

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 336**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2013 PCT/US2013/075208**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14093948**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2013 E 13862510 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2931877**

54 Título: **Métodos que modulan el efecto inmunorregulador de las células madre**

30 Prioridad:

14.12.2012 US 201261737616 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2020

73 Titular/es:

**RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW
JERSEY (100.0%)
Old Queen's, Somerset Street
New Brunswick, NJ 08909, US**

72 Inventor/es:

**SHI, YUFANG;
REN, GUANGWEN y
ZHANG, LIYING**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 756 336 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

Métodos que modulan el efecto inmunorregulador de las células madre

- 5 La presente invención se refiere a nuevos procedimientos para mejorar las actividades inmunosupresoras o inmunoestimuladoras de las células madre mesenquimales (MSC).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 La terapia celular implica la administración de células vivas para cualquier propósito, incluyendo propuestas de diagnóstico o preventivas y de cualquier afección, por ejemplo, medicina regenerativa, trasplante e incluso cáncer. Se cree que las células madre tienen un tremendo potencial en la terapia celular. Sin embargo, su uso eficaz en un entorno clínico ha sido esquivo por diversas razones.

- 15 Las células madre tienen dos características distintas que las distinguen de otros tipos de células. Primero, no están especializadas y pueden renovarse durante largos periodos sin cambios significativos en sus propiedades generales. En segundo lugar, en ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, las células madre pueden inducirse para diferenciarse en diversos tipos de células especializadas. Por lo tanto, las células madre resultaron muy prometedoras para la medicina regenerativa. Hay dos tipos principales de células madre: células madre embrionarias (ES) y células
20 madre adultas.

- Las células madre adultas existen en muchos tejidos maduros, tales como médula ósea, músculos, grasas y cerebro. Si bien la mayoría de los estudios de células madre adultas se han centrado en las células madre hematopoyéticas CD34+, el linaje distintivo de las células madre mesenquimales (MSC) de tipo fibroblastos CD34-, especialmente las
25 derivadas de la médula ósea, ha atraído una atención significativa de los investigadores básicos y clínicos (Chen, et al. (2006) Immunol. Cell Biol. 84:413-421; Keating (2006) Curr. Opin. Hematol. 13:419-425; Pommey y Galipeau (2006) Bull. Cancer 93:901-907). Se ha demostrado que las MSC derivadas de la médula ósea se diferencian en varios tipos de células diferentes de tejido, tal como cartílago, hueso, músculo y tejido adiposo (Barry y Murphy (2004) Int. J. Biochem. Cell Biol. 36:568-584; Le Blanc y Ringden (2006) Lancet 363:1439-1441).

- 30 Las células madre mesenquimales tienen un gran potencial para la medicina regenerativa y los trastornos autoinmunes, y se han evaluado en ensayos clínicos para tratar diferentes tipos de enfermedades, incluyendo fibrosis hepática, diabetes, EICH y enfermedad de Crohn. Las MSC pueden ayudar al injerto exitoso de médula ósea trasplantada y células diferenciadas de células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas (iPS). Por
35 consiguiente, el comportamiento inmunosupresor de las MSC puede proporcionar un procedimiento beneficioso para combatir dichas afecciones.

- Desde otro ángulo, el sistema inmune desempeña un papel clave en la lucha contra el desarrollo y la progresión tumoral. Los tumores siempre van acompañados de un microentorno inmunosupresor. Las MSC tienen una capacidad
40 intrínseca para migrar específicamente a los tumores, y se ha sugerido como un vector específico de tumor para administrar agentes antitumorales. De hecho, las MSC han sido diseñadas genéticamente para expresar diversos factores antitumorales, incluyendo interferón tipo I, TRAIL, IL-12 y LIGHT, y se ha demostrado que poseen un potente efecto antitumoral en modelos animales. Por lo tanto, mejorar las respuestas inmunológicas antitumorales mediante el uso de los efectos estimulantes guiados por MSC es muy prometedor para la terapia adicional contra el cáncer.

- 45 Los mecanismos in vivo subyacentes a través de los cuales las MSC modulan la respuesta inmunológica, la supresión o la inducción son en gran medida desconocidos. Más importante aún, los efectos clínicos de las MSC varían significativamente dependiendo del estado fisiológico y patológico del huésped, y el microentorno experimentado por las propias MSC. Por lo tanto, existe la necesidad de comprender y desarrollar adicionalmente regímenes para emplear
50 con éxito los efectos inmunomoduladores de las MSC en entornos clínicos.

- Ren Guangwen, et al. (2008) Cell Stem Cell 2(2): 141-150 divulgan que la función inmunosupresora de las MSC es provocada por IFN γ y la presencia concomitante de cualquiera de las otras tres citocinas proinflamatorias, TNF α , IL-1 α o IL-1 β .

- 55 Weitao Huang, et al. (2006) Stem Cells 24(6): 1512-1518 divulgan que IL-17A expandió las células madre mesenquimales (MSC) humanas e indujo la proliferación de células de estroma maduras en cultivos de estroma derivados de médula ósea.

- 60 Slavko Mojsilovic, et al. (2011) Cell and Tissue Research 346(3): 305-316 divulgan que IL-17 aumentó la frecuencia

de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F), así como la proliferación de MSC de médula ósea de una manera dependiente de la dosis, mientras que la suplementación básica del factor de crecimiento de fibroblastos no tuvo un efecto significativo sobre la frecuencia de CFU-F pero indujo un aumento en la proliferación celular.

- 5 El documento US2009/202479 divulga una composición y procedimientos de tratamiento para la inflamación que comprenden células madre adultas y citocinas inflamatorias, así como el tratamiento de la inflamación asociada con trastornos autoinmunes, alergias, sepsis, cáncer, así como para prevenir, reducir o tratar el rechazo al trasplante y/o la enfermedad de injerto contra huésped.

10 RESUMEN DE LA INVENCION

En el presente documento se describen procedimientos para suprimir e inducir la respuesta inmunológica por poblaciones entrenadas de MSC. También se proporciona en el presente documento una nueva fuente de adyuvantes inmunes que usan MSC modificadas genéticamente.

- 15 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición según la reivindicación 1. Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición según la reivindicación 3. Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit según la reivindicación 8.

- 20 Para su uso terapéutico, la composición farmacéutica de la invención se puede proporcionar como un kit. Un kit de la invención puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable; una población aislada de células madre mesenquimales; IFN gamma aislado (IFN γ); IL-1 alfa aislada (IL-1 α); interferones tipo 1 (IFN-I tales como IFN- α (alfa), IFN- β (beta)), factor de crecimiento transformante beta (TGF β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), interleucina-17 A aislada (IL17-A) y factor de necrosis tumoral (TNF). El kit puede contener instrucciones para usar el
25 kit en un procedimiento para atenuar una respuesta inmunológica y/o inducir o estimular una respuesta inmunológica. En otra realización más, el kit contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable, inhibidores de moléculas inmunosupresoras (tales como inhibidores de la NO sintasas (iNOS)/indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO)), otras citocinas o formulaciones terapéuticas para estimular o suprimir una respuesta del sistema inmune.

- 30 En un aspecto de la invención, la composición que contiene MSC purificadas aisladas, IFN γ e IL-17A se describe en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona una composición que comprende MSC aisladas, IFN γ , TNF α , IL-1 e IL-17 en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- En el presente documento se describen procedimientos para modular una respuesta inmunológica administrando una
35 cantidad eficaz de una composición que contiene MSC aisladas que se han tratado con IFN γ y cualquiera de las citocinas IL-1 α ; un IFN-I, TGF β , FGF, TNF α o IL-17 y cualquier combinación de las mismas, a un sujeto que necesite un tratamiento para suprimir o inducir la respuesta inmunológica del sujeto. También se describen en el presente documento procedimientos para mejorar la inmunosupresión en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición que contiene MSC aisladas que se han tratado con IFN γ y cualquiera de las citocinas IL-1
40 α , β ; TNF α o IL-17 en comparación con un sujeto que no ha recibido dicho tratamiento o que recibe fármacos antiinflamatorios que incluyen corticosteroides o fármacos antiinflamatorios no esteroideos para suprimir la inmunidad.

- Los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación en ejemplos que pretenden ilustrar, no limitar,
la invención. Los expertos en la técnica reconocerán procedimientos y materiales que son similares o equivalentes a
45 los descritos en el presente documento, y que pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 50 La Figura 1 es un gráfico que muestra que la inmunosupresión de las MSC se induce por las citocinas proinflamatorias. Las MSC clonadas se complementaron con las combinaciones indicadas de citocinas recombinantes (20 ng/ml cada una) durante 8 horas, después se cultivaron conjuntamente con blastos de linfocitos T CD4+ en una relación de 1:20 (MSC:linfocitos T), y se evaluó la proliferación después de 8 horas más. Los valores representan la media \pm DE de cinco pocillos de un representante de tres experimentos con diferentes clones. * $p < 0,001$.

- 55 La Figura 2 es un gráfico que muestra que las MSC deficientes en iNOS aumentan la DTH. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con OVA en adyuvante completo de Freund por infección de la base de la cola. Los ratones se estimularon en la almohadilla plantar con 200 μ g de OVA agregado administrado con o sin MSC de tipo silvestre o iNOS $^{-/-}$ (2,5 $\times 10^5$ células) el día 7. El aumento del espesor de la almohadilla plantar se determinó después de 24 horas como una
60 medida de DTH. Los datos mostrados son medias \pm DE de un representante de tres experimentos. * $p < 0,005$ frente a OVA en solitario.

La Figura 3 es un gráfico que muestra que las MSC previenen la EICH de una manera dependiente de las citocinas inflamatorias y NO. Los ratones receptores (C57BL/6xC3H, F1) fueron irradiados letalmente y se les inyectaron i.v. células C57BL/6 de médula ósea más esplenocitos. Los días 3 y 7 después del trasplante de médula ósea, a los receptores se les administraron las MSC indicadas. Para algunos grupos de MSC de tipo silvestre, se inyectaron i.p. 5 L-NMMA, anti-IFN γ o un cóctel de 3 anticuerpos contra TNF α , IL-1 α e IL-1 β , (3 Abs). La supervivencia se controló diariamente durante 12 semanas.

La Figura 4 es un gráfico que muestra que las células estromales de linfoma (LSC) promueven el desarrollo del linfoma de una manera dependiente de NO. La línea celular de linfoma de linfocitos B 355 (C3H-gld/gld de fondo, 0,5 x 10⁶ 10 células/ratón) se inyectó junto con células estromales de linfoma derivadas de ratones (fondo de C3H, P5, 0,25x10⁶ células/ratón) por la cola vena i.v. el día 0. Se inyectó 1400 W (inhibidor de NOS, 0,1 mg/ratón) el día 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 por i.p. La supervivencia de los ratones se registró cuando los ratones estaban moribundos.

La Figura 5 es un gráfico que muestra que la combinación de inhibidor de NOS con IFN γ promueve la terapia de 15 melanoma de ratón. Se inyectaron células de melanoma B16-F0 en ratones C57BL/6 el día 0 por i.v. (0,5x10⁶células/ratón). Se administraron por inyección i.p. IFN γ (250 ng/ratón) y 1400 W (inhibidor de NOS, 0.1 mg/ratón) el día 4, 8, 12, 16, 20. La supervivencia de los ratones se registró cuando los ratones estaban moribundos.

Figura 6. IL-17A aumenta en gran medida la expresión de iNOS inducida por citocinas inflamatorias en BM-MSC de 20 ratón tanto a nivel de ARNm como de proteína. Las BM-MSC se trataron con las citocinas indicadas. La expresión del gen iNOS se midió por PCR en tiempo real.

Figura 7. IL-17A promovió significativamente el efecto inmunosupresor mediado por MSC. Las células MSC y la línea 25 celular de hibridoma de linfocitos T A1.1 se cultivaron conjuntamente en una relación de 1:20. Los cocultivos se complementaron con IFN γ + TNF α o IL-17A + IFN γ + TNF α . La proliferación celular se midió por la densidad celular indicada por D.O. 570 nm.

Figura 8. IL-17A evitó la descomposición del ARNm de iNOS, (A) se midió la estabilidad del ARNm de iNOS en 30 diferentes puntos de tiempo después del tratamiento con actinomicina D en los grupos de tratamiento con IFN γ +TNF α e IFN γ +TNF α +IL-17A. (B) Efecto potenciador de la expresión de iNOS de IL-17A en diferentes momentos después del tratamiento con IFN γ y TNF α .

Figura 9. (A). Las MSC clonadas se trataron primero con las combinaciones indicadas de citocinas recombinantes 35 IFN γ , TNF α , IL-17A (2 ng/ml cada vez) durante 12 h, después se cultivaron conjuntamente con blastos de linfocitos T CD4⁺ a una relación de 1:20 (MSC: linfocitos T), y la proliferación se evaluó mediante la incorporación de ³H-timidina después de 12 h más. (B). La expresión de ARNm de los miembros de la familia del receptor de IL-17 en MSC o Raw 264.7 (macrófagos) se examinó por RT-PCR. NC: Sin RT. (C). La expresión superficial de IL-17RA se detectó por inmunofluorescencia o citometría de flujo en MSC clonadas. (D y E). Las MSC se trataron primero con IFN γ y TNF α 40 con o sin IL-17A (10 ng/ml), IFN γ y TNF α se complementaron a diferentes concentraciones de citocinas, durante 12 h, y después se cultivaron junto con blastos de linfocitos T CD4⁺ (D) o células de hibridoma de linfocitos T A1.1 (E) en una relación de 1:20 durante 12 h. La proliferación de linfocitos T se midió mediante la incorporación de ³H-Tdr. (F). Las MSC se trataron primero con IFN γ y TNF α (2 ng/ml) con concentraciones graduadas de IL-17A, durante 12 h, y después se cultivaron junto con células de hibridoma de linfocitos T A1.1 en una relación de 1:10 durante 12 h. La proliferación de linfocitos T se midió mediante la incorporación de ³H-timidina. (G). Las MSC se cultivaron junto con 45 esplenocitos C57BL/6 frescos más anti-CD3, anti-CD28 y anticuerpos contra IL-17A, en una relación de 1:20 o 1:40 (MSC:esplenocitos), durante 48 h, y después la proliferación celular se evaluó por la incorporación de ³H-timidina. Los valores de proliferación representan medias \pm SEM de tres pocillos de un representante de tres experimentos.

Figura 10. (A y C). Las MSC se cultivaron con diferentes combinaciones de citocinas inflamatorias IFN γ , TNF α , IL-17A 50 (10 ng/ml) durante 12 h, y después las células se cosecharon para la extracción de ARN. Los niveles de expresión de ARNm de las moléculas inflamatorias iNOS, IL-6, CXCL1 (A) y las quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10 (C) se detectaron mediante RT-PCR cuantitativa. (B). Las MSC se cultivaron con diferentes combinaciones de citocinas inflamatorias IFN γ , TNF α , IL-17A (10 ng/ml) durante 24 h, y se detectó el nivel de proteína de iNOS por Western Blot. (D). Las MSC se complementaron con Sup-CD3 o Sup-CD3 pretratados con anticuerpos contra IL-17A, y las células 55 se recogieron para extracción de ARN después de 12 h. La expresión de iNOS, IL-6, CXCL1, CCL2, CCL5, CXCL9 y CXCL10 se midió por RT-PCR cuantitativa. Sup-CD3: Sobrenadante de esplenocitos activados por anti-CD3 y anti-CD28. (E). Las MSC se trataron con Sup-CD3 o Sup-CD3 pretratados con anticuerpos contra IL-17A, y el nivel de proteína de iNOS se evaluó por Western Blot después de 24 h. Los valores de expresión de ARNm son medias \pm SEM 60 de tres pocillos de un representante de tres experimentos independientes. Los datos de Western Blot son de un representante de tres experimentos independientes.

Figura 11. Las MSC con inactivación de Act1 o control se trataron con IL-17A durante un tiempo diferente y los niveles

- de fosforilación de IκBα, ERK, p65, JNK se evaluaron por Western Blot. **(B)** Las MSC con inactivación de Act1 o control se trataron con IFNγ y TNFα con o sin IL-17A (todas las citocinas complementadas a 5 ng/ml) y los niveles de proteína de iNOS y Act1 se evaluaron mediante Western Blot. **(C)** Las MSC (inactivación de Act1 o control) se trataron con diferentes citocinas durante 12 h, y la expresión de iNOS se midió por RT-PCR cuantitativa. Los valores de expresión de ARNm son medias ± SEM. **(D)** Las MSC (inactivación de Act1 o control) se trataron primero con IFNγ y TNFα con o sin IL-17A (todas las citocinas complementadas a 5 ng/ml) durante 12 h, y después se cultivaron junto con células de hibridoma de linfocitos T A1.1 en una relación de 1:10 durante 12 h. La proliferación de linfocitos T se midió mediante la incorporación de ³H-Tdr, tomando el nivel de proliferación de A1.1 en solitario como del 100 %.
- 10 Figura 12. (A), las WT MSC o *auf1*^{-/-} MSC se trataron con IFNγ y TNFα, o junto con IL-17A (todas las citocinas complementadas a 10 ng/ml) durante 12 h, y la expresión de iNOS, IL-6 y CXCL1 se midió por RT-PCR cuantitativa. Los valores de expresión de ARNm son medias ± SEM de tres pocillos de un representante de tres experimentos independientes. (B). Las WT MSC se trataron con IFNγ y TNFα (10 ng/ml), o junto con diferentes concentraciones de IL-17A; las *auf1*^{-/-} MSC se trataron con IFNγ y TNFα (10 ng/ml), o junto con 10 ng/ml de IL-17A. Después de 24 h, las células se cosecharon para la detección de iNOS por Western Blot. Western blot es un representante de tres experimentos independientes.
- 15 Figura 13. (A y B). Las MSC de tipo silvestre (A) o *auf1*^{-/-} MSC (B) se trataron con IFNγ y TNFα, con o sin IL-17A (todas las citocinas complementadas a 10 ng/ml), durante 6 h, y después se añadió actinomicina D (5 μg/ml) para detener la transcripción. En los puntos de tiempo indicados, los niveles de ARNm se analizaron por RT-PCR cuantitativa, tomando el nivel de expresión en el momento de la adición de actinomicina D al 100 %. Los valores de expresión de ARNm son medias ± DE de tres pocillos de un representante de tres experimentos independientes.
- 25 Figura 14. (A). Las WT MSC o *auf1*^{-/-} MSC se trataron primero con IFNγ y TNFα con o sin IL-17A (todas las citocinas complementadas a 5 ng/ml) durante 12 h, y después se cultivaron junto con células de hibridoma de linfocitos T A1.1 a una relación de 1:10 durante 12 h. La proliferación de linfocitos T se midió mediante la incorporación de ³H-Tdr, tomando el nivel de proliferación de A1.1 en solitario como del 100 %. (B). Las WT MSC o *auf1*^{-/-} MSC se trataron en primer lugar con IFNγ y TNFα con o sin IL-17A (10 ng/ml), IFNγ y TNFα se complementaron a diferentes concentraciones de citocinas, durante 12 h, y después se cultivaron junto con células de hibridoma de linfocitos T A1.1 a una relación de 1:10 durante 12 h. La proliferación de linfocitos T se midió mediante la incorporación de ³H-Tdr, tomando el nivel de proliferación de A1.1 en solitario como del 100 %.
- 30 Figura 15. (A). Se midieron los niveles séricos de ALT. (n = 3-5 ratones por grupo). (B). Cálculo de números absolutos de células mononucleares (CMN) en tejidos hepáticos. (C). Los números absolutos de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ se determinaron por citometría de flujo. (D). Tinción H&E de secciones de hígado 8 h después de la administración de ConA. a. Ratones no tratados; b. ConA+PBS; c. ConA+ MSC de tipo silvestre; d. MSC de tipo silvestre tratadas previamente con ConA+ IFNγ+TNFα; e. MSC de tipo silvestre pretratadas ConA+ IFNγ+TNFα+IL-17A; f. ConA+ *auf1*^{-/-} MSC; g. *auf1*^{-/-} MSC pretratadas con ConA.+ IFNγ+TNFα; h. *auf1*^{-/-} MSC pretratadas con ConA+ IFNγ+TNFα+IL-17A.
- 40 Figura 16. Los interferones tipo I y FGF-2 regulan negativamente el efecto inmunosupresor de las MSC a través de la producción de NO de atenuación. (A) IFN de tipo I (IFN α) inhibió la expresión de la proteína iNOS inducida por IFN γ + TNF α en las MSC, sin afectar los factores transcripcionales relacionados en las rutas STAT1 y NFκB. (B) Complemento de IFN de tipo I: IFNα o β inhibieron notablemente la inmunosupresión medicada con MSC en el sistema MSC + esplenocito + anti-CD3. (C) FGF-2 (FGF β) inhibió la producción de NO inducida por IFN γ + TNF α o IFN γ + IL-1β en MSC, reflejado por el contenido de nitrato en los sobrenadantes del cultivo. (D) El complemento de FGF-2 redujo significativamente el efecto inmunosupresor de las MSC en el sistema MSC+esplenocito+anti-CD3.
- 45 Figura 17. (A) Construcción de un sistema de expresión de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) humana inducida por el promotor de óxido nítrico sintasa (iNOS) de ratón inducible en células madre mesenquimales (MSC). (A) Construcción de plásmidos. (B) Las iNOS^{-/-} MSC, las MSC iNOS^{-/-} MSC transfectadas con vector vacío y transfectadas con IDO humano se estimularon con (+) y sin (-) citocinas inflamatorias de ratón recombinantes IFNγ y TNFα. La expresión de IDO humana se midió mediante transferencia Western.
- 50 Figura 18. (A) Para determinar la eficiencia de la transducción, las células transducidas se analizaron para la expresión de GFP por citometría de flujo. (B) MSC-GFP y MSC-IFNα se cultivaron a 5×10⁵ por ml durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de IFNα mediante el kit IFNα Elisa (PBL, NJ). (C) Para probar si el IFNα liberado por las células transducidas tenía alguna función biológica, la expresión superficial de H-2Kb en MSC-GFP, MSC-GFP tratadas con IFNα recombinante (ebioscience, CA) o sobrenadante de MSC-IFNα y MSC-IFNα se examinó por citometría de flujo después de la tinción con APC-H-2Kb (ebioscience, CA).
- 60

Figura 19. (A). Se inyectaron 1×10⁶ células tumorales B16 con o sin 1×10⁶ MSC-GFP o MSC-IFNα en ratones C57BL/6

por vía intramuscular. Doce días después, los tumores se extirparon y se pesaron. (B) Se inyectaron por vía intramuscular 1×10^6 células B16 con diferentes números de MSC-IFN α : 1×10^6 (1:1), 1×10^5 (1:10), 1×10^4 (1:100), 1×10^3 (1:1000), 1×10^2 (1:10000) o sin MSC-IFN α . Doce días después, los tumores se extirparon y se pesaron. C. Se inyectaron por vía intramuscular 1×10^6 células tumoral B16 con o sin MSC-IFN α en ratones C57BL/6. La supervivencia de los ratones se controló durante cien días después de la inoculación del tumor. (D y E) Se inyectaron por vía intramuscular 1×10^6 células tumorales B16 en ratones C57BL/6. Después de tres (D) o cuatro (E) días, se inocularon por vía intramuscular 1×10^6 MSC-GFP o MSC-IFN α . Doce días después de la inoculación del tumor, los tumores se extirparon y se pesaron. F. Se inocularon por vía intramuscular 1×10^6 células tumorales B16 en ratones C57BL/6. Tres días después, se inyectaron por vía intramuscular PBS, 5 μ g de IFN α recombinante o 1×10^6 MSC-IFN α . Después de otros nueve días, los tumores se extirparon y se pesaron. Estos experimentos se repiten 2 a 3 veces. Barras de error, media \pm d.e. para todas las gráficas. La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student de dos colas no pareada.

Figura 20. (A) Se inyectaron por vía intramuscular 1×10^6 MSC-IFN α etiquetadas con luciferasa en ratones C57BL/6 junto con 1×10^6 células B16. El D0, D3, D7, D15 y D21 después de la inyección, las MSC se detectaron mediante imágenes en vivo. Brevemente, los ratones se anestesiaron y se les administraron 150 mg/kg de D-luciferina (Caliper Lifescience, MA) por vía intraperitoneal 15 minutos antes de la obtención de imágenes. Los datos BLI se obtuvieron con el sistema de imágenes Berthod NC100. (B). Las intensidades de señal de luciferasa se calcularon y se presentaron (barras de error, media \pm d.e.). (C) Se inyectaron por vía intramuscular 1×10^6 células tumorales B16 con o sin 1×10^6 MSC-IFN α en ratones C57BL/6. Doce días después, se recogieron los tumores. Para la tinción con HE y Ki-67 (Abcam, MA), las muestras tumorales se fijaron en formalina al 10 % a temperatura ambiente durante una semana y se prepararon secciones de parafina. Para el ensayo TUNEL, los tumores se incluyeron en OCT, se congelaron inmediatamente y se prepararon secciones para el ensayo TUNEL con el kit de detección de muerte celular in situ (Roche, Basilea, Suiza) siguiendo el protocolo del productor.

Figura 21. (A). Se sembraron 1000 células B16 por pocillo en una placa de 96 pocillos con 0 ng/ml, 10 ng/ml o 100 ng/ml de IFN α de ratón recombinante. Tres días después, las células se incubaron durante dos horas con 10 μ l de CCK8 (Dojindo, Shanghai, China), y se midió la D.O (450 nm). (B y C) Se inyectaron por vía intramuscular 1×10^6 células tumorales B16 con o sin 1×10^6 MSC-GFP o MSC-IFN α en ratones C57BL/6 (B) o ratones NOD-SCID (C). Doce días después, los tumores se extirparon y se pesaron. (D y E) Se inyectaron por vía intramuscular 1×10^6 células tumorales B16 con 1×10^5 , 1×10^4 MSC-IFN α o sin MSC-IFN α en ratones C57BL/6 (D) o ratones NOD-SCID (E). Doce días después, los tumores se extirparon y se pesaron. (F). Se inyectaron 1×10^6 células tumorales B16 con o sin 1×10^4 MSC-IFN α en ratones C57BL/6. El anticuerpo de agotamiento específico de células NK anti-asialo GM1 (Wako, Osaka, Japón) o el vehículo de control se inyectaron i.v. cada cuatro días desde el día anterior a la inoculación de las células tumorales. Doce días después, los tumores se extirparon y se pesaron. (G) Se inyectaron 1×10^6 células tumorales B16 con o sin 1×10^4 MSC-IFN α en ratones C57BL/6 o ratones con deficiencia de β 2m. Doce días después, los tumores se extirparon y se pesaron. Estos experimentos se repiten 2 a 3 veces. Barras de error, media \pm d.e. para todas las gráficas. La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student de dos colas no pareada.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN REALIZACIONES PREFERIDAS

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención y se entenderá que tiene los significados que se describen a continuación. En el caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significará hasta más o menos el 5 % del término particular.

Como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" se refiere a excluir otros principios activos o cualquier otro ingrediente que pueda afectar materialmente a la característica básica de una composición, formulación o estructura, pero que generalmente incluye excipientes.

Como se usa en el presente documento de la invención, una "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad de células madre, citocinas, o una composición terapéutica que contiene ambas, que es suficiente para modular, atenuar o inducir una respuesta inmunológica (es decir, supresión de respuestas de los linfocitos T o promoción de una respuesta inmunológica) en el sujeto, reduciendo así al menos un signo o síntoma de la enfermedad o trastorno bajo tratamiento.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" y similares, se refieren a aliviar los signos o síntomas de la enfermedad logrados mediante la administración de una composición a un paciente que necesita dicho tratamiento. Dicho alivio puede tener lugar antes de que aparezcan signos o síntomas de la

enfermedad, así como después de su aparición, por lo tanto, abarca el tratamiento profiláctico y activo. Además, "tratar", "que trata" o "tratamiento" no requiere un alivio completo de los signos o síntomas, o una cura. A nivel celular, puede incluir la reducción de la población celular enferma o diana en al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % en comparación con las células no tratadas o células tratadas con control o un agente comparativo.

