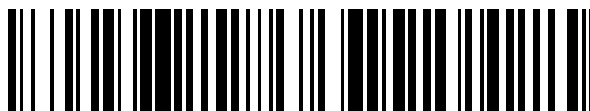


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 650**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008** **E 16171424 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3095450**

54 Título: **Células madre mesenquimales para su uso en el mejoramiento de la función pulmonar**

30 Prioridad:

22.03.2007 US 726676

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

10.06.2020

73 Titular/es:

MESOBLAST INTERNATIONAL SÀRL (100.0%)
Route de Pre-Bois 20
1217 Meyrin, CH

72 Inventor/es:

AGGARWAL, SUDEEPTA;
PITTENGER, MARK F.;
VARNEY, TIMOTHY y
DANILKOVITCH, ALLA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 765 650 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre mesenquimales para su uso en el mejoramiento de la función pulmonar

Antecedentes de la invención

5 Esta invención se refiere a células madre mesenquimales para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) en un animal.

10 Las células madre mesenquimales (MSC) son las células madre multipotentes que pueden diferenciarse fácilmente en linajes incluyendo osteoblastos, miocitos, condrocitos y adipocitos (Pittenger, et al., Science, vol. 284, pg. 143 (1999); Haynesworth, et al., Bone, vol. 13, pg. 69 (1992); Prockop, Science, vol. 276, pg. 71 (1997)). Estudios in vitro han demostrado la capacidad de las MSC a diferenciarse en músculo (Wakitani, et al., Muscle Nerve, vol. 18, pg. 1417 (1995)), precursores de tipo neuronal (Woodbury, et al., J. Neurosci. Res., vol. 69, pg. 908 (2002); Sanchez-Ramos, et al., Exp. Neurol., vol. 171, pg. 109 (2001)), cardiomiocitos (Toma, et al., Circulation, vol. 105, pg. 93 (2002); Fakuda, Artif. Organs, vol. 25, pg. 187 (2001)) y posiblemente otros tipos de células. Además, se ha demostrado que las MSC proporcionan capas de alimentación eficaces para la expansión de células madre embrionarias y hematopoyéticas (Eaves, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 938, pg. 63 (2001); Wagers, et al., Gene Therapy, vol. 9, pg. 606 (2002)). Estudios recientes con una variedad de modelos animales han demostrado que las MSC puede ser útiles en la reparación o regeneración de hueso, cartílago, menisco o tejidos miocárdicos dañados (DeKok, et al., Clin. Oral Implants Res., vol. 14, pg. 481 (2003)); Wu, et al., Transplantation, vol. 75, pg. 679 (2003); Noel, et al., Curr. Opin. Investing. Drugs, vol. 3, pg. 1000 (2002); Ballas, et al., J. Cell. Biochem. Suppl., vol. 38, pg. 20 (2002); Mackenzie, et al., Blood Cells Mol. Dis., vol. 27 (2002)). Varios investigadores han utilizado MSC con resultados alentadores para el trasplante en modelos de enfermedades de animales incluyendo la osteogénesis imperfecta (Pereira, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., vol. 95, pg. 1142 (1998)), parkinsonismo (Schwartz, et al., Hum: Gene Ther., vol. 10, pg. 2539 (1999)), lesión de la médula espinal; (Chopp, et al., Neuroreport, vol. 11, pg. 3001 (2000); Wu, et al., J. Neurosci. Res., vol. 72, pg. 393 (2003)) y trastornos cardíacos (Tomita, et al., Circulation, vol. 100, pg. 247 (1999). Shake, et al., Ann. Thorac. Surg., vol. 73, pg. 1919 (2002)). Es importante destacar que también se han reportado resultados prometedores en ensayos clínicos para la osteogénesis imperfecta (Horwitz, et al., Blood, vol. 97, pg. 1227 (2001); Horowitz, et al. Proc. Nat. Acad. Sci., vol. 99, pg. 8932 (2002)) y mejora de injerto de los trasplantes heterólogos de médula ósea (Frasson, et al., Int. Society for Cell Therapy, SA006 (abstract) (2002); Koc, et al., J. Clin. Oncol., vol. 18, pg. 307 (2000)).

30 Las MSC expresan antígenos de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie, pero no expresan MHC de clase II (Le Blanc, et al., Exp. Hematol., vol. 31, pg. 890 (2003); Potian, et al., J. Immunol., vol. 171, pg. 3426 (2003)) y no hay moléculas coestimuladoras de B7 o CD40 (Majumdar, et al., J. Biomed. Sci., vol. 10, pg. 228 (2003)), lo que sugiere que estas células tienen un fenotipo inmunogénico bajo (Tse, et al., Transplantation, vol. 75, pg. 389 (2003)). Las MSC también inhiben respuestas proliferativas de células-1 de una manera independiente de MHC (Bartholomew, et al., Exp. Hematol., vol. 30, pg. 42 (2002); Devine, et al., Cancer J., vol. 7, pg. 576 (2001); DiNicola, et al., Blood, vol. 99, pg. 3838 (2002)). Estas propiedades inmunológicas de las MSC pueden mejorar su trasplante de injertos y limitar la capacidad del sistema inmune del receptor para reconocer y rechazar las células alogénicas después del trasplante. La producción de factores de MSC, que modulan la respuesta inmune y apoyan la hematopoyesis, junto con su capacidad de diferenciarse en tipos de células apropiadas con estímulo local hacen deseables a las células madre para los estudios de trasplante celular (Majumdar, et al., Hematother. Stem Cell Res., vol. 9, pg. 841 (2000); Haynesworth, et al., J. Cell. Physiol., vol. 166, pg. 585 (1996)).

Breve resumen de la invención

45 Los Solicitantes han examinado actualmente las interacciones de las células madre mesenquimales con poblaciones aisladas de células inmunes, incluyendo células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras (Th1 y Th2), y células NK. Sobre la base de estas interacciones, los solicitantes descubrieron que las células madre mesenquimales pueden regular la producción de diversos factores que pueden regular varias etapas en el proceso de respuesta inmune. Por lo tanto, las células madre mesenquimales se pueden emplear en el tratamiento de condiciones de enfermedad y trastornos que afectan el sistema inmune, o enfermedades, condiciones o trastornos que implican inflamación, daño epitelial, o respuestas alérgicas. Dichas enfermedades, condiciones y trastornos se seleccionan de COPD y ARDS.

55 Además, se cree que las células madre mesenquimales expresan y secretan factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF, que promueve la angiogénesis mediante la estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Las células madre mesenquimales también estimulan a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para producir VEGF.

Por otra parte, se cree que las células madre mesenquimales estimulan a las células dendríticas (DC) para producir interferón-beta (IFN-β), que promueve la supresión de tumores y la inmunidad contra la infección viral.

Descripción detallada de la invención

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

5 En general, la terapia con células madre mesenquimales (MSC), se basa, por ejemplo, en la siguiente secuencia: la cosecha de tejido que contiene MSC, aislamiento y expansión de MSC, y administración de las MSC al animal, con o sin manipulación bioquímica o genética.

10 Las células madre mesenquimales que se administran pueden ser una composición homogénea o pueden ser una población de células mixtas enriquecidas en las MSC. Composiciones de células madre mesenquimales homogéneas se pueden obtener mediante el cultivo de células del persistió o médula adherente y las composiciones de células madre mesenquimales se pueden obtener mediante el cultivo de células del periostio o madre adherentes, y las células madre mesenquimales pueden identificarse por marcadores de superficie celular específicos que se identifican con anticuerpos monoclonales únicos. Un método para obtener una población de células enriquecida en células madre mesenquimales se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,486,359. Las fuentes alternativas de células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a, sangre, piel, sangre del cordón umbilical, músculo, grasa, hueso, y pericondrio.

15 Las células madre mesenquimales se pueden administrar por una variedad de procedimientos. Las células madre mesenquimales se pueden administrar sistémicamente, tal como mediante administración intravenosa, intraarterial, o intraperitoneal.

20 Las células madre mesenquimales pueden ser de una variedad de fuentes, incluyendo autólogo, alogénico, o xenogénicas.

Las células madre mesenquimales se pueden administrar en combinación con un portador farmacéutico aceptable. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden administrar como una suspensión de células en un medio líquido farmacéuticamente aceptable o gel para la inyección o aplicación tópica.

25 Las células madre mesenquimales se administran a un animal para tratar la inflamación que resulta de una enfermedad pulmonar o trastorno seleccionado de Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS) y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD).

30 Aunque el alcance de esta realización no se limita a ningún razonamiento teórico, la respuesta inflamatoria en las enfermedades o trastornos pulmonares antes mencionados implica la secreción de TNF-alfa y/o MCP-1. Se cree que las células madre mesenquimales migran al tejido pulmonar inflamado debido al aumento de la producción de TNF-alfa y/o MCP-1, que son quimioatrayentes para las células madre mesenquimales.

Se debe entender, sin embargo, que el alcance de este aspecto de la presente invención no está limitada al tratamiento de cualquier respuesta inflamatoria particular.

35 Las células madre mesenquimales se administran en una cantidad eficaz para tratar una respuesta inflamatoria en un animal. Las células madre mesenquimales se pueden administrar en una cantidad desde aproximadamente 1×10^5 células/kg a aproximadamente 1×10^7 células/kg. En otra realización, las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 células/kg a aproximadamente 5×10^6 células/kg. La dosificación exacta de las células madre mesenquimales que va a ser administrada depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso y sexo del paciente, la respuesta inflamatoria que se está tratando, y la extensión y gravedad de la misma.

40 Las células madre mesenquimales se pueden administrar en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, como se describe anteriormente en este documento.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para tratar trastornos pulmonares o enfermedades que tienen fibrótico y puede incluir además, componentes inflamatorios, seleccionados de, Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS) y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD).

45 Las células madre mesenquimatosas, en una realización, se administran al animal con el fin de mejorar la función pulmonar debido a enfermedades pulmonares o enfermedades en otros órganos que conducen a insuficiencia pulmonar o fibrosis pulmonar. Tales enfermedades tienen componentes fibróticos y además también pueden tenerlos inflamatorios y/o inmunológicos, y se seleccionan entre Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS) y Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

50 El Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS) es una enfermedad pulmonar potencialmente mortal que tiene una variedad de causas, que incluyen, pero no se limitan a a lesiones en el sistema respiratorio y traumatismo cerrado repentino en el tórax. La enfermedad se caracteriza por la inflamación del parénquima pulmonar, lo que da como resultado en intercambio de gases deteriorado y la expresión y secreción concomitante de mediadores inflamatorios. Estos mediadores inflamatorios incluyen TNF-alfa, IL-1, IL-8 y proteína quimioatrayente de monocitos

1 o MCP-1. TNF-alfa y MCP-1 son quimioatrayentes para las células madre mesenquimales. Por lo tanto, una mayor expresión de TNF-alfa y MCP-1 en el pulmón dañado facilitará el reclutamiento de células madre mesenquimatosas en el área del daño del tejido pulmonar.

