

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 183**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00	(2006.01)
C12N 5/078	(2010.01)
C12N 5/0783	(2010.01)
C12N 5/0735	(2010.01)
A61K 35/26	(2015.01)
A61P 37/00	(2006.01)
C12M 1/12	(2006.01)
C12M 1/42	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)
A61K 35/12	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2010 PCT/US2010/059522**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11087637**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2010 E 10843462 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 2510084**

54 Título: **Procedimientos de uso y aparato para modulación inmunitaria de células madre**

30 Prioridad:

08.12.2009 US 283782 P
08.12.2009 US 283810 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2020

73 Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (100.0%)
352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street
Urbana, IL 61801, US

72 Inventor/es:

ZHAO, YONG

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 784 183 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

Procedimientos de uso y aparato para modulación inmunitaria de células madre

5 REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional U.S. Ser. No. 61/283,782, depositada el 8 de diciembre de 2009, titulada "Stem cell educator and clinical applications" y la Solicitud de Patente Provisional U.S. Ser. No. 61/283,810, depositada el 8 de diciembre de 2009, titulada "Stem cell immune modulation and its molecular mechanisms,". Esta solicitud es también una continuación en parte de la Solicitud de Patente Provisional U.S. Ser. No. 12/099,054 depositada el 7 de abril de 2008 titulada "Isolate Embryonic-Like Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood,".

CAMPO TÉCNICO

15 La presente invención se relaciona generalmente con procedimientos y aparatos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades relacionadas con el trastorno inmunitario. El alcance de la protección es definido por las reivindicaciones adjuntas.

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La creciente prevalencia de enfermedades autoinmunes humanas y enfermedades relacionadas con el trastorno inmunitario, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades degenerativas neuronales, presenta un desafío para encontrar terapias más efectivas. La terapia basada en células madre, incluidas las células madre embrionarias y adultas, proporciona una herramienta de tratamiento racional para la medicina regenerativa y tiene potencial para revolucionar la terapéutica moderna. Debido a su alto potencial de autorrenovación y capacidad de diferenciación pluripotente, las células madre embrionarias (ES) se han convertido en un área de investigación muy activa. Sin embargo, las preocupaciones éticas han limitado su disponibilidad y utilidad práctica. Dejando de lado estas preocupaciones éticas, utilizar la fertilización *in vitro* (IVF) y la transferencia nuclear alterada (ANT) para generar células ES se torna problemático debido a la complejidad de las tecnologías requeridas.

Recientemente, sangre del cordón umbilical humano se ha utilizado como fuente de células madre para repoblar el sistema hematopoyético y otros órganos. La sangre del cordón umbilical proporciona una fuente abundante para la generación de células madre, incluidas las células madre mesenquimales y las células madre derivadas de monocitos. Se han informado células madre que expresan marcadores moleculares en ES de la sangre del cordón umbilical después de la eliminación de las células hematopoyéticas (incluida la delección de todas las células positivas para el antígeno común leucocitario CD45). Sin embargo, la escasez de esta población celular previamente descrita [en sangre del cordón umbilical restringe significativamente su aplicación práctica.

También se han descrito varias otras células madre de tipo embrionario derivadas de fuentes adultas en lugar de fuentes embrionarias. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 7.045.148, las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Números de Serie 2005/0148034, 2005/0118715, 2004/0028660, 2003/0235909, 2002/0160510, 2003/0180269 y Solicitud de Patente Internacional número WO 03/068937 describen células madre de tipo embrionario extraídas de la placenta o de la sangre del cordón umbilical. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 2006/0078993 describe células madre de tipo embrionario derivadas de la membrana amniótica del cordón umbilical. Las células madre descritas en estas patentes o solicitudes de patentes son de origen mesenquimatoso que no expresan el marcador CD45 (CD45⁻). En otro ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 2006/0147426 describe células madre derivadas de médula ósea humana. La Solicitud Internacional PCT/US06/38524 por Zhao y Mazzone describe una célula madre de tipo embrionario aislada de la sangre del cordón umbilical que es adecuada para terapias con células madre.

Además, la Solicitud Internacional PCT/US07/22260 por Zhao y Mazzone describe una célula madre de tipo embrionario aislada de la sangre periférica que también es adecuada para terapias con células madre. US 2002/188240 describe un biorreactor para terapia celular.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen procedimientos y aparatos que utilizan células madre con características de células madre de tipo embrionario para educar a células inmunes autorreactivas como un mecanismo para tratar enfermedades autoinmunes.

En un aspecto de la invención, se describen biorreactores para modular linfocitos y suprimir células T autorreactivas,

que tienen una cámara que tiene al menos una superficie de sustrato cargada positivamente e hidrófoba, una población de células madre unidas a la superficie del sustrato, un conducto de entrada para introducir linfocitos dentro de la cámara y un conducto de salida para extraer los linfocitos tratados después del cocultivo con las células madre.

- 5 La superficie del sustrato del biorreactor se puede formar como una o más capas de lámina. Alternativamente, la superficie del sustrato puede estar formada por una pluralidad de microportadores. En otra realización más, la superficie del sustrato puede ser una capa de membrana permeable.

En algunas realizaciones, la superficie del sustrato comprende polímero hidrófobo, tal como poliestireno al que se unen fácilmente las células madre. Las células madre pueden exhibir una confluencia de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 95% en la superficie del sustrato. El biorreactor preferiblemente alberga una población de al menos 10⁶ células madre dentro de la cámara. En algunos casos, las células madre están presentes dentro de la cámara en una relación con los linfocitos de al menos 1:10.

15 La cámara del biorreactor se puede construir para permitir el contacto célula a célula entre las células madre y los linfocitos o para evitar dicho contacto célula a célula, por ejemplo, para evitar el arrastre de células madre cuando los linfocitos tratados se retiran de la cámara. Además, las células madre se pueden cultivar en múltiples capas superficiales de sustrato dentro de la cámara.

20 Las células madre se pueden obtener de la sangre del cordón umbilical o de la sangre periférica. Las células madre pueden ser alogénicas para los linfocitos o autólogas para los linfocitos.

En otro aspecto de la invención, se describen sistemas para inhibir un trastorno autoinmune que tiene un conducto de fluido para extraer sangre de un sujeto; un aparato de aféresis para separar linfocitos de la sangre extraída; y un biorreactor que tiene una cámara con al menos una superficie de sustrato cargada positivamente e hidrofóbica de manera que se pueda unir una población de células madre a la superficie del sustrato, un conducto de entrada para introducir linfocitos en la cámara y un conducto de salida para extraer los linfocitos tratados después del cocultivo con las células madre; y un conducto de fluido para devolver los linfocitos tratados al sujeto. El biorreactor tiene todos los elementos, características y funciones reivindicados.

30 En otro aspecto, se describen procedimientos para inhibir un trastorno autoinmune debido a células T autorreactivas que implican las etapas de extracción de sangre de un sujeto que necesita tratamiento, aislando linfocitos de la sangre extraída, exponiendo los linfocitos a células madre de manera que las células T reguladoras (Treg) se activan para suprimir las células T autorreactivas y devolver al menos una porción de los linfocitos tratados al sujeto. Por ejemplo, el procedimiento se puede practicar cuando el trastorno autoinmune es diabetes.

La etapa de exponer los linfocitos a células madre puede incluir además: cultivar las células madre en un reactor, por ejemplo, haciendo crecer las células madre para confluenciar en una superficie del sustrato que tenga una carga positiva neta, e introducir los linfocitos del sujeto en el reactor.

40 El procedimiento se puede practicar con células madre que son alogénicas o autólogas a los linfocitos del sujeto. Las células madre pueden obtenerse de sangre del cordón umbilical o de sangre periférica, por ejemplo, células madre autólogas obtenidas de la propia sangre periférica de un sujeto.

45 La etapa de cultivar las células madre en el biorreactor puede incluir además recoger sangre periférica que comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC); cultivar las PBMC, de modo que las PBMC vuelvan a células madre de tipo embrionario; aislar las células madre de tipo embrionario y unir las células madre de tipo embrionario a una superficie del reactor.

50 El procedimiento puede implicar la modulación de células Treg mediante la expresión de un ligando de muerte programada 1 (PD-L1) por las células madre y/o donde las células Treg se activan mediante la liberación de óxido nítrico (NO) por las células madre. El procedimiento puede implicar la activación de las células Treg por contacto célula a célula con las células madre y/o por factores solubles secretados por las células madre dentro del reactor. El procedimiento de activación de las células T reguladoras (Treg) puede implicar además la exposición de las células Treg a células madre que expresan carboxipeptidasa M (CPM) o a células madre que expresan el receptor brady kinin B 1 o exponiendo las células Treg a células madre que expresan la proteína del regulador autoinmune (AIRE).