Como se usa en el presente documento, los términos "administración" o "administrar" o "régimen de tratamiento" dentro del alcance de la presente invención incluyen una administración terapéutica única, o administraciones múltiples o repetidas, o una administración terapéutica de control de cualquiera de los componentes individuales de la presente invención o en combinación. Dichos términos también pretenden incluir modos de administraciones tales como local, sistémica, intravascular, intramuscular, intraperitoneal, dentro de la barrera hematoencefálica, inyección intervencionista específica de órganos o por otras vías diferentes.

En términos generales, la presente invención describe la composición, los procedimientos y los kits que emplean citocinas inflamatorias tales como IL-1 α , interleucina beta (IL-1 β), TNF α , IL-17 A, IFN-I, TGF β , FGF para tratar previamente las MSC para aumentar sus efectos inmunomoduladores, tales como los efectos inmunosupresores, en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades tales como esclerosis múltiple, artritis, lupus, sepsis, hepatitis, cirrosis, enfermedad de Parkinson, infecciones crónicas, EICH e incluso cáncer y tumores sólidos.

La inmunosupresión es provocada por la citocina inflamatoria, producida durante una respuesta inmunológica. En ausencia de citocinas inflamatorias, las MSC no obtienen sus propiedades inmunosupresoras. Al menos un aspecto de la presente invención describe la adición de citocinas inflamatorias para cebar y entrenar MSC para lograr una función inhibidora potente y duradera hacia la respuesta inmunológica. Dicha afectación podría manifestarse particularmente por la proliferación de linfocitos T activados u otros parámetros de respuesta inmunológica, incluidos los macrófagos activados y otras células inmunes, los niveles séricos de citocinas inflamatorias tales como IFN γ o TNF α .

El papel crucial de las citocinas inflamatorias ha sido mediante estudios in vivo sobre la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), encefalomiелitis autoinmune experimental, hepatitis autoinmune, infecciones crónicas, cirrosis hepática, cirrosis pulmonar y artritis reumatoide. En al menos un aspecto de la invención, se describen MSC modificadas genéticamente que pueden aumentar inversamente la respuesta inmunológica, debido a la secreción de una gran cantidad de quimiocinas y factores de crecimiento por MSC en ausencia o reducción de NO oIDO. Por lo tanto, la presente invención ofrece potentes estrategias supresoras y aumentativas para controlar la respuesta inmunológica.

Al menos un aspecto de la invención está dirigido a una población de células madre cebadas o entrenadas que se obtienen mediante un procedimiento de (i) obtención de células progenitoras multipotentes de una fuente celular, (ii) cultivo de dichas células multipotentes en un medio adecuado, (iii) separación de las células madre mesenquimales de células diferenciadas en dicho medio, (iv) activación de al menos un subconjunto de dichas células madre mesenquimales separadas con IFN γ y al menos una citocina en cantidades eficaces, seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α I, IL-1 β , IL-17A, TGF α , FGF, IFN-I (IFN α , β), TNF α , y cualquier combinación de las mismas. Un subconjunto de estas células madre entrenadas producidas por dicho procedimiento puede potenciar, impulsar, mejorar o inducir la respuesta inmunológica cuando se administra a un sujeto que lo necesita. El sujeto puede ser un mamífero, preferiblemente un ser humano, o un paciente humano que padece una enfermedad. Otro subconjunto de células madre capacitadas puede ser capaz de suprimir, disminuir o atenuar la respuesta inmunológica en un sitio de interés.

También se describe en el presente documento un procedimiento para producir una población de células madre cebadas o entrenadas siguiendo las etapas de (i) obtener células progenitoras multipotentes de una fuente celular, (ii) cultivar dichas células multipotentes en un medio adecuado, (iii) separar las células madre mesenquimales de células diferenciadas en dicho medio, (iv) activar al menos un subconjunto de dichas células madre mesenquimales separadas con IFN γ y al menos una citocina en cantidades eficaces, seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL-17A, TGF α , FGF, IFN-I (IFN α , β), TNF α , y cualquier combinación de las mismas. El procedimiento puede emplear un medio específico que puede lograr las propiedades óptimas de MSC. El procedimiento puede incluir una etapa de filtración o extracción donde todas las citocinas residuales se separan sustancialmente de las células madre entrenadas producidas. Las células madre entrenadas utilizadas en el presente documento se refieren a las células madre producidas por el procedimiento descrito en el presente documento y pueden consistir en células madre clonales, no clonales o de ambos tipos.

En una realización, los subconjuntos de células madre entrenadas pueden suprimir, disminuir o atenuar la respuesta inmunológica en un sitio de interés. En el presente documento se describen reactivos farmacéuticos que bloquean las propiedades inmunosupresoras de otros tratamientos o regímenes biológicos tales como interferón o vacunas.

También se describen en el presente documento composiciones que bloquean las propiedades inmunosupresoras de las MSC asociadas a tumores para mejorar la inmunidad a enfermedades inmunosupresoras tales como cáncer. Por consiguiente, las células entradas para MSC pueden ser complementarias o usarse en combinación con otros protocolos estándar de terapia inmunológica tumoral para aumentar la respuesta inmunitaria bajo estrés. Dicha terapia
5 inmunológica puede incluir vacunas e inmunoterapias contra el cáncer usando MSC genética, biológica y farmacéuticamente modificadas, vacunas y terapias proteicas o génicas como adyuvantes inmunes.

En el presente documento se divulga un procedimiento para estimular la respuesta inmunológica en un sujeto que lo necesita según las etapas de (a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que contiene un inhibidor
10 de la óxido nítrico sintasa inducible, un inhibidor de indoleamina 2, 3-dioxigenasa, una población de células madre mesenquimales deficientes en óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), una población de células madre mesenquimales deficientes en 2,3-dioxigenasa indoleamina (IDO), o cualquier combinación de los mismos, y (b) inhibir la producción de uno o más de óxido de nitrógeno (NO), indoleamina 2, 3 dioxigenasa (IDO) o prostaglandina E 2 (PGE2).

15 Al menos otro aspecto de la invención se refiere a una composición que incluye (a) una población de células madre mesenquimales aisladas producidas por un procedimiento que comprende las etapas de: (i) obtener células progenitoras multipotentes de una fuente celular; (ii) cultivar dichas células multipotentes en un medio para producir una subpoblación de células madre mesenquimales y una subpoblación de células diferenciadas; (iii) separar células madre mesenquimales de células diferenciadas en dicho medio, (iv) activar al menos un subconjunto de dichas células
20 madre mesenquimales separadas con IPNy y al menos una citocina en cantidades eficaces seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , TGF β , FGF, IFN-I (IFN α , β), TNF α , y cualquier combinación de las mismas; y opcionalmente (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición obtenida puede inducir la respuesta inmunológica del sujeto que recibe dicha composición. En otra realización, dicha composición puede estar sustancialmente libre de cualquier citocina usada durante la fase de expansión. El término sustancialmente libre como
25 se usa en el presente documento pretende tener menos del 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 % o el 0,1 % por peso de la composición. En otra realización, la población celular puede contener además células madre mesenquimales clonadas o no clonadas, células diferenciadas, o una mezcla de las mismas.

En otra realización, la etapa de activación de las MSC se logra presentando al menos un subconjunto de MSC a IPNy
30 y al menos una citocina en cantidades eficaces seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL -17 A, TNF α , y cualquier combinación de las mismas durante un periodo de tiempo suficiente para obtener las propiedades inmunosupresoras deseadas. En esta realización, la composición obtenida contiene MSC aisladas que suprimen o atenúan la respuesta inmunológica en el sujeto que recibe dicha composición tanto por vía sistémica como local. En otra realización, la composición está sustancialmente libre de cualquier citocina residual. En dicha realización, la
35 composición suprime la proliferación de linfocitos T inmunes locales. En otra realización, la población celular puede contener además células madre mesenquimales clonadas o no clonadas, células diferenciadas o incluso una mezcla de las mismas, donde al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 % o el 90 % de dicha población de células está formada por MSC clonadas.

40 También se describen en el presente documento procedimientos para activar, potenciar, aumentar o inducir la respuesta inmunológica en un paciente que lo necesite, donde una población de MSC aisladas se ceba o se entrena mediante la exposición a (a) IPNy aislado y (b) al menos una citocina en cantidades eficaces seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , TGF β , FGF, IFN-I (IFN α , β), TNF α y cualquier combinación de las mismas durante un periodo de tiempo suficiente. Como se usa en el presente documento, la frase "periodo de tiempo suficiente"
45 dentro del alcance de la presente invención incluye un periodo de tiempo necesario para entrenar a las MSC para exhibir las propiedades deseadas. Dicho periodo de tiempo varía de al menos 1 hora a aproximadamente 4 semanas, incluyendo 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, etc. La población celular puede contener además células madre mesenquimales clonadas o no clonadas, células diferenciadas o incluso una mezcla de las mismas, donde al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 % o el 90 % de dicha población de células está formada por MSC clonadas.

50 La población de MSC aisladas puede administrarse por separado o como una mezcla con el IPNy aislado y/u otras citocinas. El paciente que lo necesita puede padecer cualquiera de uno de trastorno autoinmune, alergia, sepsis, cirrosis, cáncer, infecciones virales y trasplante de órganos.

55 El procedimiento para inducir inmunosupresión puede emplear una población de células madre mesenquimales entrenadas que se obtienen mediante un procedimiento específico de (i) obtener células progenitoras multipotentes de una fuente celular tal como una médula ósea, (ii) cultivar dichas células, incluyendo células madre diferenciadas y multipotentes en un medio adecuado, (iii) separar las células madre mesenquimales de las células diferenciadas en dicho medio, (iv) activar al menos un subconjunto de dichas células madre mesenquimales separadas exponiéndolas
60 durante un periodo de tiempo suficiente a IPNy y al menos una citocina seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL-17A y TNF α . El medio utilizado para activar las células madre mesenquimales no tiene ninguna otra fuente de citocinas.

El procedimiento para tratar al sujeto que lo necesita puede incluir administrar cantidades eficaces de una composición que contiene las células mesenquimales entrenadas por vía local a un sitio afectado por una afección para tratamiento.

- 5 También se divulgan en el presente documento procedimientos para inducir la expresión de NO sintasas (iNOS), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en al menos un subconjunto de dichas células madre mesenquimales. El aumento de la concentración de NO, metabolitos IDO en el sitio de tratamiento puede mejorar el resultado clínico.

Una población de MSC puede transducirse con éxito para liberar IFN α funcional. En el presente documento se describen procedimientos para usar MSC secretora de IFN α para tratar el cáncer y controlar el crecimiento tumoral.

En otro aspecto más de la presente invención, las poblaciones de células madre entrenadas se describen en un kit terapéutico para su uso en un entorno clínico. En al menos una realización, el kit terapéutico contiene además IFN γ y al menos una citocina tal como IL-1 α , IL-1 β , IL-17A, IFN-I, TGF β , FGF, TNF α , y cualquier combinación de las mismas. En realizaciones particulares, los kits terapéuticos pueden ensamblarse para usarse para inmunosupresión o mejora inmunológica con instrucciones apropiadas para desencadenar dicha respuesta inmunológica respectivamente. En una realización, el kit puede consistir esencialmente en MSC entrenadas, IFN γ y al menos otra segunda citocina, pero sin ningún otro principio activo que altere materialmente el comportamiento de las MSC entrenadas.

En una realización, el kit terapéutico para inmunosupresión contiene una población de células madre entrenadas, IFN γ y al menos una citocina tal como IL-1 α , IL-1 β , IL-17A, TNF α y cualquier combinación de las mismas. En otra realización, el kit terapéutico para la mejora inmunológica contiene una población de células madre clonadas entrenadas, IFN γ y al menos una citocina tal como IL-1 α , IL-1 β , IFN-I, TGF, TNF α y cualquier combinación de las mismas. En otra realización, las citocinas son de tipo aislado. En otra realización, las instrucciones para usar el kit articulan las etapas para desencadenar el resultado clínico deseado.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para estimular la respuesta inmunológica en un paciente que los necesite que padece, por ejemplo, cáncer o una infección viral. A los pacientes se les pueden administrar cantidades eficaces de una composición que comprende un inhibidor de óxido nítrico sintasa inducible, un inhibidor de indoleamina 2, 3-dioxigenasa, una población de células madre mesenquimales deficientes en óxido nítrico inducible (iNOS), una población de células madre mesenquimales deficientes en indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o cualquier combinación de los mismos. El procedimiento puede causar la inhibición de la producción de uno o más de óxido de nitrógeno (NO), indoleamina 2, 3 dioxigenasa (IDO) o prostaglandina E 2 (PGE2), 1-MT, 1400W, L-NMMA u otros agentes adecuados. Los inhibidores mencionados anteriormente de iNOS o IDO pueden administrarse individualmente o como una mezcla. El estado del paciente puede ser posterior a la recepción de un régimen de inmunoterapia, incluyendo un régimen que incluye las MSC entrenadas o cebadas descritas en el presente documento, u otro régimen de inmunoterapia que puede incluir el tratamiento con interferones indicados, anticuerpos, terapia celular u otras terapias que modulan la respuesta inmunológica.

En el presente documento también se divulgan procedimientos para cribar reactivos o fármacos para inhibir o aumentar la actividad de IDO en MSC de mamífero, incluyendo MSC humanas o de ratón, mediante la construcción de células deficientes en iNOS de ratón que expresan IDO humana donde la proteína IDO consiste en la secuencia de aminoácidos codificada por el gen IDO humano bajo el control del promotor iNOS de ratón, mejorando así la función inmunosupresora de las MSC. También se describen procedimientos para cribar reactivos o fármacos para mejorar o inhibir la actividad de IDO en el modelo de ratón con expresión de IDO humana controlada por el promotor iNOS de ratón, de modo que dicha administración regula la actividad de IDO, por lo tanto, trata la enfermedad implicada en la expresión anormal de IDO en cáncer o infecciones, especialmente en combinación con terapias inmunes.

Las células madre mesenquimales humanas pueden derivarse de varias fuentes celulares, por ejemplo, derivados de placenta o de la médula ósea, u obtenerse de varias fuentes diferentes, incluyendo tapones de piezas de hueso esponjoso de la cabeza femoral, obtenidos de pacientes con enfermedad degenerativa de las articulaciones durante la cirugía de reemplazo de cadera o rodilla, y de médula aspirada obtenida de donantes normales y pacientes de oncología de los que se ha obtenido médula para un futuro trasplante de médula ósea. Aunque la médula recolectada generalmente está preparada para la separación del cultivo celular mediante varios procedimientos de aislamiento mecánico diferentes que dependen de la fuente de la médula recolectada (es decir, la presencia de astillas de hueso, sangre periférica, etc.), la etapa crítica involucrada en los procedimientos de aislamiento es el uso de un medio especialmente preparado que contiene agentes que permiten no solo el crecimiento de células madre mesenquimales sin diferenciación, sino también la adherencia directa de solamente las células madre mesenquimales al área de superficie de plástico o vidrio de la placa de cultivo.

Al producir un medio que permita la unión selectiva y la supervivencia de las células madre mesenquimales deseadas,

que están presentes en las muestras de médula en cantidades muy pequeñas, es posible separar las células madre mesenquimales de las otras células (es decir, glóbulos rojos y blancos, fibroblastos, otras células mesenquimales diferenciadas, etc.) presentes en la médula ósea. Otras fuentes de MSC humanas incluyen el cordón umbilical, el tejido graso y la raíz del diente. Las MSC son progenitores multipotentes para una diversidad de tipos celulares del linaje de células mesenquimales, incluyendo hueso, cartílago, grasa, tendón, tejido nervioso, fibroblastos y células musculares. Las células madre mesenquimales pueden aislarse y purificarse de tejidos tales como médula ósea, sangre (incluida sangre periférica), periostio y dermis, y otros tejidos que tienen orígenes mesodérmicos. A este respecto, se ha encontrado que, aunque estas células progenitoras están normalmente presentes en la médula ósea, por ejemplo, en cantidades muy pequeñas y que estas cantidades disminuyen considerablemente con la edad (es decir, de aproximadamente 1/10.000 células en un paciente relativamente joven a tan poco como 1/2.000.000 en un paciente anciano), las células madre mesenquimales humanas pueden aislarse de diversos tejidos y purificarse cuando se cultivan en un medio específico mediante su unión selectiva, denominada "adherencia" a los sustratos.

Las células madre mesenquimales se identifican típicamente basándose en la expresión o falta de expresión de marcadores particulares. Por ejemplo, las MSC son CD34-, CD11b, CD11c-, CD45-, MHC de clase II, CD44+, Sca-1+, y MHC de clase I bajo. Además, las MSC pueden identificarse por su capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células mesenquimales. Los experimentos in vitro han demostrado que las condiciones de cultivo, los aditivos, los factores de crecimiento y las citocinas pueden inducir con precisión a las MSC a convertirse en células mesenquimales seleccionadas. Por ejemplo, se ha demostrado que la dexametasona en combinación con isobutilmetilxantina o insulina o una mezcla de isobutilmetilxantina, insulina e indometacina impulsa a las MSC a diferenciarse en adipocitos. Del mismo modo, las MSC pueden diferenciarse en células del músculo esquelético cuando se estimulan con 5-azacitidina. Se ha demostrado que 13-VGF hace que las células madre mesenquimales se diferencien en células musculares cardíacas.

Aunque la invención no se limita al uso de MSC obtenidas por cualquier procedimiento particular, las MSC pueden aislarse de la médula ósea y el cordón umbilical, purificarse y expandirse culturalmente por cualquier metodología aceptable en la técnica. Los tapones o aspirados de células de médula ósea (que consisten predominantemente en glóbulos rojos y blancos, y una cantidad muy pequeña de células madre mesenquimales) se pasan a través de jeringas para disociar el tejido en células individuales. En una realización preferida, se obtiene una población de células progenitoras multipotentes a partir de una fuente adecuada, tal como médula ósea, cordón umbilical o tejido adiposo, se cultiva además y se expande en un medio adecuado que contiene típicamente glutamina. Después, se identifican las células madre mesenquimales a partir de las células diferenciadas y se expanden aún más en un medio que contiene IFN γ y al menos una citocina seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL-17A, IFN-I, TGF, FGF, TNF α , y cualquier combinación de los mismos. En otra realización, las células madre mesenquimales clonales se identifican a partir de las células diferenciadas y se expanden aún más en un medio que contiene IFN γ y al menos una citocina seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL-17A, IFN-I, TGF, FGF, TNF α , y cualquier combinación de los mismos. En cualquier caso, las células madre mesenquimales expandidas en dicho medio están entrenadas y programadas para suprimir o mejorar la respuesta inmunológica en un entorno clínico particular.

En una realización, las células progenitoras multipotentes se cultivan en medio adecuado tal como medio completo (por ejemplo, medio MEM con suero bovino fetal al 10 %) y atmósfera humidificada. Los medios no se cambian durante al menos un día para permitir que las células se unan a la placa de cultivo. Posteriormente, los medios se reemplazan cada 3-4 días. Cuando las células han crecido hasta la confluencia, las células se separan de la placa de cultivo, preferiblemente con tripsina. Las células pueden subcultivarse en medios sin suero después de la eliminación o inactivación de la tripsina. Se proporcionan procedimientos adicionales para aislar y cultivar células madre mesenquimales en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 20070160583 y 20070128722. Las MSC también se pueden aislar de la gelatina de Wharton del cordón umbilical usando procedimientos similares.

En una realización, las células madre mesenquimales aisladas de esta invención pueden ser un subconjunto de una población celular heterogénea que incluye ciertas células diferenciadas. En otra realización, las células madre mesenquimales aisladas son una composición homogénea que contiene solo MSC clonales entrenadas. En otra realización, las MSC pueden ser una población celular mixta enriquecida en MSC. A este respecto, una población aislada de MSC está compuesta por al menos aproximadamente el 75 % de MSC, o al menos aproximadamente el 83 %, 84 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, o el 98 % de MSC clonadas, mientras que el resto puede incluir células diferenciadas, células progenitoras, células sanguíneas o cualquier otra célula adecuada que mejore el resultado clínico.

En cantidad eficaz se refiere a la cantidad de MSC y citocinas que es suficiente para atenuar una respuesta inmunológica (es decir, supresión de las respuestas de los linfocitos T) en el sujeto, reduciendo así al menos un signo o síntoma de la enfermedad o trastorno.

Las células madre mesenquimales utilizadas según la invención son, en orden de preferencia, autólogas, alogénicas o xenogénicas, y la elección puede depender en gran medida de la urgencia de la necesidad de tratamiento.

Las citocinas de la presente invención pueden obtenerse mediante procedimientos de purificación convencionales, mediante tecnologías recombinantes o de fuentes comerciales. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de interferón gamma (IFN γ) se proporciona con los N.º de acceso de GENBANK NP 000610 (ser humano) y NP 032363 (ratón). Las fuentes comerciales de proteína IFN incluyen, por ejemplo, INTERMUNE (Brisbane, California) y PeproTech, Inc. (Rocky Hill, N.J.). Del mismo modo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , caquexina o caquectina) se proporciona con los N.º de acceso de GENBANK NP 000585 (ser humano) y NP 038721 (ratón) y está disponible comercialmente de fuentes como ProSpec Bio (rehovot, Israel) y PeproTech, Inc. De manera similar, la interleucina 1-alfa humana (IL1 α) y la interleucina 1-beta (IL1 β) se conocen con los N.º de acceso P01583 y P01584, respectivamente, y están disponibles en fuentes comerciales tales como ProSpec Bio y PeproTech, Inc. La interleucina 17A (IL17A), conocida con los N.º de acceso BC067505 (ser humano) y NM 010552 (ratón). Cuando se usan según esta invención, las citocinas están "aisladas", es decir, son homogéneas (100 %) o casi homogéneas (90 al 99 %). En realizaciones particulares, las citocinas son proteínas recombinantes.

La interleucina 17A es una de las citocinas inflamatorias clave, producida principalmente por los linfocitos T CD4⁺ (Th17) productores de IL-17, que es una citocina bien conocida por sus funciones proinflamatorias en las respuestas inflamatorias y autoinmunes. IL-17A señala a través de un complejo de receptor heteromérico, IL-17RA e IL-17RC. Tras la unión de IL-17A, IL17RA recluta la Ley 1, un mediador crítico aguas abajo del procedimiento de señalización inducido por IL-17A. Aunque se sabe mucho sobre las vías de señalización inducidas por IL-17A y el papel de IL-17A en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, sus dianas celulares y su modo de acción siguen siendo esquivos.

La presente invención emplea IL-17A en solitario o en combinación con otras citocinas para facilitar las MSC entrenadas que causan supresión inmune. Las MSC y las citocinas mencionadas anteriormente pueden estar en forma de una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto que necesita tratamiento con la misma. Las composiciones de la invención pueden administrarse por cualquier procedimiento convencional incluyendo inyección parenteral (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o intravenosa, infusión intravenosa, intervención de órganos específicos o aplicación tópica. El tratamiento puede estar compuesto por una dosis única o una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo.

La composición farmacéutica típicamente contiene al menos un vehículo aceptable. El portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con las MSC y las citocinas y no perjudicial para los receptores de las mismas. Típicamente, el vehículo puede ser una solución isotónica adecuada tal como solución salina tamponada con fosfato, medio de cultivo, tal como DMEM, solución salina fisiológica con o sin albúmina, dextrosa acuosa al 5 % y/o mezclas de los mismos, y otros líquidos adecuados conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización preferida para su uso terapéutico, la composición farmacéutica de la invención también se puede proporcionar como un kit. Un kit de la invención puede contener solamente un vehículo farmacéuticamente aceptable; una población aislada de células madre mesenquimales estimuladas o entrenadas con IFN y aislado e IL-1 α aislada; e IL17A aislada e instrucciones adicionales para usar el kit en un procedimiento para atenuar una respuesta inmunológica. En este aspecto de la invención, se pueden administrar las células estimuladas con componentes de citocina del kit. El kit también puede incluir opcionalmente un medio para administrar las células, por ejemplo mediante inyección. En una realización opcional, las composiciones de esta invención adecuadas para administración parenteral pueden contener además uno o más antioxidantes en combinación con una o más soluciones, acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, suspensiones o en forma de polvos liofilizados estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener la combinación de antioxidantes, minerales y vitaminas, tampones, solutos que hacen que la formulación final sea isotónica.

La presente invención proporciona además una composición que comprende una población de MSC clonadas aisladas, IFN γ aislado, IL-1 α o β aisladas, e IL-17A aislada en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una población de MSC aisladas, IFN γ aislado, TNF α aislado e IL-17A aislada en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición también comprende IL-1 α o β aisladas. Los procedimientos de uso de dichos kits proporcionan la atenuación de una respuesta inmunológica siguiendo las etapas de administrar una cantidad eficaz de MSC, IFN γ aislado, IL-1 α aislada, TNF α e IL-17A aislada a un sujeto que necesita un tratamiento, atenuando así la respuesta inmunológica del sujeto.

En el presente documento se divulga un procedimiento para atenuar una respuesta inmunológica que comprende administrar una cantidad eficaz de células madre mesenquimales aisladas, IFN γ aislado, IL-1 aislada e IL-17A aislada a un sujeto que necesita un tratamiento, atenuando así la respuesta inmunológica del sujeto. El procedimiento puede

comprender además TNF- α aislado.

El tratamiento puede dirigirse hacia la esclerosis múltiple, artritis, lupus, sepsis, hepatitis, cirrosis, enfermedad de Parkinson, infecciones crónicas y enfermedad de injerto contra huésped. Las MSC pueden proporcionarse como una
5 composición farmacéutica, donde las MSC se formulan con un cóctel de citocinas antes de la administración. Las MSC y las citocinas pueden administrarse como componentes individuales. Un sujeto que necesita tratamiento puede ser un mamífero (por ejemplo, un ser humano, mono, gato, perro, caballo, etc.) con una enfermedad o trastorno particular asociado con una respuesta inmunológica adversa. El sujeto puede ser humano.

10 La eficacia también se puede determinar controlando la expresión de iNOS,IDO y/o quimiocina. Los sujetos que se benefician de la atenuación de una respuesta inmunológica adversa incluyen sujetos que tienen o se sospecha que tienen un trastorno autoinmune (por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo 1, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, EICH, cirrosis o psoriasis), alergia (por ejemplo, fiebre del heno) o sepsis. Además, debido a que la inflamación organiza el microentorno alrededor de los tumores, contribuyendo a la proliferación, la supervivencia y la
15 migración, ciertos pacientes con cáncer también pueden beneficiarse de la presente composición.

En el trasplante de órganos y el trasplante de médula ósea, los linfocitos T de origen donante pueden reconocer el MHC del receptor y conducir al desarrollo de EICH. Esta enfermedad a menudo mortal con frecuencia no responde a ninguna terapia inmunosupresora, pero los nuevos enfoques dirigidos a las moléculas inmunomoduladoras se
20 muestran muy prometedores en el tratamiento de la EICH. Más recientemente, se ha demostrado que las MSC son altamente eficaces en el tratamiento de EICH en ensayos preclínicos y clínicos. El análisis presentado en el presente documento demuestra además que la actividad de las MSC está mediada por la producción de NO o IDO después de la estimulación con citocinas proinflamatorias. Por consiguiente, la composición de esta invención encuentra uso en el trasplante de órganos o el tratamiento de EICH.