5 La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, o COPD, es una causa importante de enfermedad y muerte en todo el mundo. La COPD se caracteriza por la obstrucción del flujo de aire debido a bronquitis crónica o enfisema. La COPD se caracteriza por un engrosamiento de las paredes alveolares y la inflamación, lo que resulta en una pérdida de elasticidad y daño al tejido alveolar, así como la obstrucción de los bronquios pulmonares con depósitos de moco.

10 La respuesta inflamatoria en la COPD incluye la secreción local de IL-6, IL-1 Beta, TNF-alfa y MCP-1. Aunque el alcance de la presente invención no pretende limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales migran al tejido pulmonar dañado en pacientes con COPD debido a una mayor producción en el pulmón dañado de los quimioatrayentes TNF-alfa y MCP-1.

15 Además, el aumento de la infiltración de neutrófilos es característico de la COPD, y la inflamación neutrofílica es resistente a los tratamientos actuales de COPD, tales como la terapia con corticosteroides. Aunque el alcance de la presente invención no se limita a ningún razonamiento teórico, se cree que el tratamiento con células madre mesenquimatosas inhibe la inflamación neutrofílica por subregulación de los factores que actúan como quimioatrayentes para neutrófilos.

20 Además, la evidencia actual sugiere que el componente inflamatorio de la COPD puede extenderse a otros tejidos del cuerpo. (Heaney, et al., Current Med. Chem. Vol. 14, No. 7, págs. 787-796 (2007)). Aunque el alcance de la presente invención no pretende limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales también se alojan específicamente en tales sitios y participan en el proceso de curación local.

25 La muerte apoptótica de las células pulmonares es otro resultado de la COPD (Calabrese, et al., Respir. Res., Vol. 6, pág. 14 (2005)). Las células madre mesenquimales secretan una variedad de factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento de hepatocitos (HFG) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), que han demostrado ser beneficiosos para el tratamiento del enfisema pulmonar (Shigemura, et al., Circulation, vol. 111, pg 1407 (2005); Morino et al., Chest, vol. 128, pág. 920 (2005)).

Aunque el alcance de la presente invención no se debe limitar a ningún razonamiento teórico, se cree que la expresión de MCP-1 y TNF-alfa resulta en el reclutamiento de células madre mesenquimales en el tejido pulmonar dañado.

30 Aunque el alcance de la presente invención no pretende limitarse a ningún razonamiento teórico, se cree que las células madre mesenquimales mejoran la función pulmonar en un animal que tiene fibrosis pulmonar mediante la inhibición de las respuestas inflamatorias mediante la reducción de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y secreción de quimiocinas, resultando en una disminución posterior en el reclutamiento de células inflamatorias en el sitio. También se cree que las células madre mesenquimales inhiben la respuesta inmune en los trastornos pulmonares que provocan una respuesta inmune, evitando de este modo, muerte celular del tejido mediada por factor soluble, así como mediado por las células.

35 Las células madre mesenquimales también facilitan la reparación de tejidos por la protección de las células del tejido de la apoptosis, y estimulan la proliferación celular y movilización de las células madre específicas de tejido a través de la secreción de factores de crecimiento tales como HGF, VEGF, y FGF. Además, las células madre mesenquimales previenen la remodelación patológica y la formación de cicatrices en el tejido pulmonar.

40 Más particularmente, se cree que las células madre mesenquimales reducen la expresión local de TNF-alfa, que a su vez conduce a una reducción en la expresión de TGF-beta y una reducción de un reclutamiento de fibroblastos, que son las células principales que contribuyen a la formación de cicatrices. Además, las células madre mesenquimales remodelan el tejido de la cicatriz pulmonar existente y/o previenen la expansión de la cicatriz, aunque la expresión y la secreción local de las metaloproteinasas de la matriz (MMP). La actividad enzimática de las MMP conduce a la degradación de proteínas de matriz extracelular, incluyendo aquellas proteínas que se incluyen en el tejido de la cicatriz.

45 Las células madre mesenquimales se pueden modificar genéticamente con uno o más polinucleótidos que codifica un agente terapéutico. Los polinucleótidos pueden ser entregados a las células madre mesenquimales a través de un vehículo de expresión apropiado. Los vehículos de expresión que se pueden emplear para modificar genéticamente las células madre mesenquimales incluyen, pero no están limitados a, vectores retrovirales, vectores adenovirales, y vectores de virus adenoasociados.

55 La selección de un polinucleótido adecuado que codifica un agente terapéutico depende de diversos factores, incluyendo la enfermedad o trastorno que está siendo tratado, y la extensión y gravedad de la misma. Los polinucleótidos que codifican agentes terapéuticos, y vehículos de expresión apropiados se describen adicionalmente en la Patente de los Estados Unidos No. 6,355,239.

Se debe entender que las células madre mesenquimales, cuando se emplea en las terapias y tratamientos mencionados anteriormente, se pueden emplear en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos para los expertos en el arte, incluyendo, pero no limitado a, factores de crecimiento, citoquinas, fármacos tales como fármacos anti-inflamatorios, y células distintas de las células madre mesenquimales, tales como células dendríticas, y se pueden administrar con portadores solubles para las células, tales como el ácido hialurónico, o en combinación con matrices sólidas, tales como colágeno, gelatina u otros polímeros biocompatibles, según corresponda.

Se debe entender que los métodos descritos en este documento se pueden llevar a cabo en un número de maneras y con diversas modificaciones y permutaciones de los mismos que son bien conocidos en la técnica. También se puede apreciar que cualquier teoría establecida como a los modos de acción o interacciones entre tipos celulares no se deben interpretar como limitantes de esta invención de ninguna manera, pero se presentan de tal manera que los métodos de la invención se pueden entender más plenamente.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

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

La figura 1 MSC modulan las funciones de células dendríticas. (A) Análisis de citometría de flujo de células DC1 monocíticas maduras, utilizando anticuerpos contra HLA-DR y CD11c y de células DC2 plasmacitoides utilizando anticuerpos contra HLA-DR y CD123 (receptor de IL-3). (---): Control de isotipo; (-): FITC/PE conjugado de anticuerpos. (B) MSC inhiben secreción de TNF- α (eje γ primario) y aumentan la secreción de IL-10 (eje γ secundaria) de DC1 y DC2 activada respectivamente. (C) las MSC cultivadas con células DC1 maduras inhiben secreción de IFN- γ (eje γ primario) por las células T y aumentan los niveles de IL-4 (eje γ secundario), en comparación con MSC o DC solo. La disminución en la producción de IFN- γ pro-inflamatorios y aumento de la producción de IL-4 anti-inflamatoria en presencia de las MSC indicaron un cambio en la población de células T hacia un fenotipo anti-inflamatorio.

La figura 2 MSC inhiben la función de las células T efectoras pro-inflamatorias. (A) Análisis de citometría de flujo del número de células T_{Reg} (en %) por tinción PBMC o fracción no adherente en el cultivo MSC + PBMC (MSC + PBMC) con anticuerpos CD4 FITC-conjugado (eje x) y CD25 PE conjugado (eje y). Puertas se fijan en basados en los anticuerpos de control de isotipo como fondo. Los gráficos son representativos de 5 experimentos independientes. (B) células T_{H1} generaron en presencia de niveles reducidos de MSC secretadas de IFN- γ (eje y primario) y células T_{H2} generadas en presencia de cantidades crecientes MSC secretadas de IL-4 (eje y secundaria) en sobrenadantes de cultivo celular. (C) MSC inhiben la secreción de IFN- γ a partir de células NK purificadas se cultivaron durante 0, 24, o 48 horas en una placa de 24 pozos. Los datos mostrados son la secreción de citoquinas media $\pm$ SD en un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

La figura 3 MSC conducen a un aumento de número de población de células T_{Reg} y aumento de la expresión GITR. (A) Una población de células CD4⁺ CD25⁺ T_{Reg} de cultivos PBMC o MSC + PBMC (relación de MSC con PBMC 1:10) (cultivadas sin estimulación adicional durante 3 días) fue aislado utilizando un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Se irradiaron estas células (para bloquear cualquier proliferación adicional) y se usaron como estimuladores en una reacción mixta de linfocitos (MLR), donde los respondedores fueron PBMC alogénicas (relación de estimulador con respondedor 1:100) en presencia de fitohemaglutinina (PHA) (2.5 mg/ml). Las células se cultivaron durante 48 horas, después de lo cual se adicionó ³H timidina, y la radiactividad incorporada se contó después de 24 horas. Los resultados mostraron que la población T_{Reg}, generada en presencia de MSC (carril 3) fue similar funcionalmente a las células T_{Reg} generadas en ausencia de MSC (carril 2). (B) Las PBMC se cultivaron durante 3 días en ausencia (esquema superior) o presencia (esquema inferior) de las MSC (relación de MSC con PBMC 1:10), después de lo cual se recogió la fracción no adherente y se inmunotizó con GITR marcada con FITC y CD4 marcada con PE. Los resultados muestran un incremento mayor de dos veces en la expresión GITR en células cultivadas en presencia de las MSC.

La figura 4 MSC producen PGE₂ y el bloqueo de PGE₂ revierte los efectos inmunomoduladores mediados por MSC. (A) secreción de PGE₂ (media $\pm$ SD) en sobrenadantes de cultivo obtenidos a partir de las MSC cultivadas en presencia o ausencia de bloqueadores de PGE₂ NS-398 o indometacina (Indomet.) A diversas concentraciones. Las concentraciones del inhibidor están en μ M y datos presentados son valores obtenidos después de cultivo de 24 horas. (B) la expresión de COX-1 y COX-2 en MSC y PBMC utilizando RT-PCR en tiempo real. MSC expresaron niveles significativamente más elevados de COX-2 en comparación con PBMC, y cuando MSC se cultivaron en presencia de PBMC, hubo un aumento >3 veces en la expresión COX-2 en las MSC. Se muestran los datos representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Los cultivos de MSC + PBMC fueron configurados en una placa de cámara trans-pozo donde las MSC se sembraron en la cámara inferior y PBMC en la cámara superior. (C) Presencia de bloqueadores de PGE₂ indometacina (Ind.) o NS-398 aumenta secreción de TNF- α de DC activadas ($\square$) y secreción de IFN- γ de células T_{H1} ($\square$) en comparación con los controles. Los datos se calcularon como % de cambio a partir de cultivos generados en ausencia de MSC y de inhibidores de PGE₂ (D) La presencia de bloqueadores de PGE₂ de indometacina (Indo) y NS-398 durante cocultivo MSC-PBMC (1:10) invierte MSC mediada por efectos anti-proliferativos en PBMC tratados con PHA. Los datos mostrados son de un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

La figura 5 Secreción de citoquinas MSC constitutivas es elevada en la presencia de PBMC alogénicas. Uso de MSC humanas previamente caracterizadas, se analizaron los niveles de las citoquinas 1 L-6 y VEGF, mediador de lípidos PGE₂, y metaloproteinasas de matriz 1 (pro MMP-1) en el sobrenadante del cultivo de las MSC cultivadas durante 24 horas en presencia (barras rayadas) o ausencia (barras abiertas) de PBMC (relación de MSC con PBMC 1:10). Las MSC producen 1L-6, VEGF y PGE₂ constitutivamente, y los niveles de estos factores aumentaron en cocultivo con PBMC, lo que sugiere que las MSC pueden jugar un papel en la modulación de las funciones inmunes en un entorno inflamatorio.