Las células Treg moduladas/activadas pueden caracterizarse por la expresión de al menos uno de los marcadores CD4, CD25, CD62L y CD69 y preferiblemente todos estos marcadores.

60 En una realización, las etapas de extraer sangre y devolver los linfocitos tratados al sujeto se pueden realizar de manera continua. Por ejemplo, la sangre del sujeto puede procesarse continuamente durante un tiempo suficiente

para extraer al menos 1 litro de sangre del sujeto.

En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un procedimiento para recoger células madre de tipo embrionario de un sujeto que comprende extraer células madre de una fuente que comprende células madre de tipo embrionario; 5 cultivar las células madre en medio de crecimiento, de modo que las células madre vuelvan a ser células madre de tipo embrionario y aislar las células madre de tipo embrionario. En algunas realizaciones, el medio de crecimiento puede comprender medios con y sin suero. Las células no requieren capas de células alimentadoras para crecer in vitro y no forman teratomas cuando crecen in vivo. El cultivo puede incluir además sembrar las células madre en una superficie con una superficie hidrófoba, tal como poliestireno u otros materiales plásticos y vidrio adecuados.

10

En algunas realizaciones, las células madre de tipo embrionario expresan al menos uno de los factores de transcripción de unión al Octámero 4 (Oct-4), Nanog homeobox (Nanog), SRY (región determinante del sexo Y)-box 2 (Sox-2), CD9, CD45, una carboxipeptidasa M (CPM), un receptor de bradiquinina B1 (B1R) y un ligando de muerte programada 1 (PD-L1). En otra realización, las células madre de tipo embrionario expresan óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). En 15 otra realización más, las células madre de tipo embrionario expresan regulador autoinmune (AIRE).

En otro aspecto, la invención describe un procedimiento para educar y modular los linfocitos o la función linfocitaria en un sujeto que lo necesita, que comprende cocultivar una primera población de células madre de tipo embrionario con una segunda población de células que comprenden linfocitos, administrando al menos la segunda población de células 20 tratadas después de cocultivar a un sujeto. Los linfocitos (incluidos los linfocitos T y los linfocitos B) pueden ser linfocitos alogénicos o linfocitos autólogos de sangre periférica humana. Cultivar los linfocitos con las células madre de tipo embrionario modula los linfocitos. Por ejemplo, la modulación puede incluir la mediación de la expresión de autoantígenos. En otra realización, las células madre de tipo embrionario modulan los linfocitos T CD4+, CD62L+. El procedimiento puede incluir la producción de óxido nítrico (NO) de regulación positiva. En otra realización más, el 25 procedimiento puede aumentar la expresión del regulador autoinmune (AIRE). En algunas realizaciones, el procedimiento puede usarse para tratar, mejorar los síntomas o retrasar la aparición de diabetes tipo I.

En otro aspecto más, la memoria descriptiva describe un procedimiento para tratar la diabetes en un sujeto mamífero que lo necesita, que comprende eliminar al menos un linfocito autoinmune del sujeto; cocultivar células madre de tipo 30 embrionario con el linfocito; y administrar el linfocito al sujeto para tratar la diabetes. En un ejemplo, los linfocitos se eliminan de la sangre periférica del sujeto. El sujeto puede someterse a citoféresis para obtener los linfocitos. En otro ejemplo, los linfocitos son linfocitos T CD4+, CD62L+. La etapa de administración puede ser a través de cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, inyección intravenosa o intraarterial. Las células pueden administrarse en una cantidad de aproximadamente 1×10^4 - 1×10^{13} células por sujeto. El procedimiento puede usarse para tratar o mejorar 35 los síntomas de la diabetes insulino dependiente. En algunos ejemplos, los linfocitos se obtienen de sangre periférica a través de citoféresis.

En otro aspecto, la invención describe un aparato para cocultivar las células madre con una segunda población de células. El aparato puede tener múltiples niveles para una pluralidad de capas de células madre con flujo a través de 40 agujeros para que las células y/o el líquido pasen de una capa a otra. En una realización, el aparato tiene una superficie con una superficie hidrófoba, tal como poliestireno u otros materiales plásticos y vidrio adecuados. En otra realización, las células madre se adhieren a la superficie del aparato. El aparato tiene una entrada y una salida. Una segunda población de células fluye hacia el aparato a través de la entrada. La segunda población puede ser cocultivada con las células madre y a continuación salir por la salida del aparato. El aparato también puede ser un sistema cerrado, 45 con conexiones directas a una entrada continua que proporciona la segunda población de células y una salida continua que elimina las células cocultivadas. La entrada continua se puede proporcionar desde una fuente como una máquina de aféresis. En otra realización, el flujo de salida continuo puede ser eliminado por una fuente tal como una máquina de aféresis.

El aparato puede comprender además un separador de membrana entre las células madre y la segunda población de 50 células. La membrana puede ser una membrana porosa. La membrana porosa tiene poros suficientemente pequeños para impedir que las células madre pasen a través de la membrana. En otra realización, la membrana porosa tiene poros suficientemente grandes para permitir el paso de factores de un lado de la membrana al otro. En una realización, las células madre se adhieren a una superficie de la membrana porosa. En otra realización, los poros no son mayores 55 que aproximadamente la mitad del tamaño de una célula madre promedio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS:

La FIG. 1 es una ilustración esquemática de un sistema según la invención para el tratamiento de trastornos 60 autoinmunes, usando un Separador de Células Sanguíneas MCS+ con un procedimiento de aguja única;

La FIG. 2 es una ilustración esquemática de un biorreactor de células madre para uso en un sistema según la

invención;

La FIG. 3 es una ilustración esquemática de otra realización de un biorreactor de células madre para uso en un sistema según la invención;

5

La FIG. 4A muestra que las células madre de sangre del cordón umbilical humano CB-SC muestran baja inmunogenicidad sin estimular la proliferación de linfocitos alogénicos;

10

La FIG. 4B muestra el porcentaje de Treg CD4⁺CD25⁺, Treg CD4⁺Foxp3⁺ y Treg CD4⁺CD62L⁺ después de cocultivo *in vitro* con CB-SC;

La FIG. 4C muestra análisis de flujo de expresiones CD25 y Foxp3 en Tregs CD4⁺CD62L⁺ después de cocultivo *in vitro* con CB-SC;

15

La FIG. 4D muestra análisis de flujo de Tregs CD4⁺CD62L⁺ después de tinción con citocinas intracelulares. IgG con isotipo coincidente sirvió como control;

20

La FIG. 5A muestra que las células Treg CD4⁺CD62L⁺ moduladas con CB-SC (Tregs mCD4CD62L) pueden corregir la hiperglucemia en ratones NOD diabéticos. Tregs CD4⁺CD62L de control purificado sirvieron como control (total de 5 millones de células/ratón, i.p., línea azul, n=5 ratones). PBS sirvió como control adicional (línea negra, n=5 ratones);

25

La FIG. 5B muestra pruebas de tolerancia a glucosa intraperitoneal (TPGTT) 3 semanas después del 1^{er} tratamiento con Tregs mCD4CD62L. Ratones NOD de siete semanas de edad sirvieron como control normal;

La FIG. 5C muestra la determinación de los niveles de insulina en sangre por ELISA;

La FIG. 5D muestra los efectos del tratamiento sobre el peso corporal del ratón;

30

La FIG. 5E muestra el análisis morfométrico de la masa de células β pancreáticas. La masa de las células β pancreáticas se determinó mediante la morfometría de recuento de puntos en las células β de los islotes con insulina positiva, seguida de inmunotinción con anti-insulina Ab (Dako) de cobaya y contratinción con hematoxilina;

35

La FIG. 5F muestra la cuantificación de células positivas para Ki67 en islotes pancreáticos después de doble inmunotinción con Ki67 e insulina Abs. IgG de conejo con isotipo coincidente sirvió como control para mAb anti-Ki67 de conejo;

40

La FIG. 6A muestra que el tratamiento con Tregs mCD4CD62L puede revertir la insulinitis y la disfunción inmune en ratones NOD diabéticos. El tratamiento con Tregs mCD4CD62L corrige la insulinitis manifiesta en ratones NOD diabéticos tipo 1;

La FIG. 6B muestra imágenes representativas para diferentes tipos de insulinitis. Los datos se recogieron de ratones NOD diabéticos tratados con Treg mCD4CD62L. Barra de escala, 50 μm;

45

La FIG. 6C muestra la determinación del nivel de IFN-γ en plasma mediante ELISA en ratones a la edad de 6 semanas;

La FIG. 6D muestra la medición del nivel de IL-4 en plasma mediante ELISA;

50

La FIG. 6E muestra la determinación del nivel de IL-10 en plasma medido por ELISA;

La FIG. 6F muestra la determinación del nivel plasmático de TGF-β1 medido por ELISA;

55

La FIG. 7 muestra los resultados apoptóticos de células inmunes infiltradas en islotes pancreáticos del tratamiento con Tregs mCD4CD62L mejorando la expresión de TGF-β1 en islotes pancreáticos;

60

La FIG. 8 muestra linfocitos aislados de pacientes con T1D cocultivados con CB-SC en una proporción de 1:10 CB-SC a linfocitos en presencia o ausencia de 10 μg/ml de PHA. Después de 24 horas, se recolectaron linfocitos flotantes para análisis de flujo (A y B).