25 La determinación in vivo de dosis adecuadas se puede lograr usando modelos animales aceptados en la técnica, tales como los modelos DTH y EICH descritos en el presente documento. Sin embargo, como la presente implica un tratamiento bajo el cuidado de un médico o veterinario, se pueden hacer ajustes en la cantidad y el tiempo de tratamiento durante el curso del tratamiento, basándose en la evaluación de la eficacia del tratamiento, que puede
30 variar de un sujeto a otro. Además, el tratamiento puede proporcionarse en fases particulares de respuestas inmunológicas en pacientes según lo descrito por el médico o veterinario.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para mejorar la eficacia de una inmunoterapia contra el cáncer mediante la administración a un sujeto que recibe un tratamiento de inmunoterapia y una cantidad eficaz de
35 un inhibidor de NOS y/o IDO. En realizaciones particulares, los inhibidores son inhibidores selectivos de IDO e iNOS, por ejemplo, como se divulga en el presente documento. Una cantidad eficaz de tal inhibidor es una cantidad que proporciona al menos una disminución del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o el 97 % en la cantidad de producción de NO y/o actividad de IDO tras la administración de la terapia inmune en comparación con un sujeto que no recibe los inhibidores. El procedimiento puede proporcionar una mejora de la eficacia terapéutica de un tratamiento con
40 interferón (por ejemplo, IFN γ) usando un inhibidor selectivo de IDO y/o iNOS.

En el presente documento se divulga un procedimiento para modificar las MSC con citocinas inflamatorias antes de la administración a pacientes. Este procedimiento mejoraría drásticamente la eficacia de las MSC en entornos clínicos. Se describen las funciones críticas de iNOS y las quimiocinas en el efecto inmunosupresor de las MSC, con la
45 presencia conjunta de IFN γ y otra citocina, ya sea TNF α , IL-1 α o IL-1 β como requisito. Se ha demostrado que las MSC cambian para promover respuestas inmunológicas cuando las citocinas inflamatorias IFN γ y TNF α eran inadecuadas para inducir una inmunosupresión suficiente.

Al menos en una realización, se describe la función de IL-17A para cambiar la dinámica de la interacción entre las
50 MSC y las citocinas inflamatorias. Los presentes inventores han descubierto que IL-17A mejora la función inmunosupresora de las MSC, incluso en presencia de bajas dosis de citocinas inflamatorias IPN γ y TNF α . A diferencia de su papel tradicional de promover respuestas inmunológicas, como se muestra en el presente documento, IL-17A desempeña un papel importante en la inmunosupresión en presencia de MSC. Por lo tanto, en ciertas circunstancias, el bloqueo de la actividad de IL-17A puede inducir o mejorar la respuesta inmunológica. En al menos una realización,
55 se describen las funciones fisiopatológicas de IL-17A.

La IL-17A es fundamental para promover la inflamación y la autoinmunidad. Los expertos en la técnica pueden apreciar que, por primera vez, se confirma la función de IL-17A en la mejora de la inmunosupresión en las MSC. Anteriormente, se ha informado ampliamente que IL-17A exacerba el progreso de la enfermedad en múltiples enfermedades
60 autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM) y enfermedad inflamatoria intestinal (EII), donde el nivel de IL-17A se eleva drásticamente. Además, la progresión de la enfermedad se ralentiza cuando se elimina genéticamente IL-17A o se administra el anticuerpo de bloqueo IL-17A.

Sin embargo, IL-17A no siempre promueve respuestas inmunológicas, ya que informes anteriores sugieren que IL-17A tiene una función protectora en los trastornos inflamatorios intestinales. La ablación genética o la neutralización de IL-17A en realidad pueden agravar el progreso de la enfermedad en el modelo de colitis inducida por dextrano-sulfato de sodio (DSS). En dicho contexto, los expertos en la técnica pueden apreciar que al menos un aspecto de la presente invención establece que IL-17A mejora la propiedad inmunosupresora de las MSC. En al menos una realización, se contempla que las MSC pueden no suprimir las respuestas inmunológicas de manera eficaz sin IL-17A.

En otro aspecto más de la presente invención, los inventores demostraron una nueva función de IL-17A en la mejora de la inmunosupresión a través de una nueva diana celular, las células madre mesenquimales. De manera similar, se ha demostrado que IL-17A ejerce estos efectos al revertir la supresión de la expresión génica conferida por el factor de descomposición de ARNm AUF1.

La lesión hepática inducida por concanavalina A ("ConA") en ratones puede emplearse para investigar el procedimiento fisiopatológico de la hepatitis fulminante autoinmune o viral, donde las respuestas de los linfocitos T desempeñan un papel fundamental en la mediación del daño hepático. Dado que la supresión de las respuestas de los linfocitos T puede atenuar drásticamente la lesión hepática inducida por ConA y se ha demostrado que las células estromales derivadas de tejido adiposo reducen el daño hepático inducido por ConA; los presentes inventores usaron MSC derivadas de médula ósea e investigaron el papel de IL-17A en la modulación del tratamiento de la lesión hepática mediada por MSC. Por lo tanto, al menos un aspecto de la presente invención establece que IL-17A puede potenciar drásticamente los efectos inmunosupresores de las MSC.

La presente invención establece además que las MSC solo pueden afectar marginalmente la progresión de la lesión hepática inducida por ConA, porque la capacidad inmunosupresora de las MSC requiere estimulación por citocinas inflamatorias. Aunque se pueden producir muchas citocinas después de la administración de ConA in vivo, estas citocinas solo pueden permanecer a niveles altos durante un corto tiempo y no pueden estimular las MSC de manera eficaz cuando se administran en un momento posterior. Por lo tanto, las MSC sin tratar no son eficaces para atenuar la lesión hepática inducida por ConA.

Por consiguiente, al menos un aspecto de la invención proporciona la función nueva y novedosa de IL-17A en la mejora de la inmunosupresión a través de una nueva diana celular, las células madre mesenquimales. Se contempla además que IL-17A puede ejercer estos efectos al revertir la supresión de la expresión génica conferida por el factor de descomposición de ARNm AUF1. Como se describe en el presente documento, IL-17A es un factor para mejorar la inmunosupresión mediada por MSC.

En ciertos casos, los inventores han encontrado la necesidad de controlar dicho efecto inmunosupresor in vitro e in vivo, ya sea positiva o negativamente. Los inventores cribaron los factores de crecimiento y las citocinas disponibles, y encontraron entre ellos que había dos factores que regulaban de forma negativa notablemente la inmunosupresión mediada por MSC: los interferones tipo I y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2).

Los interferones tipo I (IFN) son una familia de citocinas que hacen que el huésped sea inmune para erradicar virus y otras infecciones intracelulares, mientras que el FGF-2 (FGF- β , factor de crecimiento básico de fibroblastos) pertenece a una familia de genes que codifican las proteínas de unión a heparina con actividad de crecimiento, antiapoptótica y de diferenciación. Sin embargo, ningún estudio ha relacionado estas dos citocinas con la regulación de la inmunosupresión. Los interferones tipo I y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) sirven como reguladores negativos en la inmunosupresión mediada por MSC a través de la regulación negativa de la expresión de iNOS. Como se describe en el presente documento, los inventores encontraron que estos dos factores podrían inhibir potencialmente el efecto inmunosupresor de las MSC hacia la proliferación de linfocitos T (Figura 16). Un análisis posterior reveló que, el complemento de cualquiera de estas citocinas fue capaz de reducir notablemente la expresión de la proteína iNOS y la producción de NO (Figura 17).

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

60 Ratones. Los ratones macho C57BL/6, C3H/HeJCr y F1 (C57BL/6xC3H), de 6-8 semanas de edad, eran del National Cancer Institute (Frederick, Md.). Los ratones IFN γ -R1 $^{-/-}$ y los ratones iNOS $^{-/-}$ eran del Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me.). Los ratones se mantuvieron en el Robert Wood Johnson Medical School Vivarium. Los animales se emparejaron

por edad y género en cada experimento, todos aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee.

Reactivos. IFN γ y TNF α de ratón recombinante, los anticuerpos monoclonales IL-1 α e IL-1 β contra TNF α , IL-1 α , IL-1 β y CCR5 de ratón, CD11b anti-ratón conjugado con FITC y F4/80 anti-ratón conjugado con PE eran de eBiosciences (La Jolla, California). El M-CSF de ratón recombinante y los anticuerpos contra IL-10 y TGF- β eran de R&D Systems (Minneapolis, Minn.). Anti-IFN γ era de Harlan (Indianápolis, Ind.). Anti-CXCR3 era de Invitrogen (Carlsbad, California). La indometacina, 1-metil-DL-triptófano (1-MT) y N G-monometil-L-arginina (L-NMMA) eran de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.).

10 **Células.** Las MSC se generaron a partir de médula ósea de tibia y fémur de ratones de 6-10 semanas de edad. Las MSC se cultivaron conjuntamente con blastos de linfocitos T. Las células se cultivaron en medio α MEM complementado con FBS al 10 %, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (todos de Invitrogen). Las células no adherentes se eliminaron después de 24 horas, y las células adherentes se mantuvieron con una reposición media cada tres días. Para obtener clones de MSC, las células en confluencia se cosecharon y se sembraron en placas de 96 pocillos mediante dilución limitada. Después, los clones individuales se recogieron y se expandieron. Las células se usaron en la etapa 5^a a 20^a.

Se generaron blastos de linfocitos T a partir de linfocitos T CD4⁺ purificados por selección negativa con kits de aislamiento de subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ (R&D Systems). Las células (1x10⁶ células/ml) se activaron mediante anti-CD3 unido a plástico y anti-CD 28 soluble durante 48 horas, después se cultivaron con IL-2 (200 U/ml) en solitario durante 48 horas. Todos los cultivos de linfocitos T se mantuvieron en medio RPMI-1640 complementado con FBS inactivado por calor al 10 %, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y β -ME 50 mM (medio completo).

25 El sobrenadante de esplenocitos activado se recogió de cultivos de esplenocitos de 48 horas (2x10⁶/ml) activados por anti-CD3 unido a plástico, después se filtró con un filtro de 0,1 μ m y se congeló.

Detección de citocinas, quimiocinas y NO. Los sobrenadantes de cultivo se ensayaron para 20 citocinas y quimiocinas diferentes con un kit de matriz de perlas multiplex (Invitrogen, Carlsbad, California) usando la tecnología Luminex (Sistema Bio-Plex, Bio-Rad, Hercules, California). IFN γ se ensayó por ELISA (BD Biosciences, San Jose, California). Se detectó NO utilizando un reactivo de Griess modificado (Sigma-Aldrich). Brevemente, todo el NO₃ se convirtió en NO₂ por la nitrato reductasa, y el NO₂ total se detectó por la reacción de Griess (Miranda, et al. (2001) Nitric Oxide 5:62-71).

35 **PCR en tiempo real.** El ARN se aisló de los sedimentos celulares usando un Mini Kit RNEASY. La síntesis de ADNC de primera cadena se realizó usando el kit SENSICRIPT RT con cebadores hexámeros aleatorios (todos los kits de Qiagen, Valencia, California). El ARNm de los genes de interés se cuantificó por PCR en tiempo real (MX-4000 de Stratagene, La Jolla, California) usando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California). La cantidad total de ARNm se normalizó en ARN endógeno de β -actina. Las secuencias de cebadores para iNOS fueron: directo, 5'-CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT-3' (SEQ ID NO:1); inverso, 5'-CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG-3' (SEQ ID NO:2). Otros cebadores eran del kit RT2 PROFILER.TM. PCR Array Mouse Chemokines & Receptors (Superarray, Frederick, Md.).

45 **Ensayo de quimiotaxis.** La quimiotaxis se probó con el sistema de quimiotaxis NeuroProhe CHEMOTX (NeuroProbe, Gaithersburg, MD), como se describe (Shi, et al. (1993) J. Immunol. Meth. 164:149-154). Las cámaras inferiores de la placa de 96 pocillos se llenaron con sobrenadante de MSC estimuladas con IFN γ más TNF α (20 ng/ml cada una o Sup.CD3-act (dilución 1:2). Después se superpuso una membrana de policarbonato libre de polivinilpirrolidina con poros de 5 μ m. Se añadieron blastos de linfocitos T (1,25x.10⁵) a las cámaras superiores. Después de una incubación de 3 horas, las células que habían migrado a través de los poros y en los pocillos inferiores se cuantificaron utilizando el ensayo MTT (Shi, et al. (1993) anteriormente). Se calculó un índice de quimiotaxis como la relación del número de blastos de linfocitos T migrados en respuesta a las MSC en comparación con el número que migró al medio en solitario.

La inmunosupresión resultante de la migración de linfocitos T hacia MSC inflamatorias activadas por citocinas se examinó en una configuración similar. Se añadieron MSC (2x10⁴) a la cámara inferior con o sin estimulación con IFN γ y TNF α (20 ng/ml cada una) durante 24 horas. Los blastos de linfocitos T activados se añadieron entonces a la cámara superior, como anteriormente. Se añadió IL-2 a ambas cámaras. Después de 3 horas, se pulsaron ambas cámaras con ³H-timidina, y se evaluó la proliferación celular 6 horas más tarde.

60 **Inducción y modulación de EICH por MSC.** Los ratones C57BL/6 x C3H F1 a las 8 semanas de edad se irradiaron letalmente (13 Gy) y después de 24 horas se infundieron mediante inyección en la vena de la cola con células nucleadas de médula ósea (5 x 10⁶) y esplenocitos (5 x 10⁶) aislados de ratones parentales C57BL/6. Los días 3 y 7 después del trasplante de médula ósea, a los receptores se les administraron 0,5x10⁶MSC derivadas de ratones

C57BL/6 de tipo silvestre, IFN γ R1^{-/-}, o iNOS^{-/-} a través de la vena de la cola. Algunos grupos de MSC de tipo silvestre también se inyectaron i.p. con el inhibidor iNOS, NG-monometil L-arginina (L-NMMA, 500 μ g/ratón), anti-IFN γ (400 μ g/ratón), o un cóctel de tres anticuerpos contra TNF α , IL-1 α e IL-1 β (200 μ g de cada uno/ratón) diariamente durante 7 días comenzando inmediatamente después de la primera administración de MSC. Como controles negativos, a los

- 5 ratones F1 se les inyectaron células de médula ósea F1. Los ratones se observaron diariamente para detectar signos de EICH (debilitamiento, pelo erizado y espalda encorvada) y se sacrificaron cuando estuvieron moribundos, marcando así el tiempo de supervivencia. El día 14, se recogieron varios tejidos y se prepararon secciones de parafina de 5 μ m y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E).
- 10 **Inducción de respuesta DTH y análisis histológico.** Se inmunizaron ratones C57BL/6 (6-8 semanas de edad) mediante inyección en la base de la cola de ovoalbúmina (OVA, 10 μ g en 50 μ l de solución salina) emulsionados con 50 μ l de adyuvante completo de Freund. El DTH se probó después de 5 días, mediante exposición a 200 μ g de OVA añadida en 30 μ l de solución salina inyectada en la almohadilla plantar posterior derecha. La almohadilla plantar izquierda se inyectó con 30 μ l de solución salina como control negativo. Después de 24 horas, el aumento del espesor
- 15 de la almohadilla plantar inducido por antígeno se midió usando un calibrador y se calculó como: (Rimm-Limin)-(R.unimm-L.unimm), donde R y L son el espesor de las almohadillas derecha e izquierda.

Análisis estadístico. La importancia se evaluó mediante la prueba t de Student de dos colas alterada o el análisis de varianza (ANOVA).

20

EJEMPLO 2

La función inmunosupresora de las MSC se induce por citocinas proinflamatorias.

- 25 Para identificar los mecanismos subyacentes, se emplearon clones de MSC de ratón. Las características de las células madre de estos clones se definieron por su capacidad para diferenciarse en adipocitos u osteoblastos y por su expresión de marcadores de superficie: CD34; CD11b, CD11c; CD45; MHC de clase II; CD44⁺; Sca-1⁺; MHC de clase I^{baj}. Todos los resultados presentados en el presente documento se replicaron usando al menos tres clones de MSC diferentes.

30

Como la mayoría de los estudios informados de inmunosupresión por MSC se basan en sus efectos sobre la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas, el efecto de las MSC se examinó primero sobre la proliferación de blastos de linfocitos T impulsada por IL-2. Se generaron nuevos blastos de linfocitos T CD4⁺ a partir de esplenocitos mediante activación con anti-CD3 seguido de expansión con IL-2 durante varios días (Devadas, et al. (2006) Immunity 25:237-247; Radvanyi, et al. (1996) Cell Immunol. 170:260-273). Se añadieron blastos de linfocitos T en una relación 1:20 (MSC:linfocitos T) junto con IL-2 (200 U/ml). La proliferación celular se evaluó mediante la incorporación de ³H-Tdr después de 8 horas. Sorprendentemente, se descubrió que la proliferación impulsada por IL-2 de estos blastos de linfocitos T no se veía afectada por la adición de MSC. Las MSC tampoco tuvieron efecto sobre la proliferación de las células de hibridoma de linfocitos T A1.1. Sin embargo, estos blastos de linfocitos T y las células de hibridoma de

35 linfocitos T no producen citocinas a menos que se reactiven a través del TCR (Fotadar, et al. (1985) J. Immunol. 135(5):3028-33). Por lo tanto, en ausencia de citocinas de linfocitos T, las MSC no pudieron suprimir la proliferación de linfocitos T.

40

Para examinar la posibilidad de que las citocinas induzcan la capacidad inmunosupresora de las MSC, estas

45 condiciones de cultivo se reprodujeron combinando MSC y esplenocitos frescos en proporciones graduadas en presencia de anti-CD3. Los resultados de este análisis indicaron que la proliferación de linfocitos T estaba completamente bloqueada cuando se añadieron MSC en una proporción tan baja como 1:60 (MSC con respecto a esplenocito). Es importante destacar que, para ejercer su efecto inmunosupresor, las MSC no tienen que ser singénicas. Se encontró un efecto similar en linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ purificados activados por el anticuerpo anti-CD3

50 unido a plástico y anti-CD28 usando MSC de entre el 5^o y 20^o pase. Por lo tanto, en condiciones donde las MSC y los linfocitos T están en cultivo conjunto durante la activación de los linfocitos T, la respuesta resultante de los linfocitos T fue fuertemente suprimida por las MSC, lo que indica que las citocinas producidas por los linfocitos T pueden tener una función. También se examinó la capacidad inmunosupresora de los clones de MSC generados a partir de diferentes cepas de ratón. Se observó que aquellos clones que exhibían un mejor potencial de diferenciación tenían

55 una mayor capacidad de inmunosupresión.

Para determinar si las citocinas secretadas por los linfocitos T activados son responsables de la inducción de la inmunosupresión por parte de las MSC, los cocultivos mixtos de MSC con blastos de linfocitos T (como se ha descrito anteriormente) se complementaron con sobrenadante de un cultivo de esplenocitos activados por anti-CD3. La

60 proliferación de linfocitos T resultante se inhibió en gran medida. También se observó que la proliferación de células A1.1 en cocultivo con MSC se inhibió por la complementación con el sobrenadante de esplenocitos activado. Estos experimentos indican que se requiere algún producto de linfocitos T activados para inducir la inmunosupresión por las

MSC. Para identificar la citocina o citocinas culpables, el sobrenadante de esplenocitos activados se trató con anticuerpos neutralizantes contra diversas citocinas antes de la adición a los cocultivos. Este análisis indicó que la neutralización de IFN γ revirtió completamente la inhibición de la proliferación de blastos de linfocitos T cocultivados con MSC complementadas con el sobrenadante de esplenocitos activados por anti-CD3. Estos resultados implican a IFN γ como una citocina clave en este procedimiento, y revelan que, bajo ciertas condiciones, esta citocina proinflamatoria principal puede mediar la inmunosupresión.

El efecto de IFN γ se probó entonces directamente añadiendo IFN γ recombinante aislado (20 ng/ml) en lugar de sobrenadante de esplenocitos activados a los cocultivos mixtos de blastos de linfocitos T MSC+ o células MSC+A1.1. Sorprendentemente, IFN γ en solitario no indujo inmunosupresión. Después, se añadieron varias otras citocinas proinflamatorias (20 ng/ml cada una) y se encontró que se requería la adición concomitante de TNF α , IL-1 α o IL-1 β junto con IFN γ para lograr la supresión de la proliferación de linfocitos T en cocultivos con MSC (relación 1:20 de MSC:linfocitos T) (Figura 1). Por lo tanto, la inducción de la función inmunosupresora de las MSC por el sobrenadante de esplenocitos activados con anti-CD3 puede deberse a la actuación del IFN γ junto con TNF α ; IL-1 α ; o IL-1 β en las MSC. Por lo tanto, aunque se requiere absolutamente IFN γ , esta citocina por sí sola no es suficiente; la señalización de inmunosupresión adecuada en las MSC requiere la acción concertada de IFN γ y cualquiera de las otras tres citocinas.

Los anticuerpos neutralizantes contra TNF α ; IL-1 α ; o IL-1 β , individualmente o juntos, se añadieron al sobrenadante de esplenocitos activados antes de la adición a cocultivos mixtos de MSC y blastos de linfocitos T. Si bien los anticuerpos individuales no tuvieron ningún efecto, el bloqueo simultáneo de las tres citocinas revirtió por completo la inhibición de la proliferación de linfocitos T. Otras citocinas, tales como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) e IL-6 (interleucina-6), no tuvieron efecto. Los datos en el presente documento indican que la combinación del IFN con cualquiera de las otras tres citocinas proinflamatorias, TNF α , IL-1 α o IL-1 β es totalmente responsable de inducir la capacidad de las MSC para inhibir la proliferación de linfocitos T, y que TNF α , IL-1 α , e IL-1 β son intercambiables en la actuación junto con IFN γ .

Se contempla que las MSC deben encontrar algún nivel de IFN γ que surge de la activación inicial de los linfocitos T. De hecho, se encontró que las MSC no afectan a la respuesta inicial de los linfocitos T cuando están presentes durante su activación inducida por anti-CD3, como lo demuestran los aumentos normales en la expresión de CD69. Como evidencia adicional de que el IFN γ liberado de los esplenocitos después de la activación inicial fue clave para inducir la inmunosupresión por parte de las MSC, se observó que las MSC derivadas de ratones deficientes en el receptor 1 de IFN γ (IFN γ R1 $^{-/-}$) eran incapaces de inducir la inmunosupresión. Se derivaron varios clones de estas IFN γ R1 $^{-/-}$ MSC (todos capaces de diferenciarse en adipocitos y células de tipo osteoblasto), y ninguno de los cinco clones probados pudo suprimir la proliferación de esplenocitos inducida por anti-CD3, lo que respalda la comprensión de que IFN γ es esencial en la inducción de la función inmunosupresora de las MSC.

Estos resultados indican que la producción inicial de IFN γ y otras citocinas por las células cercanas a las MSC son fundamentales para inducir la capacidad inmunosupresora. De hecho, el anti-IFN γ (20 μ g/ml) también bloqueó por completo el efecto supresor de las MSC en este contexto. Además, aunque los anticuerpos contra TNF α , IL-1 α e IL-1 β (20 μ g/ml de cada uno) fueron ineficaces individualmente, se evitó la inmunosupresión cuando se añadieron los tres anticuerpos juntos, de forma similar a su efecto cuando se añadieron al sobrenadante de esplenocitos activados. Por lo tanto, la acción concomitante de IFN γ producido localmente junto con TNF α , IL-1 α e IL-1 β es suficiente para inducir que las MSC se vuelvan inmunosupresoras.

EJEMPLO 3

La inmunosupresión de las MSC requiere óxido nítrico

Para identificar el mecanismo a través del cual se efectúa la inmunosupresión por MSC expuestas a citocinas, se examinó la respuesta de esplenocitos activados con anti-CD3 cocultivados con MSC (1:20, MSC:esplenocitos) en un sistema TRANSWELL en varias configuraciones. Cuando se separó por una membrana permeable (membrana de poro de 0,4 μ m) en las dos cámaras del pocillo, las MSC casi no tuvieron efecto sobre la proliferación de linfocitos T, lo que indica que una proteína asociada a la membrana celular u otro factor o factores de acción local fueron imprescindibles para la supresión de la proliferación de linfocitos T por MSC cebadas con citocinas. Si bien un informe reciente (Sato, et al. (2007) anteriormente) mostró que se requiere PGE-2, pero noIDO, se encontró que PGE-2 no estaba involucrado. De hecho, no se encontró ningún efecto sobre la inmunosupresión por las MSC por indometacina (10 μ M, un bloqueador de PGE-2), anti-IL-10 (20 μ g/ml), anti-TGF β (20 μ g/ml) o 1-metil-DL-triptófano (1-MT, 1 mM, un inhibidor deIDO), descartando así estos factores.

Se sabe que el óxido nítrico (NO) a altas concentraciones inhibe las respuestas de los linfocitos T. Se difunde rápidamente desde su fuente, pero la concentración de la forma activa disminuye en aproximadamente 100 μ m. Por

lo tanto, el NO puede actuar solo en las proximidades de las células que lo producen, lo que es consistente con las características predichas del factor que media la inmunosupresión de las MSC. Para determinar si el NO tenía tal papel, se detuvo su producción usando un inhibidor selectivo de la actividad de iNOS, N G-monometil-L-arginina (L-NMMA). Cuando se añade a cocultivos mixtos de MSC y esplenocitos en presencia de anti-CD3, L-NMMA restableció completamente la proliferación normal de esplenocitos. Otros inhibidores de iNOS tales como 1400 W y L-NAME mostraron el mismo efecto. Además, las MSC derivadas de ratones deficientes en iNOS (iNOS^{-/-}) casi no tuvieron efecto sobre la proliferación de esplenocitos. Además, de cinco clones de iNOS^{-/-} MSC derivados (todos capaces de diferenciarse en adipocitos y células de tipo osteoblasto), ninguno era inmunosupresor. Estos resultados indican que la actividad de NO producida por las MSC en respuesta a la inducción de citocinas media su supresión de las respuestas de los linfocitos T.

El análisis en el presente documento indica que la inmunosupresión por MSC se induce por IFN γ y citocinas proinflamatorias y está mediada por NO. Por consiguiente, se contempló que las MSC podrían aumentar su expresión de iNOS y producir NO después de la exposición a estas citocinas. Para examinar esto, las MSC se trataron con sobrenadante de esplenocitos activados y el nivel de ARNm de iNOS se ensayó mediante PCR en tiempo real y se comparó con β -actina. Los resultados de este análisis indicaron que iNOS se reguló positivamente de forma significativa en las MSC 4 horas después de la estimulación, con una expresión de alto nivel sostenida durante al menos 48 horas. A las 12 horas después de la estimulación, el nivel de ARNm de iNOS fue más de 7 veces mayor que el mensaje de β actina, lo que indica una expresión extremadamente alta. Se observó un efecto similar cuando se añadieron juntos IFN γ y TNF α (20 ng/ml de cada uno), mientras que ninguno de los dos fue ineficaz.

Además, IL-1 α e IL-1 β fueron de nuevo intercambiables con TNF α a este respecto. Cuando se añadieron anticuerpos para neutralizar las actividades de las citocinas en el sobrenadante de esplenocitos activados con anti-CD3, se observó que el anti-IFN γ en solitario, o la combinación de 3 anticuerpos contra TNF α , IL-1 α e IL-1 β , impidió la regulación positiva de iNOS por parte de las MSC. Cuando los anticuerpos contra TNF α , IL-1 α o IL-1 β se usaron individual o doblemente, no hubo ningún efecto. Por lo tanto, las mismas citocinas que inducen la inmunosupresión también son potentes inductores de la expresión de iNOS por parte de las MSC.

Para determinar si la expresión de iNOS en las MSC tratadas con citocinas realmente conduce a la producción de NO, se midieron dos productos de descomposición estables de NO, nitrato (NO₃) y nitrito (NO₂) en medio acondicionado de MSC tratadas con sobrenadante de esplenocitos activados por anti-CD3. La cantidad de NO₂ producida por las MSC después del tratamiento fue al menos 10 veces mayor que la de los macrófagos CD11b⁺F4/80⁺ tratados de manera similar, que se sabe que son productores abundantes de NO. Estos resultados son consistentes con los altos niveles de expresión de ARNm de iNOS descritos en el presente documento. Por lo tanto, la regulación positiva de la expresión de iNOS por parte de las MSC en respuesta a las citocinas proinflamatorias conduce a la producción de NO, que puede actuar sobre los linfocitos T en estrecha proximidad.