La figura 6 MSC inhiben la proliferación de células T inducida por mitógeno de un modo dependiente de la dosis. El aumento del número de PBMC alogénicas se incubaron con números constantes de MSC (2,000 células/pozo) sembradas en placas en una placa de 96 pozos en presencia o ausencia de PHA (2.5 mg/ml) durante 72 horas, y la incorporación de ³H timidina determinada (en el recuento por minuto, o cpm). Hubo una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de PBMC tratadas con PHA en presencia de las MSC. Se muestran los resultados representativos de 1 de 3 experimentos independientes. Resultados similares fueron reportados por LeBlanc, et al., Scand J. Immunol., vol. 57, pg. 11 (2003).

La figura 7 Diagrama esquemático del mecanismo de acción de MSC propuesto. MSC median sus efectos inmunomoduladores afectando a las células tanto de los sistemas inmunes innatos (DCS-vías 2-4; y NK vía 6) y adaptativos (T- vías 1 y 5 y B-vía 7). En respuesta a un patógeno invasor, DC inmaduras migran al sitio de entrada potencial, madura y adquieren la capacidad de las células T naive (por medio de señales de antígeno específicas y coestimuladoras) para convertirse en células T efectoras de protección (T_H1 mediada por células o inmunidad T_H2 humoral). Durante la interacción MSC-DC, MSC, por medio de contacto directo célula-célula o a través de factor secretado, puede alterar el resultado de la respuesta inmune mediante la limitación de la capacidad de las DC para montar una respuesta mediada por células (vía 2) o mediante la promoción de la capacidad para montar una respuesta humoral (vía 4). También, cuando las células T efectoras maduras están presentes, las MSC pueden interactuar con ellas para sesgar el equilibrio de las respuestas de T_H1 (vía 1) hacia respuestas T_H2 (vía 5), y probablemente hacia un aumento de la actividad de las células B productoras de IgE (vía 7), deseables resultados para la supresión de los síntomas de GvHD y enfermedad autoinmune. MSC en su capacidad para dar como resultado un aumento de la generación de la población de T_{Reg} (vía 3) puede resultar en un fenotipo tolerante y puede ayudar a un huésped receptor al reducir la inflamación espectador en su microambiente local. La línea entrecortada (----) representa el mecanismo propuesto.

La figura 8. Tratamiento de MSC proporciona una mejora en porcentaje del volumen espiratorio forzado predicho en un segundo (% FEV1 Pred.) en los pacientes tratados con las células madre mesenquimales en comparación con los pacientes que recibieron un placebo.

La figura 9. Medición de la distancia recorrida en una cinta después de seis minutos. Los pacientes que fueron tratados con MSC mostraron un aumento en la distancia recorrida en comparación con los que recibieron un placebo.

La figura 10. Recuperación de la frecuencia cardíaca en pacientes sometidos a prueba de rutina. Un mayor porcentaje de los pacientes sometidos a la prueba de esfuerzo mostró una recuperación de la frecuencia cardíaca a los valores basales en 15 minutos o menos que los que fueron tratados con un placebo.

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Materiales y métodos de cultivo de MSC humanas

MSC humanas se cultivaron como se describe por Pittenger et al., Science, vol. 284, pg. 143 (1999). En resumen, las muestras de médula se recogieron de la cresta ilíaca de donantes anónimos tras el consentimiento informado por Poietics Technologies, Div of Cambrex Biosciences. MSC se cultivaron en Medio de Eagle modificado de Dulbecco completo, bajo en glucosa (Life Technologies, Carlsbad, California) que contiene solución al 1% de antibiótico-antimótico (Invitrogen, Carlsbad, California) y suero fetal bovino al 10% (FBS, JRH BioSciences, Lenexa, Kansas). MSC creció como una monocapa adherente y se despegaron con tripsina/EDTA (0.05% de tripsina a 37°C, durante 3 minutos). Todas las MSC utilizadas se caracterizaron previamente para potencial multilínea y retienen la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales (condrocítico, adipogénica, y osteogénica) (Pittenger, et al., Science, vol. 284, pg. 143 (1999)).

Aislamiento de células dendríticas

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de Poietics Technologies, Div of Cambrex Biosciences (Walkersville, MD). Los precursores de células dendríticas (DC) del linaje de monocitos (CD1c+) se seleccionaron positivamente a partir de PBMC utilizando un método de separación magnética de 2 etapas de

acuerdo con Dzionek, et. al., J. Immunol., vol. 165, pg. 6037 (2000). En resumen, células B que expresan CD1c fueron agotadas magnéticamente de células CD19+ usando perlas magnéticas, seguido de marcación de la fracción agotada de células B con CD1c marcadas con biotina (BDCA1+) y anticuerpos anti-biotina y las separan de la fracción de células no marcadas utilizando columnas magnéticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Auburn, California). Los precursores de las DC del linaje plasmocitoide se aislaron de PBMC mediante clasificación inmunomagnética de las células recubiertas de anticuerpos marcados positivamente (BDCA2+) (Miltenyi Biotech, Auburn, California).

Cultivo MSC-DC

En la mayoría de los experimentos, las MSC y DC humanas se cultivaron en igual número de diversos períodos de tiempo y el sobrenadante del cultivo celular se recogió y almacenó a -80°C hasta su posterior evaluación. En experimentos seleccionados, las MSC se cultivaron con células DC1 o DC2 maduras (relación MSC:DC 1:1) durante 3 días, y luego los cultivos combinados (MSC y DCs) fueron irradiados para evitar cualquier proliferación. A continuación, se adicionaron células T alogénicas, naïve anticuerpo purificado, (CD4+, CD45RA+) a las MSC/DC irradiados y se cultivaron durante 6 días adicionales. A continuación, se recogió la fracción de células no adherentes (células T purificadas) de los cultivos, se lavaron dos veces y se volvieron a estimular con PHA durante otras 24 horas, después de lo cual los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron y se analizaron por ELISA para determinar IFN- γ y IL-4 secretados.

Aislamiento de células NK

Las poblaciones purificadas de células NK se obtuvieron por el agotamiento de las células no-NK que están marcadas magnéticamente con un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (anticuerpos anti - CD3, - CD14, -CD19, -CD36 y anti-IgE) como una reactivo primario y anticuerpos monoclonales anti-biotina conjugados con microperlas como reactivo de marcación secundario. Las células no-NK marcadas magnéticamente se mantuvieron en columnas MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, California) en un campo magnético, mientras que las células NK pasaron a través y se recogieron.

Aislamiento de la población de células T_{Reg}

La población de células T_{Reg} se aisló utilizando un procedimiento de aislamiento de 2 etapas. En primer lugar, células T no CD4+ fueron indirectamente marcadas magnéticamente con un cóctel de anticuerpos marcados con biotina y microperlas anti-biotina. Las células marcadas fueron entonces agotadas por separación sobre una columna MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, California). A continuación, las células CD25+ CD4+ se marcaron directamente con microperlas CD25 y se aislaron por selección positiva de la fracción de células T CD4+ pre-enriquecido. Las células T CD4+ CD25+ marcadas magnéticamente se retuvieron en la columna y se eluyeron después de la retirada de la columna del campo magnético.

Con el fin de determinar si el aumento de la población CD4+ CD25+ generada en presencia de MSC fue supresora en la naturaleza, las poblaciones de células CD4+ CD25+ T_{Reg} se aislaron de cultivos de PBMC o MSC + PBMC (relación MSC con PBMC 1:10) (cultivados sin ninguna estimulación adicionalmente durante 3 días) utilizando un procedimiento de aislamiento magnético de 2 etapas. Estas células fueron irradiadas para bloquear cualquier proliferación adicional y se utilizan como estimuladores en una reacción mixta de linfocitos (MLR), donde respondedores fueron PBMC alogénicas (relación estimulador con respondedor 1:100) en presencia de PHA (2.5 μ g/ml). El cultivo se llevó a cabo durante 48 horas, después de lo cual se adicionó ³H timidina. La radiactividad incorporada se contó después de 24 horas.

PBMC se cultivaron en ausencia o presencia de las MSC (relación MSC con PBMC 1:10), después de lo cual se recogió la fracción no adherente y se inmunotizó con marcado con receptor TNF inducido por glucocorticoides marcados con FITC, o G1TR, y CD4 marcado con PE.

Generación de células T_{H1}/T_{H2}

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se sembraron a 2x10⁶ células/ml, durante 45 min. a 37 °C con el fin de eliminar los monocitos. La fracción no adherente se incubó en presencia de anticuerpos anti-CD3 (5 μ g/ml) y anti-CD28 (1 μ g/ml) unidos a la placa bajo condiciones T_{H1} (IL-2 (4 ng/ml) IL-12 (5 ng/ml) + anti-IL-4 (1 μ g/ml)) o T_{H2} (IL-2 (4 ng/ml) + IL-4 (4 ng/ml) + anti-IFN- γ (1 μ g/ml)) durante 3 días en presencia o ausencia de MSC. Las células se lavaron y luego se volvieron a estimular con PHA (2.5 μ g/ml) durante otras 24 ó 48 horas, después de lo cual los niveles de IFN- γ e IL-4 se midieron en sobrenadantes de cultivo por ELISA (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota).

Análisis de los niveles de VEGF, PGE2, y pro-MMP-1 en el sobrenadante del cultivo de las MSC.

El uso de MSC humanas previamente caracterizadas, los niveles de interleucina-6 (IL-6), VEGF, mediador de lípidos de la prostaglandina E₂ (PGE₂), y matriz metaloproteínasa 1 (pro-MMP-1) se analizaron en el sobrenadante del cultivo de las MSC cultivadas durante 24 horas en presencia o ausencia de PBMC (relación MSC con PBMC 1:10).

Proliferación de PBMC

PBMC purificadas se preparan por centrifugación leukopack (Cambrex, Walkersville, Maryland) en Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Oslo, Norway). Las células separadas se cultivaron (por triplicado) en presencia o ausencia de MSC (sembradas en placas 3-4 horas antes de la adición de PBMC para permitir que se asienten) durante 48 horas en presencia del mitógeno PHA (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri). En experimentos seleccionados, las PBMC se resuspendieron en medio que contiene inhibidores de PGE₂ indometacina (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) o NS-938 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan). Se adicionó (³H)-timidina (20 µl en un cultivo de 200 µl) y las células cosechadas después de un cultivo adicional de 24 horas utilizando un recolector automático. Los efectos de los bloqueadores de MSC o PGE₂ se calcularon como el porcentaje de la respuesta control (100%) en presencia de PHA.

