γ), para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, en la que la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria del intestino, en la que las células de la población celular se prepararan mediante un método que comprende cultivar células sin diferenciación sobre una superficie sólida en presencia de un medio de cultivo adecuado o un suero adecuado e incubar las células en condiciones que permitan a las células adherirse a la superficie sólida y proliferar, y en la que el método comprende seleccionar células que quedan adheridas a la superficie sólida después de al menos dos pasos.

Se divulga que las células divulgadas por este documento pueden usarse también para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados.

Por tanto, en un aspecto, las células divulgadas por este documento se usan como un medicamento. En una divulgación particular, pueden usarse medicamentos que contienen las células divulgadas por este documento para inducir tolerancia a trasplante, o para tratar, y así aliviar, síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, o enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados, en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o enfermedades. Por tanto, las células divulgadas por este documento pueden usarse para tratar terapéutica o profilácticamente y así aliviar los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o para aliviar los síntomas de enfermedades mediadas inmunológicamente en un sujeto que padece dichas enfermedades.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable para referirse a un estado en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmunitaria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno autoinmunitario" para referirse a un estado en un sujeto caracterizado por lesión celular, de tejido y/o de órgano producida por una reacción inmunológica del sujeto contra sus propias células, tejidos y/u órganos. El término "enfermedad inflamatoria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno inflamatorio" para referirse a un estado en un sujeto caracterizado por inflamación, preferiblemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar o no asociados con la

inflamación. Además, la inflamación puede estar o no producida por un trastorno autoinmunitario. Por tanto, ciertos trastornos pueden caracterizarse como trastornos tanto autoinmunitarios como inflamatorios.

5 Los mecanismos mediante los que ciertos estados pueden producir autoinmunidad en algunos sujetos no se entienden bien generalmente, pero pueden implicar factores tanto genéticos como extrínsecos. Por ejemplo, las bacterias, virus o fármacos pueden desempeñar un papel en el desencadenamiento de una respuesta autoinmunitaria en un sujeto que ya tenía una predisposición genética al trastorno autoinmunitario. Se ha propuesto, por ejemplo, que sujetos con ciertas alergias comunes son más susceptibles a trastornos autoinmunitarios.

10 Prácticamente cualquier enfermedad autoinmunitaria, trastorno inflamatorio o enfermedad mediada inmunológicamente puede tratarse con las células divulgadas por este documento. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichos trastornos y enfermedades que pueden tratarse son los enumerados previamente con el encabezamiento "definiciones".

15 **Células T-reg divulgadas por este documento**

La presente divulgación se refiere, en otro aspecto, a células T reguladoras (T-reg), es decir, células (incluyendo T-reg Foxp3+CD4+CD25+ y células Tr1 productoras de IL-10/TGFb) que suprimen de manera activa la activación del sistema inmunitario y previenen la autorreactividad patológica, es decir una enfermedad autoinmunitaria, que pueden obtenerse de las células divulgadas por este documento, denominadas a continuación en el presente documento células T-reg divulgadas por este documento.

Por tanto, también se divulga un método para el aislamiento de una población de células T-reg divulgadas por este documento, que comprende:

- 25 (a) poner en contacto una población de células divulgadas por este documento con leucocitos de sangre periférica, y
- 30 (b) seleccionar la población de células T-reg divulgadas por este documento.

En consecuencia, las células divulgadas por este documento pueden usarse para producir un subconjunto de células T, las células T-reg divulgadas por este documento, que constituye un aspecto adicional de la presente divulgación. Las células T-reg divulgadas por este documento pueden aislarse por medios convencionales conocidos por un experto en la materia.

35 Las células T-reg divulgadas por este documento pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados.

40 Por tanto, en otro aspecto, las células T-reg divulgadas por este documento se usan como medicamento. En una divulgación particular, pueden usarse medicamentos que contienen las células T-reg divulgadas por este documento para inducir tolerancia a trasplante, o para tratar, y así aliviar, los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, o enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados, en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o enfermedades. Por tanto, las células T-reg divulgadas por este documento pueden usarse para tratar terapéutica o profilácticamente y así aliviar los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o para aliviar los síntomas de enfermedades mediadas inmunológicamente en un sujeto que padece dichas enfermedades.

50 Prácticamente cualquier enfermedad autoinmunitaria, trastorno inflamatorio o enfermedad mediada inmunológicamente puede tratarse con las células T-reg divulgadas por este documento. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichos trastornos y enfermedades que pueden tratarse son los enumerados previamente con el encabezamiento "definiciones". En una realización particular, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria crónica, tal como, por ejemplo, EII o AR.

55 También se divulga el uso de poblaciones de células divulgadas por este documento en la producción de células T-reg específicas para un antígeno o grupo de antígenos elegido y el uso de éstas en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con ese antígeno o grupo de antígenos. Ejemplos de tales antígenos son los que desempeñan un papel en enfermedades autoinmunitarias, tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, reacción de hipersensibilidad de tipo IV, lupus, psoriasis y otros trastornos autoinmunitarios conocidos en la técnica y descritos en otra parte en el presente documento. En resumen, las poblaciones de células divulgadas por este documento se cultivan *in vitro* en presencia de un antígeno, grupo de antígenos o tipos celulares elegidos que expresan y/o presentan este antígeno o antígenos. Las células divulgadas por este documento pueden preestimularse opcionalmente con IFN γ , LPS u otros agentes de activación conocidos en la técnica. Tras un periodo de cultivo de aproximadamente 2, 4, 6, 12, 24, 48 o más horas, preferiblemente entre aproximadamente 12 y 65 aproximadamente 24 horas, la población de células divulgada en este documento se cultiva además conjuntamente, opcionalmente tras la eliminación del antígeno, grupo de antígenos o células que portan dicho antígeno, con

leucocitos de sangre periférica obtenidos de un sujeto. Este cultivo conjunto dará como resultado la producción de células T-reg específicas para el antígeno elegido, que pueden usarse para el tratamiento del sujeto. Opcionalmente, estas células T-reg pueden expandirse en número *ex vivo* usando técnicas de cultivo conocidas en la técnica antes de administrarse al paciente. Sin querer restringirse por la teoría, los inventores creen que las poblaciones de células divulgadas por este documento pueden presentar el antígeno elegido mediante el HLA de clase II sobre la superficie celular (aparentemente inducidas por IFN γ) a los leucocitos de sangre periférica, de modo que las células T-reg aumentan y o se activan dentro de la población de leucocitos de sangre periférica. Tal como se muestra en el ejemplo 11, los inventores han demostrado que las poblaciones de células divulgadas por este documento pueden fagocitar moléculas de pequeño peso molecular y por tanto pueden presentar tales moléculas tras la estimulación con IFN γ mediante moléculas de HLA de clase II. Se cree que la presentación del antígeno elegido mediante este mecanismo con la interacción con los leucocitos de sangre periférica da como resultado la producción de células T-reg descrita anteriormente. Como metodología de tratamiento alternativa, tal como se describe en el ejemplo 7, se administra una población de células divulgada por este documento directamente *in vivo* sin ningún cultivo conjunto y puede generar células T-reg específicas, que a su vez pueden tratar un trastorno.

Por tanto, la presente divulgación describe un método *in vitro* de obtención de células T-reg específicas para un antígeno o grupo de antígenos elegidos, que comprende:

- (a) poner en contacto una población de células divulgada por este documento con dicho antígeno o grupo de antígenos elegidos;
- (b) poner en contacto dicha población de células con leucocitos de sangre periférica;
- (c) seleccionar una población de células T-reg específicas para dicho antígeno o grupo de antígenos elegidos.

La divulgación también describe el uso de las células T-reg específicas de la etapa (c) en el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con dicho antígeno o grupos de antígenos elegidos mediante la administración de dichas células T-reg al sujeto del que se obtuvieron los leucocitos de sangre periférica. La población de células divulgada por este documento, tal como se usa en este método, puede ser del sujeto (autóloga) o de un donante (alógena).

Células irradiadas divulgadas por este documento

Si se desea, las células divulgadas por este documento pueden irradiarse usando una fuente controlada adecuada de radiación ionizante, tal como un dispositivo irradiador gamma. Las condiciones de irradiación debe ajustarse experimentalmente el experto en la materia para determinar el tiempo de exposición requerido para conferir una dosis de radiación que produzca la detención del crecimiento a largo plazo de las células divulgadas por este documento. Dicha dosis de radiación puede ser por ejemplo de 1-100, 5-85, 10-70, 12-60 Gy o más preferiblemente de 15-45 Gy.

Dado que las células divulgadas por este documento pueden usarse para usos terapéuticos, la irradiación de las células divulgadas por este documento antes de la administración al sujeto puede resultar beneficiosa dado que dicho tratamiento de irradiación hace que las células no puedan proliferar o sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el sujeto. Dichas células irradiadas constituyen un aspecto adicional de la presente divulgación.

Las células irradiadas divulgadas por este documento pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados. Dicho uso constituye un aspecto adicional de la presente divulgación.

Por tanto, en otro aspecto, las células irradiadas divulgadas por este documento se usan como un medicamento. En una realización particular, pueden usarse medicamentos que contienen las células irradiadas divulgadas por este documento para inducir tolerancia a trasplante o para tratar, y de ese modo aliviar, los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, o enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados, en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o enfermedades. Por tanto, las células irradiadas divulgadas por este documento pueden usarse para tratar terapéutica o profilácticamente y de ese modo aliviar los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o para aliviar los síntomas de enfermedades mediadas inmunológicamente en un sujeto que padece dichas enfermedades.

Prácticamente, cualquier enfermedad autoinmunitaria, trastorno inflamatorio o enfermedad mediada inmunológicamente puede tratarse con las células irradiadas divulgadas por este documento. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas enfermedades y trastornos que pueden tratarse son los enumerados anteriormente con el encabezamiento "definiciones".

Células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento

Además, si se desea, las células divulgadas por este documento pueden preestimularse con IFN- γ . Los métodos para la preestimulación con IFN- γ son evidentes para los expertos en la materia, y en el ejemplo 2 se facilita un procedimiento. Preferiblemente, las células se preestiman usando una concentración de IFN- γ de entre 0,1 y 100, 0,5 y 85, 1 y 70, 1,5 y 50, 2,5 y 40 ng/ml o más preferiblemente 3 y 30 ng/ml, y un tiempo de estimulación preferiblemente mayor de 12 horas, por ejemplo, 13, 18, 24, 48, 72 horas o más.

Dado que las células divulgadas por este documento pueden usarse para usos terapéuticos, la preestimulación de las células divulgadas por este documento con IFN- γ antes de la administración al sujeto puede resultar beneficiosa dado que el periodo de tiempo entre la administración de las células preestimuladas con IFN- γ y la expresión de IDO en el sujeto puede reducirse.

También se divulga un método que comprende el tratamiento de las células divulgadas por este documento con IFN- γ y con el fin de preestimar dichas células. Las células que pueden obtenerse según dicho método, denominadas a continuación en el presente documento "células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento", constituyen un aspecto adicional del presente documento. Las células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento pueden aislarse por medios convencionales conocidos por el experto en la materia.

Las células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados. Dicho uso constituye un aspecto adicional del presente documento.

Por tanto, en otro aspecto, las células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento se usan como un medicamento. En una realización particular, pueden usarse medicamentos que contienen las células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento para inducir tolerancia a trasplante, o para tratar, y de ese modo aliviar, los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, o enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados, en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o enfermedades. Por tanto, las células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento pueden usarse para tratar terapéutica o profilácticamente y de ese modo aliviar los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o para aliviar los síntomas de enfermedades mediadas inmunológicamente en un sujeto que padece dichas enfermedades.

Prácticamente cualquier enfermedad autoinmunitaria, trastorno inflamatorio o enfermedad mediada inmunológicamente puede tratarse con las células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas enfermedades y trastornos que pueden tratarse son los enumerados anteriormente con el encabezamiento "definiciones".

Células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento y células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento

Además, si se desea, las células divulgadas por este documento pueden someterse a los tratamientos de irradiación y estimulación con IFN- γ , en cualquier orden; es decir, las células divulgadas por este documento pueden someterse en primer lugar a irradiación y las células resultantes pueden someterse posteriormente a estimulación con IFN- γ , o viceversa, las células divulgadas por este documento pueden someterse en primer lugar a estimulación con IFN- γ y posteriormente las células resultantes pueden someterse a irradiación.

Por tanto, en un aspecto, las células divulgadas por este documento pueden preestimularse con IFN- γ y las células resultantes (células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por el documento) pueden irradiarse para convertirse en células irradiadas, denominadas a continuación en el presente documento "células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento".

En otro aspecto, las células divulgadas por este documento pueden irradiarse y las células resultantes (células irradiadas divulgadas por este documento) pueden preestimularse con IFN- γ para convertirse en células preestimuladas con IFN- γ denominadas a continuación en el presente documento "células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento".