En el presente estudio, con la activación de linfocitos T o cuando se añaden citocinas inflamatorias exógenas, los linfocitos T entran primero en la detención del ciclo celular y después mueren en 24 horas. También se observó que esta apoptosis dependía del NO, ya que no se observó apoptosis de linfocitos T cuando se usaron inhibidores de iNOS. La apoptosis también estuvo ausente cuando se usaron iNOS^{-/-} o IFN γ R1^{-/-} MSC. Por lo tanto, la detención del ciclo celular inducida por NO y la apoptosis de linfocitos T son parte del mecanismo de inmunosupresión mediada por MSC activadas por citocinas inflamatorias. Se han observado diferencias entre especies en la expresión de iNOS inducida por citocinas inflamatorias en los macrófagos (Schneemann & Schoedon. 2002) Nat. Immunol 3 (2): 102). Se encontró que el NO se indujo por citocinas inflamatorias en macrófagos de ratón, rata y origen bovino, pero no en macrófagos caprinos, conejo, porcinos y humanos (Schneemann y Schoedon (2002) anteriormente; Jungi, et al. (1996) Vet. Immunol Immunopathol. 54:323-330). Por lo tanto, las funciones de IDO y NO en la inhibición de la proliferación de linfocitos T por MSC de ratón y humanos se analizaron en una comparación directa. Se descubrió que la inhibición de NO por L-NMMA revirtió por completo la inmunosupresión de las MSC de ratón, mientras que la inhibición de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica por las MSC humanas fue revertida por 1-MT, lo que indica que las MSC de seres humanos utilizan IDO como el principal efector de la inmunosupresión, en comparación con las MSC de ratón que utilizan NO (Ren G. Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Rabson AB, Shi Y. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. Stem Cells 2009, 27:1954-1962).

55

EJEMPLO 4

La propiedad quimioattractiva de las MSC se induce por las citocinas proinflamatorias

En varios estudios, la inmunosupresión eficaz por MSC in vivo se ha logrado con tan solo una a cinco MSC por millón de células somáticas y, a menudo, dura meses, con cura completa de los trastornos inmunes en algunos casos. Teniendo en cuenta que las MSC están inmóviles después de establecerse en los tejidos, y que la inmunosupresión

está mediada por NO, que actúa solo muy localmente cerca de su fuente, este efecto inmunosupresor es sorprendente. Se contempló que las MSC inducidas por citocinas podrían tener un mecanismo para atraer células inmunes a su vecindad, donde las concentraciones localmente altas de NO podrían actuar eficazmente en los linfocitos T diana. Para explorar esto, los cocultivos de MSC y esplenocitos se controlaron con el tiempo bajo el microscopio.

5 Tras la estimulación anti-CD3, se observó que los esplenocitos migraban activamente hacia las MSC en forma de huso. Por el contrario, no se produjo migración en ausencia de estimulación anti-CD3. Dado que los esplenocitos tienen una viabilidad limitada, la falta de locomoción hacia las MSC en ausencia de estimulación podría deberse a la mala salud de estas células in vitro. Para excluir esto, se examinó la capacidad de las MSC cebadas con sobrenadante
10 de esplenocitos activados para atraer células de hibridoma de linfocitos T A1.1, que sobreviven bien incluso en ausencia de IL-2. En estas condiciones, la microvideografía de tomas a intervalos reveló una rápida migración de los linfocitos T hacia las MSC dentro en 1,5 horas posteriores al inicio del cocultivo. Sin el cebado de las MSC, sin embargo, no hubo movimiento neto de los linfocitos T hacia las MSC. Por lo tanto, las MSC promueven la migración de linfocitos T solo después de que las MSC hayan estado expuestas a citocinas proinflamatorias.

15 Para examinar el papel de diversas citocinas al permitir que las MSC atraigan linfocitos T, las MSC se pretrataron con diversas combinaciones de citocinas recombinantes y se observó la migración resultante de linfocitos T preactivados en cocultivos. Este análisis indicó que los mismos pares de citocinas de linfocitos T (es decir, IFN γ y TNF α ; IFN γ e IL-1 α o IFN γ e IL-1 β) que habían inducido la función inmunosupresora de las MSC también hicieron que atrajeran los
20 linfocitos T. Del mismo modo, utilizando la neutralización de anticuerpos de citocinas específicas, se encontró que la migración hacia las MSC se impedía por anti-IFN γ en solitario, o bloqueando TNF α , IL-1 α e IL-1 β como un trío, idéntico a sus efectos sobre la supresión de MSC inducida por sobrenadante de esplenocitos activados de la proliferación de linfocitos T. Por lo tanto, es probable que la función inmunosupresora inducida por citocinas de las MSC dependa de la migración de linfocitos en proximidad con las MSC, donde los niveles de NO son más altos.

25

EJEMPLO 5

Las citocinas proinflamatorias inducen a las MSC a producir quimiocinas que son fundamentales para la inmunosupresión

30

La fuerte migración de linfocitos T activados hacia MSC cebadas con citocinas indicó que las MSC secretan potentes quimioatrayentes, tales como quimiocinas. Por consiguiente, la producción de quimiocinas de leucocitos por MSC cultivadas en diversas condiciones se determinó analizando el sobrenadante. No se observó una producción significativa de quimiocinas para las MSC cultivadas en solitario sin citocinas, lo que corrobora los hallazgos de que
35 las MSC en su forma innata no pueden atraer a los linfocitos T. Sin embargo, cuando se cultivaron conjuntamente con esplenocitos activados con anti-CD3, las MSC produjeron varias quimiocinas en grandes cantidades, incluyendo CXCL-9 (MIG) a 1,5 ng/ml (12 ng/ml en otro experimento) y CXCL-10 (IP-10) a 50 ng/ml a una relación MSC:esplenocito de 1:60. Estas son potentes quimiocinas específicas de linfocitos T; se ha demostrado que las concentraciones de solo 1 a 10 ng/ml de cualquiera de las quimiocinas en solitario conducen a una quimiotaxis
40 significativa in vitro (Loetscher, et al. (1998) Eur. J. Immunol. 28:3696-3705; Meyer, et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31:2521-2527). La producción de CXCL-9 y CXCL-10 se inhibió por la neutralización de anticuerpos de IFN γ en solitario, o las tres citocinas TNF α , IL-1 α e IL-1 β , similares a los efectos sobre la inducción de inmunosupresión. La producción de quimiocinas se indujo de manera similar al añadir IFN γ y TNF α recombinante (20 ng/ml de cada uno) a las MSC en solitario, siendo TNF α intercambiable de nuevo con IL-1 α e IL-1 β . Por lo tanto, estas citocinas son
45 suficientes para inducir la expresión de quimiocinas en MSC, que probablemente sean responsables de impulsar la quimiotaxis de los linfocitos T hacia las MSC. Por lo tanto, una vez que hayan migrado a una proximidad cercana con las MSC, se espera que los linfocitos T activados secreten citocinas que induzcan la producción de quimiocinas adicionales por las MSC, creando así un ciclo de retroalimentación positiva para atraer aún más linfocitos T a las proximidades de las MSC.

50

Para examinar sistemáticamente el perfil de expresión de quimiocinas de las MSC, se examinó la expresión de 84 genes diferentes que codifican las quimiocinas y sus receptores en MSC tratadas con sobrenadante de esplenocitos sin tratar o activados con anti-CD3. El ARN total se analizó por PCR en tiempo real utilizando el kit Mouse Chemokines and Receptors RT2 PROFILER. TM. PCR Array kit, y los niveles de ARNm de quimiocina se compararon con los de
55 la β actina (Tabla 1). La combinación de algunas citocinas humanas también indujo una producción de quimiocinas similar en las MSC humanas.

Tabla 1. Inducción de la expresión de quimiocinas y genes relacionados en MSC tratadas con sobrenadante de linfocitos T activados (β-actina definida como 1×10^7 unidades)				
Símbolo del gen	Descripción	Sobrenadante de linfocitos T de control	Sobrenadante de linfocitos T activados	Coefficiente de aumento
Cxd9	Ligando 9 de quimiocina (motivo C-X-C), MIG	4	8.963.294	2.025.062
Cxd5	Ligando 5 de quimiocina (motivo C-X-C), ENA-78	2	4.302.867	1.978.890
Cxd2	Ligando 2 de quimiocina (motivo C-X-C), GRO β	2	2.711.838	1.681.250
Cd7	Ligando 7 de quimiocina (motivo C-C), MCP-3	0	24.269	1.111.786
Cxd10	Ligando 10 de quimiocina (motivo C-X-C), IP-10	111	19.719.159	177.864
Cxd1	Ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C), Gro α	47	5.170.437	110.278
Cd5	Ligando 5 de quimiocina (motivo C-C), RANTES	215	8.022.162	37.344
Cd2	Ligando 2 de quimiocina (motivo C-C), MCR1	3.252	11.653.869	3.584
Cxd11	Ligando 11 de quimiocina (motivo C-X-C), ITAC	5	17.370	3.534
Cd12	Receptor de quimiocina (motivo C-C) de tipo 2	110	56.765	518
Cd17	Ligando 17 de quimiocina (motivo C-C), TARC	294	23.212	79
Cx3d1	Ligando 1 de quimiocina (motivo C-X3-C), fractalquina	69.309	2.349.699	34
Crnkort	Receptor huérfano 1 de quimiocina	32.965	617.300	19
Cd8	Ligando 8 de quimiocina (motivo C-C), MCP-2	628	10.070	16
Cd9	Ligando 9 de quimiocina (motivo C-C)	182	2.193	12
Cd9	Receptor 9 de quimiocina (motivo C-C)	999	3.860	4
Cxd13	Ligando 13 de quimiocina (motivo C-X-C), BCA-1	19.067	48.073	3
Cxor6	Receptor 6 de quimiocina (motivo C-X-C)	4.943	7.516	2
Crnklr1	Receptor 1 de tipo quimiocina	49.839	47.340	1
Codop2	Proteína 2 de unión a quimiocina	0	9.015	N/A
Actn	<i>β-actina</i>	10.000.000	10.000.000	1

Las MSC (1 matraz 1×10^6 /T-25 en 5 ml de medio completo) se estimularon con sobrenadante de linfocitos T sin tratar o activados (50 % del volumen final) durante 12 h. La quimiocina y la expresión del gen del receptor de quimiocinas se ensayaron mediante PCR en tiempo real.

Se encontró que, a excepción de los bajos niveles de CX3CL-1 (fractalquina) y CXCL13 (ligando 13 de quimiocina (C-X-C), BCA-1), los niveles de ARNm en las MSC expuestas al sobrenadante de esplenocitos sin tratar eran insignificantes. Sorprendentemente, el tratamiento de MSC con sobrenadante de esplenocitos activados dio como resultado un aumento de más de un millón de veces en algunas quimiocinas, tales como CXCL2 (ligando 2 de quimiocina (C-X-C), Gro β), CXCL5 (ligando 5 de quimiocina (C-C), RANTES), CXCL9 (ligando 9 de quimiocina (C-X-C), MIG), CXCL10 (ligando 10 de quimiocina (C-X-C), IP-10) y CCL7 (ligando 7 de quimiocina (C-C), MCP-3). En términos absolutos, algunas quimiocinas alcanzaron el mismo nivel de expresión que la β -actina, o incluso más. Por ejemplo, CXCL10 mostró dos veces el número de copias de ARNm como β -actina. Las quimiocinas que fueron altamente inducidas son inductores extremadamente potentes de quimiotaxis de leucocitos y es probable que desempeñen un papel importante en la inmunosupresión de las MSC. De hecho, se observó que el bloqueo de anticuerpos de CXCR3, un receptor para las quimiocinas de linfocitos CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (Lazzeri & Romagnani, (2005) Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord. 5:109-118), que fueron altamente inducidas en las MSC, inhibió la quimiotaxis de los blastos de linfocitos T hacia las MSC y revirtió la supresión de su proliferación.

Para examinar directamente la capacidad de impulsar la quimiotaxis del sobrenadante de MSC inducido por citocinas proinflamatorias, se empleó el sistema de quimiotaxis CHEMOTX (NeuroProbe). Este sistema está compuesto por cámaras superiores e inferiores separadas por una membrana de policarbonato libre de polivinilpirrolidina (5 μ m de tamaño de poro). El sobrenadante de los cultivos de MSC se puso en las cámaras inferiores y se añadieron blastos de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ activados a las cámaras superiores en presencia de IL-2. La quimiotaxis se cuantificó después de 3 horas. Se encontró que la quimiotaxis drástica tanto por los linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ tuvo lugar en respuesta al sobrenadante de cultivo de MSC tratadas con IFN γ más TNF α o con IFN γ más IL-1. Se obtuvieron resultados similares con el sobrenadante de MSC tratadas con medio acondicionado por esplenocitos activados.

Por el contrario, los sobrenadantes de control negativo de las MSC no tratadas o los esplenocitos activados en solitario no eran quimiotácticos, como lo fue la adición directa de IFN γ más TNF α sin MSC. De forma importante; esta actividad quimiotáctica podría bloquearse por anticuerpos contra CXCR3 y CCR5, dos de los receptores de quimiocinas específicos de linfocitos T más importantes, especialmente cuando ambos anticuerpos se añadieron juntos. Además de reclutar linfocitos T, las MSC activadas por citocinas también atraeron a las células dendríticas derivadas de médula ósea, macrófagos y linfocitos B.

El sistema CHEMOTX también se usó para examinar el papel de la quimiotaxis en la inhibición de la proliferación de linfocitos T. En este ensayo, se añadieron MSC a los pocillos inferiores, con o sin adición de IFN γ más TNF α , y se añadieron blastos de linfocitos T (con IL-2) a los pocillos superiores. En esta configuración, las quimiocinas producidas por las MSC en los pocillos inferiores deberían inducir la migración de linfocitos T a través de la membrana y hacia los pocillos inferiores, donde el NO producido por las MSC podría inhibir así su proliferación. Después de una incubación de 3 horas, los pocillos tanto superiores como inferiores se pulsaron con 3H-timidina durante 6 horas más y las células en ambos pocillos se cosecharon para determinar la proliferación. Los niveles de proliferación de los blastos de linfocitos T tanto CD4 $^{+}$ como CD8 $^{+}$ se inhibieron significativamente por las MSC en presencia de IFN γ y TNF α . Una vez más, el bloqueo de anticuerpos contra los receptores de quimiocinas de linfocitos T, CXCR3 y CCR5, revirtió significativamente este efecto. Estos datos indican además que la quimiotaxis de linfocitos T es fundamental en la inmunosupresión mediada por MSC.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que cuando las MSC están expuestas a citocinas proinflamatorias durante una reacción inmune, producen grandes cantidades de varias quimiocinas, especialmente aquellas específicas para los linfocitos T, que atraen a los linfocitos T muy cerca de las MSC, donde altas concentraciones de NO actúan para suprimir la función de los linfocitos T.

EJEMPLO 6

20 ***La prevención de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) por parte de las MSC depende de las citocinas inflamatorias y la producción de NO***

Se inyectó a los ratones en la almohadilla plantar OVA en solitario u OVA y MSC de ratones deficientes en iNOS o de tipo silvestre. Los ratones se expusieron en la almohadilla plantar a OVA y la respuesta DTH resultante se midió por la hinchazón de la almohadilla plantar. Los resultados de este análisis indicaron que la administración de MSC de tipo silvestre dio como resultado una inflamación reducida en la respuesta DTH. En fuerte contraste, las MSC deficientes en iNOS no solo no redujeron la inflamación, sino que también mejoraron la respuesta DTH en comparación con los ratones expuestos a los que no se inyectó MSC (Figura 2). El análisis histológico de las almohadillas mostró indicadores reducidos de inflamación en la piel de animales coinyectados con MSC de tipo silvestre, mientras que aquellos coinyectados con iNOS $^{-/-}$ MSC habían aumentado la infiltración de fluidos y leucocitos en el sitio de la inflamación. Este experimento no solo demuestra el requisito de NO en la supresión de una respuesta inmunológica, sino que también muestra que, en ausencia de producción de NO, la quimiotaxis mediada por MSC potencia la inflamación, y podría usarse para aumentar las respuestas inmunológicas locales, tal como para promover la eficacia de vacunas o provocar respuestas inmunológicas eficaces a tumores usando inhibidores de iNOS e IDO.

Uno de los efectos sorprendentes de la inmunosupresión por MSC es la capacidad de suprimir la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Le Blanc, et al. (2004) anteriormente; Le Blanc y Ringden (2006) anteriormente). Para investigar si la producción de NO inducida por citocinas por MSC da como resultado la inmunosupresión in vivo, se inyectaron 5×10^6 células de médula ósea nucleadas y 5×10^6 esplenocitos de ratones C57BL/6 en ratones F1 irradiados letalmente (C57BL/6 x C3H) para establecer el modelo de EICH de ratón. Todos los ratones receptores de control positivo desarrollaron EICH extenso (debilitamiento, pelo erizado y espalda encorvada) entre los días 15 y 22, mientras que los controles negativos que recibieron médula ósea F1 singénica no se vieron afectados.

Cuando los ratones F1 se trataron con MSC ($0,5 \times 10^6$ células derivadas de ratones donantes inyectados i.v. los días 3 y 7) después del trasplante de médula ósea, hubo una protección significativa contra EICH; todos los ratones tratados con MSC sobrevivieron durante al menos 33 días y algunos durante más de 75 días. Por el contrario, los ratones F1 tratados con MSC derivados de ratones iNOS $^{-/-}$ o IFN γ R1 $^{-/-}$ no estaban protegidos, ya que su supervivencia no era diferente de los controles positivos no tratados (Figura 3). Esta falta de protección por MSC deficientes en IFN γ R1 o iNOS indica que la producción de IFN γ y NO es esencial para la inmunosupresión mediada por MSC in vivo.

Dado que los resultados in vitro indicaron que IFN γ actúa junto con cualquiera de las tres citocinas, TNF α , IL-1 α o IL-1 β , para inducir la función inmunosupresora de las MSC, se examinó el papel de estas citocinas en la protección mediada por MSC de EICH. Se inyectó a los ratones anticuerpos neutralizantes contra estas citocinas o L-NMMA durante 7 días después de la infusión de MSC de tipo silvestre, y se permitió que se desarrollara EICH. Tanto anti-IFN γ como L-NMMA causaron una reversión significativa de la protección mediada por MSC contra EICH (Figura 3), mientras que los ratones de control negativo no mostraron ningún efecto adverso en respuesta a estos tratamientos.

El efecto de un cóctel de 3 anticuerpos contra TNF α , IL-1 α e IL-1 β fue menos drástico y no alcanzó significación estadística (Figura 4). Este resultado implica además la producción de IFN γ y NO, pero es equívoco para las otras citocinas. Sin embargo, es importante reconocer que, además de la sinergia con IFN γ para inducir la inmunosupresión por parte de las MSC, TNF α e IL-1 también son factores importantes en la patogénesis normal de la EICH. De hecho, se ha informado que la neutralización de TNF α o IL-1 puede disminuir la gravedad de EICH (Hattori, et al. (1998) Blood

91:4051-4055; McCarthy, et al. (1991) Blood 78:1915-1918). Por lo tanto, era de esperar que la protección contra EICH no fuera revertida en mayor medida por estos anticuerpos.

El examen histológico de la gravedad de la inflamación en diversos órganos de estos ratones también se examinó 14 días después del trasplante de médula ósea. La extensión de la infiltración de leucocitos observada se correlacionó bien con los resultados de supervivencia; los ratones inducidos por EICH mostraron un mayor número de linfocitos en el hígado, los pulmones y la piel, mientras que estuvieron casi ausentes en los tratados con MSC. Además, la protección por MSC fue revertida casi completamente por anti-IFN γ y L-NMMA, mientras que el cóctel de 3 anticuerpos contra TNF α , IL-1 α e IL-1 β fue menos eficaz. Juntos, los hallazgos de estos experimentos de EICH, así como los de los estudios DTH, indican claramente un papel para IFN γ y NO en la inmunosupresión mediada por MSC in vivo.

EJEMPLO 7

Las células estromales de linfoma tipo MSC derivadas de tumor son inmunosupresoras

Dado que las células tumorales en el linfoma no son adherentes, es posible aislar las células estromales tumorales de los linfomas desarrollados en ratones p53+/- . Se observó que estas células pueden pasarse in vitro y pueden diferenciarse en adipocitos y células de tipo osteoblasto. Curiosamente, al igual que las MSC derivadas de médula ósea, estas células estromales tumorales también son inmunosupresoras y pueden inhibir eficazmente la proliferación de esplenocitos activados por anti-CD3. Este efecto inmunosupresor también dependía de IFN γ + TNF α y NO, ya que anti-IFN γ y los inhibidores de iNOS podrían revertir el efecto inmunosupresor.

EJEMPLO 8

Las células estromales de linfoma (LSC) promueven el desarrollo del linfoma de manera dependiente de NO

Para examinar el efecto de las células estromales de linfoma en el crecimiento tumoral, se inyectó conjuntamente la línea celular de linfoma de linfocitos β 355 (C3H-gld/gld de fondo, $0,5 \times 10^6$ células con células estromales de linfoma derivadas de ratones gld/gld (fondo C3H), P5, $0,25 \times 10^6$ células/ratón). Se observó que la inyección conjunta de células estromales mejoró significativamente la mortalidad. Curiosamente, la administración de 1400 W (inhibidor de NOS, 0,1 mg/ratón el día 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28) revirtió significativamente el efecto (Figura 4). Por lo tanto, las células estromales tumorales podrían promover significativamente el crecimiento tumoral.

EJEMPLO 9

La combinación del inhibidor de NOS con IFN γ promueve la terapia de melanoma de ratón

Para probar el papel del NO producido por células estromales tumorales en la inmunoterapia tumoral, se inyectaron células de melanoma B16-F0 en ratones C57BL/6 el día 0 ($0,5 \times 10^6$ células/ratón). Se administraron IFN γ (250 ng/ratón) o 1400 W (inhibidor de NOS, 0,1 mg/ratón) por inyección i.v. el día 4, 8, 12, 16, 20. La supervivencia de los ratones se registró cuando los ratones estaban moribundos. Se observó que la terapia combinada promovió drásticamente la supervivencia del ratón (Figura 5). Por lo tanto, IFN γ tiene funciones duales en el desarrollo tumoral; una es prevenir el desarrollo de tumores produciendo algunos factores angiostáticos o bloqueando la producción de factores de angiogénesis, la otra es inducir inmunosupresión por las células estromales tumorales u otras células ambientales a través de factores productores como NO,IDO o PGE2. Por lo tanto, la inhibición de uno o más de NO, IDO o PGE2 puede mejorar drásticamente el tratamiento contra el cáncer. Por lo tanto, cuando se usan inmunoterapias tales como las basadas en citocinas, vacunación, anticuerpos, células dendríticas o linfocitos T, para tratar el cáncer, las células estromales tumorales podrían ser responsables de la incapacidad de este tratamiento para erradicar completamente los tumores en la mayoría de los casos. El uso combinado de inhibidores de iNOS e IDO con inmunoterapias podría proporcionar formas eficaces de erradicar tumores.

Ejemplo 10

IL-17A se sinergia con IFN γ y TNF α para inducir una alta expresión de la molécula efectora inmunosupresora iNOS en células madre mesenquimales de médula ósea de ratón (BM-MSc).

La inmunosupresión mediada por MSC de ratón depende de las citocinas inflamatorias. Sin estas citocinas, las MSC no poseen el efecto inmunosupresor, a menos que en presencia de citocinas inflamatorias IFN γ y con TNF α o IL-1, las MSC sean estimuladas para expresar el efector inmunosupresor óxido nítrico (NO), que es catalizado por la NO sintasa inducible (iNOS), y varias moléculas auxiliares-quimiocinas y moléculas de adhesión. Las quimiocinas y las moléculas de adhesión conservan los linfocitos T y otras células inmunes en las proximidades de las MSC, donde una gran cantidad de NO suprime la función de las células inmunes.

Dado que el entorno inflamatorio in vivo contiene diversos tipos de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento además de los tres tipos de citocinas que se han mencionado anteriormente, las funciones in situ de las MSC en los sitios con daño tisular deberían verse afectadas por diversas citocinas en nichos de microambientes particulares, los presentes inventores examinaron otras citocinas, especialmente aquellas que se expresan a altos niveles en enfermedades autoinmunes y la lesión tisular.

Entre varias citocinas probadas, se encontró que IL-17A potenciaba en gran medida la expresión de iNOS en presencia de IFN γ y TNF α . IL-17A es una citocina proinflamatoria fundamental encontrada en muchas afecciones patológicas, sin embargo, se sabe poco sobre cómo influye en la biología de las MSC. Como se muestra en la Figura 6, tanto a nivel de ARNm como de proteína, IL-17A mejoró enormemente la expresión de iNOS. Este hallazgo indicó que un complemento adicional de IL-17A podría ser una estrategia potencial para mejorar la actividad inmunosupresora de las MSC.

15 Ejemplo 11

IL-17A mejora la inmunosupresión mediada por BM-MSc en la proliferación de linfocitos T.

Para probar si la expresión de iNOS mejorada con IL-17A es funcional o no, se realizó un sistema de cocultivo de MSC-linfocitos T para evaluar la actividad inmunosupresora de las MSC. Como se muestra en la Figura 7, la complementación con IFN γ y TNF α podría disminuir la proliferación de linfocitos T de una manera dependiente de la concentración de citocinas. Sorprendentemente, la adición de IL-17A mejoró la supresión de MSC en la proliferación de linfocitos T. Por lo tanto, IL-17A es funcional en la mejora de la inmunosupresión mediada por MSC.

25 Ejemplo 12

Materiales y procedimientos

Reactivos y ratones

El IFN γ de ratón recombinante, TNF α , IL-17A y anticuerpos contra IL-17A eran de eBiosciences (La Jolla, CA). El IL-2 de ratón recombinante era de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los anticuerpos contra β -actina, GAPDH, iNOS, p-I κ B α , p-P65, p-JNK y p-ERK1/2 eran de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). El anticuerpo contra Act1 era de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). PMSF y actinomicina D se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Los ratones C57BL/6 se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos en el vivero con agua y alimento proporcionados ad libitum. Todos los protocolos de animales están aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee.

Células: Se generaron MSC usando el protocolo como se describe en el ejemplo 1. Brevemente, se extrajeron tibia y médula ósea de fémur de ratones de tipo silvestre o auf1^{-/-} de 6-8 semanas de edad. Las células se cultivaron en medio DMEM complementado con FBS al 10 %, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (medio completo, todos de Invitrogen, Carlsbad, CA). Todas las células no adherentes se eliminaron después de 24 horas (h), y las células adherentes se mantuvieron. El medio se cambió cada 2-3 días. Para obtener clones de MSC, las células en confluencia se cosecharon y se sembraron en placas de 96 pocillos mediante dilución limitada. Después, los clones individuales se recogieron y se expandieron. Las MSC fueron capaces de diferenciarse en adipocitos y osteocitos en las respectivas condiciones de diferenciación. Las células se usaron antes del 15^o pase.

Se generaron blastos de linfocitos T a partir de esplenocitos ingenuos aislados de ratones C57BL/6, y se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con FBS inactivado por calor al 10 %, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, y β -ME 50 μ M. Los esplenocitos (1×10^6 células/ml) se activaron con anti-CD3 y anti-CD28 durante 48 h, y se cosecharon, con sobrenadante filtrado (0,1 μ m) y se congelaron. Después, las células se cultivaron con IL-2 (200 U/ml) en solitario durante 48 h.

Ensayo de proliferación: Para ensayar la proliferación de linfocitos T, se añadieron 0,5 μ Ci de 3H-timidina a cada pocillo de las placas de 96 pocillos 6 horas antes de la terminación de los cultivos por congelación. Después, las placas se descongelaron, las células se recogieron y se evaluó la 3H-Tdr incorporada con un contador de centelleo Wallac Microbeta (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

Ensayos de descomposición de ARN mensajero: Se realizaron esencialmente ensayos de descomposición de ARN mensajero. Las MSC se incubaron con combinaciones de citocinas durante 6 h. Se añadió actinomicina D (Act-D) al medio a una concentración final de 5 μ g/ml para detener la transcripción. En diversos puntos de tiempo después de la

adición de Act.D, las células se cosecharon para la extracción de ARN total.