RT-PCR cuantitativa

El ARN total de los pellets celulares se prepararon utilizando un kit disponible comercialmente (Qiagen, Valencia, California) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. ADN genómico contaminante se eliminó utilizando el kit libre de ADN (Ambion, Austin, Texas). RT-PCR cuantitativa se realizó en un sistema de detección MJ Research Opticon (South San Francisco, California) utilizando kit RT-PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Valencia, California) con los cebadores a una concentración de 0.5 µM. Los cambios relativos en los niveles de expresión en células cultivadas bajo condiciones diversos se calcularon por la diferencia en los valores de Ct (punto de cruce) utilizando β-actina como control interno. La secuencia de los cebadores específicos COX-1 y COX-2 fueron: COX-1: 5'-CCG GAT GCC AGT CAG GAT GAT G-3' (hacia adelante), 5'-CTA GAC AGC CAG ATG CTG ACA G-3' (reverso); COX-2: 5'- ATC TAC CCT CCT CAA GTC CC-3' (hacia adelante), 5'-TAC CAG AAG GGC AGG ATA CAG-3' (reverso).

Un número creciente de PBMC alogénicas se incubaron con números constantes de MSC (2,000 células/pozo) en placas en una placa de 96 pozos en presencia de PHA (2.5 µg/ml) durante 72 horas, y la incorporación de ³H timidina (se determinó cuentas por minuto, cpm). Las PBMC y MSC se cultivaron a relaciones de MSC: PBMC de 1:1, 1:3, 1:10, 1:30, y 1:81.

Resultados

En el presente estudio, se examinó la interacción de las MSC humanas con poblaciones aisladas de células inmunes, incluyendo células dendríticas (DC1 y DC2), células T efectoras (T_H1 y T_H2) y células NK. La interacción de MSC con cada tipo de célula inmune tuvo consecuencias específicas, lo que sugiere que las MSC pueden modular varias etapas en el proceso de respuesta inmune. La producción del (los) factor(es) secretado(s) que modulan y puede ser responsables de efectos inmuno-moduladores de MSC fue evaluada y fue implicada a la síntesis de prostaglandinas.

Las células dendríticas precursoras de mieloides (DC1) y plasmocitoide (DC2) se aislaron por clasificación inmunomagnética de células BDCA1⁺ y BDCA2⁺, respectivamente, y madurados por incubación con GM-CSF e IL-4 (1x10³ UI/ml y 1x10³ UI/ml, respectivamente) para las células DC1, o IL-3 (10 ng/ml) para células DC2. El uso de la citometría de flujo, las células DC1 fueron HLA-DR⁺ y CD11c⁺, mientras que las células DC2 fueron HLA-DR⁺ y CD123⁺ (Fig. 1A). En presencia del agente inflamatorio lipopolisacárido bacteriano (LPS, 1 ng/ml), las células DC1 produjeron niveles moderados de TNF-α pero cuando MSC estaban presentes (relaciones examinadas 1:1 y 1:10), fue >50% de reducción en secreción de TNF-α (Fig. 1B). Por otro lado, las células DC2 producen IL-10 en presencia de LPS y sus niveles se aumentaron más de 2 veces por encima del cocultivo MSC:DC2 (1:1) (Fig. 1B). Por lo tanto, la MSC modificó el perfil de citocinas de las DC activadas en cultivo hacia un fenotipo más tolerogénico. Además, las DC activadas, cuando se cultivan con MSC, fueron capaces de reducir IFN-γ y aumentar niveles de IL-4 secretada por las células T CD4⁺ naïve (Fig. 1C), sugiriendo un cambio mediada por MSC de fenotipo de células T pro-inflamatorias a anti-inflamatorias.

Como el aumento de la secreción de IL-10 juega un papel en la generación de células reguladoras (Kingsley, et al., J. Immunol., vol. 168, pg. 1080 (2002)), se cuantificaron las células T reguladoras (T_{Reg}) por citometría de flujo en cocultivos de PBMC y MSC. En el cultivo de PBMC con MSC durante 3-5 días, hubo un aumento en el número de células T_{Reg}, como se determina por tinción de PBMC con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25 (Fig. 2A), más el apoyo a una respuesta tolerogénica inducida por MSC. La población de células CD4⁺ CD25⁺ T_{Reg}, generada en presencia de las MSC expresaron niveles aumentados del receptor de TNF inducido por glucocorticoide (GITR), un receptor de superficie celular expresado en las poblaciones de células T_{Reg}, y era de supresión en la naturaleza, ya que suprime la proliferación de células T alogénicas (Fig. 3A, B). A continuación, las MSC se investigaron en cuanto a su capacidad directa para afectar la diferenciación de células T. El uso de anticuerpo seleccionado células T purificadas (células CD4⁺ Th), IFN-γ que produce T_H1 e IL-4 que producen células T_H2 se generaron en presencia o ausencia de MSC. Cuando MSC estuvieron presentes durante la diferenciación, hubo una reducción de la secreción de IFN-γ por las células T_H1 y el aumento de la secreción de IL-4 por las células T_H2 (Fig. 2B). Ningún cambio significativo en niveles de IFN γ o IL-4 se observaron cuando se adicionaron las MSC al cultivo después de las células Th se habían diferenciado (en 3 días) en tipos T_H1 o T_H2 efectoras (datos no mostrados). Estos experimentos sugieren que las

MSC pueden afectar la diferenciación de células T efectoras directamente y alterar la secreción de citoquinas de las células T hacia un fenotipo humoral.

De manera similar, cuando las MSC fueron cultivadas con células NK purificadas (CD3, CD14-, CD19-, CD36-) en una relación 1:1 para diversos períodos de tiempo (0-48 horas), hubo una disminución de la secreción de IFN- γ en el sobrenadante del cultivo (Fig. 2C), lo que sugiere que las MSC pueden modular las funciones de las células NK también.

El trabajo previo ha indicado que las MSC modifican funciones de las células T por el factor(es) soluble(s) (LeBlanc, et al., Exp. Hematol., vol. 31, pg. 890 (2003); Tse, et al., Transplantation, vol. 75, pg. 389 (2003). Se observó que la MSC secretó varios factores, incluyendo IL-6, la prostaglandina E₂, VEGF y proMMP-1 constitutivamente, y los niveles de cada aumento en el cultivo con PBMC (Fig. 5). Con el fin de investigar los factores derivados de MSC que conducen a la inhibición de TNF- α y el aumento de producción de IL-10 por las DC, se investigó el papel potencial de la prostaglandina E₂, como se ha demostrado para inhibir la producción de TNF- α por DCs activadas (Vassiliou, et al., Cell. Immunol., vol. 223, pg. 120 (2003)). El medio acondicionado del cultivo MSC (cultivo de 24 horas de 0.5 x 10⁶ células/ml) contenía aprox. 1000 pg/ml de PGE₂ (Fig. 4A). No había presencia detectable de inductores conocidos de la secreción de PGE₂, por ejemplo, TNF- α , IFN- γ o IL-1 β (datos no mostrados) en el sobrenadante de cultivo que indica una secreción constitutiva de PGE₂ por MSC. La secreción de PGE₂ por hMSCs se inhibió 60-90% en presencia de inhibidores conocidos de la producción de PGE₂, NS-398 (5 μ M) e indometacina (4 μ M) (Fig. 4A). A medida que la liberación de la secreción de PGE₂ se produce como resultado de la actividad enzimática de la enzima la ciclooxigenasa 1 (COX-1) constitutivamente activa y la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) inducible (Harris, et al., Trends Immunol., vol. 23, pg. 144 (2002)) Se analizó la expresión de ARNm de COX-1 y COX-2 en MSC y PBMC utilizando sistema de cultivo trans pozos. MSC expresaron niveles significativamente más elevados de COX-2 en comparación con PBMC y los niveles de expresión aumentan >3 veces en cocultivo de MSC y PBMC (relación de MSC con PBMC 1:10) durante 24 horas (Fig. 4B). Se observaron cambios modestos en los niveles de COX-1 lo que sugiere que el aumento en la secreción de PGE₂ en cocultivo de MSC-PBMC (Fig. 5) está mediada por la expresión inducida de COX-2. Para investigar si los efectos inmunomoduladores de MSC en DC y células T estaban mediadas por PGE₂, MSC se cultivaron con células dendríticas activadas (DC1) o células T_H1 en la presencia de inhibidores de la PGE₂ NS-398 o indometacina. La presencia de NS-398 o indometacina aumentó la secreción de TNF- α por DC1, y secreción de IFN- γ de células T_H1 (Fig. 4C), respectivamente, lo que sugiere que los efectos de MSC en tipos de células inmunitarias puede ser mediada por PGE₂ secretada. Estudios recientes han demostrado que las MSC inhiben la proliferación de células T inducida por diversos estímulos (DeNicola, et al., Blood, vol. 99, pg. 3838 (2002); LeBlanc, et al., Scand. J. Immunol., vol. 57, pg. 11 (2003)). Se observó que las MSC inhiben la proliferación de células T inducida por mitógeno de un modo dependiente de la dosis (Fig. 6) y cuando inhibidores de PGE₂ NS-398 (5 μ M) o indometacina (4 μ M) estaban presentes, hubo un incremento >70% en incorporación de (³H) timidina por PBMC tratadas con PHA en cultivos que contienen MSC en comparación con los controles sin inhibidores (Fig. 4D).

En resumen, se propone un modelo de interacción MSC con otros tipos de células inmunes (Fig. 7). Cuando las células T maduras están presentes, las MSC pueden interactuar con ellos directamente e inhiben la producción de IFN- γ pro-inflamatorias (vía 1) y promover fenotipo de células T reguladoras (vía 3) y las células T_H2 anti-inflamatorias (vía 5). Además, las MSC pueden alterar el resultado de la respuesta inmune de células T a través de las DC mediante la secreción de PGE₂, inhibición de las células DC1 pro-inflamatorias (vía 2) y la promoción de las células DC2 anti-inflamatorias (vía 4) o DCs reguladoras (vía 3). Un cambio hacia la inmunidad T_H2, a su vez, sugiere un cambio en la actividad de las células B hacia una mayor generación de anticuerpos del subtipo IgG1/IgE (vía 7). MSC, por su capacidad para inhibir la secreción de IFN- γ a partir de células NK modifican probablemente la función de células NK (vía 6). Este modelo de interacciones de células MSC:inmune es coherente con la experimentación realizada en varios otros laboratorios (LeBlanc, et al., Exp. Hematol., vol. 31, pg. 890 (2003); Tse, et al., Transplantation, vol. 75, pg. 389 (2003); DiNicola, et al., Blood, vol. 99, pg. 3838 (2002)). Un examen más detallado de los mecanismos propuestos está en marcha y los estudios en animales ahora son necesarios para examinar los efectos in vivo de la administración del MSC.

Ejemplo de referencia 2

Las células madre mesenquimales se administraron a una paciente mujer de 33 años, que padece de enfermedad severa de injerto contra huésped gastrointestinal grado IV (GVHD). El paciente fue refractario a todos los otros tratamientos de GVHD. Vistas endoscópicas de colon del paciente mostraron áreas de ulceración e inflamación antes del tratamiento. Histología de colon del paciente mostró que la enfermedad de injerto contra huésped había destruido la gran mayoría de las criptas intestinales del paciente, antes del tratamiento.

Al paciente se le administró una infusión intravenosa de células madre mesenquimales alogénicas en 50 ml de plasma Lyte A (Baxter) en una cantidad de 3 X 10⁶ células por kilogramo de peso corporal.