La FIG. 8A muestra tinción intracelular con citocinas;

La FIG. 8B muestra tinción intracelular con Foxp3;

5 La FIG. 8C muestra el ensayo de proliferación celular. El clon de células T CD4+ específico de GAD derivado del paciente con T1D se cocultivó durante 3 días con CB-SC en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) y péptido GAD específico o péptido de proinsulina de control no específico;

La FIG. 9A muestra la expresión de CPM, B1R e iNOS en CB-SC. IgG con isotipo coincidente sirvió como control para inmunotinción. Aumento, 400;

10 La FIG. 9B y 9C muestran ensayo en tiempo real para la producción de NO;

La FIG. 9D muestra experimentos de cocultivo de linfocitos estimulados con PHA mitógeno cocultivados con CB-SC en presencia de inhibidor de CPM MGTA (10 μ M) y antagonista de B1R DALKD (2 μ M);

15 La FIG. 10A muestra análisis de PCR en tiempo real para el gen Aire, seguido de electroforesis en gel de agarosa al 2%;

20 La FIG. 10B muestra inmunocitoquímica para el factor de transcripción del Aire. IgG con isotipo coincidente sirvió como control (izquierda) para tinción con AIRE (derecha) con un aumento de 200. Los datos son representativos de ocho preparaciones de CB-SC.

La FIG. 11A muestra respuestas de dosis de Aire siRNA, como se muestra por Western Blot. El control negativo siRNA (NC) a 40 nM sirvió como control;

25 La FIG. 11B muestra que un Western blot con tres pares de siRNA específico de Aire (P1, P2 y P3) podría derribar los niveles de proteína de expresión de AIRE, CPM y PD-L1 con beta-actina sirviendo como control interno;

30 La FIG. 11C muestra el análisis de flujo en la expresión de Foxp 3. Linfocitos aislados de sangre periférica adulta fueron cocultivados con CB-SC en una proporción de 1 : 10 de linfocitos : CB-SC, en presencia de 50 nM Aire siRNA y siRNA de control negativo (NC). Después de la estimulación con PHA durante 24 horas, se recolectaron células para análisis de flujo;

La FIG. 12 es una ilustración de un biorreactor de células madre para uso en un sistema según la invención.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento y un aparato para un uso novedoso de células madre. Estas células madre pueden ser de sangre del cordón umbilical o de sangre periférica (y no de origen mesenquimatoso). Estas células pueden aislarse y expandirse utilizando tecnología simple. Un aspecto particularmente útil de la invención es que estas células pueden aislarse de la sangre periférica de un individuo, particularmente un individuo adulto, para terapias con células madre autólogas, o las células pueden aislarse de otro individuo para terapias con células madre no autólogas. La presente memoria descriptiva también describe el uso de células madre en la modulación de la función de células mononucleares, tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas (DC) y granulocitos.

45 En una realización preferida de la invención, las células madre tienen características que incluyen, pero no se limitan a, marcadores de células madre Oct-4, Nanog y Sox-2, junto con otros genes relacionados con células madre embrionarias (ES), por ejemplo, dominio Zinc finger y SCAN que contiene 10 (ZNF206, también llamado ZSCAN10), miembro de la familia Zic 3 heterotaxia 1 (ZIC3), miembro de la familia Zic 2 (ZIC2), proteína asociada al crecimiento 43 (GAP43), dominio PR que contiene 14 (PRDM14), proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, Z polipéptido 1 (PTPRZ1), tipo podocalixina (PODXL), homólogo polihomeótico 1 (PHC1), proteína Zinc finger 589 (ZNF589), una carboxipeptidasa M (CPM), un receptor de bradiquinina B1 (B1R) (SEQ ID NO:1) y un ligando de muerte programada 1 (PD-L1). En otra realización, las células madre de tipo embrionario expresan óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). En otra realización más, las células madre de tipo embrionario expresan el regulador autoinmune (AIRE) (SEQ ID NO:2). Las secuencias para Oct-4, Nanog y Sox-2 se pueden encontrar en GenBank Nos. de Adhesión NM_002701, Z11898 y Q01860; GenBank Nos. de Adhesión NM_024865 y NP_079141; y GenBank Nos. de Adhesión Z31560 y CAA83435, respectivamente.

60 En otra realización, las células madre también pueden tener características hemotopoyéticas caracterizadas por la expresión del antígeno leucocitario común CD45. En una realización adicional, las células madre no expresan CD3, CD20 (antígeno B1 de superficie celular de linfocitos B, No. de Adhesión M27394), CD11c (integrina, alfa X, No. de Adhesión NM_000887), CD11b/Mac-1 (complemento subunidad del receptor 3 del componente 3, No. de Adhesión

NM_000632) y marcadores CD14 (No. de Adhesión NM_001040021 y P08571). En otra realización más, las células madre no expresan el marcador CD34 (antígeno de células progenitoras hematopoyéticas CD34, No. de Adhesión P28906).

- 5 La presente memoria descriptiva también describe el uso de células madre para impedir o retrasar la aparición y/o revertir o tratar trastornos y enfermedades autoinmunes, tales como diabetes (incluyendo tipo 1, tipo 1.5 y tipo 2). Como se muestra en los Ejemplos, después del cocultivo con células madre, se pueden aislar y administrar varias poblaciones de linfocitos T a un sujeto para impedir o retrasar la aparición y/o revertir o tratar trastornos y enfermedades autoinmunes, como la diabetes. Por ejemplo, las células T que son positivas para el marcador CD62L
- 10 (un marcador para linfocitos de memoria) pueden ser aisladas. Las células T CD4+CD25+CD62L+CD69+ pueden retrasar significativamente la aparición de diabetes en un sujeto en riesgo. Por ejemplo, se demostró que la administración de células T CD4+CD25+CD62L+CD69+ modula la etapa de inicio de las respuestas autoinmunes de ratones NOD diabéticos y retrasa significativamente la aparición de diabetes. Después de la administración de células T CD4+CD25+CD62L+CD69+, el trastorno o enfermedad autoinmune, como la diabetes, puede revertirse para lograr
- 15 la euglucemia.

La presente memoria descriptiva describe además un procedimiento y aparato para terapia basada en células madre que comprende las células madre de tipo embrionario de la presente invención. En un ejemplo, las células madre se usan para tratar una enfermedad autoinmune y enfermedades relacionadas con trastorno inmunitario, como la

20 diabetes, en un sujeto mamífero.

En otro ejemplo más, la presente invención describe un procedimiento para la inmunorregulación de al menos un linfocito autoinmune. El procedimiento comprende proporcionar una muestra de sangre periférica humana adulta; extracción de linfocitos de la muestra; cocultivar los linfocitos con las células madre; recoger las células de linfocitos

25 del cocultivo y administrar los linfocitos nuevamente al sujeto. Las células madre se pueden unir a una superficie de un biorreactor. Además, las células madre no requieren una capa de alimentación celular. La presente invención es adecuada para terapias de cocultivo basadas en células madre, terapias de células autólogas y no autólogas.

Las células T reguladoras (Tregs) juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis y la auto-tolerancia

30 a través de su impacto inhibitorio sobre las células T efectoras autorreactivas, como la liberación de citocinas inmunosupresoras interleucina-10 (IL-10) y/o el factor de crecimiento transformante beta1 (TGF)-beta1). La evidencia creciente demuestra que las anormalidades de Tregs, ya sea en número de células o en función, están asociadas con el inicio y la progresión de enfermedades autoinmunes, como la diabetes. La manipulación de Tregs para el tratamiento de enfermedades autoinmunes es una estrategia novedosa. Un número limitado de estudios se ha centrado en la

35 restauración de la función de Treg alterada para conferir protección contra la diabetes autoinmune, pero no la modulación de la función de Treg. Las células madre, como se describe en esta invención, pueden corregir defectos funcionales de Tregs, lo que lleva a la reversión de enfermedades autoinmunes manifiestas, como la diabetes.