Los niveles de ARNm de iNOS, CXCL1, CCL2, CXCL10 e IL-6 se midieron en cada punto de tiempo por RT-PCR cuantitativa y se normalizaron a niveles de ARNm de β -actina. Los porcentajes de ARNm restantes para cada punto de tiempo se representaron frente al tiempo después de la adición de Act.D. Las constantes de descomposición de primer orden, k, se determinaron por regresión no lineal. Las semividas de ARNm asociadas, $t_{1/2}$, se calcularon con la ecuación $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Aislamiento de ARN y ensayo de expresión génica: Se aisló ARN total con el kit RNAPrep Pure Cell/Bacteria. La síntesis de ADNc de primera cadena se realizó con un kit de síntesis de ADNc. Los niveles de ARNm se midieron por RT-PCR cuantitativa (7900 HT; Applied Biosystems, Foster City, CA) con SYBR Green Master Mix y se normalizaron al nivel de ARNm de β -actina.

Las secuencias de pares de cebadores directos e inversos son las siguientes:

- 15 iNOS, directo 5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3' e inverso 5'-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG-3';
 β -actina: directo 5'-CCACGAGCGGTTCCGATG-3' e inverso 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3';
 20 IL-6: directo 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' e inverso 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3';
 CXCL1: directo 5'-CTGCACCCAAACCGAAGTC-3' e inverso 5'-AGCTTCAGGGTCAAGGCAAG-3';
 CCL2: directo 5'-TCTCTCTTCTCCACCACCATG-3' e inverso 5'-GCGTAACTGCATCTGGCTGA-3';
 25 CCL5: directo 5'-TTTCTACACCAGCAAGTGC-3' e inverso 5'-CCTTCGTGTGACAAACACGAC-3';
 CXCL9: directo 5'-AGTGTGGAGTTCGAGGAACCCT-3' e inverso 5'-TGCAGGAGCATCGTGCATT-3';
 30 CXCL10: directo 5'-TAGCTCAGGCTCGTCAGTTCT-3' e inverso 5'-GATGGTGGTTAAGTTCGCT-3'.

Análisis de transferencia Western: Las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo, se cosecharon y se lisaron en el tampón RIPA (Millipore, Temecular, CA) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche, Natley, NJ) y PMSF (Sigma) durante 30 min en hielo. Los lisados se aclararon por centrifugación a 16.000 g durante 35 15 minutos. La concentración de proteína del sobrenadante se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA).

Las muestras de proteínas se diluyeron en tampón de carga 5 x SDS (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS al 10 %, azul de bromofenol al 0,5 %, glicerol al 50 %, β -mercaptoetanol al 5 %) y se fraccionaron en SDS al 10 %-gel de poliacrilamida. 40 Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman Inc., Clifton, NJ) y se incubaron durante 1 h en leche en polvo desnatada al 5 % disuelta en TEST (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, Tween 20 al 0,05 %) a temperatura ambiente. Las membranas de transferencia se incubaron con anticuerpos primarios durante una noche a 4 °C, se lavaron extensamente en TBST, se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con HRP (Cell Signaling) durante 1,5 h a temperatura ambiente, y se lavaron de nuevo con TBST. Las membranas de transferencia 45 se desarrollaron con reactivos quimioluminiscentes (Millipore, Billerica, MA) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Detección de inmunofluorescencia del receptor de IL-17A: Las MSC cultivadas se lavaron primero con PBS y se fijaron con metanol enfriado con hielo a -20 °C durante 10 minutos. Después de una incubación de 10 minutos con Triton X-100 al 0,3 % en PBS, las células se bloquearon con BSA al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario anti-IL-17RA (Santa Cruz) durante una noche a 4 °C. Después del lavado con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor 594 y DAPI (Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS antes de fotografiarse.

55 Lesión hepática inducida por ConA en ratones: Se inyectó por vía intravenosa ConA (Vector Labs, Burlingame, CA) a ratones C57BL/6 (8-10 semanas de edad) en PBS a 15 mg/kg para inducir lesión hepática. Las MSC (5 x 10⁵) derivadas de ratones de tipo silvestre o ratones *aif1*^{-/-} se trataron con o sin IFN γ , TNF α en presencia o ausencia de IL-17A (10 ng/ml para cada citocina) durante 12 h, y después se administraron por vía intravenosa a ratones que habían sido tratados con ConA durante 30 minutos. Los ratones se sacrificaron y se tomaron muestras de suero y tejidos hepáticos después de 7,5 h más. La actividad sérica de alanina aminotransferasa (ALT) se determinó mediante una detección de ALT. Las secciones histológicas de hígado fijadas con formalina se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). 60

Aislamiento de células mononucleares de hígado y análisis de citometría de flujo: Las células mononucleares hepáticas (MNC) se purificaron en un gradiente del 40 %/70 % y se tiñeron con anti-CD3-PE, anti-CD4-PerCP/Cy5.5 y anti-CD8a-APC (eBiosciences) durante 30 min a 4 °C en tampón de tinción (PBS, FCS al 3 %). Para la detección de la expresión superficial de IL-17RA en MSC clonadas, las células se tiñeron con anti-IL-17RA-PE (eBiosciences) y se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Análisis estadístico: La regresión no lineal y los análisis estadísticos se realizaron con el software PRISM v5 (GraphPad Software, Inc.). Las comparaciones entre las muestras se realizaron con la prueba t no pareada. Las diferencias con $P < 0,05$ se consideraron significativas. (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Resultados: IL-17A aumenta el efecto inmunosupresor de las MSC

El presente ejemplo establece que la función inmunosupresora de las MSC no es innata, sino inducida por las citocinas proinflamatorias de una manera dependiente de la concentración. Se requiere una combinación de IFN γ y una de las otras tres citocinas inflamatorias (TNF α , IL-1 α o IL-1 β) para permitir los efectos inmunosupresores de las MSC. IL-17A es una citocina proinflamatoria pleiotrópica conocida por sus funciones críticas en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Curiosamente, también se sabe que IL-17A se sinergia con ciertas citocinas para promover los programas de expresión génica necesarios para la inflamación. Por lo tanto, los presentes inventores examinaron si IL-17A podría sinergizar con concentraciones subóptimas de IFN γ y TNF α para inducir la propiedad inmunosupresora de las MSC.

Las MSC se cultivaron con diversas combinaciones de citocinas recombinantes IFN γ , TNF α e IL-17A a bajas concentraciones (2 ng/ml de cada una) durante 12 h; se añadieron blastos de linfocitos T CD4 $^{+}$ a los cultivos en una relación 1:20 (MSC:linfocitos T), junto con IL-2, y la proliferación de linfocitos T se evaluó mediante la incorporación de ^3H -timidina (se observa que los blastos de linfocitos T proliferan en la presencia de IL-2, pero no producen citocinas sin activación de TCR adicional). Después se concluyó que ninguna de las tres citocinas en solitario puede inducir inmunosupresión en las MSC.

Las MSC se trataron primero con las combinaciones indicadas de citocinas recombinantes IFN γ , TNF α , IL-17A (2 ng/ml cada vez) durante 12 h, después se cultivaron conjuntamente con blastos de linfocitos T CD4 $^{+}$ a una relación 1:20 (MSC: linfocitos T), y la proliferación se evaluó mediante la incorporación de ^3H -timidina después de 12 h adicionales. Por consiguiente, la proliferación de linfocitos T se suprime en presencia de IFN γ y TNF α , y esta supresión puede potenciarse notablemente con IL-17A (Figura 9 A), lo que demuestra una nueva función inmunomoduladora de IL-17A, una potente citocina proinflamatoria.

La expresión de ARNm de los miembros de la familia del receptor de IL-17 en MSC o Raw 264.7 (macrófagos) se examinó entonces por RT-PCR. NC: Sin RT. Como tal, IL-17A señala a través de IL-17RA e IL-17RC, y la expresión de ambos receptores en MSC se confirmó por RT-PCR (Figura 9B), donde se usó una línea celular de macrófagos de ratón Raw 264.7 como control positivo; la expresión de la superficie celular de IL-17RA también se confirmó por microscopía de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo (Figura 9C, paneles superior e inferior, respectivamente).

Dado que las concentraciones de citocinas inflamatorias varían en diferentes fases de una respuesta inflamatoria, se evaluó adicionalmente la dependencia de la concentración de IFN γ y TNF α de la inmunosupresión potenciada por IL-17A. Las MSC se cultivaron con las concentraciones indicadas de IFN γ y TNF α , sin o con 10 ng/ml de IL-17A. Después, las MSC se cultivaron conjuntamente con blastos de linfocitos T CD4 $^{+}$ o el hibridoma de linfocitos T A1.1 para evaluar los efectos sobre la proliferación de linfocitos T. IL-17A fue capaz de mejorar el efecto inmunosupresor de las MSC sobre los linfocitos T a concentraciones de IFN γ y TNF α tan bajas como 1-2 ng/ml de cada una (Figura 9D, 9E).

Incluso a concentraciones más altas de IFN γ y TNF α (es decir, 10-20 ng/ml), IL-17A todavía mejoró la inmunosupresión, aunque el efecto fue menos pronunciado. No obstante, las MSC se trataron con IFN γ y TNF α (2 ng/ml) con concentraciones graduadas de IL-17A, durante 12 h, y después se cultivaron junto con células de hibridoma de linfocitos T A1.1 a una relación de 1:10 durante 12 h. Por consiguiente, las bajas concentraciones de IFN γ y TNF α (2 ng/ml de cada una), tan pequeñas como 0,5 ng/ml de IL-17A, fueron suficientes para provocar una disminución drástica en la proliferación de linfocitos T ($p < 0,05$; Figura 9 F).

Esta observación establece que las MSC pueden suprimir la proliferación de esplenocitos primarios activados dependiendo de las citocinas inflamatorias secretadas por los linfocitos T. La activación de los linfocitos T conduce a la producción de muchas citocinas, incluida la IL-17A. Para confirmar que IL-17A contribuye al efecto inmunosupresor de las MSC, se usó anticuerpo contra IL-17A para neutralizarlo en un sistema de cocultivo de esplenocitos activados por MSC. Mientras que las MSC inhibieron notablemente la proliferación de esplenocitos activados, esta inhibición se

revirtió parcialmente tras la adición de anticuerpo contra IL-17A, es decir, la proliferación aumentó en presencia de anticuerpo (Figura 9G). El efecto óptimo del anticuerpo se produjo con una relación MSC:esplenocito de 1:40. Con una relación MSC:esplenocito de 1:20, la reversión fue menos pronunciada, pero aún estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que IL-17A puede mejorar los efectos inmunosupresores de las MSC, particularmente cuando se cultivan en concentraciones más bajas de IFN γ y TNF α .

IL-17A se sinergia con las citocinas inflamatorias para inducir la expresión de genes inmunomoduladores en las MSC

10 El óxido nítrico (NO) y las quimiocinas, actuando en concierto, son las moléculas clave que median los efectos inmunosupresores de las MSC. Los genes de quimiocina e iNOS en MSC son inducidos por IFN γ y TNF α . Sin embargo, IL-17A mejoró la inmunosupresión por MSC cultivadas con IFN γ y TNF α (Figura 9 D, 9 E). Este estudio fue diseñado entonces para mostrar que IL-17A se sinergia con IFN γ y TNF α para inducir la expresión de iNOS y quimiocinas en las MSC. Para probar esta hipótesis, se cultivó una población de MSC con diversas combinaciones de IFN γ , TNF α y/o
15 IL-17A, y se evaluaron los efectos sobre la expresión de genes inmunomoduladores seleccionados.

En comparación con las MSC cultivadas con combinaciones simples o dobles de citocinas, la adición de IFN α , TNF α e IL-17A aumentó drásticamente la expresión de iNOS, IL-6 y CXCL1 a nivel de ARNm (Figura 10A); el análisis Western blot también confirmó un aumento en los niveles de proteína iNOS (Figura 10 B). Sin embargo, la expresión
20 de otras quimiocinas tales como CCL5, CCL2, CXCL9, CXCL10, que desempeñan papeles fundamentales en los efectos inmunosupresores de las MSC, no se vieron afectadas por la adición de IL-17A (Figura 10 C).

Para confirmar que los efectos sobre la expresión génica se debieron a IL-17A, las MSC se cultivaron con sobrenadante de esplenocitos activados con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de anticuerpo
25 neutralizante contra IL-17A. La adición de anti-IL-17A a los sobrenadantes bloqueó la inducción de la expresión génica de iNOS, IL-6 y CXCL1 sin afectar a CCL2, CCL5, CXCL9 o CXCL10 (Figura 10D, 10E). La transducción de la señal de bloqueo de IL-17A usando las MSC de inactivación de Act1 verificó adicionalmente dicha conclusión,

El reclutamiento de la proteína adaptadora Act1 a IL-17RA está vinculado a la señalización dependiente de IL-17A.
30 Dado que la fosforilación de I κ B α , ERK, p65, JNK se vio afectada en estas MSC de inactivación de Act1 (Figura 11A), IL-17A no pudo regular positivamente la expresión de iNOS inducida por IFN γ + TNF α en las MSC de inactivación de Act1 (Figura 11B, 11C). Mientras tanto, la mejora de la inmunosupresión por IL-17A en las MSC tampoco se observó en ausencia de Act1 (Figura 11D). Por lo tanto, los efectos sobre la expresión génica se debieron a IL-17A. Juntos, estos datos indicaron que IL-17A puede sinergizar con IFN γ y TNF α para inducir la expresión de genes que contribuyen
35 a la función inmunosupresora de las MSC.

IL-17A revierte la supresión de la expresión génica impuesta por la proteína de unión a ARN AUF1

Los ARN mensajeros que codifican iNOS y muchas citocinas/quimiocinas se degradan rápidamente, lo que limita la
40 abundancia tanto de los ARNm como de las proteínas. La activación de las vías de señalización, particularmente durante las respuestas inmunológicas, estabiliza muchos de estos ARNm para aumentar su expresión. De hecho, un mecanismo principal por el cual IL-17A induce la expresión de muchos genes mediadores inflamatorios es mediante la estabilización de sus ARNm. Numerosas proteínas se unen a secuencias de ARN específicas, generalmente en el 3'-UTR, y se dirigen a los ARNm para una degradación rápida. Los elementos ricos en AU (ARE) comprenden una de
45 estas familias de secuencias de degradación de ARNm. Existen numerosas proteínas que se unen a ARE para provocar la expresión controlada de los ARNm que las albergan. Estas proteínas incluyen AUF1, HuR, KSRP, TIA-1/TIAR y TTP. Algunos de los objetivos de estas proteínas incluyen los ARE-ARNm que codifican iNOS, IL-6 y CXCL1. La proteína de unión a ARE AUF1 consiste en cuatro isoformas (p37, p40, p42 y p45) que se unen y regulan la degradación de los ARNm de iNOS e IL-6. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que AUF1 puede actuar para limitar
50 la expresión de ARNm de iNOS y citocinas/quimiocinas y que IL-17A puede bloquear esta actividad de AUF1 aumentando así la expresión génica,

Como tal, se comparó la expresión génica inducida por citocinas entre MSC derivadas de médula ósea de ratones auf1^{-/-} y ratones de tipo silvestre. Las células se cultivaron como antes con combinaciones de citocinas, con o sin IL-
55 17A. Mientras que los niveles de ARNm de iNOS, IL-6 y CXCL1 eran normalmente muy bajos en los MSC de tipo silvestre, la adición de IL-17A (junto con IFN γ y TNF α) indujo aumentos significativos en estos ARNm (Figura 12A; $p < 0,001$). Por el contrario, los niveles de estos tres ARNm fueron mucho más altos en las auf1^{-/-} MSC cultivadas con IFN γ + TNF α , y la adición de IL-17A tuvo poco efecto sobre los niveles de ARNm (es decir, IL-17A aumentó su abundancia en menos de dos veces). Del mismo modo, IFN γ y TNF α fueron suficientes para inducir al máximo la
60 proteína iNOS en las auf1^{-/-} MSC sin la necesidad de IL-17A, en contraste con las MSC de tipo silvestre (Figura 12B, comparar los carriles 7 y 8 con el carril 5).

Dados los efectos de AUF1 e IL-17A sobre la expresión génica, era posible que la inactivación de AUF1 en solitario fuera suficiente para proporcionar el grado de estabilización de ARNm, y una mayor expresión génica, que normalmente requeriría IL-17A. Las MSC de tipo silvestre y *auf1*^{-/-} MSC se cultivaron con IFN γ + TNF α , con o sin IL-17A. Después de 6 h, se añadió Act.D para detener la transcripción.

5 En diversos puntos de tiempo, se aisló el ARN de las células y se determinaron los niveles de ARNm individuales para evaluar la cinética de descomposición del ARNm. En las MSC de tipo silvestre, los ARNm de iNOS, IL-6 y CXCL1 eran relativamente inestables con semividas de $4,3 \pm 1,4$ h, $0,7 \pm 0,1$ h, y $0,59 \pm 0,08$ h, respectivamente; IL-17A condujo a una doble estabilización de los tres ARNm (Figura 13A; $p < 0,05$ para cada uno). Los ARNm de CCL2 y CXCL10, que
10 no respondieron a IL-17A (véase la Figura 13C), no se estabilizaron por IL-17A, como era de esperar (Figura 13A; $t_{1/2} = \sim 2$ h para ambos ARNm, con o sin IL-17A).

A diferencia de las MSC de tipo silvestre, la inactivación de AUF1 estabilizó fuertemente los ARNm de iNOS, IL-6 y CXCL1 (Figura 13B; $t_{1/2} > 10$ h para iNOS e IL-6; $t_{1/2} = 4,3 \pm 0,6$ h para CXCL1). IL-17A no tuvo ningún efecto sobre la semivida de los ARNm de iNOS e IL-6 (Figura 13B), mientras que estabilizó el ARNm de CXCL1 al menos dos veces (Figura 13B; $t_{1/2} > 10$ h frente a $4,3 \pm 0,6$ h sin IL-17A; véase el Análisis). Estos datos de descomposición de ARNm indicaron que (i) AUF1 normalmente promueve la degradación de ARNm de iNOS, IL-6 y CXCL1 en MSC e IL-17A causa su estabilización; (ii) la estabilización de estos ARNm por inactivación de AUF1 es comparable en magnitud a los efectos estabilizadores de IL-17A sobre ARNm en MSC de tipo silvestre; y (iii) la inactivación de AUF1 parece
15 obviar un requisito para que IL-17A induzca la expresión génica de iNOS/quimiocina. Por lo tanto, AUF1 puede servir como un punto de control a través del cual IL-17A debe actuar para provocar sus efectos sobre la expresión génica de MSC, y posiblemente la inmunosupresión final, que se examina a continuación.

Efectos de AUF1 sobre la inmunosupresión por MSC in vitro

25 Dado que la inactivación de AUF1 indujo la expresión génica de quimiocina sin la necesidad de IL-17A (véase la Figura 12 y 13), se planteó la hipótesis de que el cultivo de *auf1*^{-/-} MSC con IFN γ + TNF α en solitario sería suficiente para fenocopiar la actividad inmunosupresora de MSC de tipo silvestre cultivadas con las tres citocinas. Para abordar esta hipótesis, se cultivaron MSC de tipo silvestre y *auf1*^{-/-}MSC con IFN γ + TNF α , con o sin IL-17A, y después se cultivaron
30 junto con el hibridoma de linfocitos T A1.1 para ensayos de proliferación de linfocitos T. IL-17A aumentó la actividad inmunosupresora de las MSC de tipo silvestre en comparación con las células cultivadas sin ella; sin embargo, IFN γ + TNF α fue suficiente para inducir la actividad inmunosupresora máxima de *auf1*^{-/-} MSC e IL-17A no aumentó adicionalmente el efecto inmunosupresor (Figura 14.A, 14B). Estos resultados, considerados en conjunto, son consistentes con las observaciones de que AUF1 limita la expresión génica de iNOS y citocina/quimiocina; IL-17A
35 revierte este efecto para mejorar la inmunosupresión por las MSC.

IL-17A aumenta el efecto terapéutico de las MSC en ratones que padecen lesión hepática inducida por ConA de manera dependiente de AUF1

40 Los inventores examinaron a continuación los efectos de IL-17A sobre la inmunosupresión in vivo por las MSC de tipo silvestre y *auf1*^{-/-} MSC. La lesión viva inducida por ConA en ratones es un modelo in vivo ya descrito de hepatitis autoinmune mediada principalmente por linfocitos T. Dado que los resultados anteriores mostraron que IL-17A puede mejorar drásticamente el efecto inmunosupresor de las MSC en un sistema in vitro, se esperaba que IL-17A pudiera permitir a las MSC un mejor efecto terapéutico en el tratamiento de la lesión hepática inducida por ConA en ratones.
45 Por consiguiente, las MSC de tipo silvestre y *auf1*^{-/-} MSC con y sin IFN γ + TNF α , en presencia o ausencia de IL-17A, durante 12 h se trataron primero y después se inyectaron por vía intravenosa en ratones que recibieron inyección de ConA 30 minutos antes. En comparación con las MSC no tratadas o IFN γ + TNF α pretratadas de tipo silvestre, las MSC de tipo silvestre pretratadas con IFN γ + TNF α e IL-17A podrían mejorar sustancialmente el daño hepático con una actividad ALT sérica muy reducida y la necrosis e inflamación del hígado (Figura 15A, 15D). Sin embargo, al igual
50 que para las *auf1*^{-/-} MSC, solo el pretratamiento con IFN γ + TNF α provocará el máximo efecto terapéutico en la lesión hepática inducida por ConA, sin la necesidad de IL-17A (Figura 15A, 15D). Según el patrón de actividad ALT sérica, las células mononucleares, así como la infiltración de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺ en el hígado también disminuyeron drásticamente en ratones a los que se administró MSC de tipo silvestre pretratadas por IFN γ + TNF α con IL-17A, o *auf1*^{-/-} MSC pretratadas por IFN γ + TNF α con o sin IL-17A (Figura 15B, 15C). Por lo tanto, un experto
55 en la técnica puede apreciar una nueva y novedosa terapia en el tratamiento del daño hepático inducido por ConA, utilizando MSC pretratadas por IFN γ + TNF α , junto con IL-17A, y el efecto de IL-17A se ejerció en un AUF1 de manera dependiente.

Ejemplo 13

60 **IL-17A promovió la expresión de iNOS mejorando la estabilidad del ARNm**

Para investigar el mecanismo de cómo IL-17A mejora la expresión de iNOS y la inmunosupresión por MSC, se estudió la estabilidad de ARN de iNOS bajo la inducción de citocinas. Como se muestra en la Figura 16A, el tiempo medio de descomposición de ARNm de iNOS es de aproximadamente 2,5 horas en el grupo de tratamiento con IFN γ + TNF α . Curiosamente, el complemento con IL-17A protegió completamente el ARNm de iNOS dentro de los puntos de tiempo probados.

En mamíferos, muchos ARNm que codifican proteínas inflamatorias podrían desestabilizarse por elementos ricos en AU (ARE) presentes en sus regiones no traducidas en 3'. La degradación rápida de ARNm se produce con la asociación de proteínas de unión a ARE (AUBP) con estos ARNm. AUF1, el factor 1 de unión a ARE/poli(U)/degradación, es uno de los AUBP mejor caracterizados, que se une a muchos ARNm de ARE para mediar la degradación. Se sospechó que AUF1 era fundamental para las observaciones apreciadas en la sobreexpresión de iNOS mediada por IL-17A en MSC.

Para probar esto, AUF1 se inactivó con ARNsi en MSC y se trató con IFN γ + TNF α con y sin IL-17A. En las MSC de tipo silvestre, IL-17A indujo notablemente la expresión de iNOS, mientras que la ausencia de AUF1 anuló en gran medida este efecto, lo que indica la importancia de AUF1 en la expresión de iNOS mediada por IL-17A en MSC. Por lo tanto, IL-17A es capaz de estabilizar el ARNm de iNOS en las MSC, lo que proporciona un procedimiento novedoso para mejorar eficazmente la terapia mediada por MSC en entornos clínicos.

20 *Los interferones tipo I y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) sirven como reguladores negativos en la inmunosupresión mediada por MSC a través de la regulación negativa de la expresión de iNOS.*

Como se ha descrito anteriormente, IL-17A podría ser un factor potencial para mejorar la inmunosupresión mediada por MSC. Sin embargo, en muchos casos, dicho efecto inmunosupresor in vitro e in vivo, ya sea positiva o negativamente, necesita ser controlado. Se examinaron los factores de crecimiento y las citocinas disponibles, y se encontraron dos factores que regulan negativamente notablemente la inmunosupresión mediada por MSC: interferones tipo I y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2).

Estos dos factores podrían inhibir potencialmente el efecto inmunosupresor de las MSC hacia la proliferación de linfocitos T (Figura 16). Un análisis posterior reveló que, el complemento de cualquiera de estas citocinas fue capaz de reducir notablemente la expresión de la proteína iNOS y la producción de NO (Figura 17). ζ

Estos hallazgos corroboran procedimientos para controlar negativamente la inmunosupresión mediada por MSC. Por consiguiente, los anticuerpos contra los interferones tipo I y el FGF pueden usarse para aumentar el efecto inmunosupresor de las MSC.

Construcción de células iNOS-/- de ratón que expresanIDO humana (IDO MSC humanizadas).

Existe una variación de especie para la inmunosupresión mediada por MSC: NO es la molécula efectora para MSC de ratón, mientras que las MSC humanas y de primate utilizan indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) como la molécula efectora supresora.

Dado que las MSC de ratón no expresan indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) después de la estimulación inflamatoria de citocinas, es difícil estudiar el papel biológico de IDO en el sistema de ratón. Para evitar este problema, las iNOS-/- MSC de ratón se transfectaron con el gen IDO humano bajo el control del promotor iNOS de ratón. Esto permitió la expresión de IDO en MSC de ratón tras la estimulación inflamatoria de citocinas. Las iNOS -/- MSC de ratón que expresan IDO humana estable se han generado con éxito, con la verificación de la alta expresión de IDO bajo la estimulación por citocinas inflamatorias de ratón. Con estas IDO MSC humanizadas, se demuestra que IDO es inmunosupresor en MSC de ratón in vitro e in vivo. Se generaron ratones humanizados con IDO a partir de ratones iNOS -/-.

El gen IDO humano también se está utilizando para reemplazar el gen iNOS de ratón en ratones normales, de modo que la expresión de IDO está controlada por los mecanismos reguladores del gen iNOS de ratón, mientras que el gen iNOS se silencia para estudiar adicionalmente la farmacología, la terapia contra el cáncer, y evaluar la respuesta inmunológica y la patogénesis inmune relacionada.

Ejemplo 14

Transducción de una población de MSC para liberar IFN α funcional

En este ejemplo, los inventores transdujeron MSC con lentivirus que codificaban GFP (MSC-GFP) o GFP junto con IFN α de ratón (MSC-IFN α). Más del 90 % de las células se transdujeron con éxito, como se muestra por la expresión

de GFP en citometría de flujo (Figura 18A). No se observaron cambios aparentes en la morfología y la tasa de proliferación entre MSC-GFP y MSC-IFN α . Para examinar el nivel de producción de IFN de MSC-IFN α , se cuantificaron los niveles de IFN α en el sobrenadante de MSC cultivadas a 5×10^5 células por ml durante 48 h (Figura 18 B).

5 El análisis ELISA mostró que había 19 ng/ml de IFN α en el sobrenadante de MSC-IFN α , mientras que no se detectó IFN α en el sobrenadante de MSC-GFP cultivado en la misma condición. Para evaluar si el IFN α liberado por MSC-IFN α posee una función biológica, la expresión de la molécula H-2Kb de MHC I en la superficie de MSC se evaluó mediante citometría de flujo. IFN α aumenta el nivel de expresión de H-2Kb.