El paciente se evaluó a las dos semanas después de la infusión. A las dos semanas después de la infusión, una vista endoscópica del colon del paciente mostró que se resolvieron las áreas de inflamación y ulceración visible antes del tratamiento. Además, una biopsia de colon del paciente mostró una regeneración significativa de las criptas intestinales. Por lo tanto, la administración de las células madre mesenquimales para la paciente resulta en

una reducción significativa en el componente inflamatorio de la enfermedad de injerto contra huésped gastrointestinal, y resulta en la regeneración de nuevo tejido intestinal funcional.

Ejemplo 3

5 9 pacientes recibieron 0.5×10^6 células madre mesenquimales por kilogramo de peso corporal, 10 pacientes recibieron 1.6×10^6 células madre mesenquimales por kilogramo de peso corporal, y 15 pacientes recibieron 5.0×10^6 células madre mesenquimales por kilogramo de peso corporal por infusión intravenosa de una suspensión de células madre mesenquimales en el plasma Lyte A (Baxter), en el que las células madre mesenquimales estaban presentes en la suspensión a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. El volumen total de la suspensión de células madre mesenquimales dado por lo tanto fue dependiente de la dosis de las células y el peso del paciente.

10 19 pacientes recibieron dosis de placebo de Plasma Lyte A. Las dosis de placebo estaban en dosis baja, media y altas de forma proporcional a los volúmenes de la suspensión de células madre mesenquimales dado a los pacientes tratados con las células madre mesenquimales. De los pacientes tratados con placebo, a 5 pacientes se les administró una dosis baja de la suspensión, 4 pacientes se administraron con una dosis media de la suspensión, y 10 pacientes recibieron una dosis alta de la suspensión.

15 La prueba de espirometría FEV1 se realizó durante un período de seis meses para detectar posibles cambios relacionados con el tratamiento. La prueba se llevó a cabo según las directrices de American Thoracic Society (Miller, et al., Eur. Respir. J., vol. 26, pgs. 319- 338 (2005)).

20 El volumen espiratorio forzado, o FEV1, es el máximo volumen de aire exhalado durante el primer segundo de una espiración forzada desde una posición de inspiración completa, expresado en litros, a la temperatura corporal (37°C), presión ambiental, saturado con vapor de agua (BTPS). Los valores de FEV1 predichos se calcularon para cada paciente en función de edad, sexo, altura, y raza. El FEV1 predicho para los hombres se calculó de la siguiente manera (Crapo, et al., Am. Rev. Respir. Dis., vol. 123, pgs. 659-664 (1981):

$$\text{FEV1 Predicho} = 0.0414 \times \text{altura (cm)} - 0.0244 \times \text{edad (años)} - 2.190$$

Se calculó el FEV1 predicho para las mujeres de la siguiente manera (Crapo, 1981):

25
$$\text{FEV1 Predicho} = 0.0342 \times \text{altura (cm)} - 0.0255 \times \text{edad (años)} - 1.578$$

Los valores anteriores se calcularon para los hombres y mujeres que no sean de origen africano-americano. Para los hombres y mujeres de origen africano-americano, los valores anteriores se multiplican por un factor de corrección de 0.88.

30 El peso de cada paciente también fue tomado. Aunque el peso no es un factor en la determinación de los valores de FEV1, la obesidad puede disminuir los volúmenes pulmonares medidos, y los cambios en el peso corporal puede dar lugar a pequeños cambios en la función pulmonar.

35 Los valores de FEV1 para todos los pacientes se midieron utilizando un espirómetro, que estaba conectado a una boquilla o tubo que se inserta en la boca del paciente. La altura y el peso de cada paciente se midió, una pinza en la nariz fue colocada en cada paciente. Cada paciente fue instruido para inhalar completa y rápidamente, con una pausa de menos de un segundo en la capacidad pulmonar total, y exhalar al máximo hasta que no más aire pueda ser expulsado. El procedimiento se repite por triplicado, y se midieron los valores de FEV1 para cada paciente. A partir de los valores de FEV1, se calculó el porcentaje de los valores de FEV1 predicho (% FEV1 Pred.). El porcentaje de valores de FEV1 predicho (% FEV1 Pred.) para cada paciente se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{FEV1 Predi. \%} = 100.0 \times \frac{\text{FEV1 Observado}}{\text{FEV1 predicho}}$$

40

El porcentaje mejorado en los valores % FEV1 Pred. de los pacientes también se calculó en diversos intervalos de tiempo hasta 6 meses (180 días) después del tratamiento. Los resultados para el MSC y los grupos tratados con placebo se muestran en la Figura 8. Estos resultados muestran el cambio porcentual medio en valores de % FEV1 Pred., de todos los pacientes tratados con MSC y el cambio porcentual medio en valores de % FEV1 Pred. de todos los pacientes que recibieron el placebo.

En comparación con el grupo control de pacientes, los pacientes que fueron tratados con las MSC mostraron una mayor mejora en % FEV1 Pred., los valores relativos a la línea base (pretratamiento), a partir de tres días a través de seis meses postinfusional. En ambos 10 y 30 días después de la infusión, la diferencia en la mejora de valores % FEV1 Pred., observados en los pacientes tratados con placebo-MSC y fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

50 Los pacientes de tratados con MSC y placebo también se sometieron a una prueba de esfuerzo en el que los pacientes caminaban en una cinta en la que la distancia recorrida por cada paciente se midió en seis intervalos de un minuto. Las medidas de distancia se tomaron después del tratamiento (línea de base), y en un mes, tres meses,

seis meses y después del tratamiento. La prueba se realizó de acuerdo con las directrices de ATS (American Thoracic Society) guidelines (Am. J. Respir. Crit. Care Med., vol. 166, pg. 111 (2002)).

- 5 Los porcentajes de cambio promedio en la distancia recorrida en todos los pacientes tratados con MSC y todos los pacientes tratados con placebo, en comparación con la distancia de línea de base se muestra en la Figura 9. En tanto los puntos de tiempo de tres meses y seis meses, los pacientes tratados mostraron MSC un aumento en la distancia recorrida en comparación con los pacientes que recibieron el placebo.

Después de la prueba de esfuerzo de seis minutos que se les dio a los pacientes, poco después del tratamiento, y en uno, tres, y seis meses después del tratamiento, se determinó la recuperación de la frecuencia cardíaca de los pacientes.

- 10 Los resultados de recuperación frecuencia cardíaca se muestran en la Figura 10. Como se muestra en la Figura 10, a los seis meses después del tratamiento, la diferencia en el porcentaje de pacientes que recibieron los tratamientos MSC que muestran la recuperación de la frecuencia cardíaca para los valores de línea base dentro de los 15 minutos después del cese de la caminata en la cinta en comparación con los pacientes que recibieron los tratamientos con placebo fue estadísticamente significativa.
- 15 Los resultados anteriores con respecto a la mejora en % FEV1 Pred., distancia recorrida, y la recuperación de la frecuencia cardíaca, muestran que los pacientes tratados con las células madre mesenquimales habían mejorado la función pulmonar en comparación con el grupo placebo. Los resultados anteriores sugieren que las enfermedades o trastornos pulmonares fibróticas pueden ser tratados con células madre mesenquimales, con lo que las células madre mesenquimales mejoran la función pulmonar, reducen el tejido de cicatriz existente en el pulmón, y/o
- 20 previenen una mayor expansión de la cicatriz en el pulmón.

Listado de secuencias

<110> Mesoblast International Sàrl

<120> Células madre mesenquimales y usos de las mismas

<130> 418-51 PCTEPT2

25 <140>

<141> 2008-03-21

<150> US 11/726,676

<151> 2007-03-22

<160> 4

30 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> secuencias sintéticas y son cebadores para la PCR derivados de COX-1 humana

<220>

<221> características_misc

<222> (1)..(22)

40 <223> cebador directo de COX-1

<400> 1 ccggatgccca gtcaggatga tg 22

<210> 2

<211> 22

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencias sintéticas y son cebadores para la PCR derivados de COX-1 humana
 5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(22)
 <223> cebador inverso de COX-1
 <400> 2 ctagacagcc agatgctgac ag 22
 10 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> secuencias sintéticas y son cebadores para la PCR derivados de COX-1 humana
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(20)
 <223> cebador directo de COX-2
 20 <400> 3 atctaccctc ctcaagtccc 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador para PCR derivado de COX-2 humana
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(21)
 30 <223> cebador inverso de COX-2
 <400> 4 taccagaagg gcaggataca g 21

REIVINDICACIONES

1. Células madre mesenquimales para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) en un animal.
- 5 2. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales se administran en una cantidad efectiva para mejorar el volumen espiratorio forzado en dicho animal.
- 10 3. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las células madre mesenquimales se administran en una cantidad efectiva para mejorar el volumen espiratorio forzado en al menos un 10% en dicho animal.
4. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 células por kilogramo de peso corporal a aproximadamente 1×10^7 células por kilogramo de peso corporal.
- 15 5. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las células madre mesenquimales se administran en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 células por kilogramo de peso corporal a aproximadamente 5×10^6 células por kilogramo de peso corporal.
- 20 6. Las células madre mesenquimales para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre mesenquimales se administran en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en 0.5×10^6 células por kilogramo de peso corporal, 1.6×10^6 células por kilogramo de peso corporal y 5×10^6 células por kilogramo de peso corporal.
7. Uso de células madre mesenquimales para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) en un animal.
- 25 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las células madre mesenquimales se administran en una cantidad suficiente para mejorar el volumen espiratorio forzado en dicho animal.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde las células madre mesenquimatosas se administran en una cantidad efectiva para mejorar el volumen espiratorio forzado en al menos un 10% en dicho animal.