En un aspecto, las células madre pueden ser cocultivadas con linfocitos T, mejorando así la producción de varias

40 poblaciones de células T que pueden impedir, retrasar, tratar y/o reducir la diabetes. En algunos ejemplos, los linfocitos cocultivados pueden administrarse a un sujeto para retrasar la aparición, reducir o mejorar un trastorno autoinmune, como la diabetes. En otros ejemplos, los linfocitos cocultivados pueden incluir al menos una célula T CD4+CD25+CD62L+CD69+. En otros ejemplos, las células T que son positivas para CD62L y positivas para al menos uno de CD69 o CD4 se pueden administrar para reducir al menos un síntoma de un trastorno autoinmune, como

45 diabetes, o mejorar el trastorno en un sujeto. Por ejemplo, los linfocitos cocultivados pueden administrarse a un sujeto, donde los niveles de glucosa en dicho sujeto se reducen a niveles con intervalos normales para dicho sujeto. En algunos ejemplos, los linfocitos cocultivados pueden expandirse in vitro utilizando factores de crecimiento de linfocitos. Ejemplos no limitantes de factores de crecimiento que pueden usarse para expandir la población de linfocitos cocultivados y/o subpoblaciones específicas de linfocitos cocultivados (como, por ejemplo, células T

50 CD4+CD25+CD62L+CD69+).

I. Definiciones

En general, se espera que los términos utilizados en esta invención se adhieran a definiciones estándar generalmente

55 aceptadas por aquellos que tienen una experiencia ordinaria en la técnica de la biología molecular. Algunas excepciones, como se enumeran a continuación, se han definido adicionalmente dentro del alcance de la presente invención.

Como se usa en esta invención, los términos "célula madre embrionaria" se refieren a una célula madre que se deriva

60 de la masa celular interna de un blastocisto (por ejemplo, un embrión humano de 4 a 7 días de edad) y que es pluripotente. Los términos "células madre de tipo embrionario", "células madre", "células madre de sangre del cordón umbilical (CB-SC)" y "células productoras de insulina derivadas de sangre del cordón umbilical (CB-IPC)", "células

madre de sangre periférica (PB-SC)", y "células productoras de insulina derivadas de sangre periférica (PB-IPC)" se usan indistintamente en esta invención para referirse a una célula madre que es *no* derivada de la masa celular interna de un blastocisto. Una célula madre de tipo embrionario es pluripotente. Las células madre de tipo embrionario muestran al menos un subconjunto de características de las células madre embrionarias (ES) y las células hematopoyéticas. El término "célula madre" se refiere a una célula maestra que puede reproducirse indefinidamente para formar las células especializadas de tejidos y órganos. Una célula madre es una célula pluripotente o multipotente de desarrollo. Una célula madre puede dividirse para producir dos células madre hijas, o una célula madre hija y una célula progenitora ("tránsito"), que a continuación prolifera en las células maduras y completamente formadas del tejido. La "célula madre" utilizada en esta invención incluye "células progenitoras" a menos que se indique lo contrario.

10

Como se usa en esta invención, el término "pluripotencial", "pluripotencial para diferenciación" o "pluripotente" se refiere a que la célula es positiva para uno o más de los marcadores pluripotentes, tales como, pero sin limitación, Oct-4, Nanog y Sox-2 y la célula tiene el potencial de diferenciarse en al menos un subconjunto de los aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de los mamíferos con estimulaciones apropiadas, tales como los factores de crecimiento apropiados.

15

Como se usa en esta invención, el término "célula totipotente" se refiere a una célula que puede formar un embrión completo (por ejemplo, un blastocisto).

20

El término "sujeto" se refiere a cualquier organismo vivo en el que se produce una respuesta inmune. El término se refiere a un animal o humano vivo que necesita tratamiento o es susceptible a una afección que involucra un microorganismo no deseado o indeseable, por ejemplo, un tratamiento particular para tener una célula patógena no deseada como se define a continuación. El término sujeto incluye, entre otros, humanos, primates no humanos como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos como perros y gatos; animales de laboratorio, incluidos roedores como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, se pretende incluir los sujetos adultos y recién nacidos, así como también fetos, ya sea hombre o mujer. En realizaciones preferidas de la invención, el sujeto es un mamífero, que incluye humanos y mamíferos no humanos. En una forma de realización preferida de la invención, el sujeto es un humano.

30

El término "indiferenciado" como se usa en esta invención se refiere a células madre embrionarias pluripotentes que no han desarrollado una característica de una célula más especializada. Como reconocerá un experto en la materia, los términos "indiferenciado" y "diferenciado" son relativos entre sí. Una célula madre que está "diferenciada" tiene la característica de una célula más especializada. Las células diferenciadas e indiferenciadas se distinguen entre sí por varios criterios bien establecidos, que incluyen características morfológicas tales como tamaño y forma relativos, relación de volumen nuclear a volumen citoplasmático; y características de expresión tales como presencia detectable de marcadores de diferenciación conocidos. Un marcador de diferenciación que indica que las células están diferenciadas o no diferenciadas incluye una proteína, carbohidrato, lípido, ácido nucleico, característica funcional y/o característica morfológica que es específica de una célula diferenciada.

40

Como se usa en esta invención, el término "sustancialmente homogéneo" cuando se aplica a las células, se refiere a una población de células, donde al menos aproximadamente el 70%, y preferiblemente aproximadamente el 80%, más preferiblemente el 90% de las células en la población son del mismo tipo celular. Los ejemplos de tipos celulares incluyen, pero no se limitan a, células madre de tipo embrionario, células productoras de insulina tipo célula beta, células neuronales, células de cardiomiocitos, células de megacariocitos, células endoteliales, células epiteliales, glóbulos rojos, linfocitos, monocitos, macrófagos, granulocitos, hepatocitos, células nefrogénicas, células adipogénicas, células osteoblásticas, células osteoclasticas, células alveolares, células cardíacas, células intestinales, células renales, células retinianas y similares. En algunos ejemplos, el término "sustancialmente homogéneo" describe una población de células donde al menos aproximadamente el 70%, y preferiblemente aproximadamente el 80%, más preferiblemente el 90% de las células en la población no están diferenciadas. En otro ejemplo, una población de células sustancialmente homogénea es aquella en la que más del 95% de las células no están diferenciadas. En otro ejemplo, una población de células sustancialmente homogénea es aquella en la que más del 99% de las células no están diferenciadas. Se puede analizar una población de células para determinar uno o más marcadores de diferenciación para determinar si la población de células es sustancialmente homogénea.

55

La producción y/o mantenimiento de una población sustancialmente homogénea de células madre de tipo embrionario y/o un tipo celular diferenciado puede medirse evaluando la proporción de células para marcadores particulares de células no diferenciadas y/o células diferenciadas. Por ejemplo, las proporciones relativas de productos de transcripción para marcadores de células indiferenciadas como Oct4, marcadores neuroprogenitores como nestina y Ngn-3, y marcadores de neuronas maduras como β -tubulina y TPH2 se evalúan mediante RT-PCR cuantitativo. Además, la producción y localización de marcadores de células indiferenciadas se puede evaluar por inmunocitoquímica.

60

Los marcadores de células madre indiferenciadas y células diferenciadas se analizan mediante cualquiera de los diversos procedimientos, como las técnicas de detección basadas en anticuerpos que utilizan un anticuerpo específico para un marcador particular. Las técnicas basadas en anticuerpos incluyen inmunofluorescencia e
 5 inmunotransferencia. Otros ensayos incluyen ensayos para la detección de mRNA que codifican un marcador particular. Dichos ensayos incluyen reacción en cadena de polimerasa, hibridación por transferencia (también conocida como Northern blots) e hibridación in situ. Los detalles de estos y otros ensayos similares se describen en esta invención y en referencias estándar que incluyen J. Sambrook y D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª ed., 2001; F. M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*,
 10 *Current Protocols*; 5ª ed., 2002; y E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

Como se usa en esta invención, los términos "linfocitos" y "leucocitos" se usan indistintamente y se refieren generalmente a células hematopoéticas, mononucleares, que incluyen, pero no se limitan a, glóbulos blancos, células
 15 T y células B, linfocitos T, células T efectoras, Células Treg, células T inmaduras, linfocitos B, células B inmaduras, células B maduras, células presentadoras de antígeno hematopoyético, células B de memoria.

Como se usa en esta invención, el término "medio de cultivo" se refiere generalmente a cualquier sustancia o preparación utilizada para el cultivo de células vivas. Un "cultivo celular" se refiere a un crecimiento de células in vitro;
 20 aunque las células proliferan, no se organizan en tejido per se.