Los expertos en la materia conocen bien métodos para la preestimulación de células con IFN- γ , así como métodos para irradiar células y algunos de ellos se han mencionado previamente. Puede usarse cualquiera de dichos métodos.

Por tanto, también se divulga un método que comprende someter las células divulgadas por este documento a (i) irradiación, y (ii) estimulación con IFN- γ , en el que los tratamientos (i) y (ii) pueden llevarse a cabo en cualquier orden, con el fin de irradiar células preestimuladas con IFN- γ o para preestimar con IFN- γ células irradiadas. Las

células que pueden obtenerse según dicho método denominadas, en el presente documento “células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento” o “células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento”, respectivamente, constituyen aspectos adicionales del presente documento. Dichas células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento, así como dichas células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento pueden aislarse por medios convencionales conocidos por el experto en la materia.

Dado que las células divulgadas por este documento pueden usarse para usos terapéuticos, la administración a un sujeto de las células divulgadas por este documento sometidas previamente a irradiación y estimulación con IFN- γ , en cualquier orden, puede resultar beneficiosa por los motivos mencionados anteriormente (por ejemplo, someter las células a un tratamiento de irradiación para hacer que las células no puedan proliferar o sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el sujeto, mientras que la preestimulación de las células con IFN- γ antes de la administración al sujeto puede implicar una reducción en el periodo de tiempo entre la administración de las células preestimuladas con IFN- γ y la expresión de IDO en el sujeto).

Las células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento, así como las células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con trastornos en los que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados. Dicho uso constituye un aspecto adicional de la presente divulgación.

Por tanto, en otro aspecto, las células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento, así como las células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento se usan como un medicamento. En una realización particular, pueden usarse medicamentos que contienen las células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento o las células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento para inducir tolerancia a trasplante, o para tratar, y de ese modo aliviar, los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios, o enfermedades mediadas inmunológicamente incluyendo rechazo de tejidos y órganos trasplantados, en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o enfermedades. Por tanto, las células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento, así como las células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento pueden usarse para tratar terapéutica o profilácticamente y de ese modo aliviar los síntomas de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios en un sujeto que padece cualquiera de dichos trastornos o para aliviar los síntomas de enfermedades mediadas inmunológicamente en un sujeto que padece dichas enfermedades.

Prácticamente cualquier enfermedad autoinmunitaria, trastorno inflamatorio o enfermedad mediada inmunológicamente puede tratarse con las células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento o con las células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas enfermedades y trastornos que pueden tratarse son los enumerados previamente con el encabezamiento “definiciones”.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento, la profilaxis y la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno en el que la modulación del sistema inmunitario de un sujeto es beneficiosa tal como una enfermedad inflamatoria, en las que la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria del intestino.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una célula divulgada por el documento, o una célula T-reg divulgada por este documento, o una célula irradiada divulgada por este documento, o una célula preestimulada con IFN- γ divulgada por este documento, o una célula preestimulada con IFN- γ irradiada divulgada por este documento o una célula irradiada preestimulada con IFN- γ divulgada por este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el uso de la invención. Las combinaciones de dos o más de dichos tipos de células están incluidas en el alcance de las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención.

La composición farmacéutica para el uso de la invención comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos (es decir, una célula divulgada por el documento, o una célula T-reg divulgada por este documento, o una célula irradiada divulgada por este documento, o una célula preestimulada con IFN- γ divulgada por este documento, o una célula preestimulada con IFN- γ irradiada divulgada por este documento o una célula irradiada preestimulada con IFN- γ divulgada por este documento, o una combinación de las mismas), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o uno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense, o la Farmacopea Europea u otra farmacopea reconocida generalmente para el uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. La composición, si se

desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes reguladores del pH. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico o terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al sujeto. La formulación debe adecuarse al modo de administración. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas son estériles y están en una forma adecuada para su administración a un sujeto, preferiblemente un sujeto animal, más preferiblemente un sujeto mamífero, y lo más preferiblemente un sujeto humano.

La composición farmacéutica de la invención puede estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas sólidas, semisólidas y líquidas, tales como preparaciones liofilizadas, disoluciones o suspensiones líquidas, disoluciones inyectables e infusibles, etc. La forma preferida depende del modo de administración previsto y de la aplicación terapéutica.

La administración de la población de células, o la composición farmacéutica que comprende la misma, al sujeto que necesita la misma para el uso de la invención puede realizarse por medio convencionales. En una realización particular, dicha población de células se administra al sujeto mediante un método que implica transferir las células al tejido deseado, o bien *in vitro* (por ejemplo, como un injerto antes del implante o de injertar) o *in vivo*, al tejido animal directamente. Las células pueden transferirse al tejido deseado mediante cualquier método apropiado, que generalmente variará según el tipo de tejido. Por ejemplo, las células pueden transferirse al injerto bañando el injerto (o infundiéndolo) con medio de cultivo que contiene las células. Alternativamente, las células pueden sembrarse sobre el sitio deseado dentro del tejido para establecer una población. Pueden transferirse células a sitios *in vivo* usando dispositivos tales como catéteres, trócares, cánulas, endoprótesis (que pueden sembrarse con las células), etc.

Las células divulgadas por este documento pueden irradiarse antes de la administración al sujeto. Este tratamiento hace que las células no puedan proliferar o sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el sujeto. Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende células irradiadas divulgadas por este documento.

Además, las células divulgadas por este documento pueden preestimularse con IFN- γ , antes de la administración al sujeto con el fin de reducir el periodo de tiempo entre la administración de las células y la expresión de IDO en el sujeto. Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica para el uso de la invención comprende células preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento.

Además, las células divulgadas por este documento pueden tanto irradiarse como preestimularse con IFN- γ , en cualquier orden, antes de la administración al sujeto. Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende células preestimuladas con IFN- γ irradiadas divulgadas por este documento o células irradiadas preestimuladas con IFN- γ divulgadas por este documento.

Las poblaciones de células divulgadas por este documento y composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en una terapia de combinación. En una realización específica, se administra la terapia de combinación a un sujeto con un trastorno inflamatorio que es resistente a uno o más agentes antiinflamatorios. En otra realización, se usa la terapia de combinación junto con otros tipos de agentes antiinflamatorios incluyendo, pero sin limitarse a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metilxantinas. Los ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, ibuprofeno, celecoxib, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, indometacina, ketoralaco, oxaprozina, nabumentona, sulindaco, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, ketoprofeno, nabumetona, etc. Tales AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de tales fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, prednisona, prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como tromboxanos y leucotrienos. También pueden usarse anticuerpos monoclonales, tales como infliximab.

Según la realización anterior, las terapias de combinación divulgadas por este documento pueden usarse antes de, simultáneamente o tras la administración de tales agentes antiinflamatorios. Además, tales agentes antiinflamatorios no abarcan los agentes caracterizados en el presente documento como agentes inductores y/o inmunomoduladores del tejido linfoide.

Método para distinguir células multipotentes adultas de células diferenciadas

Puede usarse la expresión de IDO tras la estimulación con IFN- γ para distinguir células que expresan dicha enzima de células que no expresan IDO.

Por tanto, en otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para distinguir células multipotentes adultas de células diferenciadas que comprende la etapa de verificar si la célula multipotente expresa IDO tras la estimulación con IFN- γ . La determinación de IDO tras la estimulación con IFN- γ puede llevarse a cabo mediante

cualquier técnica convencional; en una realización, la determinación de IDO tras la estimulación con IFN- γ puede llevarse a cabo tal como se divulga en el ejemplo 2.

Tal como se mencionó previamente, las células de la población de células divulgada por este documento se caracterizan porque no expresan IDO de manera constitutiva, sino sólo tras la estimulación con IFN- γ . Además, aparte de IFN- γ , ninguna otra molécula proinflamatoria tal como IL-1, TNF- α o endotoxina puede inducir por sí misma la expresión de IDO en las células de la población de células divulgada por este documento. Esta característica puede usarse para distinguir las células de la población de células divulgada por este documento de otras células.

Ejemplos

La invención se describirá ahora en más detalle, por medio de ejemplos que de ninguna manera pretenden limitar el ámbito de la invención, sino que, más bien, estos ejemplos servirán para ilustrar la invención con referencia a las figuras adjuntas.

Ejemplo 1

Aislamiento y expansión de células divulgadas por este documento

I. Material y Métodos

Aislamiento de células divulgadas por este documento de tejido adiposo

Se obtuvo tejido adiposo humano mediante liposucción, con anestesia local y sedación general. Se introdujo una cánula hueca de punta roma en el espacio subcutáneo a través de una pequeña incisión (inferior a 0,5 cm de diámetro). Con succión suave, la cánula se movió a través del compartimento de tejido adiposo de la pared abdominal para la rotura mecánica del tejido graso. Se inyectaron una solución salina y el vasoconstrictor epinefrina en el compartimento del tejido adiposo para minimizar la pérdida de sangre. De esta manera, se obtuvieron de 80 a 100 ml de lipoaspirado de partida de cada paciente que iba a tratarse.

Se lavó el lipoaspirado de partida exhaustivamente con solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS; Gibco BRL, Paisley, Escocia, RU) para eliminar las células sanguíneas, la solución salina y el anestésico local. Se digirió la matriz extracelular con una disolución de colagenasa tipo II (0,075 %; Gibco BRL) en solución salina equilibrada (5 mg/ml; Sigma, St. Louis, EE. UU.) durante 30 minutos a 37 °C para liberar la fracción celular. Después se inactivó la colagenasa mediante la adición de un volumen igual de medio de cultivo celular (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL)) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS; Gibco BRL). Se centrifugó la suspensión de células a 250 x g durante 10 minutos. Se resuspendieron las células en NH₄Cl 0,16 M y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA) para la lisis de los eritrocitos. Se centrifugó la mezcla a 250 x g y se resuspendieron las células en DMEM más FBS al 10 % y mezcla al 1 % de ampicilina/estreptomicina (Gibco BRL) y luego se filtraron a través de una malla de 40 μ m y se sembraron en botellas de cultivo de tejidos a una concentración de 10-30 x 10³ células/cm².

Aislamiento de células divulgadas por este documento de cartílago articular

Se obtuvo cartílago articular hialino humano de la articulación de la rodilla de un donante por medio de técnicas artroscópicas. Se tomaron aproximadamente 4 cm² de cartílago del margen externo del cóndilo femoral, pero el tamaño de la biopsia puede variar dependiendo de la edad del donante, la estructura de la articulación y la consideración del cirujano. Se suspendió la biopsia en una solución salina estéril y se almacenó a 3-8 °C hasta su uso. No deben almacenarse muestras de cartílago vivo durante más de 48 horas.

Se transfirió la biopsia de cartílago a 1 ml de medio de cultivo celular estéril que contenía FBS al 1 %, y se desmenuzó para obtener fragmentos de tejido tan pequeños como fuera posible. Se suspendieron los fragmentos de cartílago resultantes en un medio similar que contenía colagenasa al 0,1 % (p/v) y se incubaron a 37 °C con agitación suave y continua. Tras la digestión, se filtró la suspensión de células obtenida a través de una malla de 40 μ m y se sembraron las células en botellas de cultivo de tejidos a una concentración de 10-30 x 10³ células/cm².

Expansión *ex vivo* de células

Se cultivaron por separado células tanto de tejido adiposo como de cartílago articular durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Después, se lavaron las botellas de cultivo con PBS para eliminar los fragmentos de células y las células que no se adherieron. Se mantuvieron las células en cultivo en el mismo medio y en las mismas condiciones hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80 %, sustituyendo el medio de cultivo cada de 3 a 4 días. Se realizó después un pase de las células con tripsina-EDTA (Gibco BRL) a una dilución de 1:3, lo que corresponde a una densidad celular de aproximadamente 5-6 x 10³ células/cm². En la figura 1

se muestra la cinética de crecimiento celular de las células aisladas de tejido adiposo humano y cultivadas *ex vivo* durante más de 25 duplicaciones de la población de células.

Caracterización celular

Se realizó la caracterización celular usando células en los pases de cultivo 1 a 25. Se analizaron células tanto de tejido adiposo como de cartílago articular por medio de citometría de flujo usando anticuerpos marcados con un marcador fluorescente (es decir, mediante inmunocitometría de fluorescencia) para detectar la presencia/ausencia de una serie de marcadores de superficie, que incluían:

- Marcadores de células presentadoras de antígeno (CPA): CD11b, CD11c, CD14, CD45 y HLAII.
- Marcadores de células endoteliales: CD31.
- Otros marcadores: CD9, CD34, CD90, CD44, CD54, CD105 y CD133.