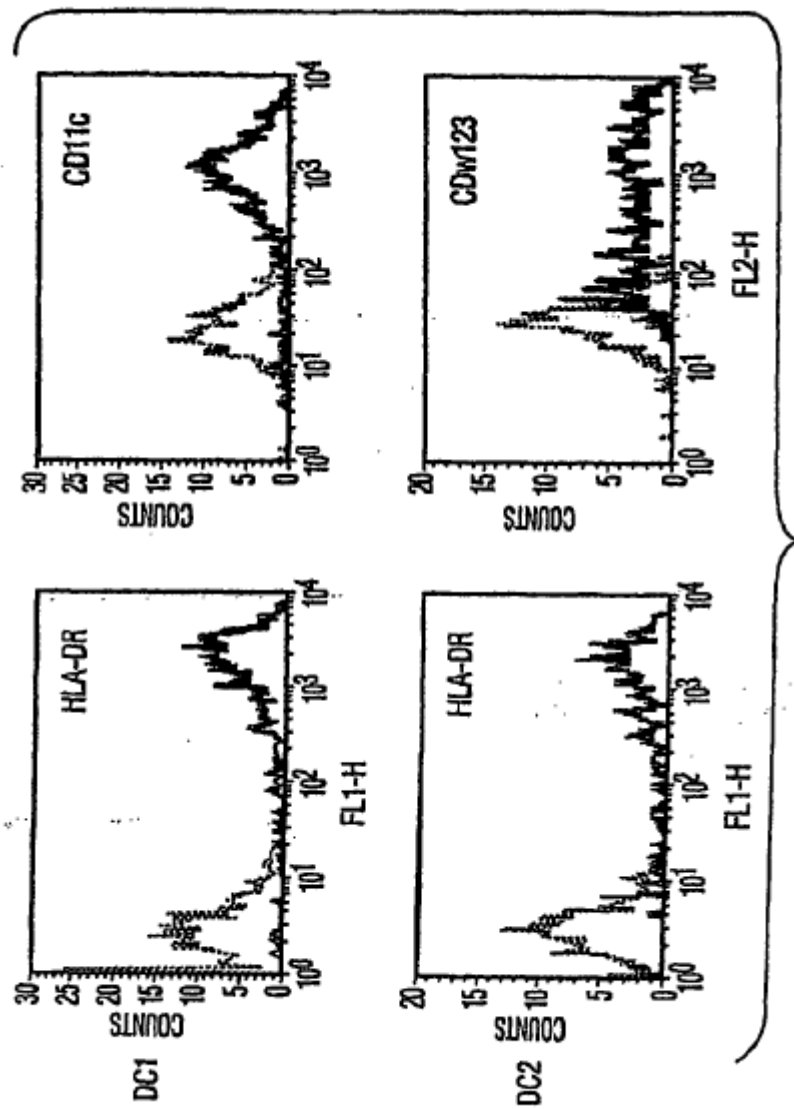


FIG. 1A

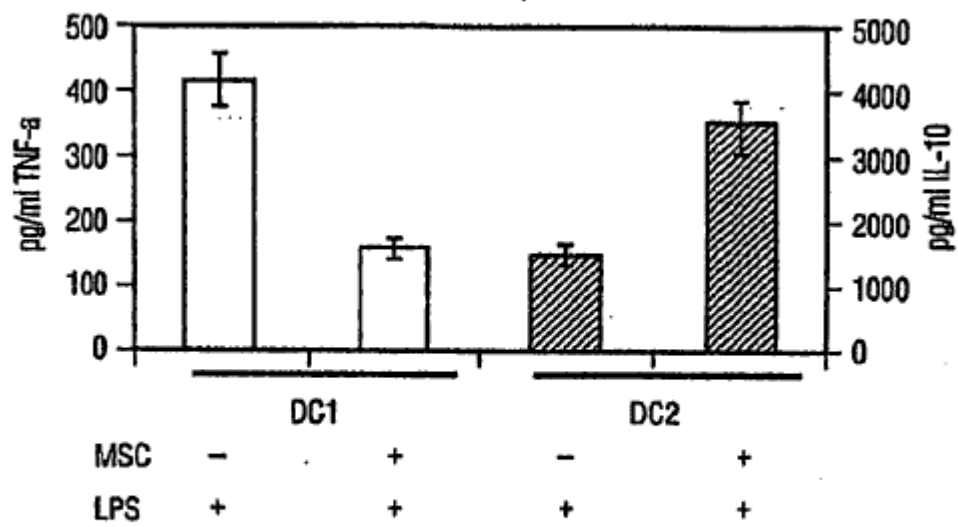


FIG. 1B

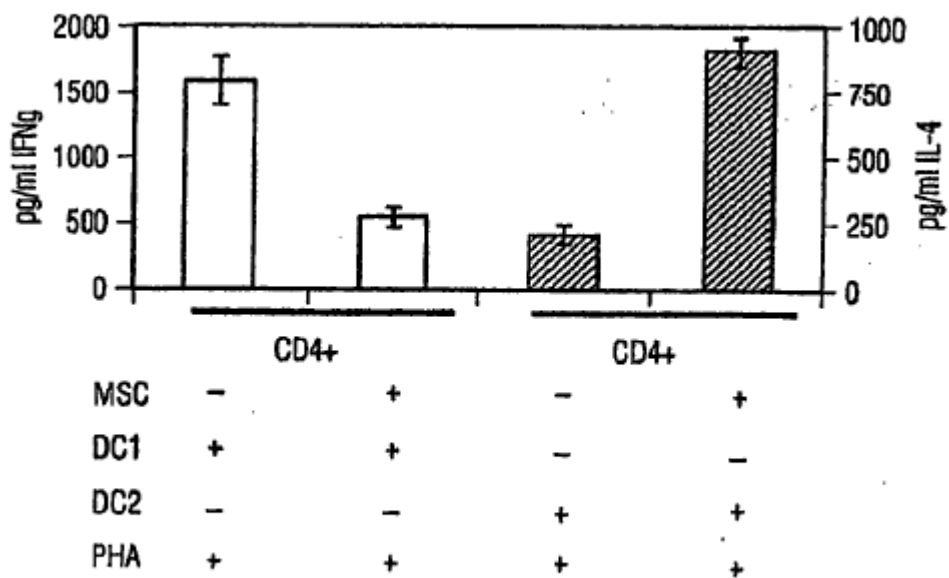
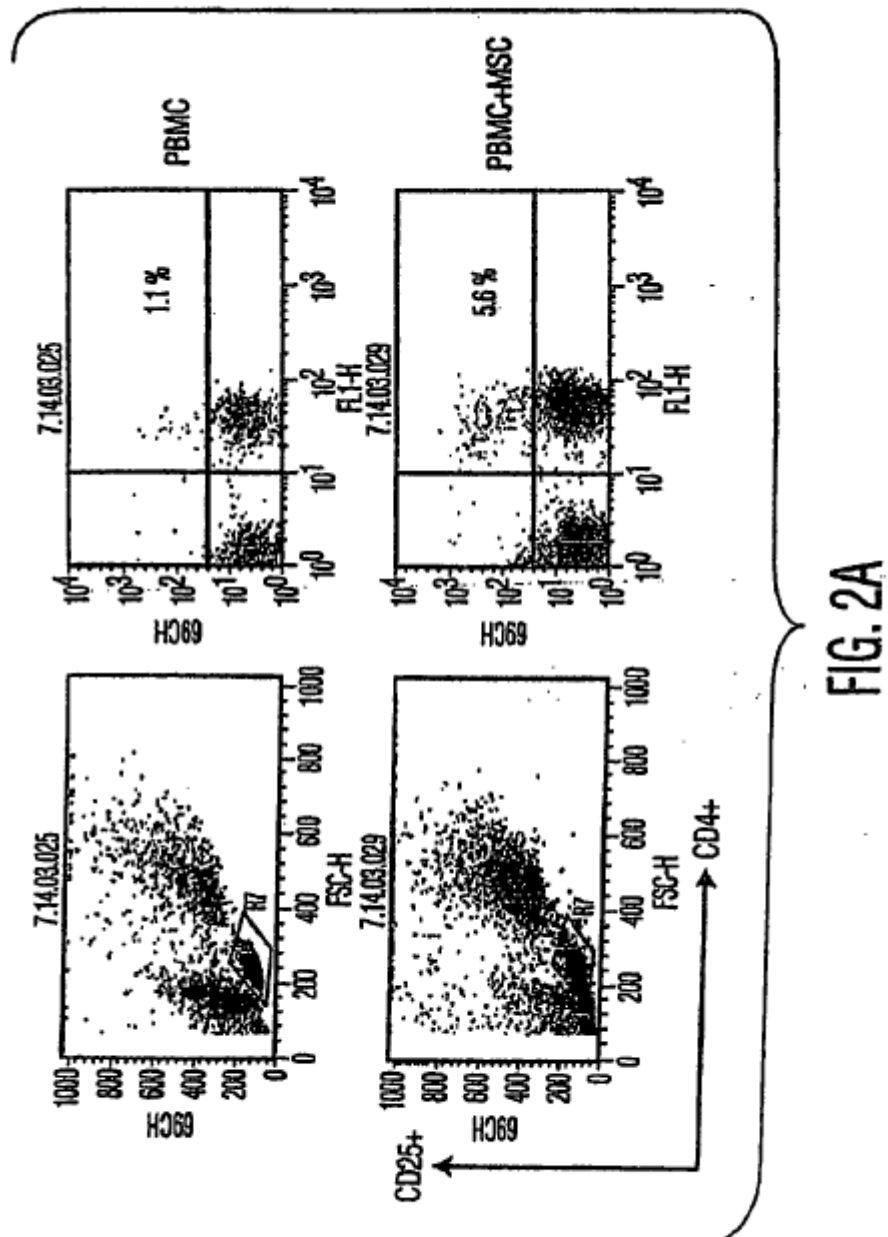