Como se usa en esta invención, los términos "tratar", "tratar", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntomas asociados con el mismo. Aunque no se excluye, tratar un trastorno o afección no requiere que el trastorno, afección o síntomas asociados con estos se eliminen por completo. Como se usa en esta invención,
 25 los términos "impedir", "prevenir", "prevención" y similares incluyen "tratamiento profiláctico" que se refiere a reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto que no tiene, pero está en riesgo o susceptible de desarrollar un trastorno o afección.

El término "administración" o "administrar" se usa en toda la memoria descriptiva para describir el procedimiento mediante el cual las células madre de tipo embrionario según la presente invención se administran a un sujeto. Las células madre de tipo embrionario se pueden administrar de varias maneras, incluyendo la vía parenteral (dicho término se refiere a vías intravenosas e intraarteriales, así como otras vías parenterales apropiadas), intratecal, intraventricular, intraparenquimatosa (incluso en la médula espinal, el tronco encefálico o la corteza motora), intracisternal, intracraneal, intraestriatal e intranigral, entre otros cuyo término permite que las células migren al sitio
 30 donde sea necesario. Las composiciones según la presente invención pueden usarse sin tratamiento con un inductor ("no tratado", es decir, sin tratamiento adicional para promover la diferenciación de células dentro de la muestra de células madre) o después del tratamiento ("tratado") con un inductor o otro agente que hace que las células madre de tipo embrionario se diferencien en células que exhiben un fenotipo favorable. La administración a menudo dependerá de la enfermedad o afección tratada y, preferiblemente, puede realizarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía
 40 intravenosa, mediante administración en el líquido cefalorraquídeo o mediante administración directa en el tejido afectado en el cerebro u otro sitio del cuerpo. Por ejemplo, en el caso de la diabetes, la ruta de administración preferida será a través del páncreas o puede ser por vía intravenosa para permitir la transmigración a través del sistema circulatorio y "dirigirse" al sitio afectado.

Los términos "trastorno autoinmune" y "enfermedad autoinmune" se usan en toda la memoria descriptiva como sinónimos para describir enfermedades que tienen manifestaciones autoinmunes, como la enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes (Tipo I), enfermedad de Graves, Síndrome de Guillain-Barre, lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis lúpica, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide y uveítis, asma, aterosclerosis, diabetes Tipo I, psoriasis y varias
 50 alergias.

El término "enfermedad relacionada con el trastorno inmunitario" se usa en toda la memoria descriptiva como sinónimos para describir enfermedades que tienen trastornos inmunitarios que contribuyen a la patogénesis de enfermedades tales como diabetes tipo II, obesidad, enfermedades cardiovasculares, presión arterial alta,
 55 hiperlipidemia, enfermedad renal crónica, una glomerulonefritis primaria; nefritis púrpura, nefritis lúpica, nefropatía diabética, pie diabético y ojos diabéticos.

Los términos "injerto" y "trasplante" e "injertar" y "trasplantar" se usan en toda la memoria descriptiva como sinónimos para describir el procedimiento mediante el cual las células madre de tipo embrionario u otras células según la presente
 60 invención se entregan al sitio donde las células pretenden exhibir un efecto favorable, como el tratamiento de enfermedades autoinmunes y el tratamiento de la diabetes. Las células madre de tipo embrionario u otras células para su uso en la presente memoria descriptiva también pueden administrarse en un área remota del cuerpo mediante

cualquier modo de administración como se describió anteriormente, dependiendo de la migración celular al área apropiada en el cuerpo para efectuar el trasplante.

El término "esencialmente" se usa para describir una población de células o un procedimiento que es al menos 90% efectivo, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% efectivo e incluso más preferiblemente al menos 98% efectivo. Así, un procedimiento que "esencialmente" elimina una población celular dada, elimina al menos aproximadamente el 90% de la población celular diana, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 98% de la población celular. Las células madre de tipo embrionario correspondientes, en ciertos ejemplos, están esencialmente libres de células hematopoyéticas (es decir, negativas para el marcador de células madre hematopoyéticas CD34), esencialmente libres de linfocitos (es decir, negativas para los marcadores de linfocitos CD3, CD20 y CD90), esencialmente libres de antígenos monocitos/macrófagos CD11b/Mac-1 y CD14, esencialmente libres de antígeno de células dendríticas CD11c, y esencialmente libres de células mesenquimales (CD45).

El término "no tumorigénico" se refiere al hecho de que las células no dan lugar a una neoplasia o tumor. Las células madre de tipo embrionario para uso en la presente invención generalmente están libres de neoplasia y cáncer.

II. Procedimientos de Aislamiento de Células Madre

La presente memoria descriptiva describe el uso de una población de células madre aisladas de sangre de cordón embrionario o sangre periférica. Las mismas se designan en esta invención como células madre de sangre del cordón umbilical (CB-SC) o células madre de sangre periférica (PB-SC). Como se usa en esta invención, los términos "sangre del cordón umbilical" y "sangre del cordón" son intercambiables.

Según los procedimientos de la memoria descriptiva, las células madre representan la población de células unida durante el cocultivo con una población de linfocitos. Los linfocitos de sangre periférica humana adulta. Los linfocitos también pueden ser, entre otros, sangre del cordón umbilical, células de la médula ósea, células esplénicas, células tímicas, ganglios linfáticos, tejidos adipocitarios y células hepáticas. Estos linfocitos pueden cocultivarse en un medio de cultivo celular muy básico con un bajo porcentaje de suero (p. ej., suero fetal bovino al 7%), medio de cultivo celular libre de suero y sin alimentadores celulares. La población de células madre unidas puede unirse a una superficie cargada positivamente. La superficie también puede ser una superficie hidrófoba, por ejemplo, como poliestireno y vidrio.

Lo que se entiende por "aislado" en la presente memoria descriptiva es que las células madre o los linfocitos se separan de otras células, como los glóbulos rojos y otras células mononucleares no unidas, que se encuentran en la sangre del cordón umbilical o la sangre periférica a través de uno o más procedimientos de aislamiento tales como, entre otros, separación mecánica o cultivo selectivo. Otros tipos celulares que pueden estar presentes en la segunda población de células, pueden eliminarse durante el procedimiento de cocultivo o el procedimiento de recogida. En un ejemplo preferido, la segunda población está compuesta por más del 50% de células mononucleares. En un ejemplo preferido, la segunda población está compuesta por más del 75% de células mononucleares. En un ejemplo preferido, la segunda población está compuesta por más del 90% de células mononucleares. En otro ejemplo, la segunda población de células es al menos 50% de células mononucleares de sangre periférica humana adulta después de la eliminación de los glóbulos rojos, las células de la médula ósea, las células esplénicas, las células tímicas, los ganglios linfáticos, los tejidos adipocitarios y las células hepáticas.

45 III. Caracterización de Células Madre

Una de las características clave para que una célula madre sea adecuada para la terapia basada en células madre es su capacidad de proliferación. Como se usa en esta invención, el término "capacidad de proliferación" se refiere a que la célula expresa uno o más marcadores de autorrenovación tales como, pero sin limitación, Nanog y la célula puede proliferar. Preferiblemente, la célula puede proliferar indefinidamente. Lo que se entiende por "proliferar" como se usa en la presente descripción es que la célula puede crecer y multiplicarse en números cuando la célula es cultivada. Los términos "proliferar" y "expandir" se usan indistintamente en esta invención.

Para no estar sujeto a ninguna teoría específica, la baja inmunogenicidad de las células madre puede contribuir a la capacidad de las células madre para regular células inmunes, como los linfocitos T. Después del cocultivo de las células inmunes con las células madre, se puede reducir la producción de citocinas inflamatorias producidas por las células inmunes, como por lo menos 2-3 veces, y se puede aumentar la producción de otras citocinas, como la TGF- β 1 se incrementa en 2-3 veces. Ejemplos de citocinas inflamatorias que pueden reducirse mediante el cultivo conjunto con células madre incluyen TNF- α , IL- β , IL- γ , IL-15, IL-17, IL-18, IL1 β , IL-21, IL22, IL-23, IL-4, IL-5 e IL-6. Las células madre, cuando se cultivan conjuntamente con células inmunes, pueden disminuir el porcentaje de células inmunes estimuladas, como células T CD8⁺ y células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ estimuladas por IL-2, junto con la normalización de otras células inmunes, como la relación CD4/CD8. La molécula CD69, un regulador negativo en linfocitos T

activados, también se puede aumentar en las células inmunes, como linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, después del cocultivo con células madre. Además, las células madre pueden inhibir la proliferación de células inmunes estimuladas, como los linfocitos estimulados por IL-2 y/o PHA.