Los anticuerpos usados en el ensayo de citometría de flujo fueron los siguientes:

- CD9: clon MM2/57 de anticuerpo IgG2b de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD11b: clon ICRF44 de anticuerpo IgG1 de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD11c: clon BU15 de anticuerpo IgG1 de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD14: clon UCHM1 de anticuerpo IgG2a de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD31: clon WM59 de anticuerpo IgG1 de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD34: clon QBEND 10 de anticuerpo de IgG1 de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD44: clon F10-44-2 de anticuerpo IgG2a de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD45: clon F10-89-4 de anticuerpo IgG2a de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD54: clon 15.2 de anticuerpo IgG1 de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD90: clon F15-42-1 de anticuerpo IgG1 de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD105: clon SN6 de anticuerpo IgG1 de ratón marcado con FITC (Serotec); y
- Anti HLA humano clase II DP, DQ, DR: clon WR18 de anticuerpo IgG2a de ratón marcado con FITC (Serotec);
- CD133: clon 293C3 de anticuerpo IgG2b de ratón marcado con PE (Miltenyi Biotec).

II. Resultados

Los resultados se recogen en la figura 2, que muestra que las células analizadas eran positivas para CD9, CD44, CD54, CD90 y CD105 y negativas para CD11b, CD11c, CD14, CD31, CD34, CD45, CD133 y HLAII. Las células eran negativas para todos los marcadores sometidos a prueba que son específicos para los linajes endotelial o de CPA (CD11b, CD11c, CD14, CD45 y HLAII).

Ejemplo 2

Inducción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por interferón-gamma (IFN- γ)

I. Material y Métodos

Se sembraron las células divulgadas por este documento aisladas de tejido adiposo humano (ejemplo 1) sobre placas de cultivo de tejidos a una densidad de 10.000 células/cm², y se incubaron durante 48 horas en las condiciones descritas anteriormente para la expansión celular. Luego, se añadieron diferentes estímulos proinflamatorios al medio de cultivo, incluyendo:

- Interleucina-1 (IL-1): 3 ng/ml
- Interferón-gamma (IFN- γ): 3 ng/ml

- Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α): 5 ng/ml
- Lipopolisacárido (LPS): 100 ng/ml

Se incubaron las células en presencia del estímulo correspondiente durante periodos que oscilaban desde 30 minutos hasta 48 horas, y entonces se recogieron mediante digestión con tripsina, y se lisaron en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM (fluoruro de fenil-metilsulfonilo), EDTA 1 mM (ácido etilendiaminotetraacético), aprotinina 5 μ g/ml, leupeptina 5 μ g/ml, Triton x-100 al 1 %, desoxicolato de sodio al 1 %, SDS al 0,1 %) que contenía inhibidores de proteasa. Entonces se usaron los lisados celulares en un experimento de inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal específico paraIDO (IgG monoclonal de ratón, clon 10.1, de *Upstate cell signaling solutions*). Además, se aisló ARN de las células tratadas y se sometió a prueba mediante experimentos de transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando cebadores específicos para el ADNc de IDO (número de registro de GenBank M34455 (GI:185790))

directo 5' GGATTCTTCCTGGTCTCTATTGG 3';

inverso: 5' CGGACTGAGGGATTTGACTCTAATG 3').

II. Resultados

Los resultados de este experimento [figura 3A (RT-PCR) y 3B (inmunotransferencia)] muestran que las células proporcionadas por el presente documento no expresan IDO de manera constitutiva. El ARNm de IDO se induce tras 2 horas de estimulación con IFN- γ , pero la expresión de la proteína puede detectarse solo entre 8-24 horas de inducción.

Se obtuvieron resultados similares cuando se aislaron las células divulgadas por este documento de otros tejidos humanos, incluyendo: médula ósea, cartílago articular y piel (figura 4).

Ejemplo 3

Comportamiento tumorigeno

I. Material y Métodos

Se realizó este experimento con células divulgadas por este documento aisladas de tejido adiposo humano tal como se describió en el ejemplo 1. Se cultivaron las muestras de células durante 2-7 semanas antes del implante subcutáneo en ratones inmunodeficientes (5×10^6 células/ratón). Los ratones eran de la cepa *nu/nu* obtenidos de Charles River Laboratories. Los ratones carecían de timo y tenían deficiencia en células T. Se siguieron los ratones a los que se les realizó el implante durante 4 meses antes del sacrificio y el estudio patológico.

Estudio patológico: Se realizó una necropsia en todos los animales. Se examinaron los animales para determinar anomalías macroscópicas en el cerebro, pulmones, corazón, hígado, riñones, bazo, ganglios linfáticos abdominales y sitio de inyección. Se recogieron los tejidos para realizar un examen histológico (corte en parafina y tinción con hematoxilina-eosina (H&E), incluyendo el sitio de inyección, los pulmones y los ganglios linfáticos.

Se usó la línea celular de teratoma (N-TERA) como control positivo, que se implantó en condiciones idénticas.

II. Resultados

Los resultados muestran que, mientras que todos los ratones a los que se les implantaron células de teratoma desarrollaron tumores tras unas pocas semanas, ninguno de los animales a los que se les implantaron las células divulgadas por este documento desarrollaron tumores en el plazo de los 4 primeros meses tras el implante [datos no mostrados].

Ejemplo 4

Tratamiento de EII inducida experimentalmente en ratones

I. Materiales y Métodos

Se indujo colitis en ratones Balb/c (6-8 semanas de edad, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) tal como se describió previamente (Neurath, M.F., *et al.* 1995. Antibodies to IL-12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* 182, 1281-1290). En resumen, los ratones se anestesiaron ligeramente con halotano, y se insertó un catéter de 3,5 F por vía intrarrectal 4 cm desde el ano. Para inducir colitis, se administraron lentamente 100 μ l de TNBS 50 o 30 mg/ml (ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) en etanol al 50 %

(para romper la barrera epitelial intestinal) en la luz mediante el catéter cargado con una jeringuilla de 1 ml. Los ratones control recibieron etanol al 50 % solo (100 μ l). Se trataron los animales por vía intrarrectal con diferentes números de las células divulgadas por este documento obtenidas de tejido adiposo humano tal como se describió en el ejemplo 1 (0,3 x 10⁶ y 1 x 10⁶ células, suspendidas en solución salina tamponada con fosfato, PBS) 12 horas tras la instilación de TNBS. En algunos experimentos, dichas células se trataron previamente con 200 U/ml de IFN- γ durante 24 horas antes de la inyección. Se siguieron los animales diariamente para determinar la supervivencia, aparición de diarrea y pérdida de peso corporal (figuras 5, 6 y 7).

II. Resultados

Tal como se muestra en la figura 5, hubo una mejora dependiente de la dosis del peso ganado tras la administración de las células divulgadas por el documento. En efecto, puede observarse una dependencia de la dosis en la figura 6 mostrando 1x10⁶ células un efecto más fuerte que 0,3x10⁶ células. En ambos casos, las células mejoraron la tasa de supervivencia de los ratones tratados con TNBS significativamente.

Además, las células preestimuladas con IFN- γ mostraron una recuperación más rápida y más fuerte del tratamiento con TNBS que las células no preestimuladas (figura 7). La gráfica muestra que los ratones tratados con TNBS perdieron peso de drásticamente y una clara mejora en los ratones que recibieron las células.

Ejemplo 5

Tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino (EII) inducida experimentalmente en ratones – experimentos adicionales:

I. Materiales y Métodos

En una extensión de los mismos experimentos del ejemplo 4, se indujo colitis en ratones Balb/c (6-8 semanas de edad, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) tal como se describió previamente (Neurath, M.F., *et al.* 1995. Antibodies to IL-12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* 182, 1281-1290). En resumen, se anestesiaron ligeramente los ratones con halotano, y se insertó un catéter de 3,5 F por vía intrarrectal 4 cm desde el ano. Para inducir colitis, se administraron lentamente 100 μ l de TNBS 50 o 30 mg/ml (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) en etanol al 50 % (para romper la barrera epitelial intestinal) en la luz mediante el catéter cargado con una jeringuilla de 1 ml. Los ratones control recibieron etanol al 50 % solo (100 μ l). Se trataron los animales por vía intrarrectal o intraperitoneal (i.p.) con diferentes números de las células divulgadas por este documento obtenidas de tejido adiposo humano (CMA) tal como se describió en el ejemplo 1 (0,3 x 10⁶ y 1 x 10⁶ células, suspendidas en solución salina tamponada con fosfato, PBS) 12 horas tras la instilación de TNBS. En algunos experimentos, dichas células se trataron previamente con 200 U/ml de IFN- γ durante 24 horas antes de la inyección. Además, en algunos experimentos, se marcaron las células con CFSE (una sonda fluorescente) antes de la administración a los ratones. Se siguieron los animales diariamente para determinar la supervivencia, aparición y gravedad de la diarrea y pérdida de peso corporal. Se recogió el suero y se obtuvieron extractos de proteína a partir de los cólonos en la fase aguda de la enfermedad (día 3). Se determinó el contenido en citocina/quimiocina en los extractos de proteína y en suero mediante ELISA. Se analizó la presencia de células marcadas con CFSE en los ganglios linfáticos mesentéricos mediante citometría de flujo.

II. Resultados

En todos los casos, los ratones tratados con las células divulgadas por este documento (CMA) mostraron una clara mejora en sus síntomas inflamatorios en comparación con los animales no tratados. La mejora era dependiente de la dosis y estadísticamente significativa en todos los parámetros sometidos a prueba, cuando las células se administraban localmente (por vía intrarrectal) o sistémicamente (i.p.), aunque esta última vía parece ser más eficaz. Tal como se mostró anteriormente en la figura 5, hubo una mejora dependiente de la dosis del peso ganado tras la administración de las células divulgadas por el documento. En efecto, puede observarse una dependencia de la dosis en las figuras 6, 7 y 8 mostrando 1x10⁶ células un efecto más fuerte que 0,3x10⁶ células. En ambos casos, las células mejoraron la tasa de supervivencia de los ratones tratados con TNBS significativamente.

Además, las células preestimuladas con IFN- γ mostraron una recuperación más rápida y más fuerte a partir del tratamiento con TNBS que las células no preestimuladas (figura 8). La gráfica muestra que los ratones tratados con TNBS perdieron peso drásticamente y una clara mejora en los ratones que recibieron las células. Esta mejora también puede medirse mediante la gravedad de la colitis.

La respuesta inmunitaria inflamatoria disminuye claramente en los animales tratados con las células divulgadas por el documento. Tal como se muestra en la figura 9, todas las citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1b, IL-12 e IFN γ) y quimiocinas (MIP-2 y RANTES) proinflamatorias sometidas a prueba, tanto en el colon (respuesta local) como en el suero (respuesta sistémica), eran inferiores en los animales tratados con las células en comparación con los ratones no tratados. Esta respuesta inhibitoria se potenció en los animales tratados con células preestimuladas con IFN- γ . Por otra parte, la citocina inmunorreguladora IL-10 aumentó en el colon de ratones tratados con CMA, en comparación

con tanto animales lesionados con TNBS no tratados como animales control. También, la infiltración de neutrófilos, tal como se mide mediante la actividad MPO, era inferior en animales tratados con CMA, e incluso inferior cuando las células se preestimularon con IFN- γ (figura 10).

5 Las células marcadas se localizaron en los ganglios linfáticos de drenaje de animales por medio de citometría celular (figura 11). Esta es la ubicación esperada si las células administradas estuviesen funcionando como CPA.

Ejemplo 6

10 Inducción de marcadores de CPA en las células divulgadas por este documento después de estimulación con IFN- γ

I. Materiales y Métodos

15 Se obtuvieron las células divulgadas por este documento de tejido adiposo subcutáneo humano (CMA) tal como se describió en el ejemplo 1. Tras un mínimo de 3 pases de cultivo, las células se incubaron en medio de cultivo convencional o en medio de cultivo que contenía 3 ng/ml de IFN- γ durante 4 días. Tras eso, las células se tiñeron para detectar algunos marcadores de superficie relacionados con la respuesta inmunitaria (relacionados específicamente con la actividad de las células presentadoras de antígeno (CPA)). Estos marcadores incluían los siguientes:

- HLA-II (DP, DQ, DR). Este receptor presenta fragmentos de antígenos exógenos a células T, iniciando la respuesta inmunitaria adaptativa (es la primera señal para la activación de células T). Las células divulgadas por este documento no expresan HLA-II de manera constitutiva. El anticuerpo usado se obtuvo de Serotec.
- 25 • CD40. Esta proteína se une a CD40L, que se expresa en la superficie de células T activadas. Las células divulgadas por este documento expresan niveles muy bajos o indetectables de CD40 de manera constitutiva. El anticuerpo usado se obtuvo de Serotec.
- 30 • ICAM-1 (CD54). Es la principal proteína implicada en la unión entre las células T y las CPA. Se necesita su expresión para que se lleven a cabo de manera apropiada otras interacciones entre las CPA y las células T. Las células divulgadas por este documento expresan niveles medios-bajos de ICAM-1 de manera constitutiva. El anticuerpo usado se obtuvo de Serotec.
- 35 • Miembros de la familia B7 de proteínas coestimuladoras (emiten la segunda señal para la activación de células T):
 - CD80 (B7-1). Anticuerpo obtenido de Serotec.
 - 40 ○ CD86 (B7-2). Anticuerpo obtenido de Serotec.
 - ICOSL (B7-H2). Anticuerpo obtenido de e-Bioscience.
 - B7-H4. Anticuerpo obtenido de e-Bioscience.
 - 45 ○ PD-L1 (B7-H1). Anticuerpo obtenido de e-Bioscience.
 - PD-L2 (B7-DC). Anticuerpo obtenido de e-Bioscience.