10 La Figura 18C explica que la expresión de H-2Kb fue baja en MSC-GFP, una propiedad intrínseca de las MSC. Sin embargo, sorprendentemente después del tratamiento con IFN α recombinante, la expresión de H-2Kb aumentó drásticamente en MSC-GFP. También se observó una expresión aumentada similar de H-2b en células tratadas con el sobrenadante de MSC-IFN α . Por consiguiente, la expresión superficial de H-2Kb en MSC-IFN α también aumentó a un nivel similar al de MSC-GFP tratado con IFN α . Estos datos demostraron que MSC-IFN α producía IFN α biológicamente funcional.

MSC-IFN α ejerció un potente efecto antitumoral in vivo.

20 Para investigar el efecto de MSC-IFN- α sobre el crecimiento tumoral in vivo, se empleó el modelo de melanoma B16 de ratón. En este sistema, todas las células y ratones están en el fondo C57BL/6. Se inocularon por vía intramuscular 1×10^6 células de melanoma B16 en solitario, o con 1×10^6 MSC-GFP o MSC-IFN- α , y los tumores se extrajeron y se pesaron doce días después. Se observó inesperadamente que MSC-IFN α detuvo por completo el crecimiento tumoral, mientras que MSC-GFP aumentó ligeramente el crecimiento tumoral (Figura 19A). Para examinar la potencia del MSC-IFN α , se inyectaron a los animales 1×10^6 células de melanoma B16 con diferentes números de MSC-IFN α . Sorprendentemente, incluso 1×10^4 MSC-IFN α (a la relación de MSC-IFN α : B16 = 1:100) todavía podría prevenir el crecimiento tumoral in vivo (Figura 19B). Además, todos los ratones inoculados con células tumorales en solitario murieron en treinta días, mientras que casi la mitad de los ratones recibieron células tumorales junto con MSC-IFN α sobrevivieron durante más de 100 días (Figura 19C).

30 Cuando se inyectaron células MSC-IFN α tres o cuatro días después de la inoculación de células de melanoma B16, el crecimiento tumoral también se inhibió eficazmente (Figura 19D y 19E). Para comparar la capacidad antitumoral de MSC-IFN α con IFN α recombinante, ratones con 5 μ g de IFN α recombinante (50.000 U) o 1×10^6 MSC-IFN α tres días después de la inoculación de células B16. Según este ensayo in vitro, se estima aproximadamente que las 1×10^6 células MSC-IFN α inyectadas solo producen aproximadamente 19 ng de IFN α diariamente. Esto está muy por debajo de los 5 μ g de IFN α recombinante inyectado. Esta observación es significativa, ya que los inventores observaron que, incluso con esta baja cantidad de IFN α producido (250 veces menor que la cantidad de IFN α recombinante inyectado), MSC-IFN α tenía un efecto antitumoral mucho más potente que el IFN α recombinante (Figura 19F). La administración repetida de IFN α ejerció aún más un potente efecto antitumoral in vivo (Figura 18 complementaria). Estos datos demostraron claramente que las MSC secretoras de IFN α poseen una actividad antitumoral altamente potente in vivo.

Las MSC persistieron en el tumor; disminuyeron la proliferación de células tumorales e indujeron la apoptosis de células tumorales.

45 Para investigar más a fondo los mecanismos del potente efecto antitumoral de MSC-IFN. α , se rastreó el destino del MSC-IFN α administrado in vivo. Por consiguiente, MSC-IFN α se marcó con luciferasa, cuya actividad se monitorizó in vivo con tecnología de imagen en vivo mediante el sistema de imagen Berthod NC100.

50 Cuando se inyectó junto con células B16, MSC-IFN α persistió solo en tumores durante más de dos semanas con disminución gradual (Figura 20A y 20B). Teniendo en cuenta el potente efecto antitumoral de MSC-IFN α (aún eficaz en la relación de MSC-IFN α : B16 = 1:100), se cree que SC-IFN α permanece dentro de los tumores y consecutivamente a una concentración secreta baja pero eficaz de IFN α localmente en el tumor durante al menos dos semanas.

55 Los expertos en la técnica pueden apreciar la superioridad de este efecto sobre la corta semivida y el alto requisito de dosis para la administración de IFN α recombinante *in vivo*. Cuando los tumores se examinaron histológicamente, se encontró infiltración masiva de linfocitos en el grupo B16 más MSC-IFN α .

MSC-IFN α inhibió la proliferación de células tumorales como se muestra por la relación disminuida de células positivas para Ki-67 y el aumento de la apoptosis de células tumorales, como se muestra por el ensayo TUNEL (Figura 20C).

60 *La actividad antitumoral de MSC-IFN α era en gran medida inmunodependiente.*

Se estudió el efecto directo del IFN α recombinante sobre el crecimiento tumoral *in vitro*. Se descubrió que el IFN α recombinante solo inhibía las células de melanoma B16 de forma marginal incluso a altas concentraciones (hasta 100 ng/ml, en comparación con 19 ng/ml producido por MSC-IFN α) (Figura 21A). Por lo tanto, considerando la inhibición completa del crecimiento tumoral observada *in vivo* por MSC-IFN α , los inventores razonaron que debería haber otros
5 mecanismos involucrados además de la inhibición directa del crecimiento tumoral.

Para probar si el sistema inmunitario desempeñó algún papel en el efecto antitumoral de MSC-IFN α , se inocularon células de melanoma B16 en solitario, o bien con MSC-GFP o MSC-IFN α en ratones NOD-SCID de tipo silvestre e inmunodeficientes en paralelo, y se comparó el crecimiento tumoral en estos ratones. En ratones de tipo silvestre,
10 MSC-IFN α inhibió completamente el crecimiento tumoral (Figura 21B), mientras que en ratones inmunodeficientes, el efecto de inhibición tumoral de MSC-IFN α se abolió en gran medida (Figura 21C). Para analizar más claramente el papel del sistema inmune en el efecto antitumoral de MSC-IFN α , se inyectó menos MSC-IFN α junto con las células tumorales B16 para minimizar la contribución de la inhibición tumoral directa. Cuando se usaron números bajos de
15 MSC-IFN α (1/100 de células tumorales), el crecimiento tumoral todavía se inhibió eficazmente en ratones de tipo silvestre (Figura 21D); sin embargo, este efecto desapareció por completo en ratones inmunodeficientes (Figura 21E).

Después, los inventores probaron si las células NK estaban involucradas en el efecto antitumoral de MSC-IFN α al agotar las células NK con el anticuerpo anti-asialo GM1. Sorprendentemente, el crecimiento tumoral se inhibió eficazmente en ratones de control; sin embargo, esta inhibición se invirtió en gran medida en ratones tratados con
20 anticuerpos contra el agotamiento de las células NK (Figura 21F). Los linfocitos T CD8 $^{+}$ también contribuyeron al efecto antitumoral de MSC-IFN α , como lo demuestra la inhibición disminuida del crecimiento tumoral por MSC-IFN α en ratones con deficiencia de linfocitos T CD8 $^{+}$, ratones knockout β 2m (Figura 21G). Estos datos mostraron claramente que el sistema inmune es crítico en el efecto antitumoral de MSC-IFN α , además de su efecto directo sobre las células tumorales.

25 En este estudio, se administró IFN α al tumor a través de MSC en ratones normales. En dichos ratones inmunocompetentes, se descubrió que el IFN α ejercía su efecto promoviendo la inmunidad antitumoral. Incluso un número bajo de MSC secretoras de IFN α tenía la capacidad de inhibir cien veces más el crecimiento de células tumorales en ratones normales, pero no en ratones inmunodeficientes. Además, se demostró que tanto las células NK
30 como los linfocitos T CD8 $^{+}$ desempeñan un papel importante en el efecto antitumoral de las MSC secretoras de IFN α *in vivo*.

IFN α podría superar la inmunosupresión de las MSC. Por consiguiente, se contempla que IFN α revierte eficazmente la propiedad inmunosupresora de las MSC inducida por IFN γ y TNF α . La existencia a largo plazo de las MSC-IFN α en
35 el tumor evitó la inyección frecuente como se observa con IFN α . Es poco probable que el nivel bajo pero eficaz de IFN α liberado por MSC-IFN α cause algún efecto secundario. Los expertos en la técnica pueden apreciar que las MSC diseñadas para expresar factores inmunoestimulantes son muy prometedoras para la terapia tumoral en el futuro.

Si bien la invención se ha descrito con referencias a realizaciones específicas, las modificaciones y variaciones de la
40 invención pueden interpretarse sin apartarse del alcance de la invención, que se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la atenuación de una respuesta inmunológica en un sujeto con esclerosis múltiple, artritis, lupus, sepsis, hepatitis, cirrosis, enfermedad de Parkinson, infecciones crónicas y enfermedad de injerto contra huésped, que comprende una población de células madre mesenquimales aisladas producidas por un procedimiento que comprende las etapas de:
- (i) obtener células progenitoras multipotentes;
 - (ii) cultivar dichas células multipotentes en un medio para producir una subpoblación expandida de células madre mesenquimales y una subpoblación de células diferenciadas;
 - (iii) separar células madre mesenquimales de células diferenciadas en dicho medio; y
 - (iv) tratar al menos un subconjunto de dichas células madre mesenquimales separadas con interferón gamma (IFN γ) e inteleucina-17A (IL-17A).
2. La composición de la reivindicación 1: donde el al menos un subconjunto de dichas células madre mesenquimales separadas también se trata con al menos otra citocina seleccionada de entre el grupo que consiste en interleucina-1 alfa (IL-1 α), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferones tipo 1 (IFN-1), TGF β y FGF.
3. Una composición que comprende una cantidad eficaz de:
- (a) una población de células madre mesenquimales entrenadas aisladas;
 - (b) IFN γ aislado e IL-17A aislado; y
 - (c) al menos otra citocina seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β y TNF α , para su uso en un procedimiento para mejorar la inmunosupresión en un paciente con esclerosis múltiple, artritis, lupus, sepsis, hepatitis, cirrosis, enfermedad de Parkinson, infecciones crónicas y enfermedad de injerto contra huésped.
4. La composición de la reivindicación 3:
- donde dicha población de células madre mesenquimales, dicho IFN γ aislado e IL-17A aislada y dicha citocina se administran en una mezcla, opcionalmente donde dicho paciente que lo necesite padece cualquiera de las afecciones seleccionadas de entre el grupo que consiste en un trastorno autoinmune, alergia, sepsis, cirrosis, cáncer, infecciones virales y trasplante de órganos, o
- donde dicha población de células madre mesenquimales, dicho IFN γ aislado e IL-17A aislada y dicha citocina se administran individualmente, o
- donde la composición induce la expresión de NO sintasas (iNOS), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en al menos un subconjunto de dichas células madre mesenquimales.
5. La composición de la reivindicación 3 o 4, donde dicha al menos otra citocina comprende TNF α .
6. La composición de la reivindicación 5:
- donde dicha población de células madre mesenquimales, dicho IFN γ aislado e IL-17A aislado y dicha al menos otra citocina se administran individualmente o en una mezcla,
- donde la composición comprende además una cantidad eficaz de un inhibidor de NOS o un inhibidor de IDO,
- donde dichas células madre mesenquimales entrenadas están en forma de vacuna,
- donde dicho paciente padece cáncer o infecciones virales, o
- donde la composición se administra localmente a un sitio de tratamiento.
7. La composición de la reivindicación 3 o 4, donde dicha al menos otra citocina comprende IL-1 α o IL-1 β .
8. Un kit para modificar una respuesta inmunológica en un sujeto con esclerosis múltiple, artritis, lupus, sepsis, hepatitis, cirrosis, enfermedad de Parkinson, infecciones crónicas y enfermedad de injerto contra huésped, que comprende

(a) un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado de entre el grupo que consiste en solución salina fisiológica, dextrosa acuosa al 5 % y una mezcla de las mismas;

(b) una población de células madre mesenquimales;

(c) interferón γ aislado e IL-17A aislada;

5 (d) al menos otra citocina seleccionada de entre el grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β y TNF α .

9. El kit de la reivindicación 8, donde la administración de una combinación de (a), (b), (c) y (d) al sujeto que lo necesite logra la supresión inmune, o donde el kit comprende además instrucciones para usar el kit para la supresión inmune ilícita.

10

10. El kit de la reivindicación 8 o 9, donde dicha al menos otra citocina comprende TNF α .

11. El kit de la reivindicación 8 o 9, donde dicha al menos otra citocina comprende IL-1 α o IL-1 β .

15

12. La composición de la reivindicación 2, donde dicha al menos otra citocina comprende IL-1 α o IL-1 β .

13. La composición de la reivindicación 2, donde dicha al menos otra citocina comprende TNF α .

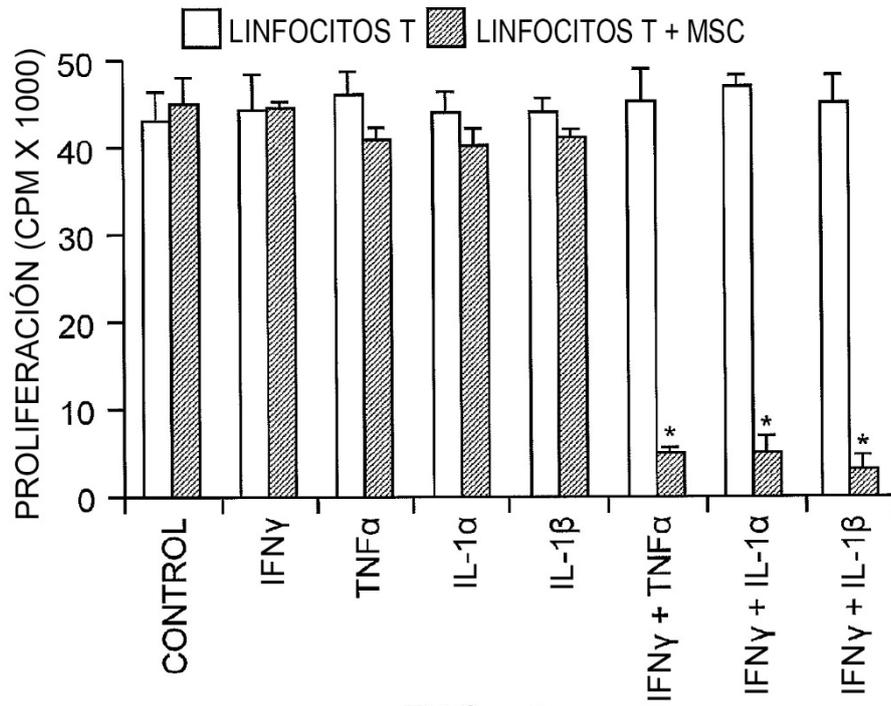


FIG. 1

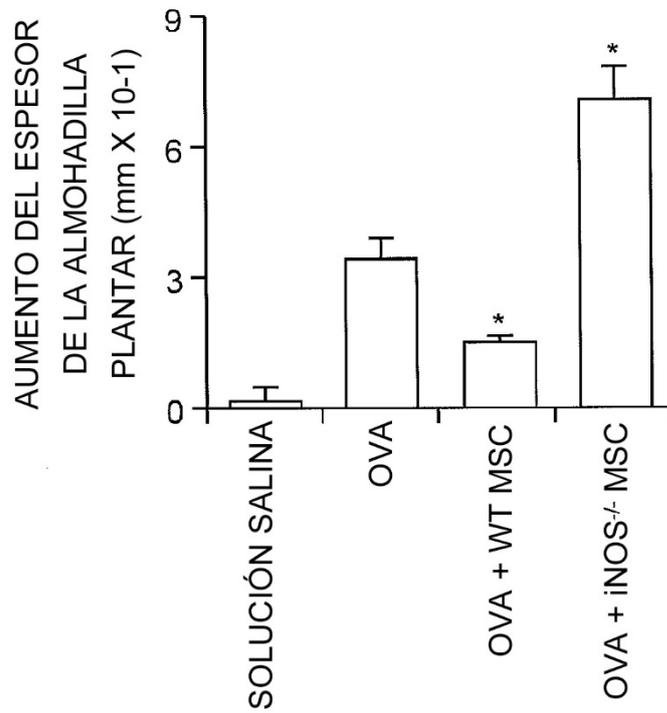


FIG. 2

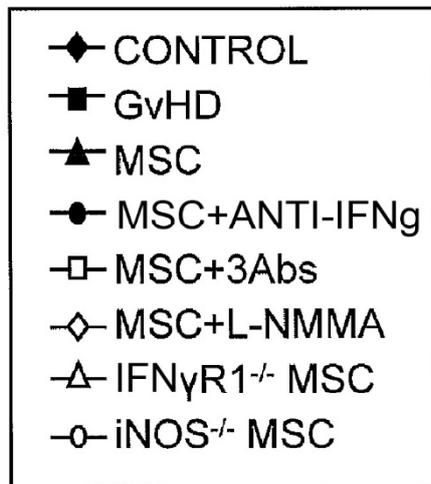
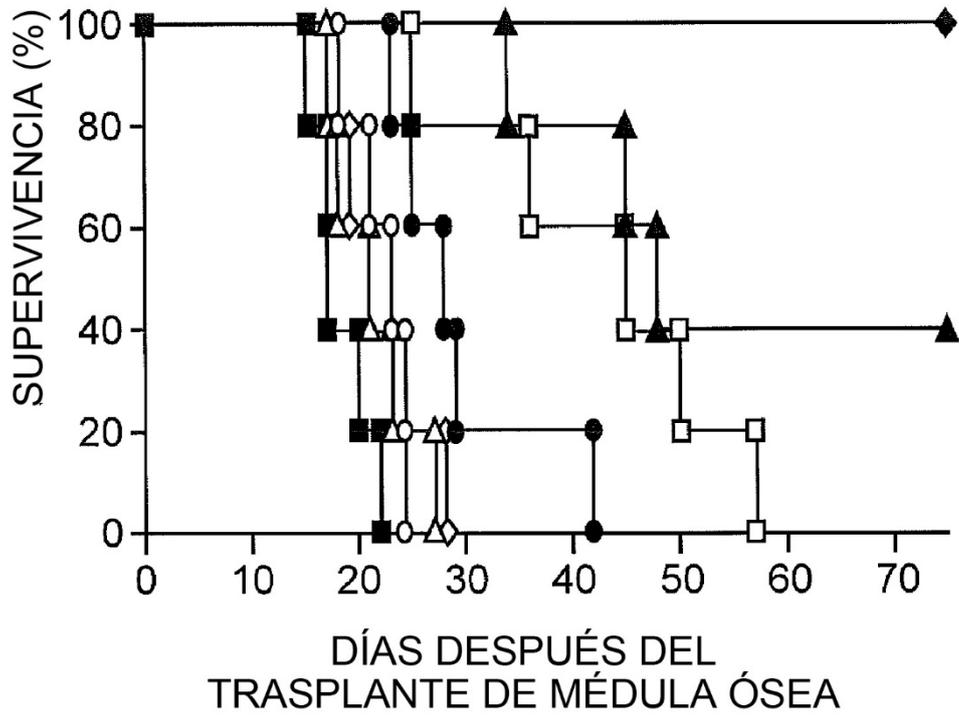