- 5 El contacto célula a célula entre las células madre y los linfocitos puede mediar el efecto inhibitorio. Interacción directa entre las células madre y los linfocitos a través de los receptores de la superficie celular en las células madre y/o en los linfocitos. Dichos receptores pueden incluir, entre otros, carboxipeptidasa M (CPM), receptor de bradiquinina B 1 (B1R) y ligando de muerte programada 1 (PD-L1).
- 10 Los factores solubles secretados por las células madre, como el óxido nítrico (NO), también pueden mediar este efecto inhibitorio, como lo demuestra el bloqueo con un potente inhibidor de la óxido nítrico sintasa (N-omega-nitro-L-arginina, L-NNA). Además, los estudios mecanicistas demostraron que el óxido nítrico (NO) producido por CB-SC contribuye a la modulación de CB-SC en los linfocitos T reguladores. La regulación epigenética de la actividad de DNA metiltransferasa (DNMT) de los linfocitos por el NO derivado de CB-SC puede bloquearse significativamente por la presencia de un inhibidor específico de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) 1400W.

IV. Procedimientos de Tratamiento

La diabetes es un problema de salud dominante. El déficit de células productoras de insulina es el problema crucial tanto para la diabetes tipo 1 como para la diabetes tipo 2. Las células productoras de insulina derivadas de células madre pueden proporcionar una herramienta racional para el tratamiento. La clave del éxito de esta terapia es la necesidad de identificar células que sean fáciles de acceder, seleccionar, cultivar, expandir y diferenciar, sin ningún problema ético y rechazo inmune. Tanto las células madre embrionarias como las adultas pueden servir como fuentes potenciales para la terapéutica clínica. Sin embargo, el sistema inmunitario reconocerá y atacará las células extrañas debido a la vigilancia inmune del cuerpo humano, incluso la aplicación de células madre embrionarias alogénicas. Por lo tanto, la aplicación de células madre autólogas es una estrategia potencialmente atractiva. Evidencias crecientes muestran que la médula ósea humana y la sangre periférica han proporcionado fuentes valiosas para la generación de células madre autólogas, incluidas células madre hematopoyéticas CD34⁺, células madre mesenquimales y células madre derivadas de monocitos.

30 La presente memoria descriptiva describe procedimientos para impedir o tratar una enfermedad autoinmune en un sujeto mamífero. El trastorno autoinmune puede ser cualquiera entre la enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes (Tipo I), enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, lupus eritematoso sistémico (SLE), nefritis lúpica, esclerosis múltiple, miastenia gravis, psoriasis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide y uveítis, asma, aterosclerosis, diabetes Tipo I, diabetes Tipo II, psoriasis y varias alergias. Un ejemplo de la enfermedad autoinmune es la diabetes tipo 1. En un ejemplo, las células mononucleares, como los linfocitos, se recogen de un sujeto. Las células mononucleares también pueden ser, entre otros, células de la médula ósea, células esplénicas, células tímicas, ganglios linfáticos, tejidos adipocitarios y células hepáticas.

40 Para aplicaciones clínicas, se pueden obtener células mononucleares de la sangre periférica del sujeto. Las células mononucleares también pueden tratarse con células madre, descritas anteriormente, cocultivando las células mononucleares con las células madre para obtener una pluralidad de células mononucleares tratadas con células madre. Durante el cocultivo, las células madre interactúan directamente con las células mononucleares para modular su función. La función modulada se puede evaluar, pero no se limita a, la expresión alterada (aumentada o disminuida) de la expresión de la superficie celular de los marcadores de inactividad o activación y la expresión alterada (aumentada o disminuida) de genes asociados con inactividad o activación o muerte celular. Las células mononucleares están moduladas por una disminución en su autoinmunidad a los autoantígenos. Después del cocultivo, las células mononucleares tratadas con células madre pueden recogerse. Las células mononucleares tratadas con células madre pueden administrarse de nuevo a un sujeto para impedir o tratar la enfermedad autoinmune. Preferiblemente, las células mononucleares tratadas con células madre se recogen del cocultivo antes de administrarlas al sujeto. En otro ejemplo, las células mononucleares tratadas con células madre se recogen del cocultivo simultáneamente a medida que se administran al sujeto.

55 En un aspecto, el procedimiento se describe para impedir o tratar una enfermedad autoinmune en un sujeto mamífero que incluye un sistema continuo y cerrado de eliminación de células mononucleares de sangre periférica de un sujeto que contiene al menos una célula mononuclear, cocultivando las células mononucleares con células madre mediante las cuales al menos un linfocito se cocultiva con las células madre, recogiendo las células mononucleares cocultivadas que contienen al menos un linfocito tratado con células madre y administrando las células mononucleares cocultivadas que contienen al menos una célula madre tratada linfocitos de vuelta al sujeto. Las células mononucleares pueden ser, entre otras, linfocitos, linfocitos T, linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD69⁺, células B, células T efectoras, células Treg, células T inmaduras, linfocitos B, células B inmaduras, células B maduras, células B de memoria, granulocitos,

monocitos, células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos.

El sistema cerrado continuo puede utilizar una técnica de aféresis para obtener sangre periférica de un sujeto y separar células mononucleares y linfocitos de la sangre periférica del sujeto. Las células mononucleares contendrían al menos un linfocito. La sangre periférica del sujeto se puede retirar, las células mononucleares se separan del plasma y los glóbulos rojos en la sangre periférica, las células mononucleares se pueden transferir a un aparato para cocultivo con células madre, mientras que el plasma y los glóbulos rojos se devuelven al sujeto. Las células mononucleares pueden cocultivarse con las células madre moviendo una solución que contiene las células mononucleares sobre las células madre. Las células mononucleares se eliminan del cocultivo y se devuelven al sujeto por gravedad o por bombeo.

En otro ejemplo más, la presente memoria descriptiva describe un procedimiento para inmunoregular al menos un linfocito. El procedimiento comprende proporcionar una muestra de sangre periférica humana adulta; retirar los glóbulos rojos de la muestra para obtener células mononucleares; cocultivar las células mononucleares con las células madre; recoger las células mononucleares del cocultivo y administrar nuevamente al sujeto. El presente procedimiento es adecuado para terapias de cocultivo basadas en células madre, terapias con células autólogas y no autólogas.

El cocultivo de células madre con células mononucleares y/o linfocitos puede conducir a la activación de las células mononucleares y/o linfocitos. La activación es una alteración morfológica y funcional de las células mononucleares y/o linfocitos que pueden inducir la síntesis de genes específicos relacionados con la activación celular, tales como, entre otros, CD69, CD 100, factores de potenciación de la proliferación de linfocitos, factor activador de timocitos, CD223, etc. La activación también puede inducir las células mononucleares y/o linfocitos a entrar en el ciclo celular. La activación también puede inducir la proliferación de células mononucleares y/o linfocitos.

En otro aspecto, las células madre crecen hasta al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de confluencia antes del cocultivo con las células mononucleares y/o linfocitos. En un ejemplo, las células madre pueden ser cocultivadas con las células mononucleares y/o linfocitos en una proporción de al menos 1:2. En un ejemplo, las células madre pueden ser cocultivadas con las células mononucleares y/o linfocitos en una proporción de al menos 1:5. En un ejemplo, las células madre pueden cocultivarse con las células mononucleares y/o linfocitos en una proporción de al menos 1:10. En un ejemplo, las células madre pueden cocultivarse con las células mononucleares y/o linfocitos en una proporción de al menos 1:20. En un ejemplo, las células madre pueden cocultivarse con las células mononucleares y/o linfocitos en una proporción de al menos 1:50. En una realización, las células madre pueden cocultivarse con las células mononucleares y/o linfocitos en una proporción de al menos 1:100.

V. Aparato

La FIG. 1 ilustra un sistema según la invención para el tratamiento de trastornos autoinmunes que tienen un conducto de fluido para extraer sangre de un sujeto, junto con un aparato de aféresis, un reactor de células madre y un conducto de retorno de fluido. En uso, la sangre se extrae del sujeto a través del conducto de fluido, por ejemplo, con una bomba hemodinámica y procesada por un aparato de aféresis para separar los linfocitos de la sangre. La sangre puede ser devuelta al paciente a través del conducto de retorno de fluido. Los linfocitos separados se entregan a un reactor de células madre ("educador de células madre") donde porciones de la población de linfocitos se modifican por interacciones con células madre dentro del reactor. En una realización preferida de la invención, las células madre activan las células Treg, que pueden recuperarse del reactor y devolverse al sujeto, por ejemplo, a través del conducto de retorno de fluido.