50 Los primeros cuatro emiten principalmente una señal estimuladora (fomentando la inducción de clones efectores de células T), mientras que PD-L1 y PD-L2 son principalmente tolerógenos (fomentando la inducción de anergia-inactivación de células T). Ninguno de ellos se expresa por las células divulgadas por este documento de manera constitutiva.

55 II. Resultados

Tras el tratamiento con IFN- γ , las células divulgadas por este documento inducen la expresión de HLA-II, PD-L1 y PD-L2, y una fuerte regulación por incremento de CD40 e ICAM-1. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 12.

60 Estos resultados son muy relevantes porque, junto con la inducción de la actividadIDO, demuestran que las células divulgadas por este documento, tras el tratamiento con IFN- γ , muestran un fenotipo característico de CPA tolerógenas.

Ejemplo 7**Tratamiento de artritis inducida por colágeno (AIC) con CMA****I. Materiales y Métodos**

5 Se indujo artritis experimental en ratones macho DBA1/Jlac (6-8 semanas de edad) mediante inyección subcutánea (s.c.) de una emulsión que contenía 200 µg de colágeno tipo II de pollo (CII) en adyuvante completo de Freund (CFA) y 200 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. Dos técnicos diferentes siguieron la evolución de la AIC diariamente, midiendo la inflamación-enrojecimiento-anquilosis de las articulaciones de las extremidades superiores e inferiores, según un sistema de puntuación preestablecido.

10 Cuando los síntomas clínicos mostraron el establecimiento de AIC (día 23 tras la inmunización, t.i.), se les inyectó a los animales i.p. diariamente 2×10^5 células divulgadas por este documento obtenidas de tejido adiposo humano tal como se describió en el ejemplo 1 (CMA), o PBS como control. Alternativamente, se les inyectó a los ratones con AIC por vía intraarticular (i.a.) una vez en una de las articulaciones afectadas. Se siguió la evolución de los animales tratados tal como se describió anteriormente, y en el día 50 t.i. se sacrificaron. Se midieron varios parámetros en la sangre y las articulaciones, incluyendo: citocinas en las articulaciones, citocinas en suero, isotipos de inmunoglobina, así como fenotipo y producción de citocinas de los linfocitos.

II. Resultados

20 Tal como se muestra en las figuras 13, 14 y 15, las células divulgadas por este documento disminuyen claramente la incidencia y gravedad de AIC en el modelo de ratón. En particular, el efecto sobre la respuesta inmunitaria es consecuente con una fuerte inhibición de la respuesta Th1 (IFN-γ, TNFα, IL-2, IL-1β, IL-6, IL-12, MIP2, RANTES e IgG2a) sin ningún aumento en la respuesta Th2 (IL-4, IgG1), y con la inducción de niveles altos de citocinas inmunorreguladoras (IL-10 y TGF-β).

Ejemplo 8**Inducción *in vivo* de células T reguladoras con las células divulgadas por el documento****I. Materiales y Métodos**

35 En un estudio similar al descrito en el ejemplo 7, se aislaron células T efectoras (CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻) y reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) del ganglio linfático de drenaje (GLD) y la membrana sinovial de ratones con AIC tratados con CMA y sin tratar, por medio de citometría celular, y se evaluó el número de células en cada población.

40 Con el fin de evaluar la capacidad de las células T reguladoras presentes en los ratones con AIC tratados con CMA para inhibir las células efectoras específicas de CII, se realizó un ensayo proliferativo en el que se cultivaron conjuntamente células T autorreactivas aisladas de ratones con AIC con números crecientes de células T de GLD (células T reguladoras) de ratones con AIC tratados con CMA o sin tratar (control) (razones de desde 1/64 hasta 1/1), y se estimularon con CII (10 µg/ml) y CPA esplénicas.

II. Resultados

45 Tal como se muestra en la figura 16.A., tanto el GLD como la membrana sinovial de ratones con AIC tratados con las células divulgadas por este documento inducen un aumento en los números de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), sin ningún aumento en los números de células T efectoras, en comparación con los ratones con AIC sin tratar (control).

50 Los datos mostrados en la figura 16.B demuestran que los ratones con AIC tratados con las células divulgadas por el documento, pero no los ratones con AIC control (sin tratar), contienen células T reguladoras que inhiben específicamente la respuesta de células T efectoras frente a CII.

55 En conclusión, el tratamiento de un modelo animal de una enfermedad autoinmunitaria experimental (AIC) con las células divulgadas por este documento induce la aparición de células T reguladoras específicas de antígeno que pueden suprimir la respuesta efectora de células T autorreactivas.

Ejemplo 9**Ensayo de proliferación de linfocitos**

60 Se sembraron en placa CMA divulgadas por este documento derivadas de tejido adiposo, obtenidas mediante los métodos del ejemplo 1, a 5000 células/cm² con y sin 200.000 linfocitos (activados con 10 µg de PHA/ml) y se cultivaron conjuntamente durante 3 días. Se midió la proliferación de linfocitos mediante la incorporación de H3. Tal como se muestra en la figura 17, el cultivo conjunto de CMA y linfocitos produjo una inhibición del 86 % de la proliferación de linfocitos. La adición de diferentes concentraciones de 1-metil-triptófano (1-MT) revirtió esta

65

supresión. 1-MT es un análogo de triptófano no metabolizable. El ensayo demuestra la necesidad de catabolismo de triptófano mediante IDO para inducir la actividad inmunosupresora de las células divulgadas por el documento.

Ejemplo 10

5 **Potencia de las CMA (producción de IDO) en relación con el número de células y la concentración de IFN- γ**

Materiales y Métodos

10 **HPLC:**

Se llevó a cabo una HPLC convencional usando una bomba de HPLC isocrática Waters 1515, un automuestreador Waters 717 y un detector de absorbancia dual Waters 2487.

15 **Protocolo de HPLC**

Se prepararon disoluciones recientes en el intervalo de 100 μ M a 100 mM de triptófano y quinurenina en acetonitrilo al 10 % en tampón fosfato de potasio (50 mM pH 6,0). A partir de estas disoluciones madre, se combinaron 50 μ l de triptófano y 10 μ l de quinurenina y 940 μ l de BSA (70 g/l) o FCS al 10 % para preparar la muestra de control y se almacenó a -80 °C

Preparación de las muestras: se recogieron 200 μ l o más de sobrenadante de las muestras (cultivos de células) en tubos Eppendorf y se almacenaron a -80 °C. Se descongelaron las muestras y las muestras de control y se añadieron 200 μ l de tampón fosfato de potasio 50 mM pH 6,0 a cada muestra de 200 μ l en un tubo Eppendorf. Se añadieron al tubo Eppendorf 50 μ l de TCA 2 M (ácido tricloroacético). Se agitó con vórtex el tubo y se centrifugó durante 10 min a 13.000 g a 4 °C. Se extrajeron 150 μ l del tubo Eppendorf para la medición.

Preparación de la columna para la medición por HPLC

30 Se preparó la columna de HPLC tal como se conoce en la técnica y se equilibró con la fase móvil, que consistía en citrato de sodio 40 mM pH 5 – en acetonitrilo al 5 %. Se inyectaron 50 μ l de la muestra descrita anteriormente de la muestra de 150 μ l en la columna (C18 de fase inversa). La separación se produce mediante una velocidad de flujo isocrática de 700 μ l/min. La detección fotométrica de L-quinurenina se produce a 365 nm, para L-triptófano a 280 nm.

35 **Resultados**

Tal como se muestra en la figura 18, las CMA sembradas en placa a 5000 células/cm² y estimuladas a 3 ng/ml de IFN- γ durante hasta 120 horas producen IDO, cuya actividad se mide mediante la metabolización de triptófano y la producción de quinurenina usando HPLC. Las CMA sembradas en placa a 5000 células/cm² y estimuladas con IFN- γ a 3 pg/ml durante hasta 120 horas no produjeron IDO. No pudo detectarse nada de quinurenina (figura 19). De manera similar, las CMA sembradas en placa a 500 células/cm² y estimuladas con IFN- γ a 3 ng/ml durante hasta 120 horas no produjeron cantidades significativas de IDO (figura 20).

45 **Ejemplo 10**

Capacidad de las CMA de fagocitar moléculas pequeñas:

Materiales y Métodos

50 Se añadió dextrano-FITC 4kDa (Sigma) a las células del ejemplo 1 durante 24 horas en cultivo. Las células se lavaron y se analizaron para determinar la incorporación del FITC fluorescente.

Resultados

55 La figura 21A muestra la imagen en campo claro de las células de la población de células lavadas. La figura 21B muestra la misma población usando microscopía de fluorescencia usando filtros de proteína fluorescente verde conocidos en la técnica. La absorción del marcador fluorescente visible en la figura 21B muestra que las células pueden fagocitar moléculas de peso pequeño y esto indica que estas células pueden presentar antígenos mediante HLA de clase II inducida mediante el tratamiento adicional de las células con IFN- γ .

60

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una población de células aisladas de tejido conjuntivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable **caracterizada en que** las células de dicha población: de células expresan indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) tras la estimulación con interferón gamma (IFN- γ), para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, en la que la enfermedad inflamatoria es enfermedad inflamatoria del intestino, en la que las células de la población celular se prepararan mediante un método que comprende cultivar células sin diferenciación sobre una superficie sólida en presencia de un medio de cultivo adecuado o un suero adecuado e incubar las células en condiciones que permitan a las células adherirse a la superficie sólida y proliferar, y en la que el método comprende seleccionar células que quedan adheridas a la superficie sólida después de al menos dos pases.
2. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que (a) la población de células se administrar por vía sistémica y/o (b) el sujeto es un humano.
3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la enfermedad inflamatoria es refractaria a uno o más agentes antiinflamatorios.
4. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la enfermedad inflamatoria es enfermedad de Crohn.
5. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que las células de la población de células se obtiene a partir de médula ósea, por ejemplo de médula ósea humana obtenida por aspiración.
6. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que las células de la población de células se obtiene a partir de tejido adiposo.
7. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que las células de la población de células son de un humano.
8. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que las células son negativas para los siguientes marcadores de superficie celular: CD31, CD34 y CD133.
9. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que las células de dicha población de células:
- (1) no expresan marcadores específicos para células presentadoras de antígeno (CPA), en los que los marcadores específicos para CPA son CD11b, CD11c, CD14, CD45 y HLAII,
 - (2) no expresan IDO de manera constitutiva,
 - (3) expresan IDO tras la estimulación con IFN- γ , y
 - (4) presentan capacidad para diferenciarse en al menos dos linajes celulares.
10. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que las células de la población de células se preparan por un método que comprende expandir las células *ex vivo*:
11. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que las células de la población de células se preparan por un método que comprende pasar las células al menos dos veces, o en el que las células se pasan al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces:
12. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que las células de la población de células se preparan por un método que comprende:
- (i) preparar una suspensión celular a partir de una muestra de un tejido conectivo;
 - (ii) recuperar las células de dicha suspensión celular;
 - (iii) incubar dichas células en un medio de cultivo celular adecuado sobre una superficie sólida en condiciones que permitan a las células adherirse a la superficie sólida y proliferar;
 - (iv) lavar dicha superficie sólida tras la incubación para eliminar las células no adheridas;

(v) seleccionar las células que tras pasarse al menos dos veces en tal medio permanecen adheridas a dicha superficie sólida; y

(vi) confirmar que la población de células seleccionada presenta el fenotipo de interés.