FIG. 3

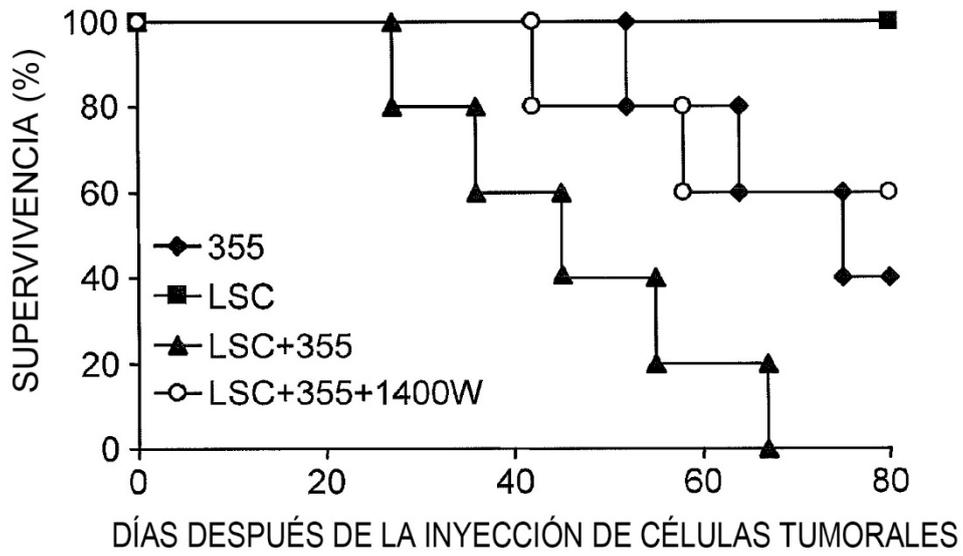


FIG. 4

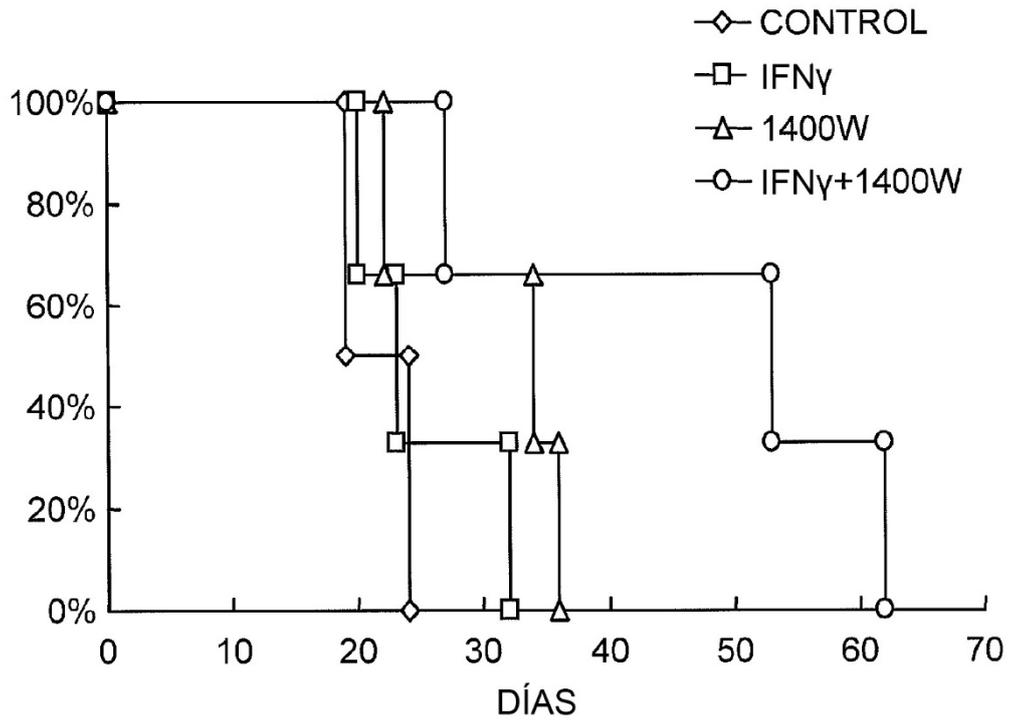


FIG. 5

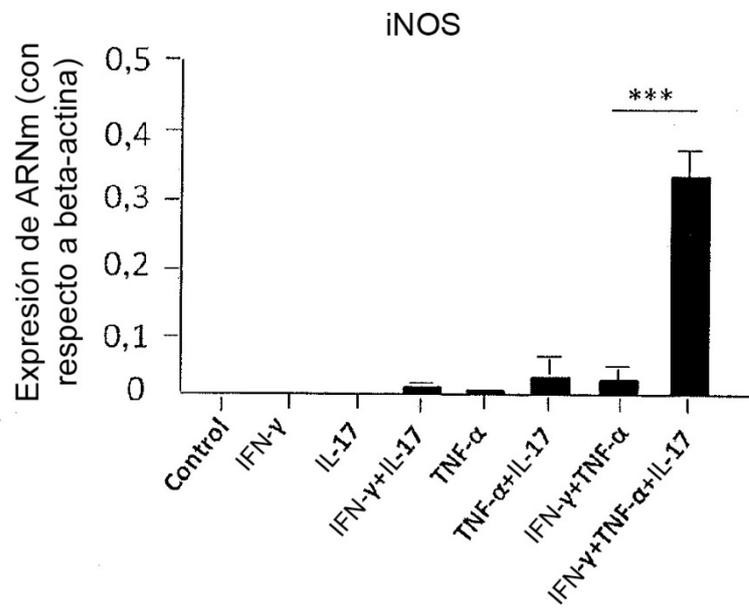


FIG. 6

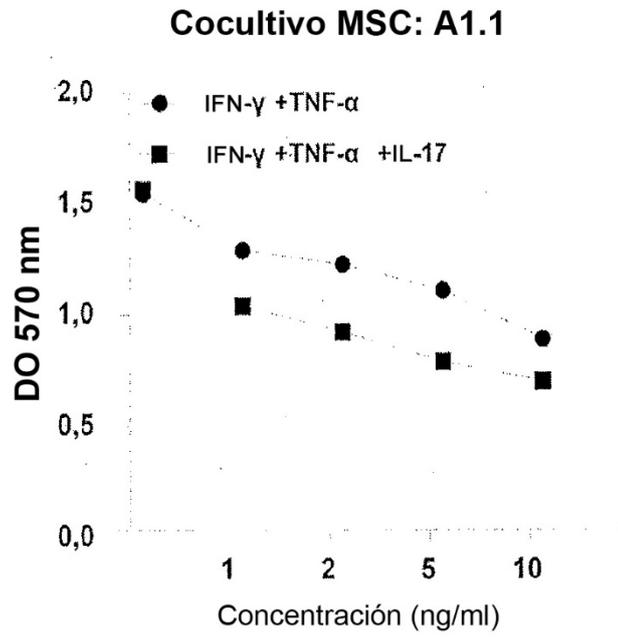


FIG. 7

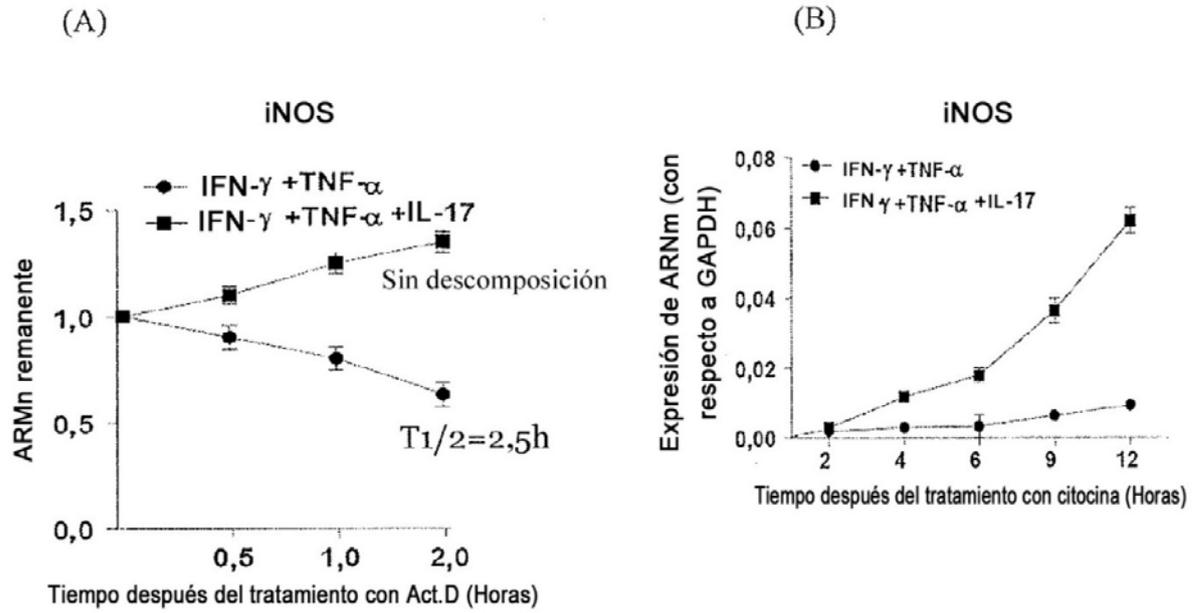


FIG. 8

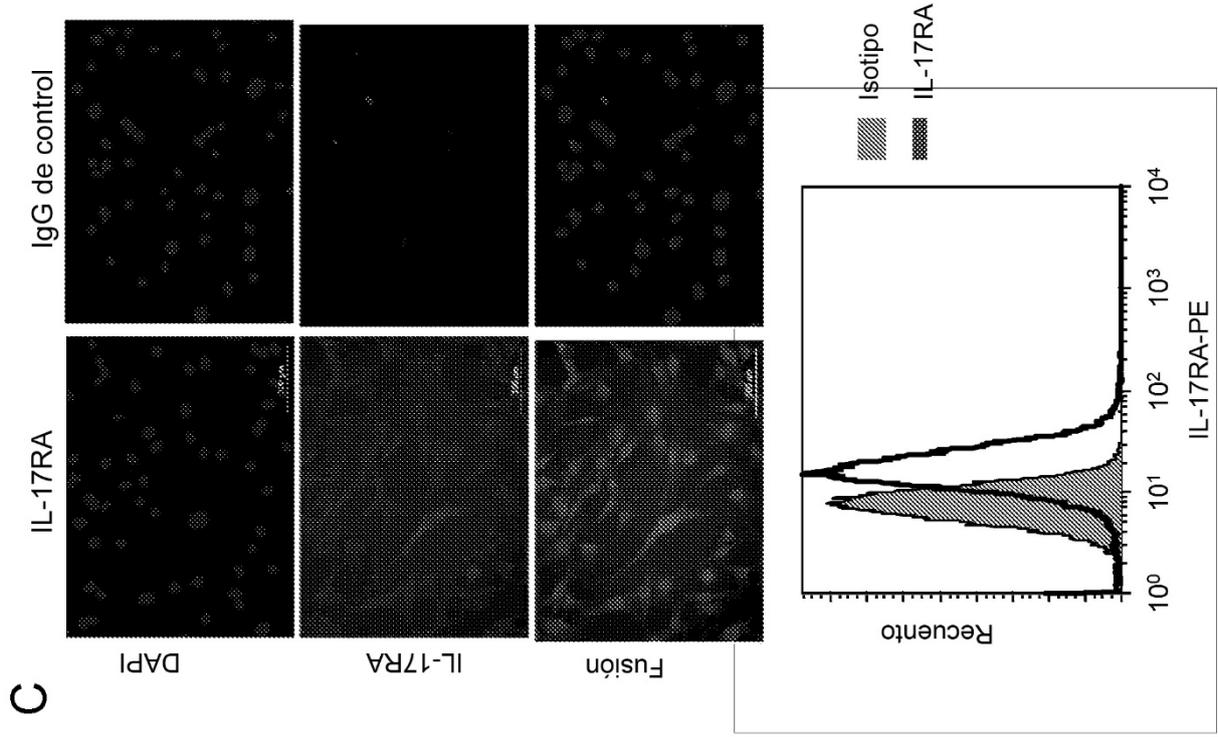
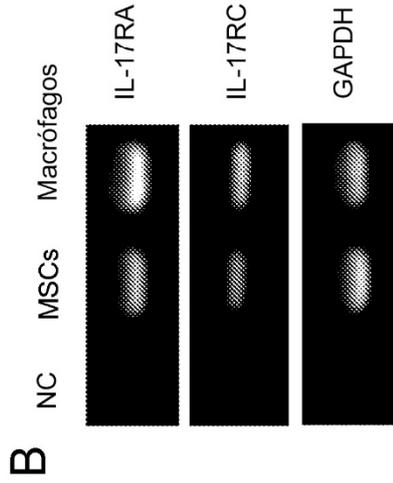
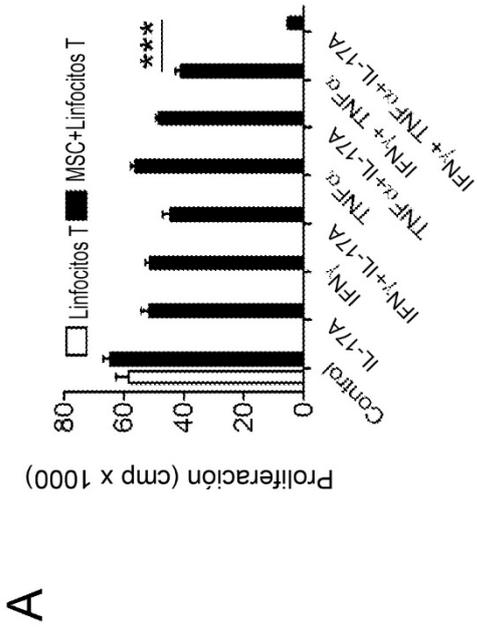


FIG. 9



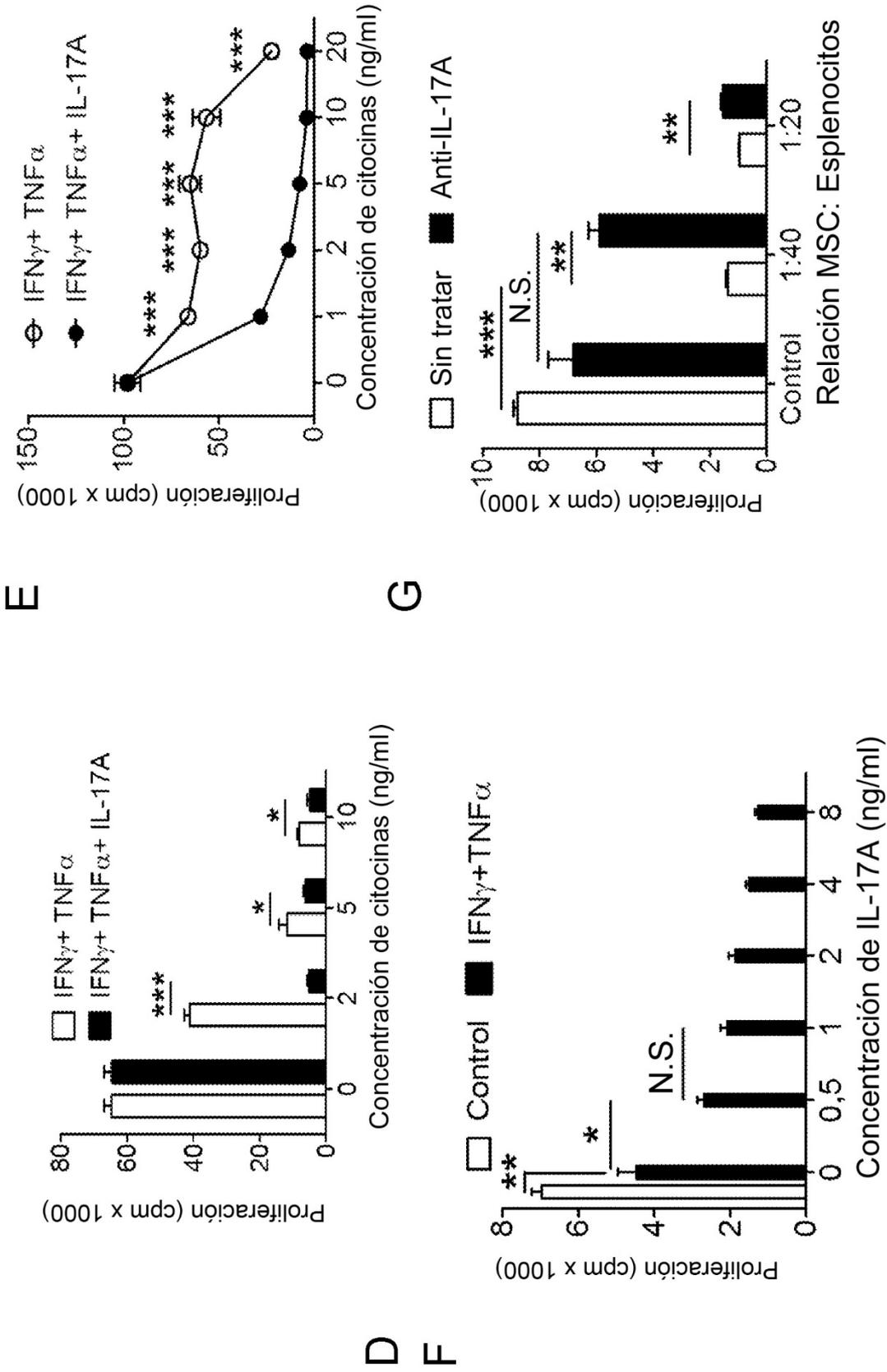


FIG. 9 (continuación)

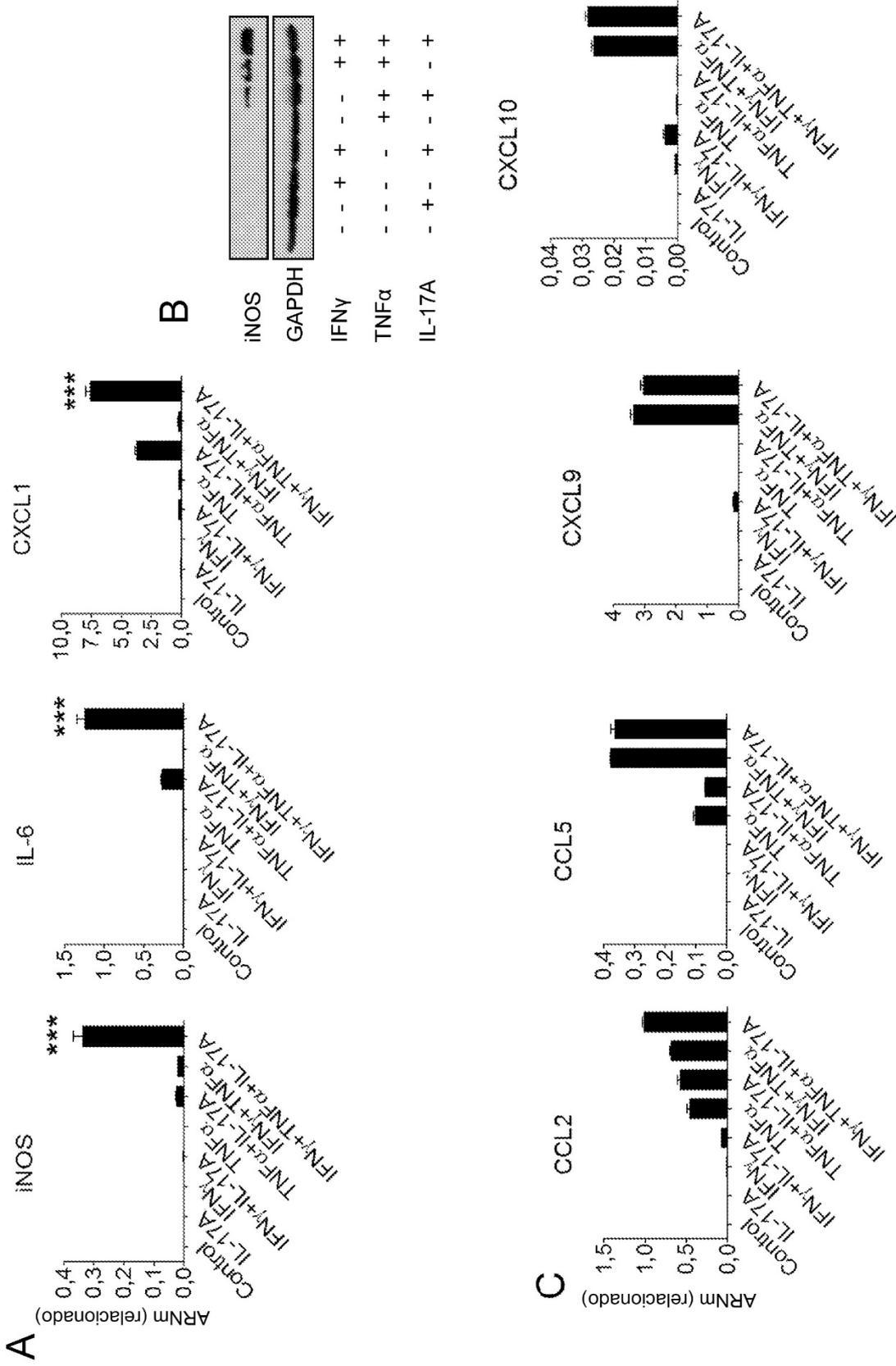


FIG. 10

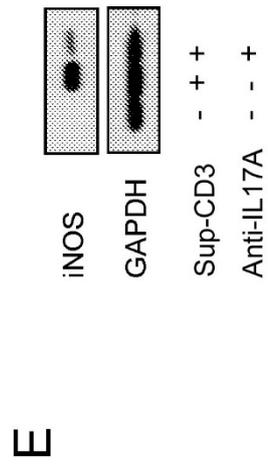
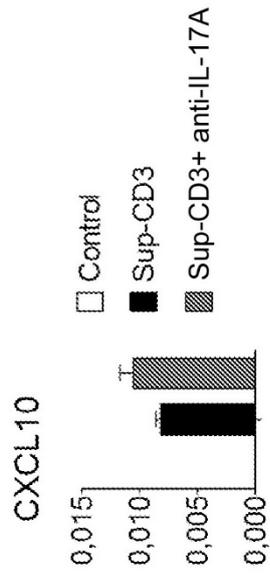
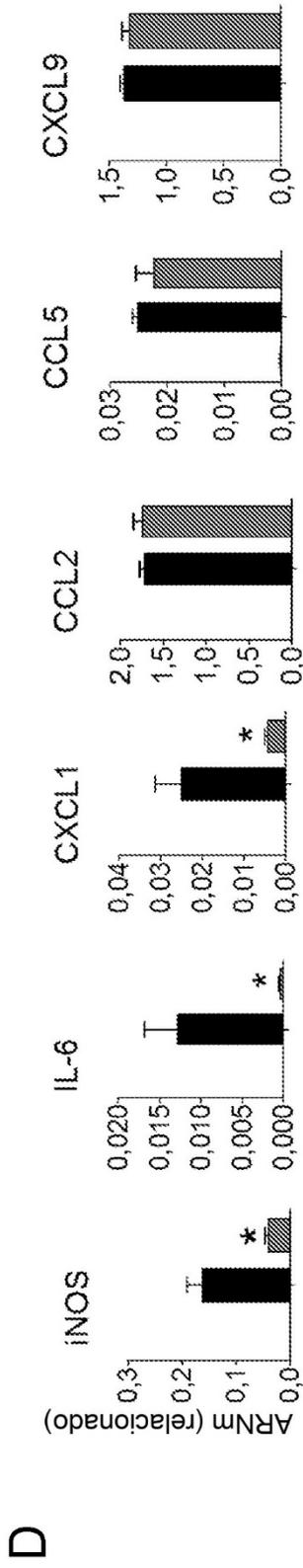


FIG. 10 (continuación)

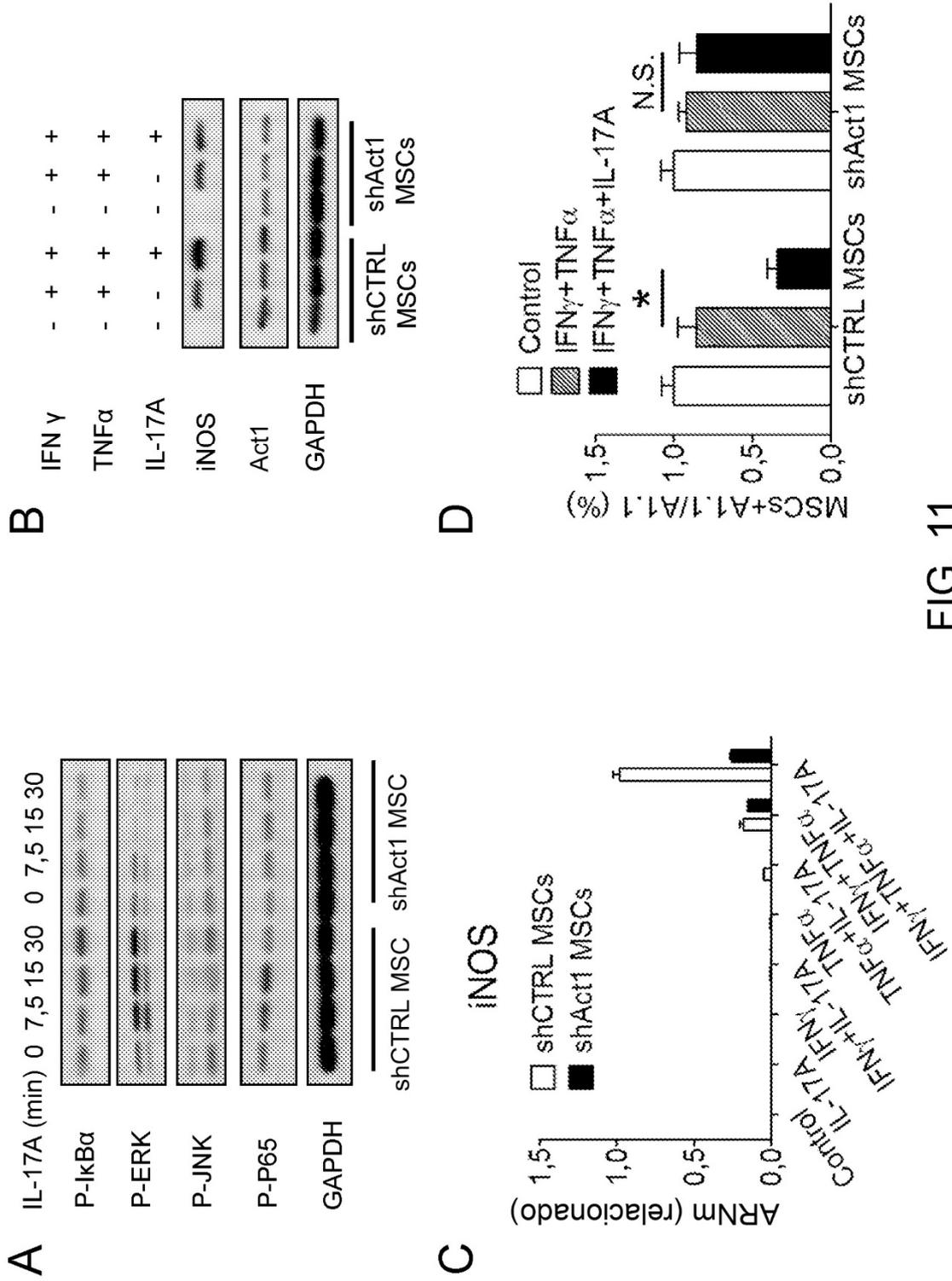
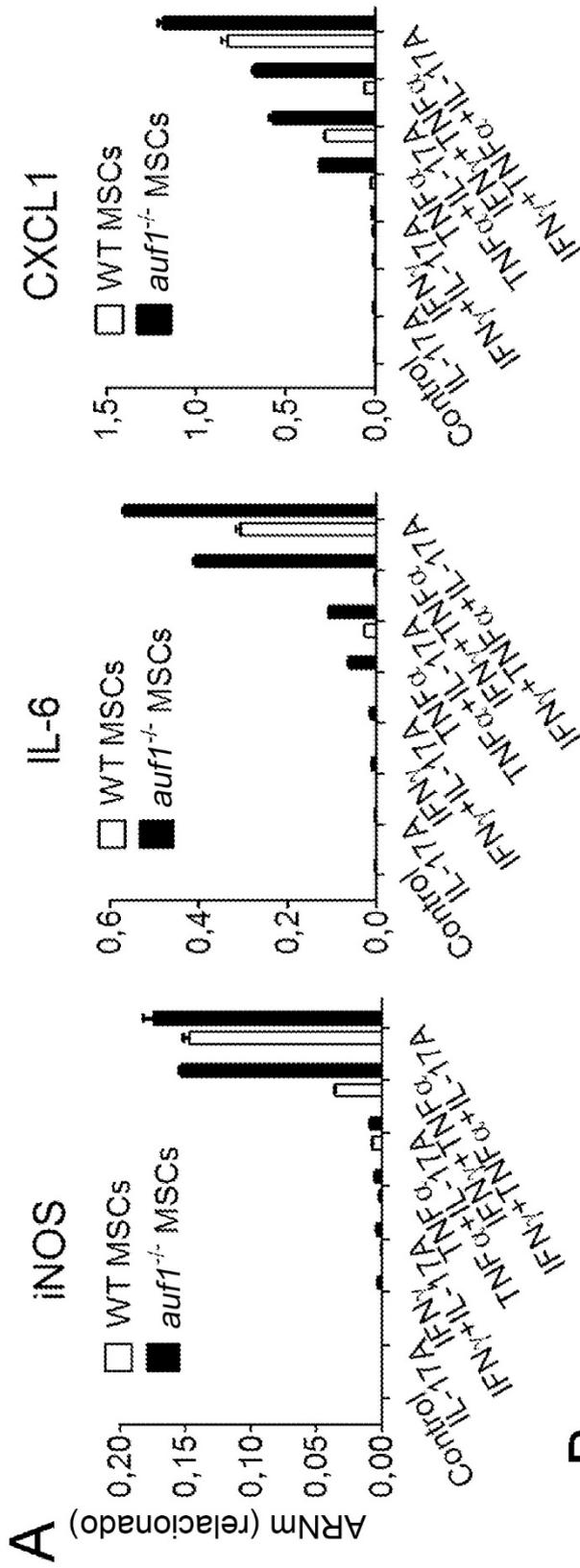