La FIG. 2 proporciona una ilustración esquemática de un reactor de células madre según la invención que incluye una cámara, una entrada de fluido, una pluralidad de capas superficiales de sustrato sembradas con células madre. Los pasos entre las capas permiten que los linfocitos fluyan desde la entrada a la salida a lo largo de la ruta de flujo. En uso, los linfocitos del aparato de aféresis de la reivindicación 1 se alimentan a la cámara donde se produce la modulación/activación. Después de un período de tiempo adecuado, las células Treg activadas (y/u otros linfocitos modulados, si los hay) pueden retirarse del reactor y regresar al sujeto.

La FIG. 3 proporciona una ilustración esquemática de otra realización de un reactor de células madre en el que los linfocitos que se someten a acondicionamiento están físicamente aislados del contacto directo con las células madre. El reactor incluye una cámara que aloja células madre cultivadas. La cámara puede tener una entrada y una salida para hacer circular un medio nutriente de células madre. Dentro de la cámara hay uno o más pasillos definidos por membranas que aíslan la ruta de flujo de linfocitos de las células madre, que pueden crecer en cualquier lugar dentro de la cámara, por ejemplo, en el exterior de la membrana tubular que aísla los linfocitos del contacto directo con las células madre. En uso, los linfocitos del aparato de aféresis de la reivindicación 1 son alimentados a la cámara a través del conducto de fluido y eliminados a través del conducto de fluido. Mientras están en la cámara, se produce la modulación/activación de ciertos linfocitos. Después de un período de tiempo adecuado, las células Treg activadas (y/u otros linfocitos modulados, si los hay) pueden retirarse del reactor y regresar

al sujeto.

Los ejemplos demuestran los defectos intrínsecos de los linfocitos T reguladores (Tregs) para el inicio y la progresión de la diabetes tipo 1 (T1D) autoinmune. Por lo tanto, la manipulación de linfocitos es un foco de investigación atractivo para desarrollar una inmunoterapia exitosa para impedir y tratar los trastornos autoinmunes. El uso de células madre, como CB-SC o PB-SC, puede corregir defectos funcionales de los linfocitos mediante la modulación de los perfiles de expresión génica global, lo que lleva a la reversión de los trastornos autoinmunes evidentes. En particular, el tratamiento de cultivo conjunto de linfocitos y células madre no solo disminuye la autoinmunidad. Todo el procedimiento puede ser simple, seguro y rentable. La divulgación de tales procedimientos y aparatos tiene un potencial impacto clínico en la diabetes y otras enfermedades autoinmunes, allanando el camino hacia una nueva terapia de linfocitos modulados con células madre para revertir la enfermedad en los pacientes.

La presente memoria descriptiva describe además un aparato para terapia basada en células madre que comprende las células madre de la presente invención. En un ejemplo, las células madre se usan para tratar una enfermedad autoinmune y enfermedades relacionadas con trastorno inmunitario, como la diabetes, en un sujeto mamífero.

El aparato puede ser un biorreactor para suprimir linfocitos autorreactivos. El biorreactor puede incluir una cámara con al menos una superficie de sustrato con carga positiva. Una población de células madre puede unirse a la superficie del sustrato. La superficie puede estar además en forma de una capa de lámina, una pluralidad de microportadores y una capa de membrana permeable. La superficie del sustrato también puede incluir una sustancia hidrófoba, como poliestireno o vidrio, a la que se pueden unir las células madre. En un ejemplo, la cámara tiene múltiples capas de sustrato. En un ejemplo, la cámara puede tener al menos dos capas y hasta 35 o cualquier número entre ellas.

La cámara también puede permitir la interacción entre las células madre y las células mononucleares/linfocitos. La interacción puede ser a través del contacto célula a célula. La interacción también puede ser a través de factores solubles liberados de una célula a otra. La cámara también puede impedir el contacto célula a célula entre las células madre y las células/linfocitos mononucleares. Se puede usar una membrana porosa para proporcionar una barrera entre las células madre y las células/linfocitos mononucleares, permitiendo que los factores solubles pasen a través de la membrana pero no las células. La membrana porosa puede tener tamaños de poro suficientemente pequeños para impedir que las células, las células madre, la población de células cocultivadas, los linfocitos y las células T pasen al lado opuesto de la membrana. En otro ejemplo, la membrana porosa tiene poros suficientemente grandes para permitir el paso de factores excretados de células madre, factores de crecimiento, citocinas, iNOS, de un lado de la membrana al otro. En una realización, las células madre se adhieren a una superficie de la membrana porosa. En otra realización, los poros no son mayores que aproximadamente la mitad del tamaño de una célula madre promedio.

El biorreactor también puede incluir un conducto de entrada para introducir linfocitos en la cámara. El conducto de entrada puede permitir que una población de células fluya hacia el biorreactor a través de la entrada. El biorreactor también puede incluir un conducto de salida para extraer los linfocitos tratados y cocultivados de la cámara. La gravedad y/o el bombeo pueden mover la población de células desde la entrada al conducto de salida.

El biorreactor puede incluir una cámara con células madre. Las células madre se pueden sembrar en la superficie del sustrato en la cámara. Además, las células madre pueden estar presentes en una concentración de al menos 10^7 células. Las células madre también se pueden sembrar a una concentración de al menos 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} células. En un ejemplo, las células madre están presentes en una confluencia de al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% en la superficie del sustrato. Las células madre también se pueden cultivar en el biorreactor para obtener una confluencia óptima. En otro ejemplo, las células madre se hacen crecer hasta una confluencia de al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% en la superficie del sustrato.

Las células madre también se pueden obtener de múltiples fuentes. Las células madre pueden ser autólogas a las células mononucleares/linfocitos que se extrajeron. Alternativamente, las células madre pueden ser alogénicas a las células mononucleares/linfocitos. Además, las células madre pueden derivarse de sangre periférica, sangre del cordón umbilical, células de médula ósea, células esplénicas, células tímicas, ganglios linfáticos, tejidos adipocitarios y células hepáticas.

En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un sistema para inhibir un trastorno autoinmune. El sistema puede incluir un conducto de fluido para extraer sangre de un sujeto y un conducto de fluido para volver a colocar los linfocitos tratados al sujeto. El sistema también puede incluir un aparato de aféresis para separar los linfocitos de la sangre extraída. El aparato de aféresis puede separar los linfocitos en función del tamaño, peso, centrifugación, etc. Además, el aparato de aféresis puede separar selectivamente células mononucleares, linfocitos, plasma y glóbulos rojos, etc. El aparato de aféresis puede ser un procedimiento de una sola aguja o de doble aguja. El aparato de aféresis puede ser un aparato comercial, como el sistema ALYX de Baxter (Reino Unido), CS3000plus de Baxter (Deerfield, IL), MCS+9000 de Haemonetics (Braintree, MA) y COBE Spectra® de CaridianBCT (Lakewood, CO).

El sistema para inhibir un trastorno autoinmune también incluye un biorreactor para suprimir los linfocitos autorreactivos. El biorreactor puede incluir una cámara con al menos una superficie de sustrato con carga positiva.

- 5 Una población de células madre puede unirse a la superficie del sustrato. La superficie puede estar además en forma de una capa de lámina, una pluralidad de microportadores y una capa de membrana permeable. La superficie del sustrato también puede incluir una sustancia hidrófoba, como poliestireno o vidrio, a la que se pueden unir las células madre. En un ejemplo, la cámara tiene múltiples capas de sustrato. En un ejemplo, la cámara puede tener al menos dos capas y hasta 35 o cualquier número entre ellas.
- 10 El sistema también puede incluir una cámara que permite la interacción entre las células madre y los linfocitos. La interacción puede ser a través del contacto célula a célula. La interacción también puede ser a través de factores solubles liberados de una célula a otra. La cámara también puede impedir el contacto célula a célula entre las células madre y los linfocitos. Se puede usar una membrana porosa para proporcionar una barrera entre las células madre y los linfocitos, permitiendo que los factores solubles pasen a través de la membrana pero no las células. La membrana
- 15 porosa puede tener tamaños de poro suficientemente pequeños para impedir que las células, las células madre, la población de células cocultivadas, los linfocitos y las células T pasen al lado opuesto de la membrana. En otra realización, la membrana porosa tiene poros suficientemente grandes para permitir el paso de factores excretados de células madre, factores de crecimiento, citocinas, iNOS, de un lado de la membrana al otro. En una realización, las células madre se adhieren a una superficie de la membrana porosa. En otra realización, los poros no son mayores que aproximadamente la mitad del tamaño de una célula madre promedio.

- El sistema para inhibir un trastorno autoinmune puede incluir un biorreactor con un conducto de entrada para introducir linfocitos en la cámara y un conducto de salida para extraer los linfocitos tratados y cocultivados de la cámara. El biorreactor también puede contener una superficie de sustrato con células madre unidas. Las células madre pueden
- 25 estar presentes en una concentración de al menos 10^7 células. Las células madre también se pueden sembrar a una concentración de al menos 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} células. En un ejemplo, las células madre están presentes en una confluencia de al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% en la superficie del sustrato. Las células madre también se pueden cultivar en el biorreactor para obtener una confluencia óptima. En otro ejemplo, las células madre se hacen crecer hasta una confluencia de al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% en la
- 30 superficie del sustrato.