5

FIGURA 1

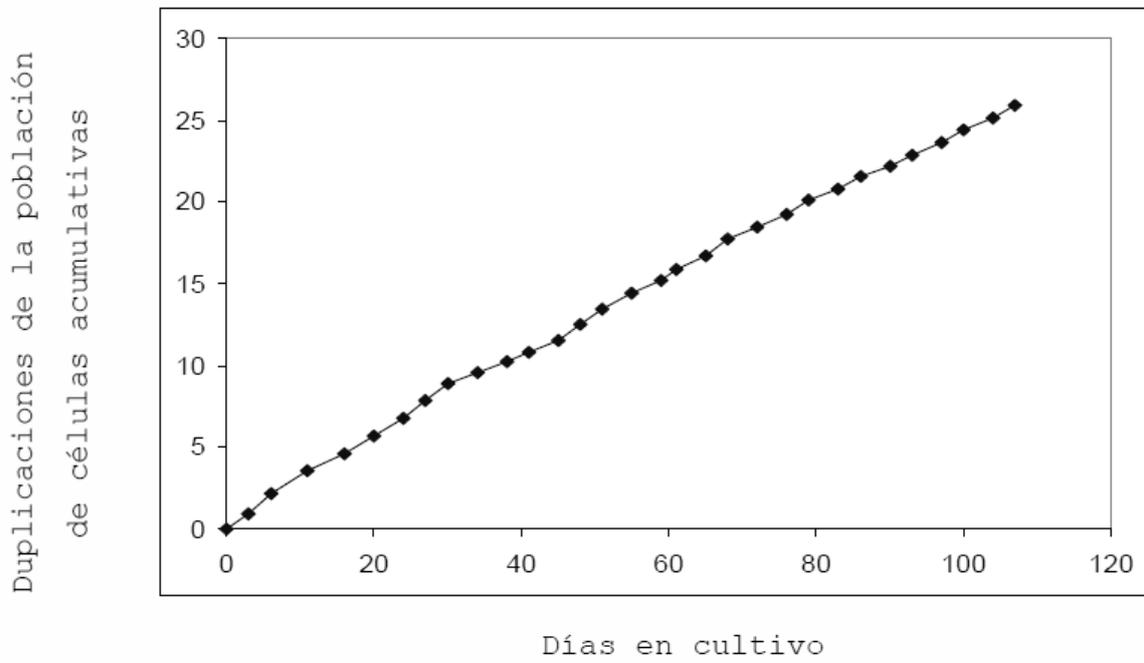


FIGURA 2

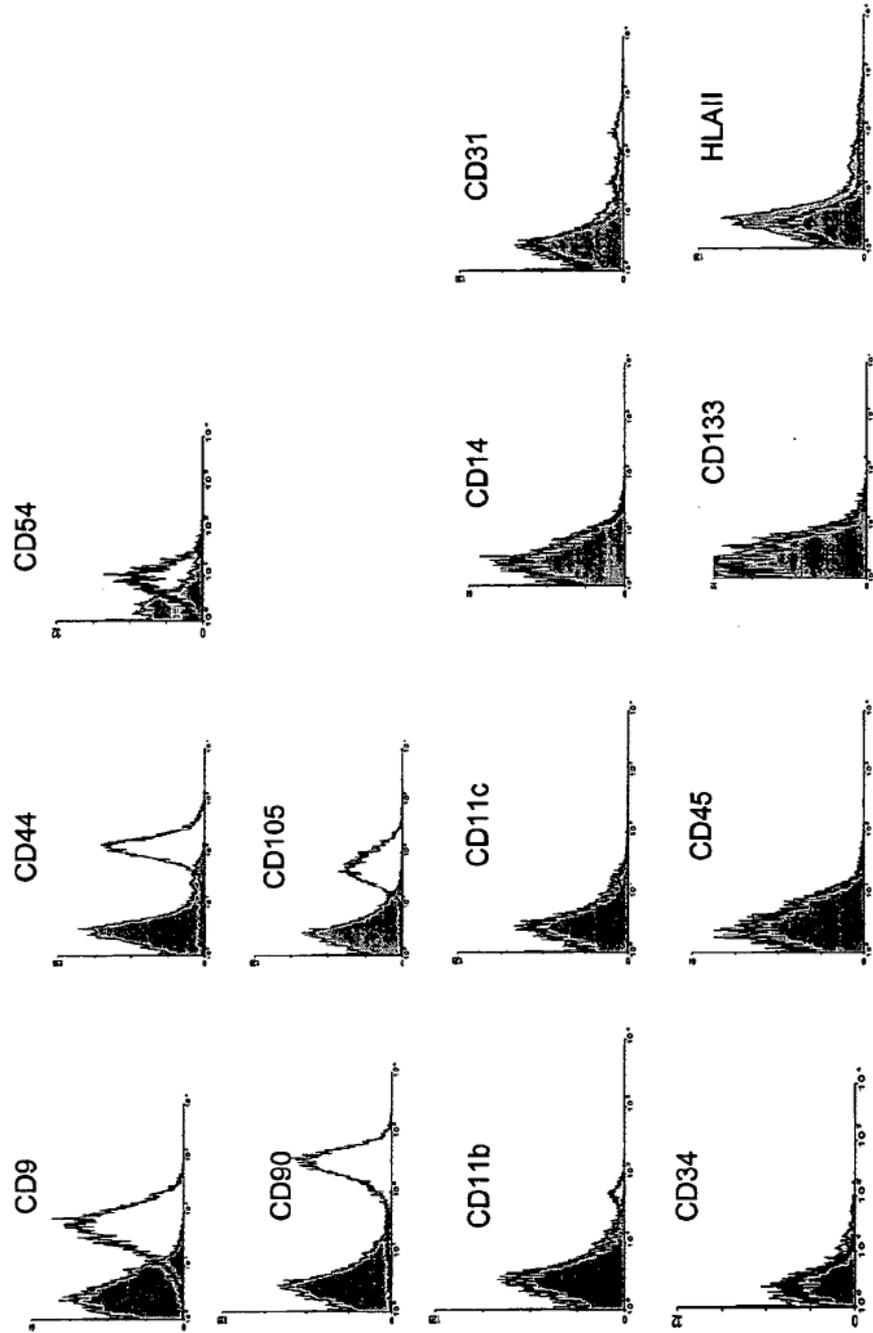
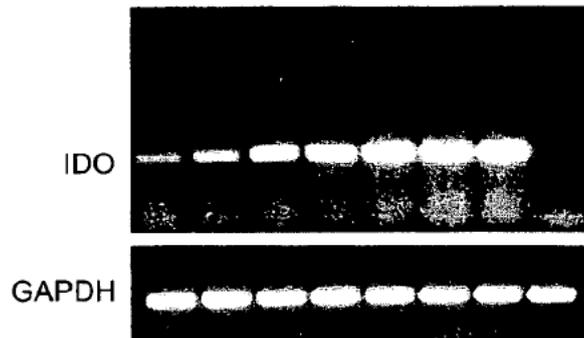