FIG. 1C



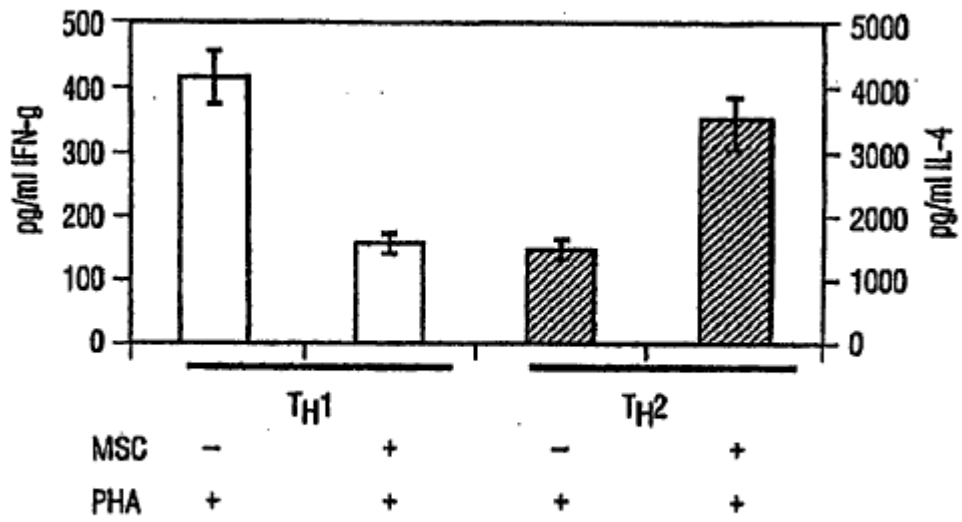


FIG. 2B

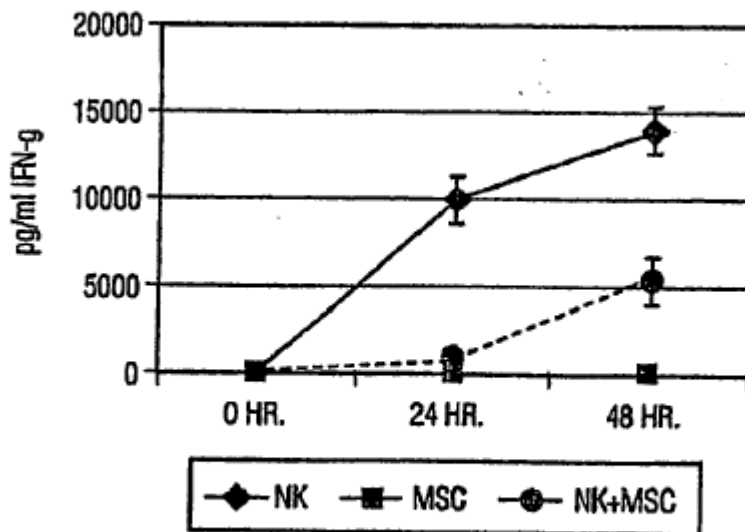


FIG. 2C

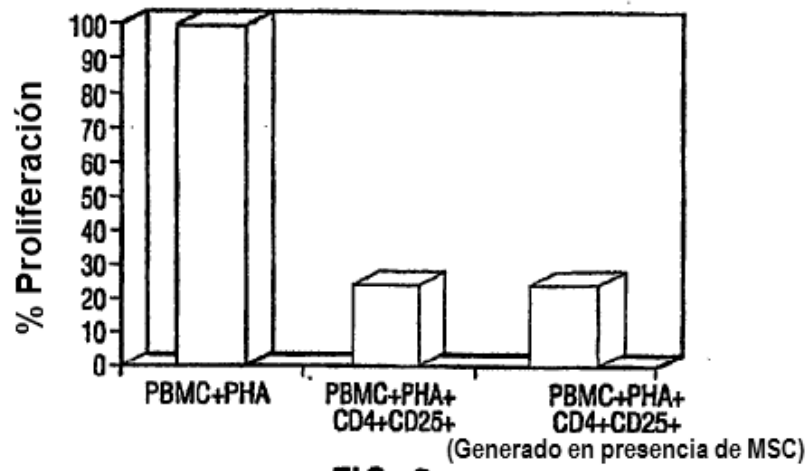


FIG. 3A

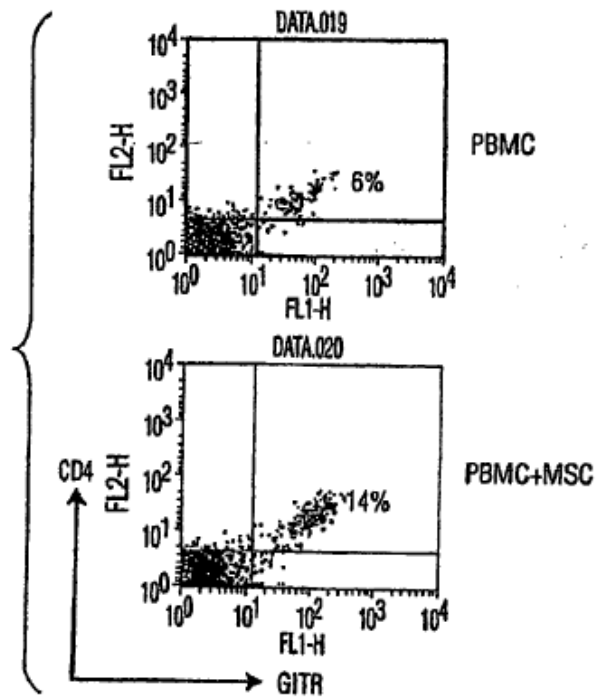


FIG. 3B

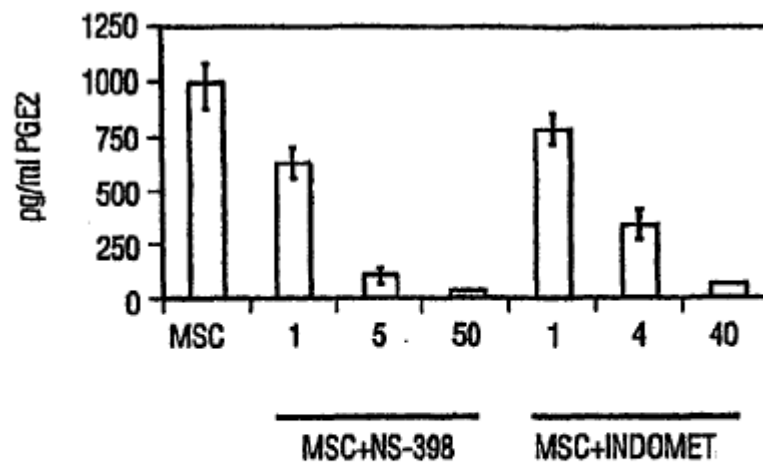


FIG. 4A

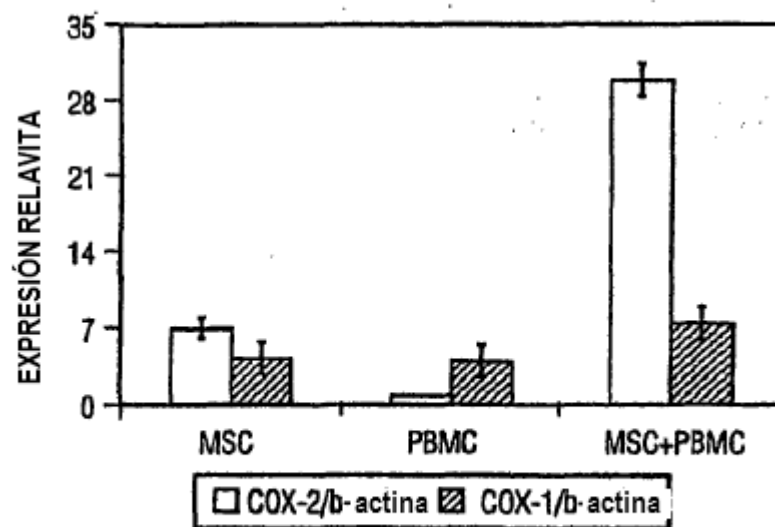


FIG. 4B

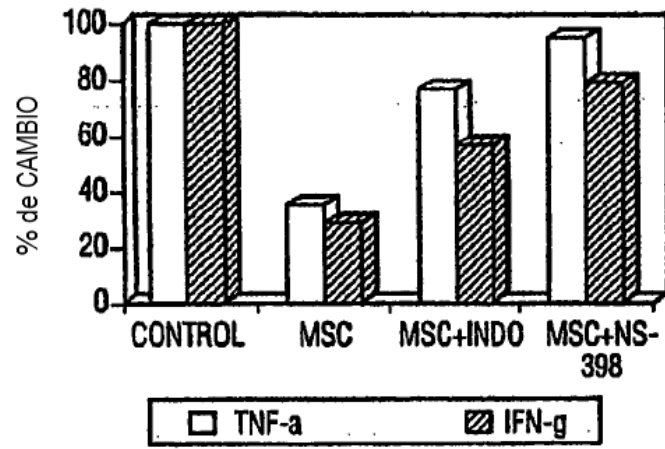