FIG. 11



B

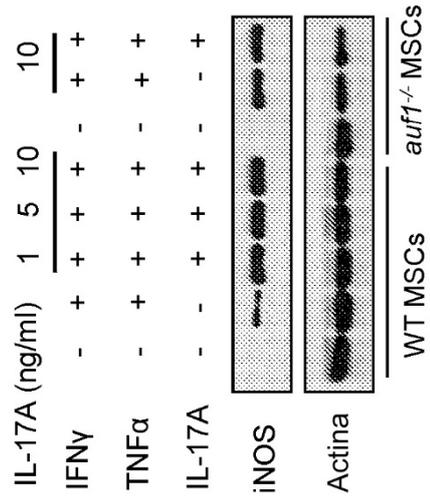


FIG. 12

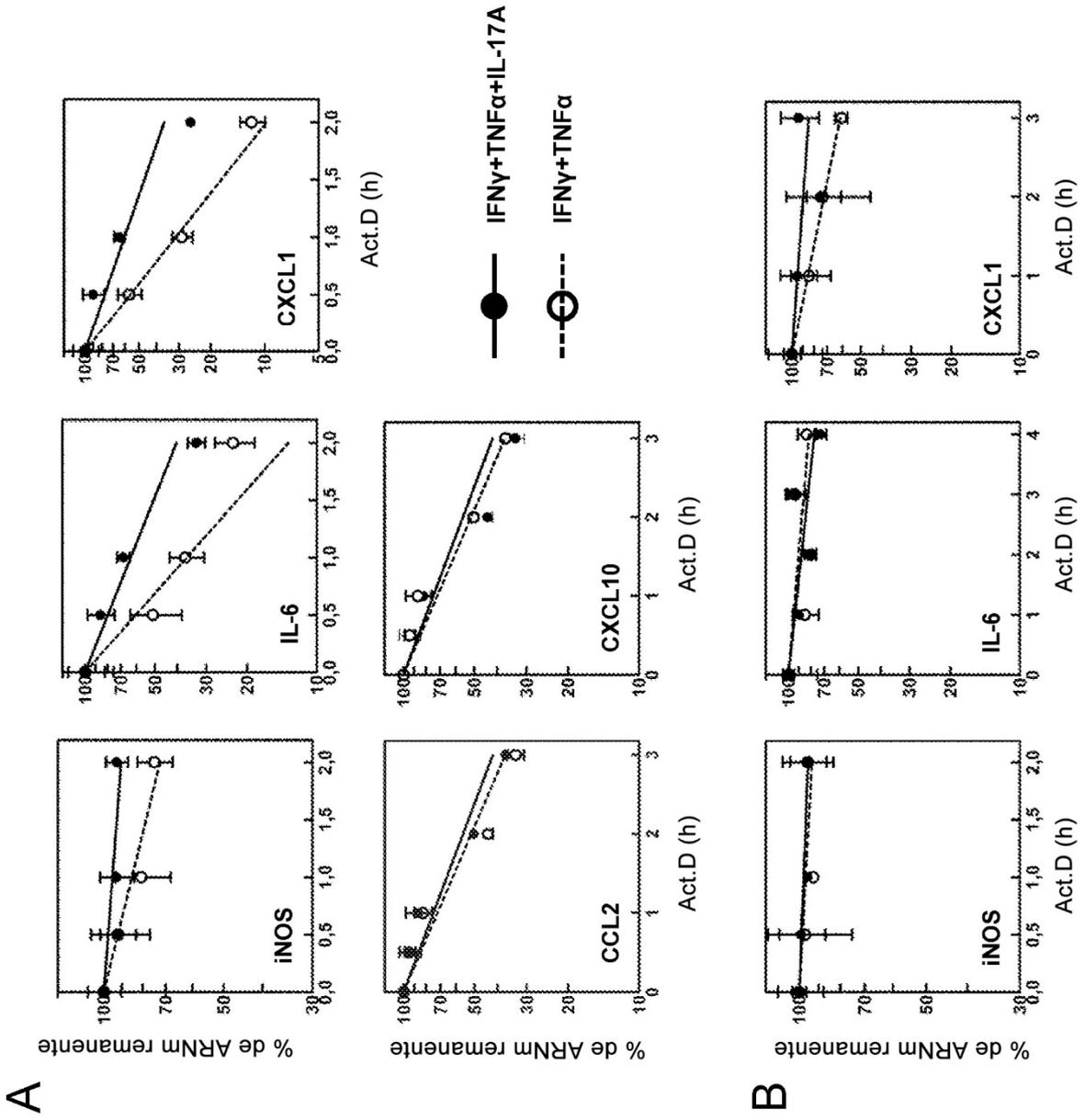


FIG. 13

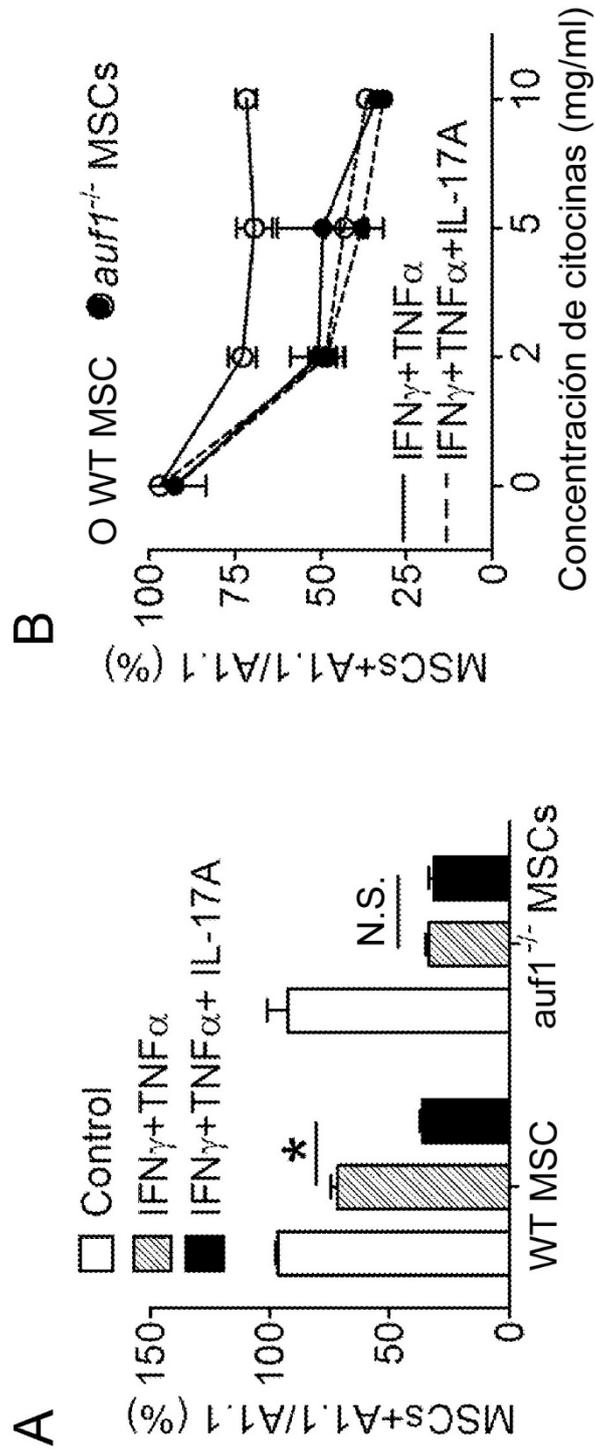


FIG. 14

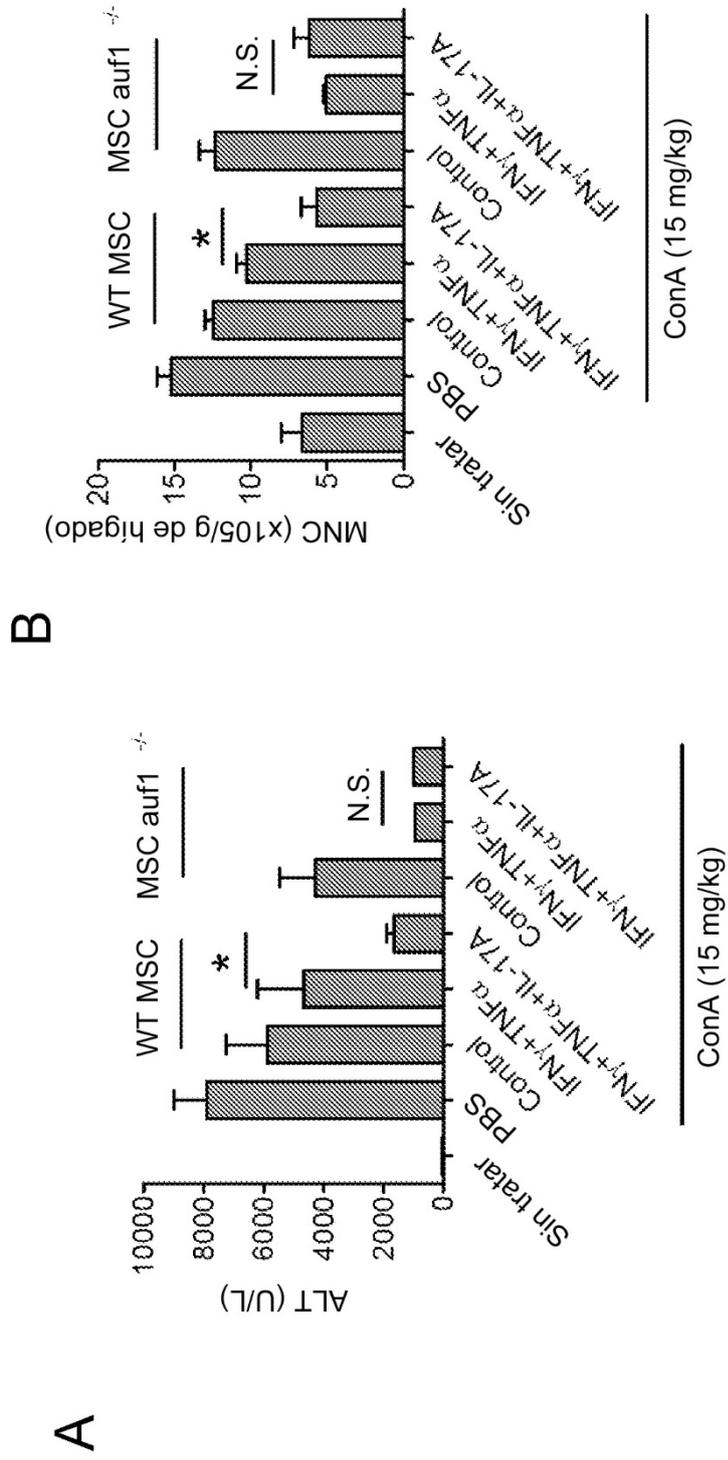


FIG. 15

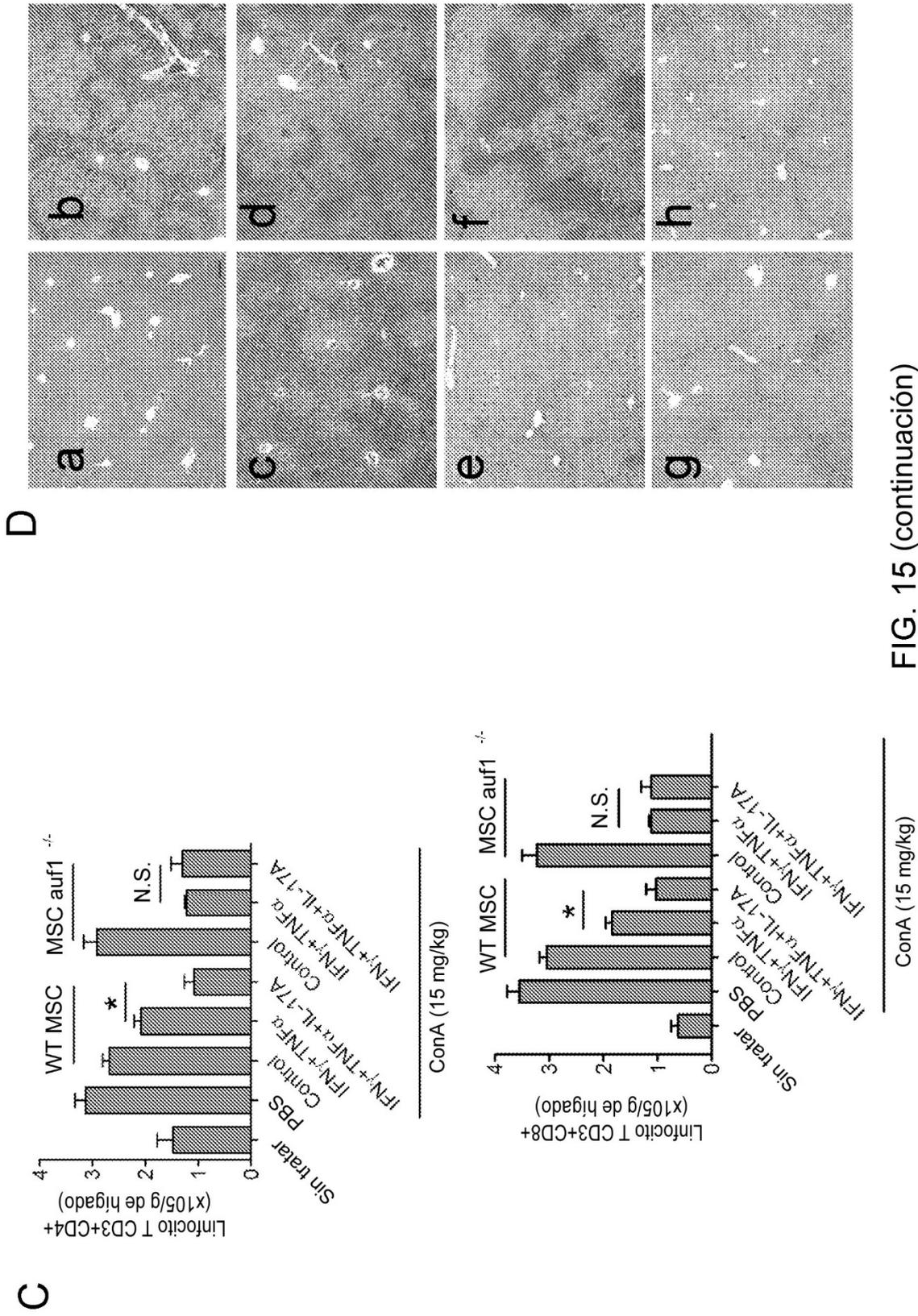


FIG. 15 (continuación)

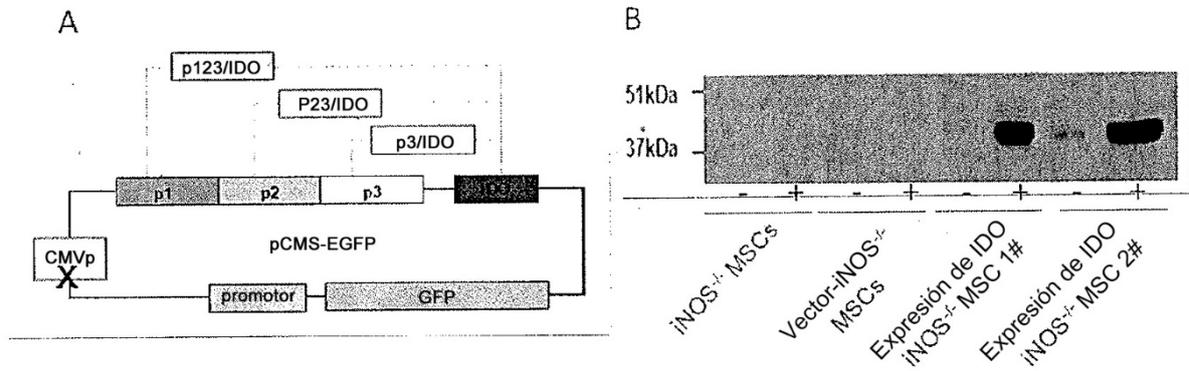


FIG. 16

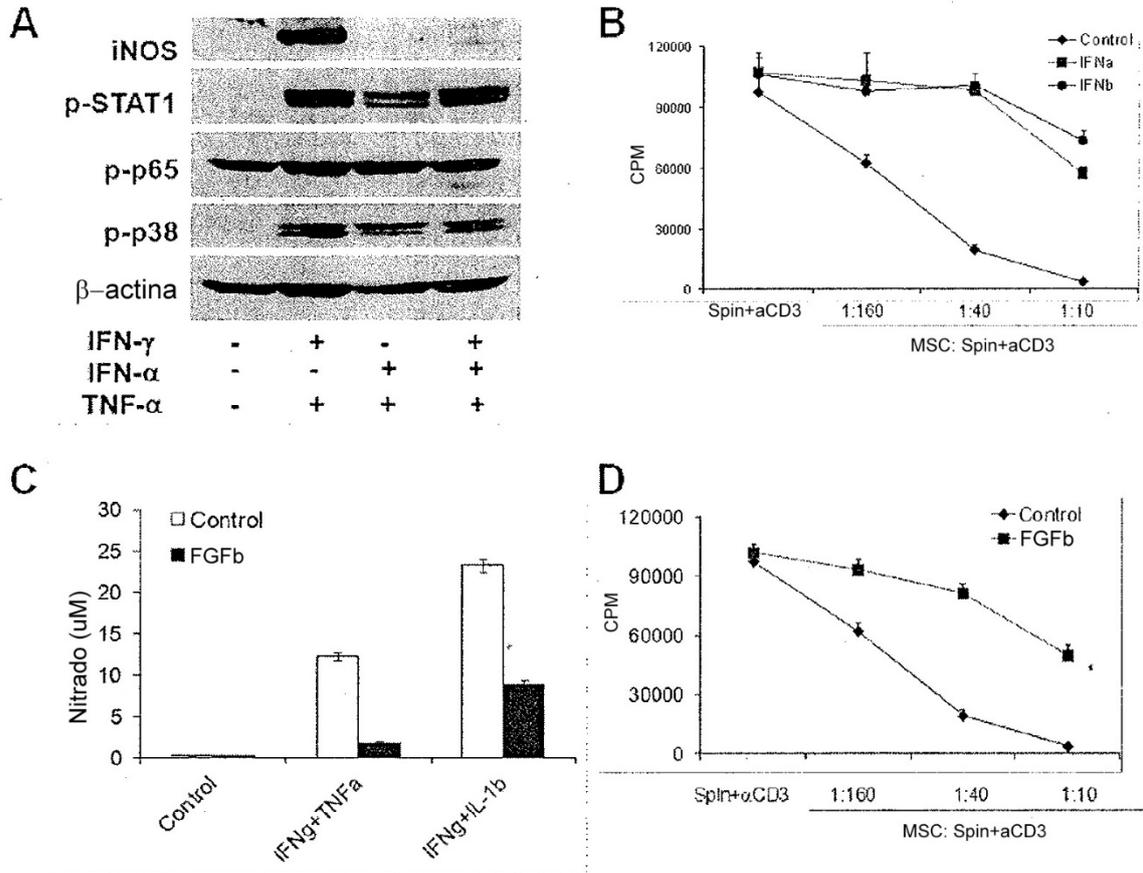


FIG. 17

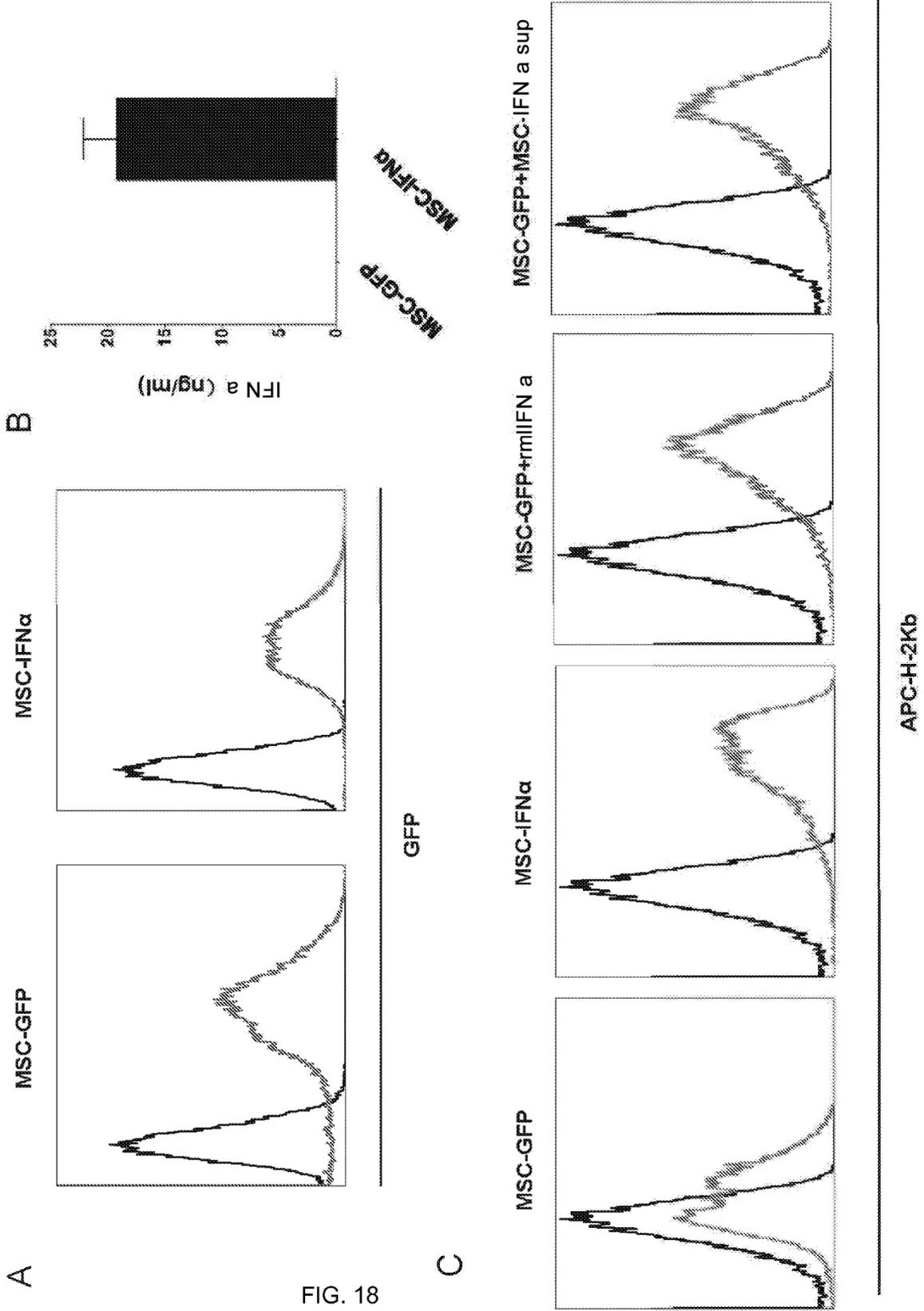


FIG. 18

C

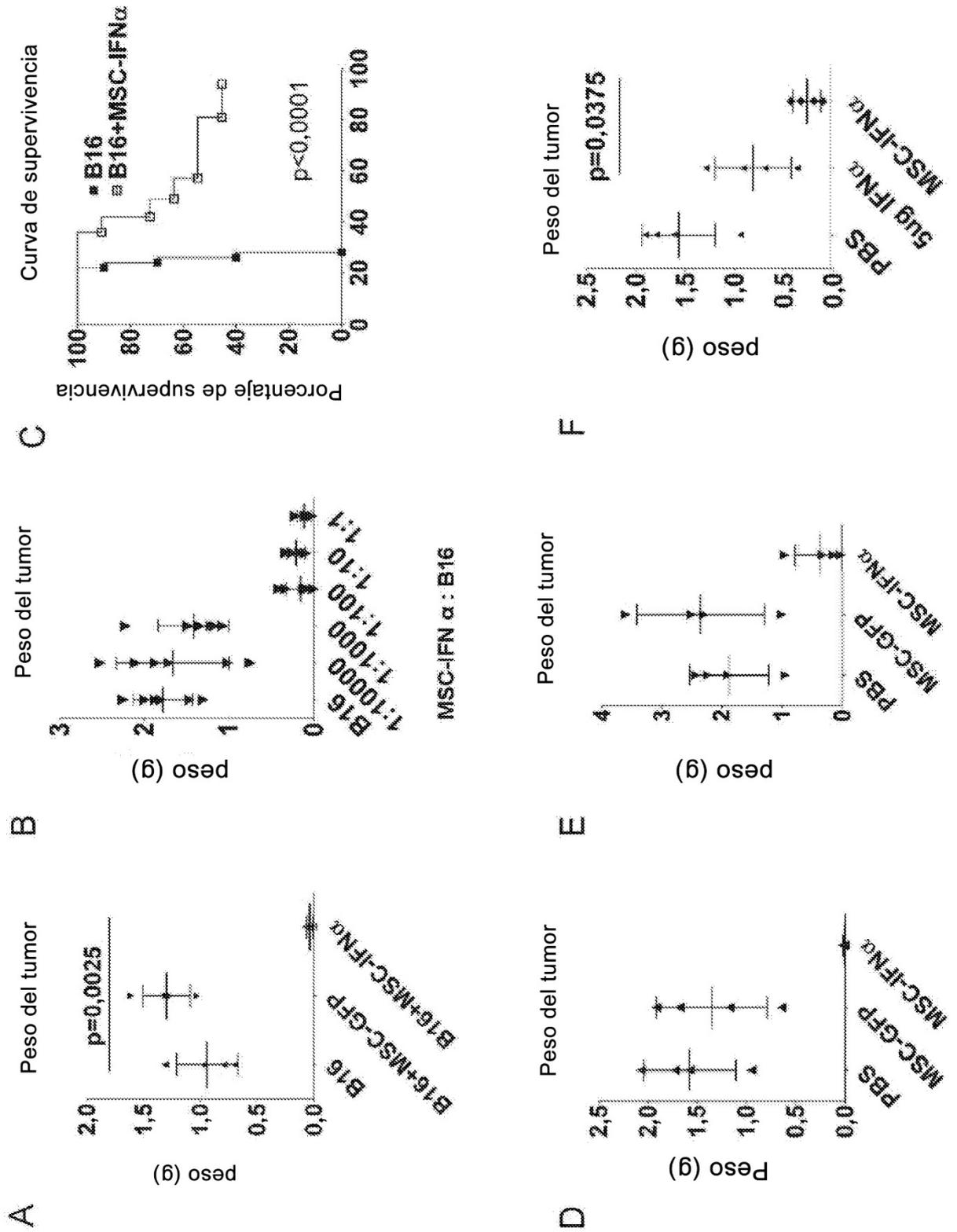


FIG. 19

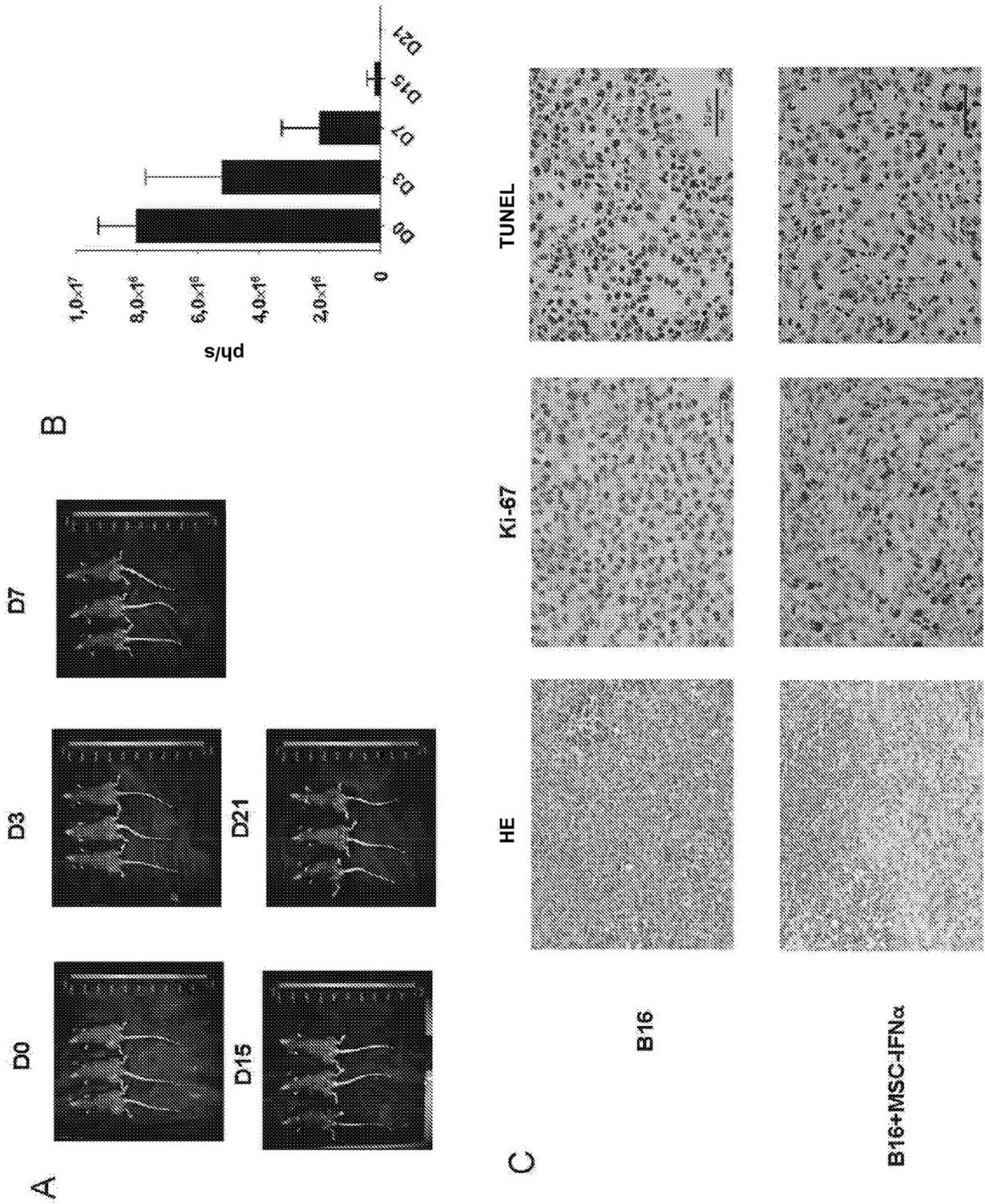


FIG. 20

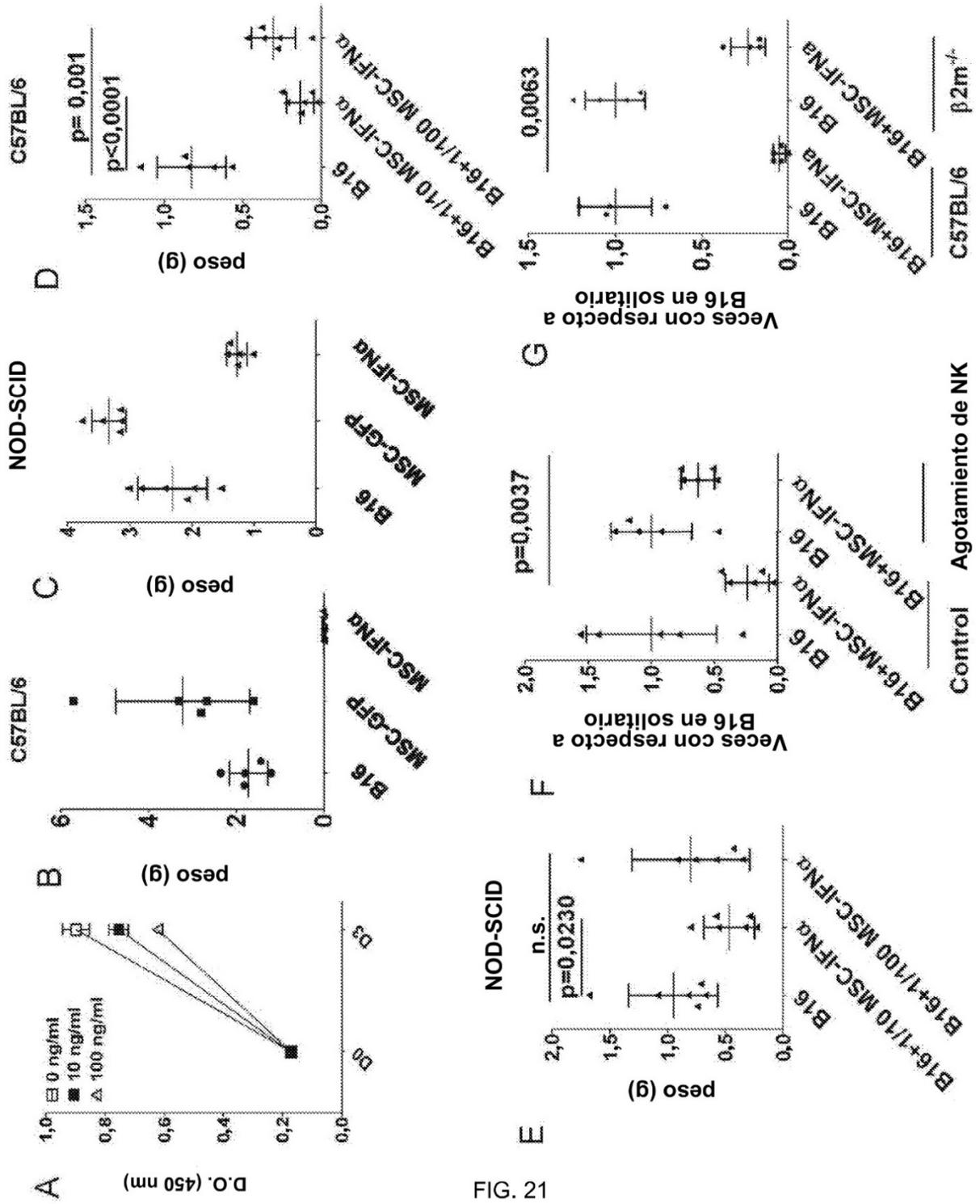


FIG. 21