FIGURA 3

3A

48 h			IFN- γ						n.i.	C-	C+
IL-1	TNF- α	LPS	0,5h	1h	2h	4h	8h	24h	48h		



3B

FIGURA 4

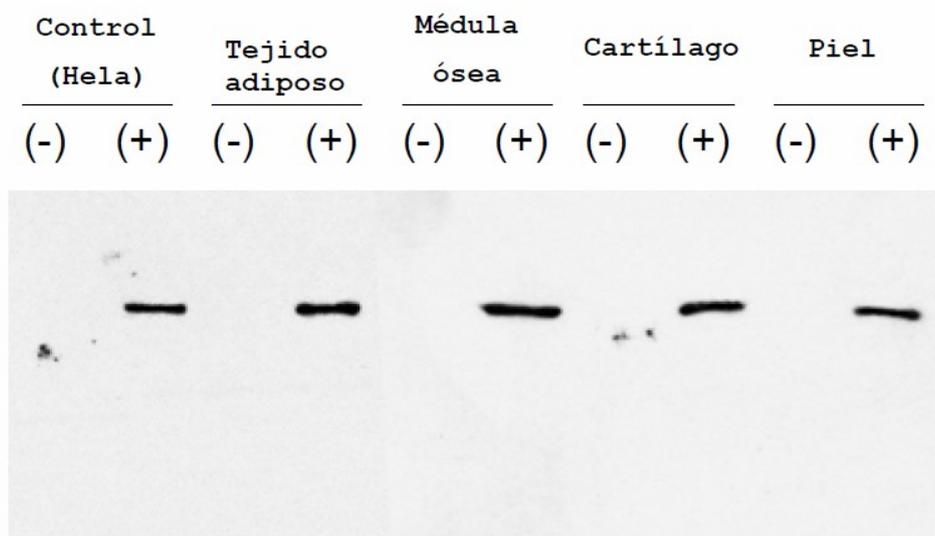


FIGURA 5

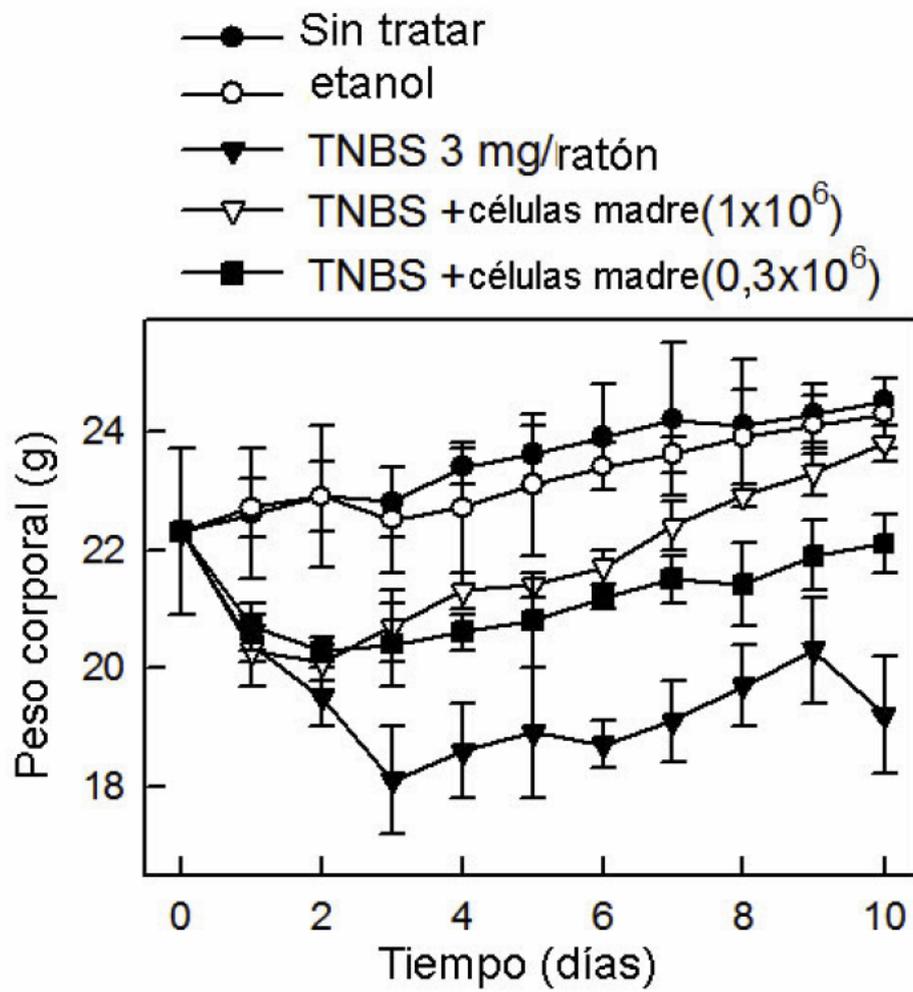


FIGURA 6

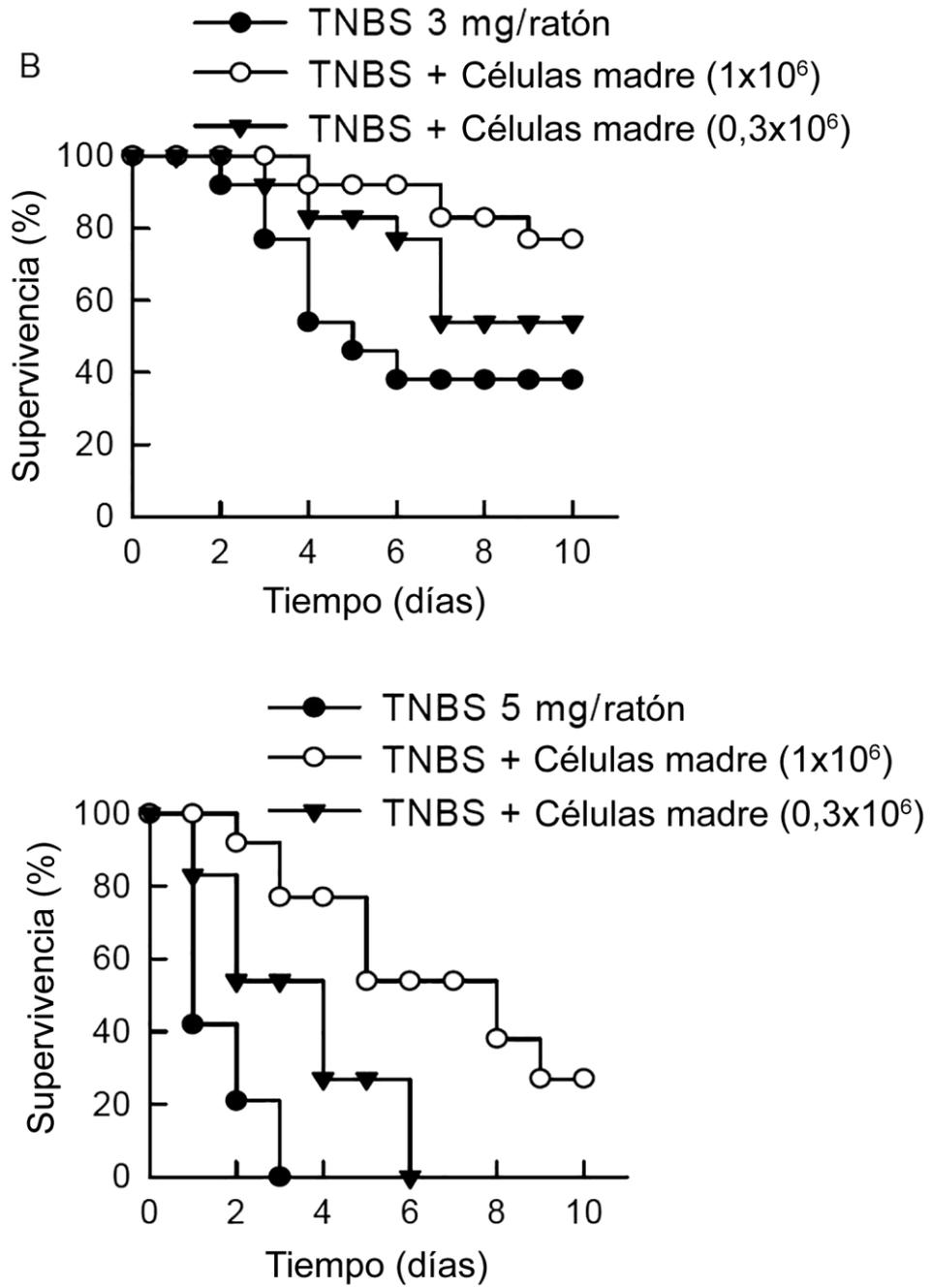


FIGURA 7

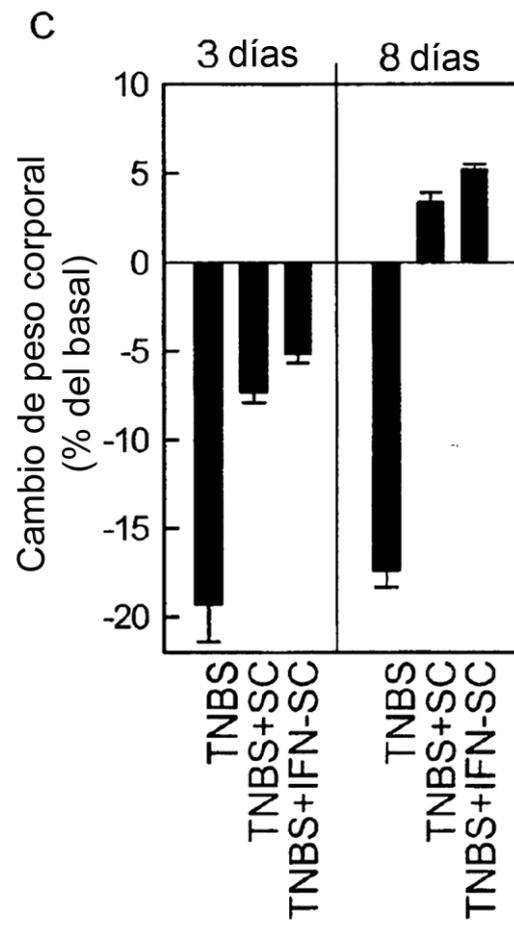


FIGURA 8

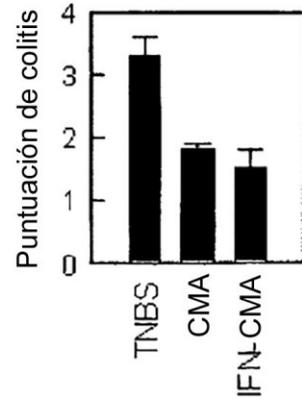
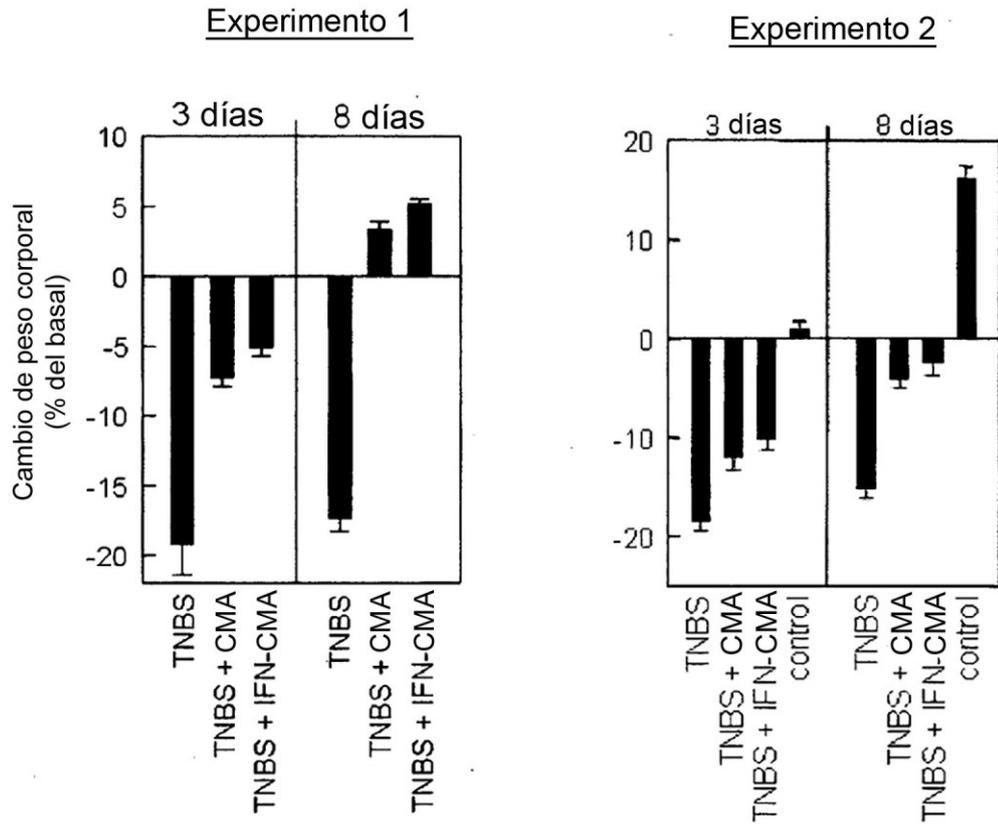