FIG. 4C

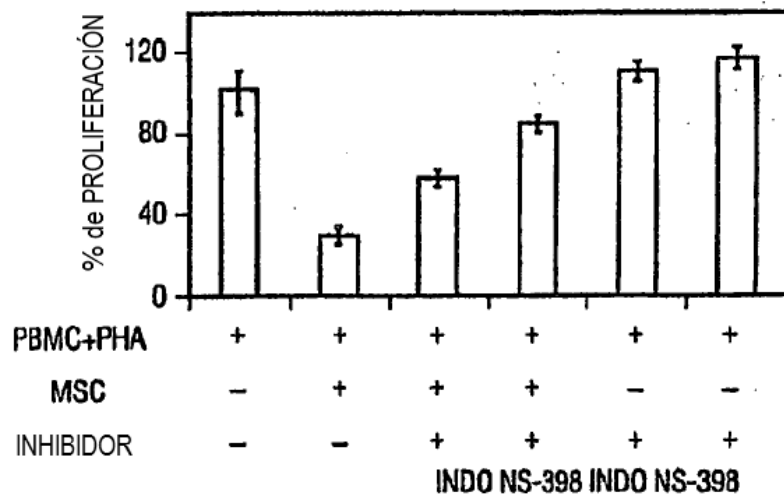


FIG. 4D

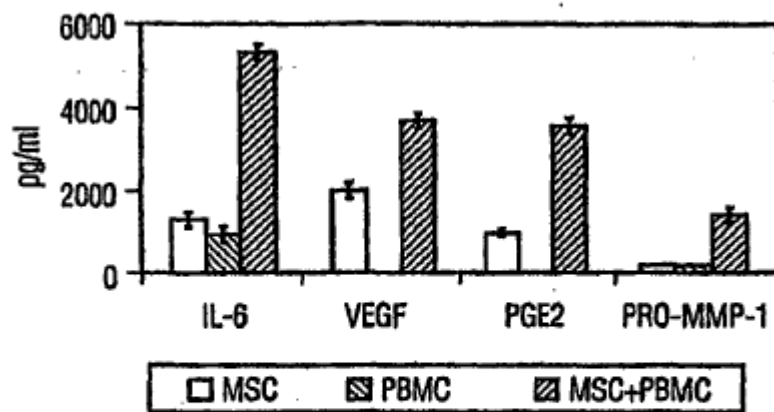


FIG. 5

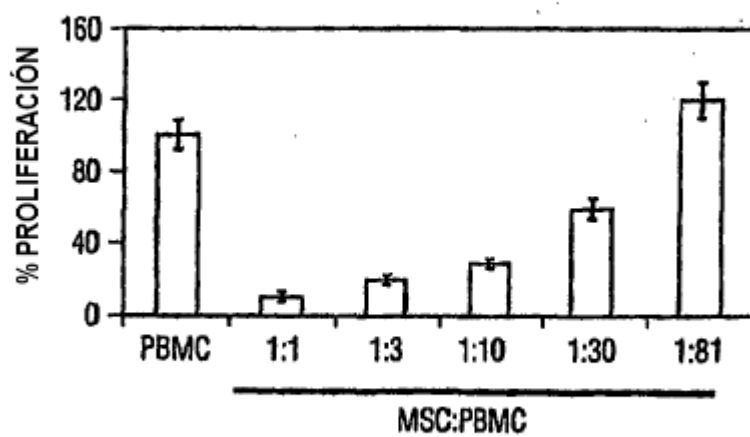


FIG. 6

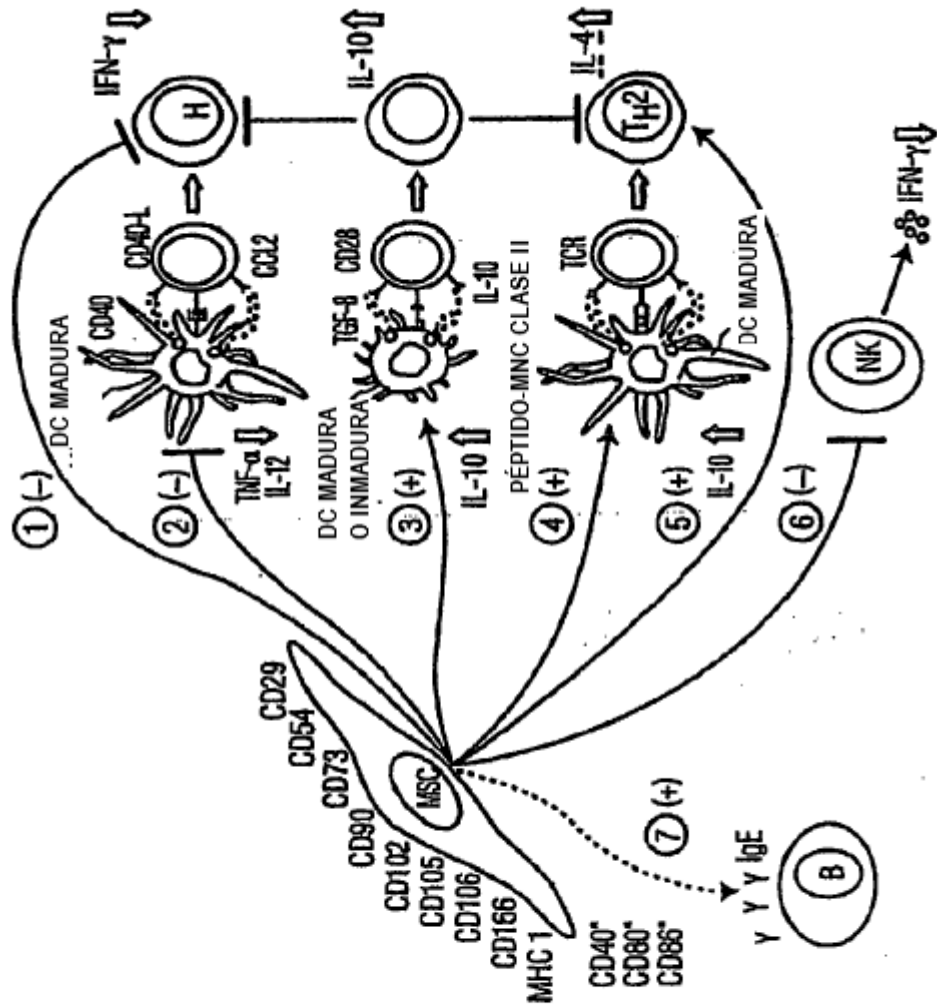


FIG. 7

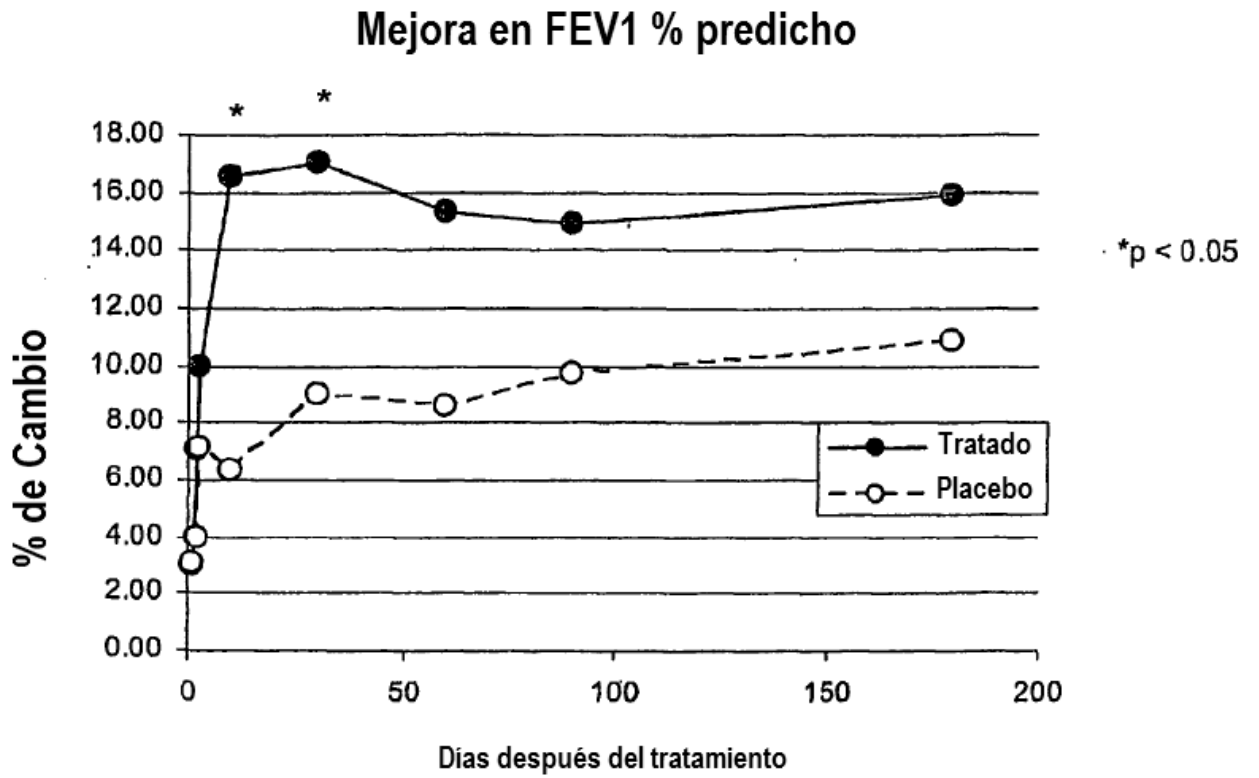


Fig. 8

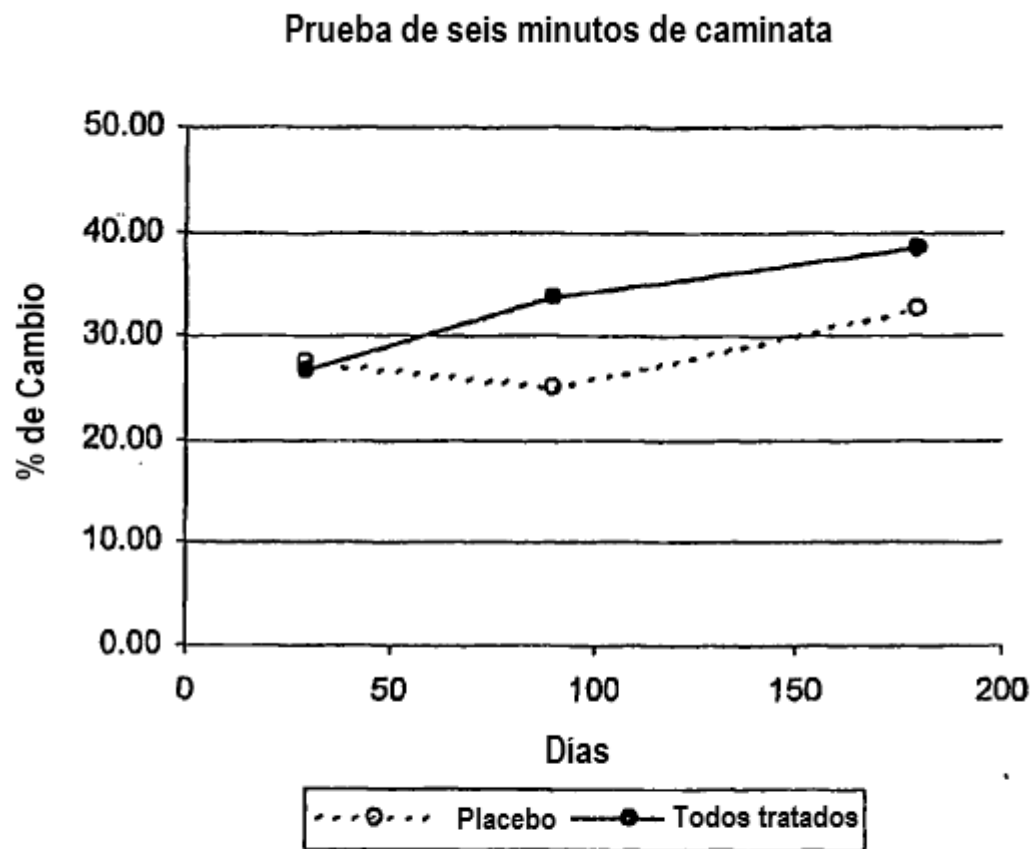


Fig. 9

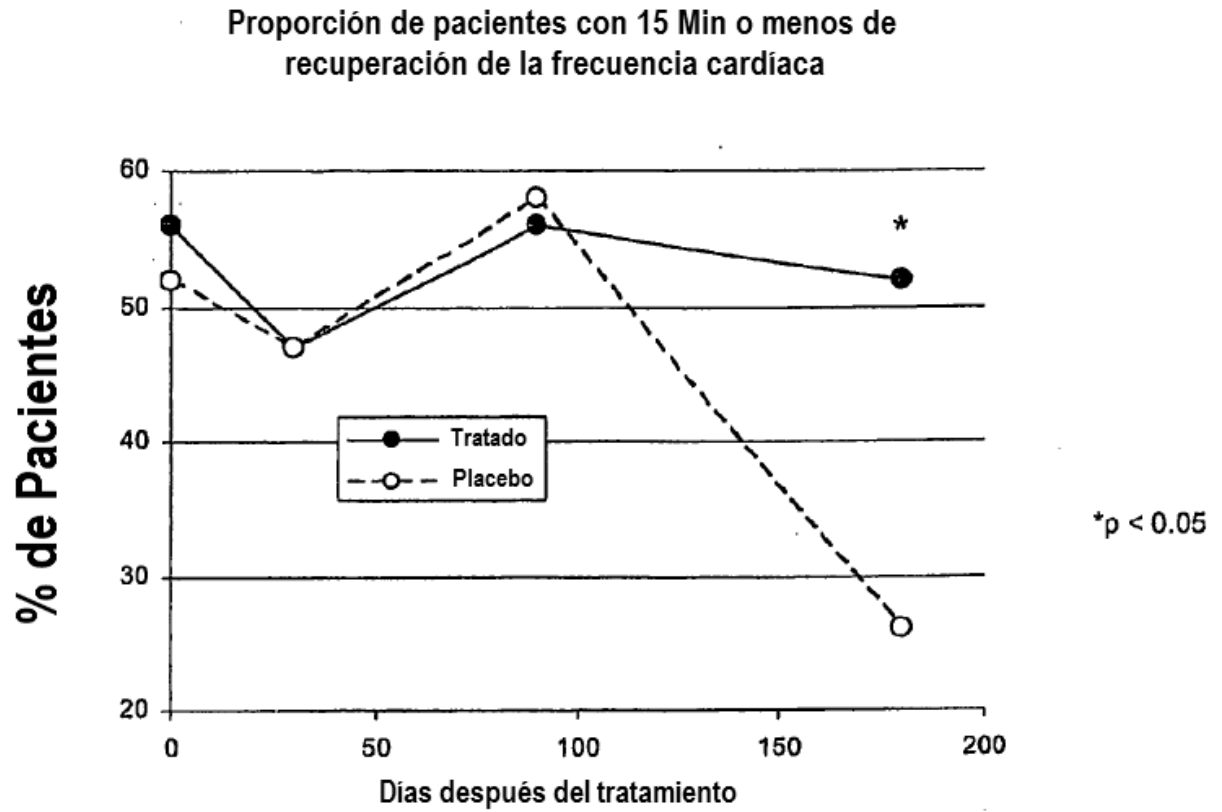


Fig. 10