FIGURA 9

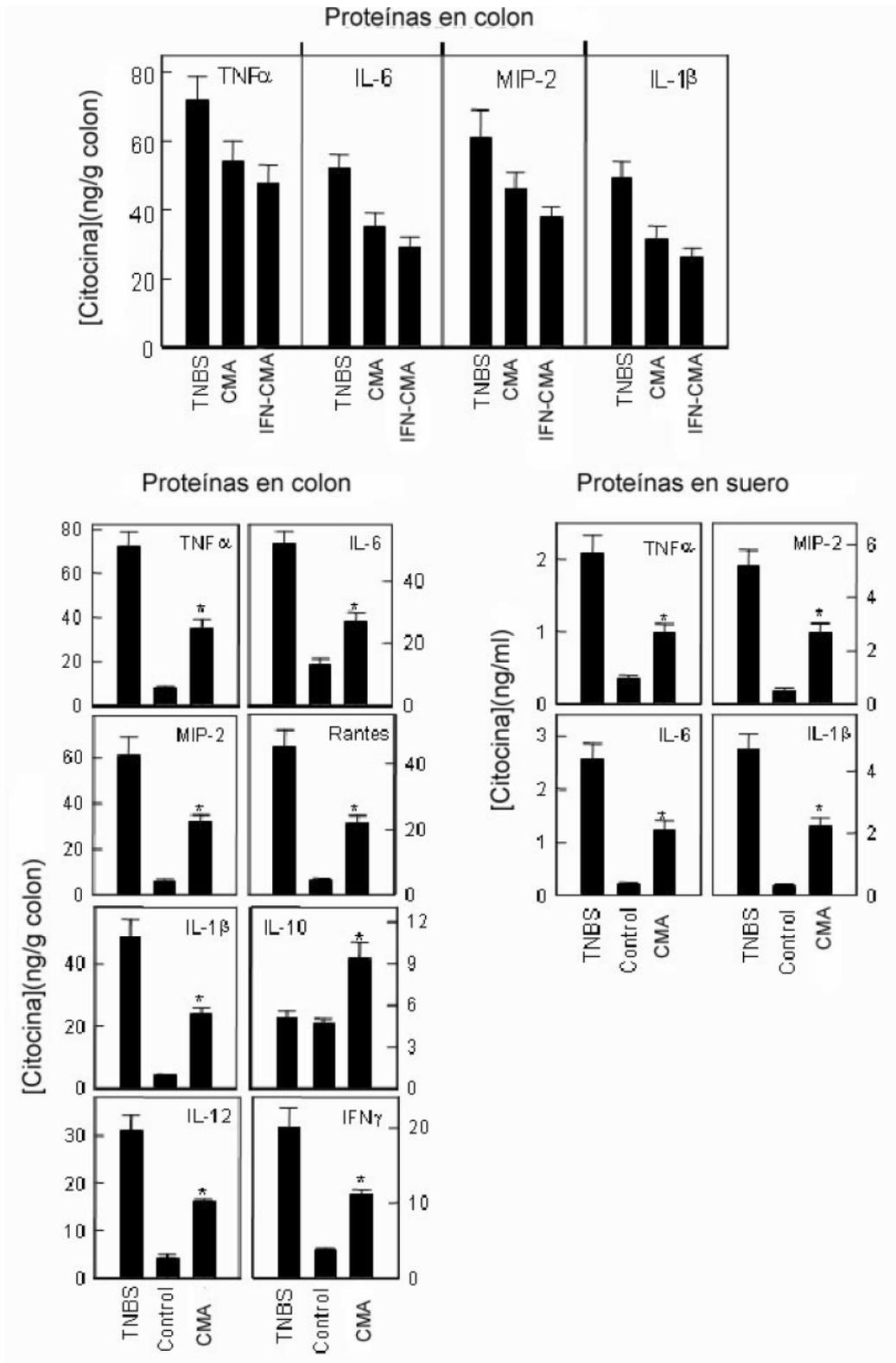


FIGURA 10

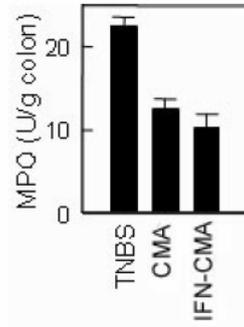


FIGURA 11

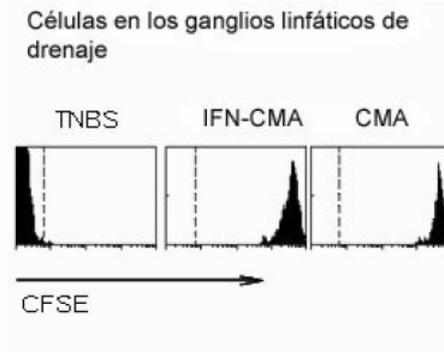


FIGURA 12

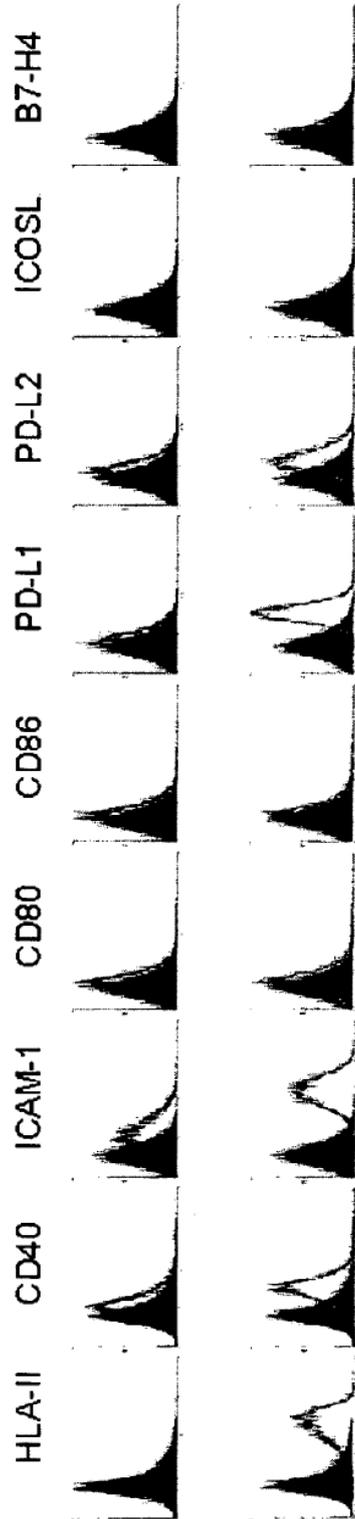


FIGURA 13

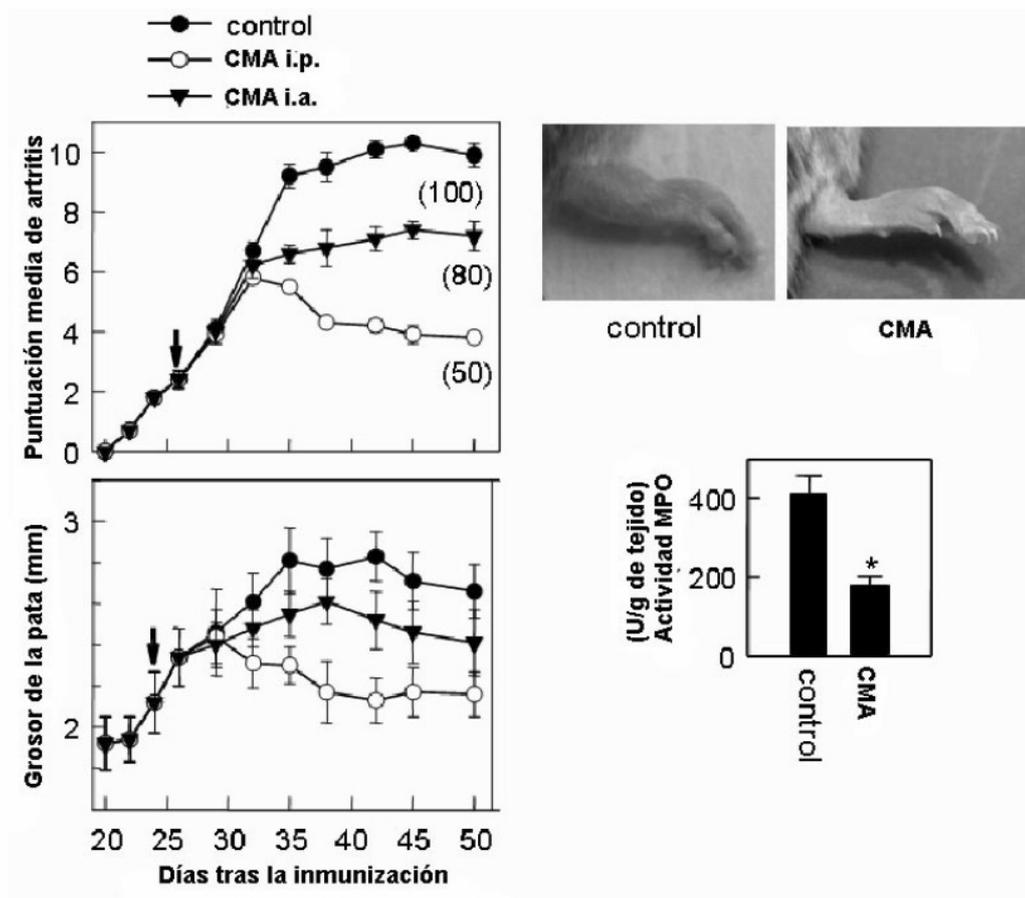
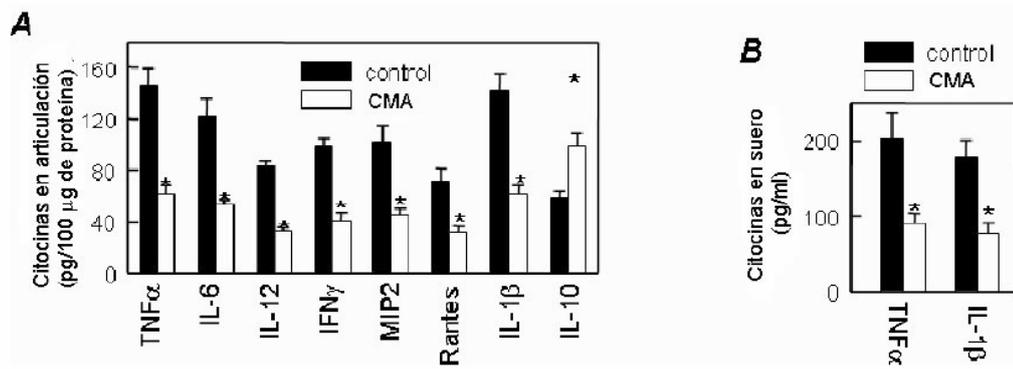
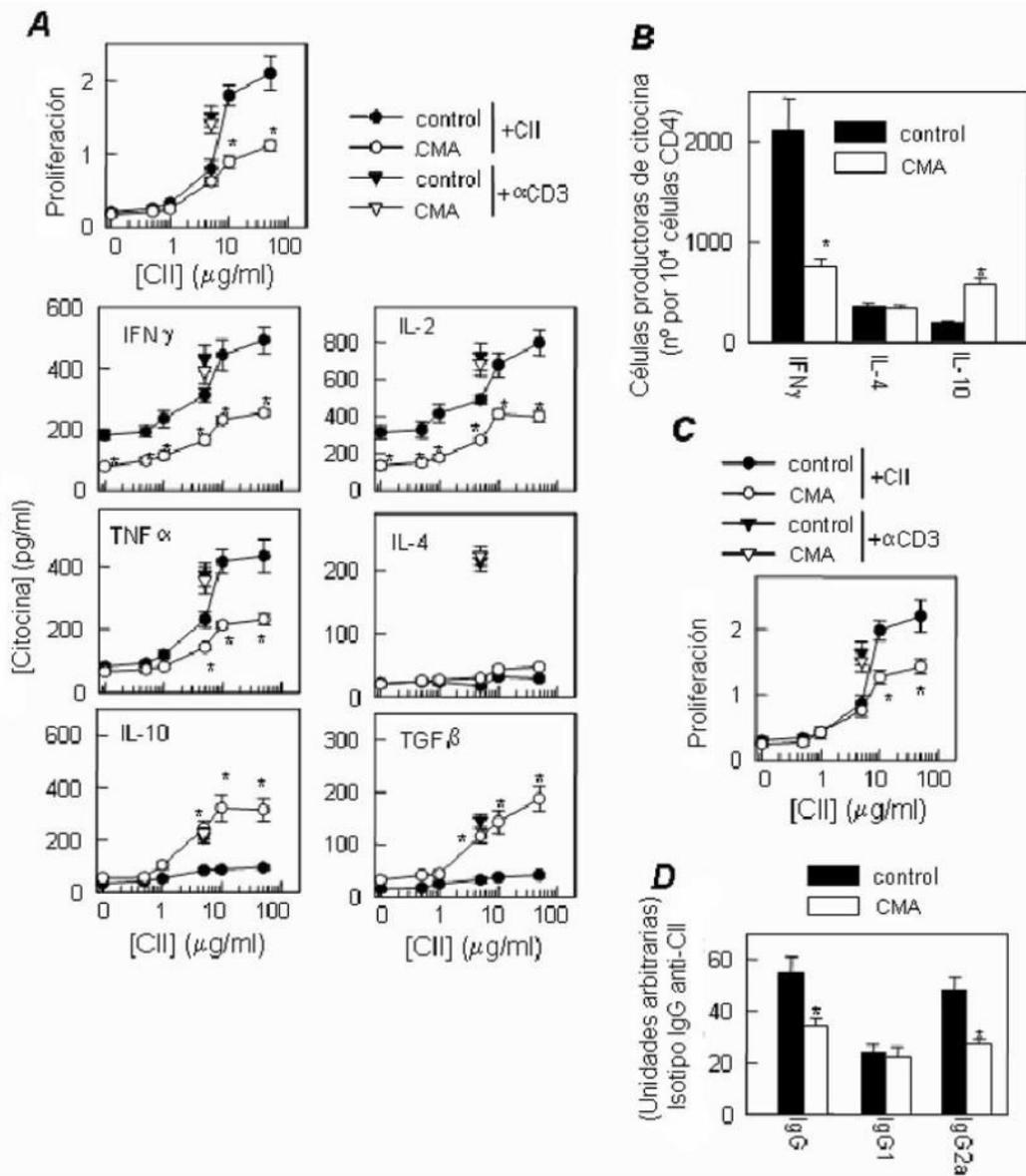


FIGURA 14



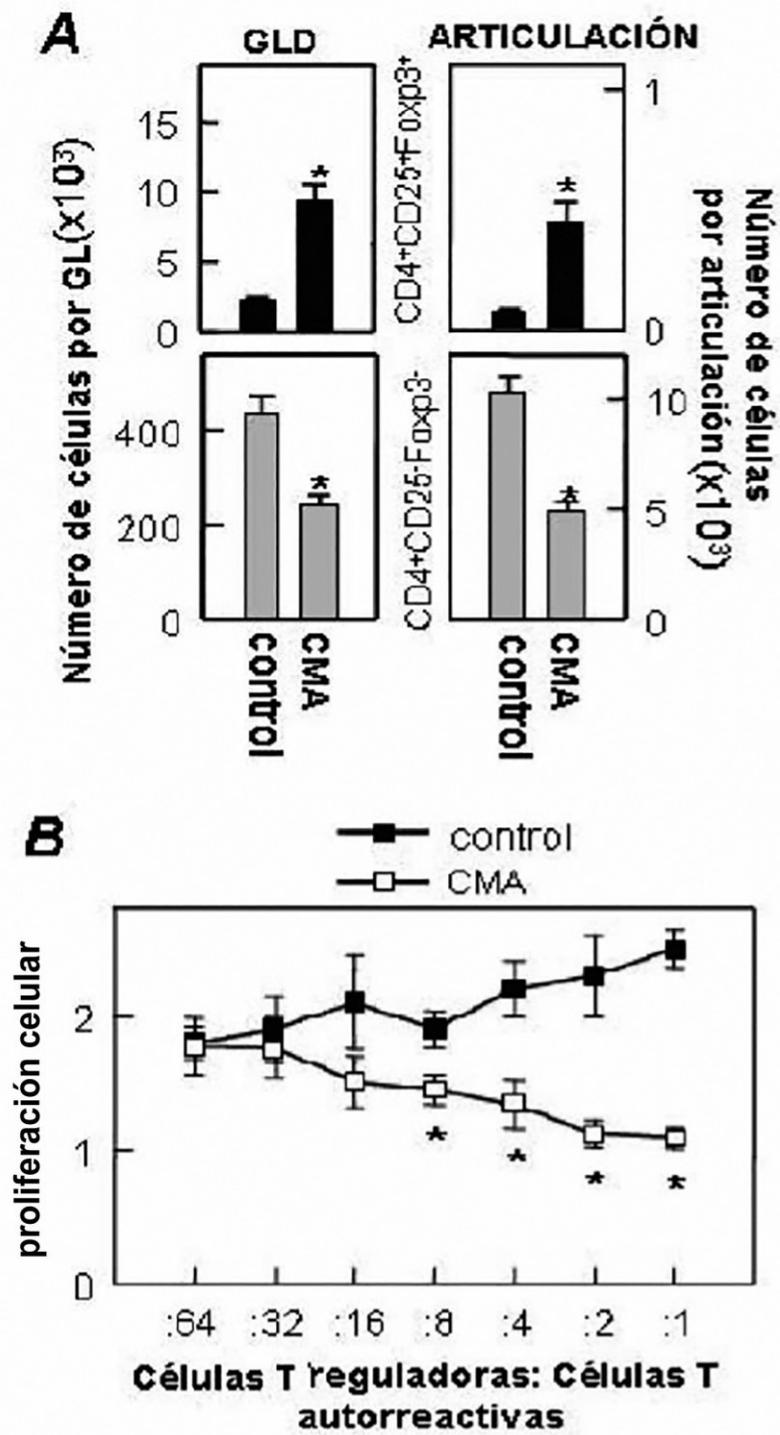
*p<0,001 frente a los controles

FIGURA 15



*p<0,001 frente a los controles

FIGURA 16



*p<0,001 frente a los controles

FIGURA 17

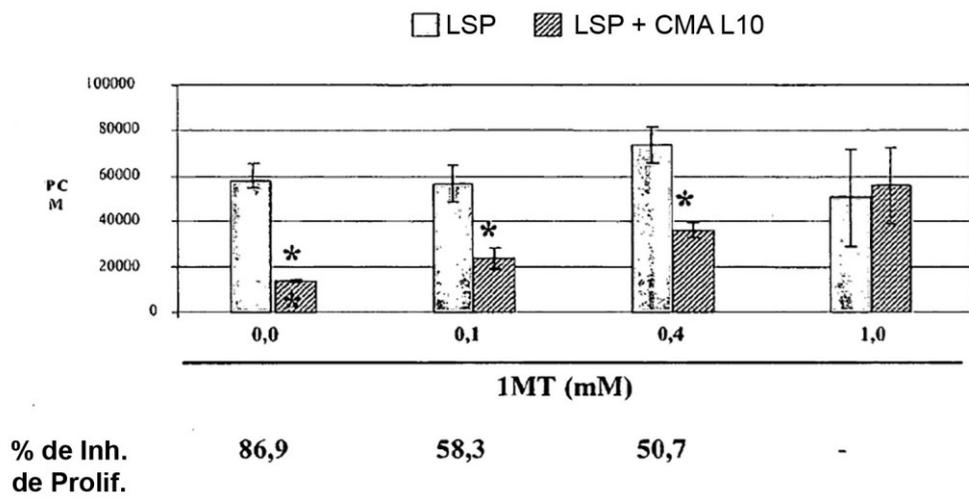


FIGURA 18

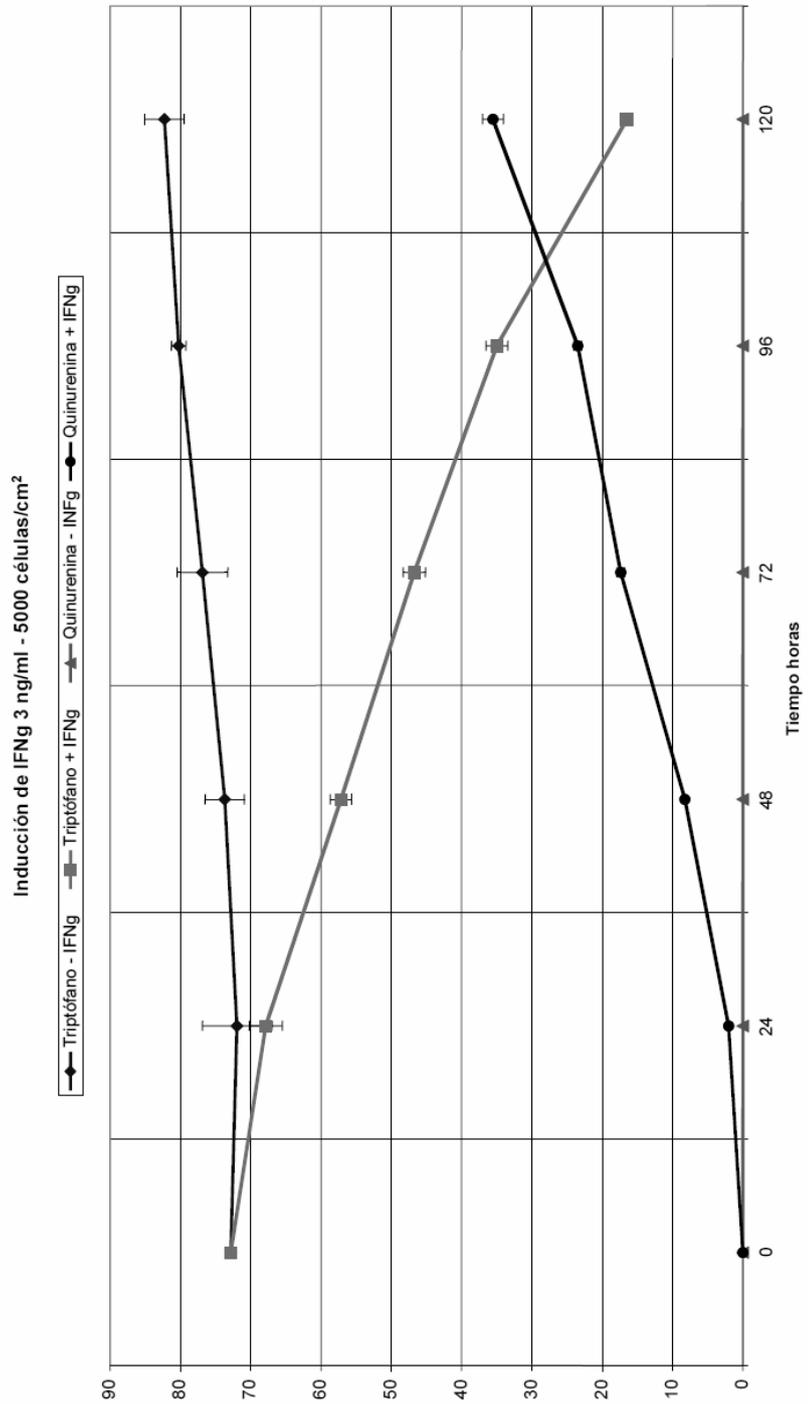


FIGURA 19

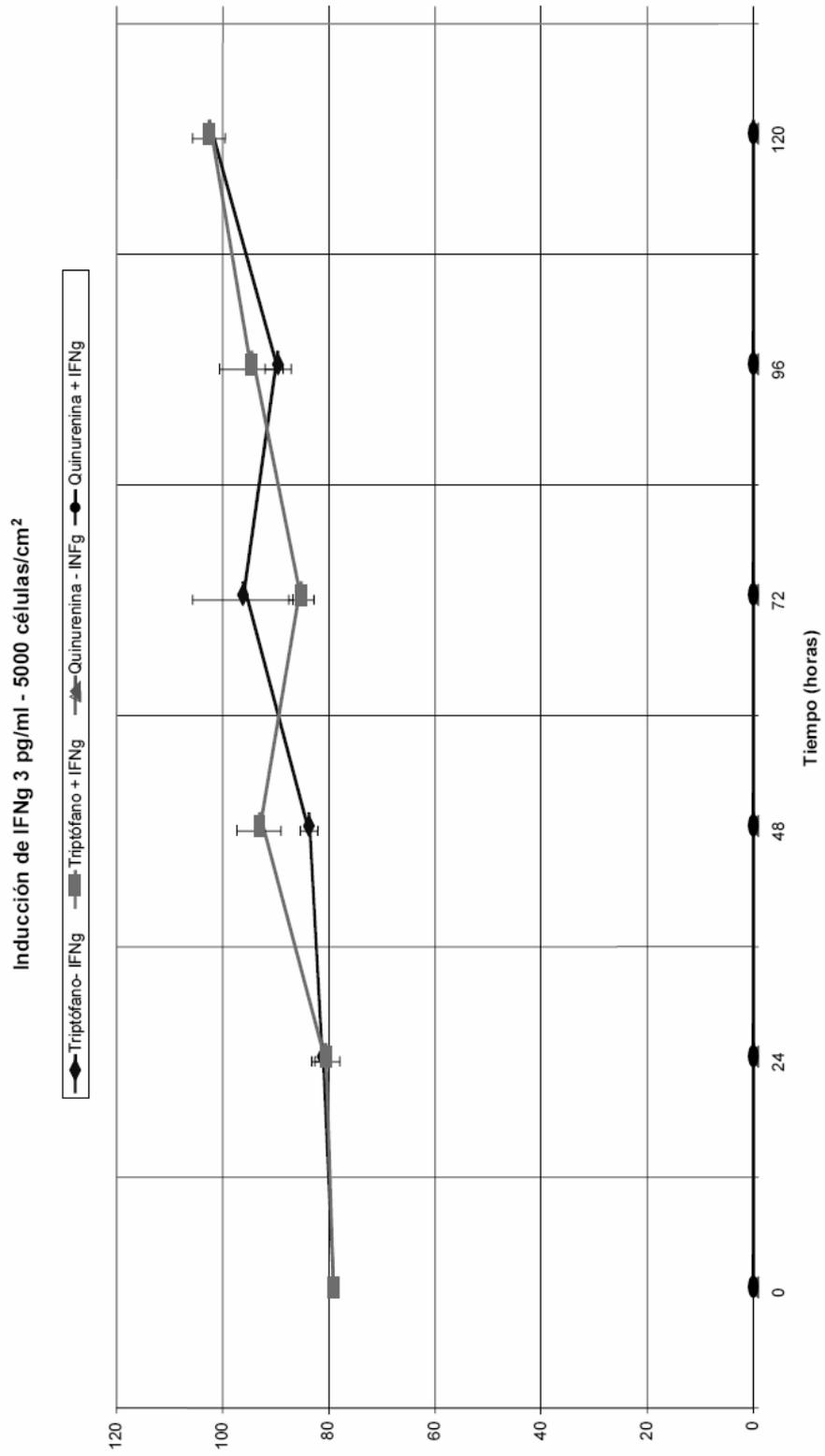


FIGURA 20

Inducción con IFNg 3ng/ml - 500 células

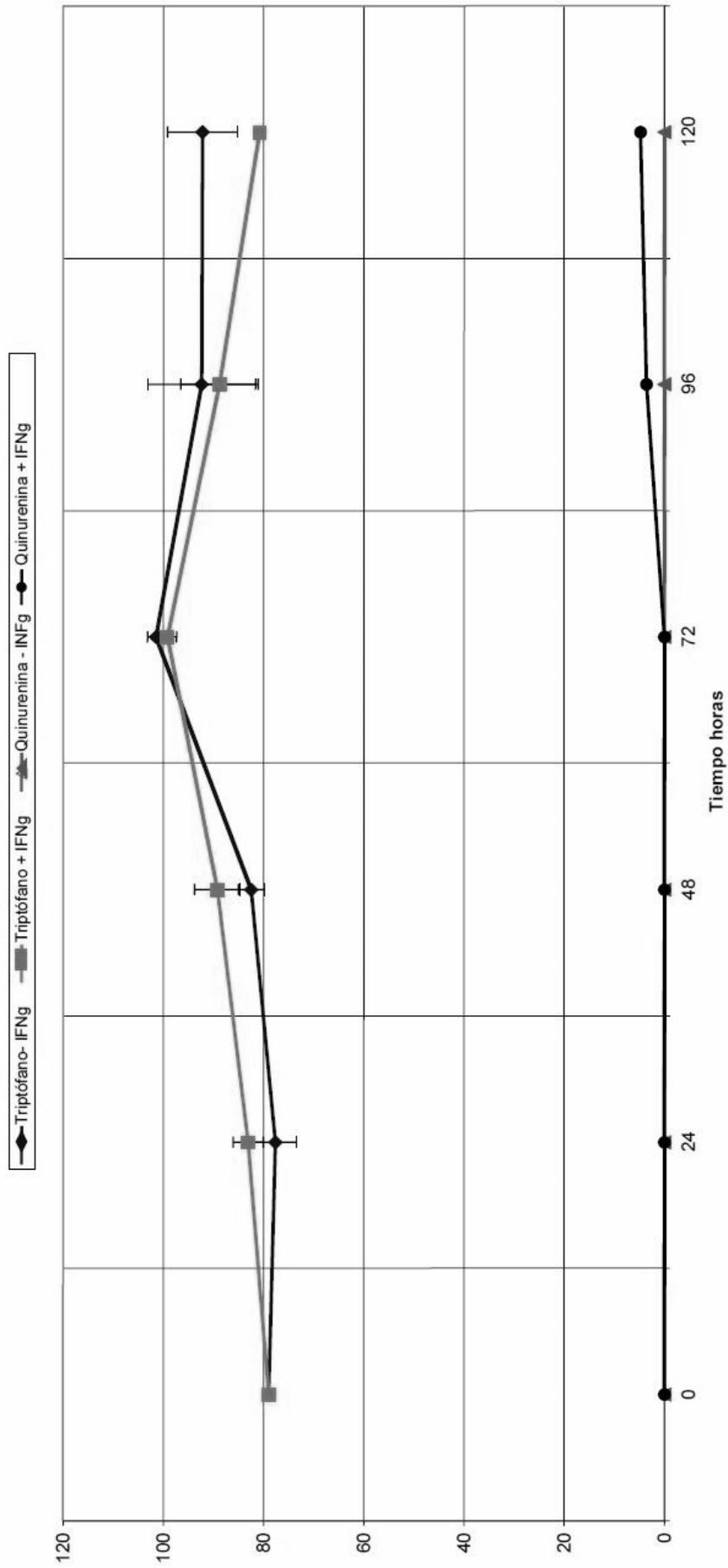


FIGURA 21