- El sistema también puede ser un sistema cerrado que permite el procesamiento continuo de la sangre de un sujeto (véase la FIG. 12). El sujeto puede conectarse al aparato de aféresis a través de un conducto de fluido, como una aguja intravenosa. El aparato de aféresis, a su vez, separa los linfocitos de la sangre periférica extraída del sujeto. Los
- 35 linfocitos pueden introducirse en las células madre en el biorreactor a través del conducto de entrada. Los linfocitos se activan, capaces de suprimir los linfocitos autorreactivos, como las células T autorreactivas, los linfocitos tratados se extraen del biorreactor a través del conducto de salida y se devuelven al sujeto a través del conducto de fluido.

- Las células mononucleares del paciente moduladas con células madre (p. ej., Células T, Tregs, células B, monocitos, DC) que se devuelven al sujeto pueden mostrar diferentes potenciales terapéuticos, como modular sistemáticamente un equilibrio inmunitario, induciendo tolerancia inmunológica en los tejidos, como como islotes pancreáticos, reduciendo la inflamación mediante la inducción de apoptosis de células inmunes infiltradas y estimulando la neogénesis de células tisulares, como la replicación de células beta de los islotes pancreáticos, seguido de la restauración general de la arquitectura de los islotes pancreáticos.

45 EJEMPLOS

- La presente invención se ilustra de manera adicional mediante los ejemplos que siguen a continuación, los cuales no deberían considerarse como limitativos. Los siguientes experimentos se realizaron para demostrar varios aspectos de
- 50 la invención.

Los análisis estadísticos de los datos en los siguientes ejemplos se realizaron mediante la prueba t de Student emparejada para determinar la significación estadística. Los valores se dan como media \pm DE (desviación estándar).

55 Ejemplo 1

Procedimientos y Materiales

- Se compraron ratones NOD/LtJ hembras, de 5-6 semanas de edad, de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) y se
- 60 mantuvieron en condiciones libres de patógenos en la Universidad de Illinois en Chicago. Los niveles de glucosa en sangre se monitorizaron usando un glucómetro Ascensia ELITE (Bayer Corporation, Elkhart, IN) entre las 9 y las 11 de la mañana en condiciones sin ayuno. Se utilizaron para el tratamiento ratones diabéticos NOD/LtJ hembras (a las

24-28 semanas de edad) con diabetes autoinmune desarrollada espontáneamente según confirmado por la pérdida de peso, poliuria y niveles de glucosa en sangre sin ayuno > 250 mg/dL durante al menos 2 días consecutivos. a un protocolo aprobado por el Comité de Cuidado Animal (ACC) de la Universidad de Illinois en Chicago.

5 **Cocultivos**

Se adquirió sangre del cordón umbilical humano (60-120 ml/unidad/bolsa) de Life-Source Blood Services (Glenview, IL), que se derivó de donantes sanos. La solicitud de sangre de cordón umbilical para nuestras investigaciones no necesita la aprobación ética de la Universidad ni firmar ningún acuerdo con los donantes debido a su disponibilidad comercial. Se generaron células madre derivadas de la sangre del cordón humano (CB-SC) como se describió anteriormente. En resumen, las células mononucleares de sangre del cordón umbilical se colocaron en placas de Petri de 150 x 15 mm (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, no en placas tratadas con cultivo de tejidos) a 1×10^6 células/ml, 25 ml/placa en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 7% (Invitrogen, Carlsbad, CA), e incubado a 37°C, en 8% de CO₂. Después de 2-3 semanas, se cultivaron conjuntamente CB-SC con una confluencia del 80-90% con linfocitos de ratón después de eliminar todas las células mononucleares de sangre del cordón umbilical no unidas. Para el cocultivo, se aislaron linfocitos de ratón de bazo de ratón NOD de 6-8 semanas de edad y se colocaron en placas sobre CB-SC en una proporción 1:10 de CB-SC: linfocitos en placas de Petri de 150 x 15 mm que contenían 25 ml de medio RPMI 1640, suplementado con 7% de suero bovino fetal (Invitrogen), e incubado a 37°C en una incubadora con 8% de CO₂. Después del cocultivo durante 2-4 días, los linfocitos en suspensión se recogieron para experimentos con una contaminación mínima de CB-SC (<1% de las células flotantes fueron positivas para un marcador de CB-SC antígeno común de leucocitos humanos CD45). Debido a que CB-SC se adhiere firmemente a las placas de cultivo y muestra una gran morfología redondeada, es fácil distinguir los linfocitos de CB-SC y recolectarlos. En los experimentos de control, los linfocitos se cultivaron en condiciones de crecimiento idénticas pero sin CB-SC.

25

Análisis de Flujo y Clasificación

El análisis de flujo y la clasificación celular se realizaron como se describió previamente. Para el análisis de flujo, las células se incubaron con anticuerpo monoclonal CD16 anti-ratón de rata (eBioscience, San Diego, CA) diluido en medio que contenía suero de caballo al 2,5% (Vector Laboratories) durante 15 minutos a 4°C para bloquear el receptor Fc e impedir tinción no específica. Las células se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-ratón de rata (eBioscience), incluidos CD3 conjugado con Alex Fluor® 647, CD4 conjugado con FITC o ficoeritrina (PE), CD25 conjugado con FITC y/o ficoeritrina-Cy7 (PE-Cy7) CD62L conjugado durante 45 minutos a 4°C y a continuación se lavó con PBS frío antes del análisis de flujo. Anticuerpos IgG anti-ratón de rata con isotipo coincidente (eBioscience) sirvieron como control negativo. Después de la tinción, las células se analizaron usando un CyAn ADP (DakoCytomation). Para la tinción de citocinas intracelulares, las células se tiñeron inicialmente para antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD4 conjugado con PE, CD25 conjugado con FITC y CD62L conjugado con PE-Cy7) y a continuación se prepararon usando un kit BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization (BD Biosciences, San José, CA). Posteriormente, las células se tiñeron con diferentes combinaciones de anticuerpos, incluyendo IL-4 conjugado con FITC, IL-10 conjugado con Alex Fluor® 647, IL-12 conjugado con Alex Fluor® 647, IFN- γ conjugado con azul Pacífico (eBioscience), biotinilado anti-TGF- β 1 Ab (Número de catálogo BAF240, R & D Systems, Minneapolis, MN). Para la tinción de TGF- β 1, las células se volvieron a teñir con FITC conjugado con estreptavidina (Vector Laboratories). El anti-Foxp3 conjugado con Alex Fluor 647 se adquirió de eBioscience. Para la clasificación de células para aislar diferentes poblaciones de células co-cultivadas CB-SC y controlar los linfocitos de ratón, o los esplenocitos de ratón recién aislados se incubaron inicialmente con CD16 Ab para bloquear la unión del receptor Fc y a continuación se incubaron con diferentes combinaciones de anticuerpos como FITC- CD4L conjugado y CD62L conjugado con PE-Cy7 durante 45 minutos a 4°C y sometido a clasificación celular usando MoFlo (DakoCytomation). Después de confirmar la pureza de la población (> 98%), Tregs CD4⁺CD62L⁺ fueron recolectados y utilizados en diferentes experimentos *in vitro* y *in vivo*.

50

PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión de diferentes mRNA se analizó por PCR cuantitativa en tiempo real. El RNA total se extrajo usando un kit Qiagen (Valencia, CA). Los cDNA de primera cadena se sintetizaron a partir de RNA total usando el kit de transcripción inversa QuantiTect según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). La PCR en tiempo real se realizó en cada muestra por triplicado utilizando el sistema de PCR en tiempo real rápido ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, CA), en las siguientes condiciones: 95°C durante 15 min, a continuación 40 ciclos de 95°C durante 15 s, y 60°C durante 60 s, utilizando los conjuntos RT²PCR Primer específico de gen validado para cada gen (SuperArray, Frederick, MD). Se determinó el nivel de expresión de cada gen, en relación con la β -actina como control interno. Para la matriz de PCR en tiempo real, se usó un kit de matriz de PCR Th1-Th2-Th3 de ratón según las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron utilizando un software de análisis de datos de matriz de PCR basado en web proporcionado por el fabricante (SuperArray).

60

Tratamiento in vivo

Para tratar ratones NOD diabéticos establecidos, los linfocitos de bazo aislados de ratones NOD hembra a las 6-8 semanas de edad se cultivaron conjuntamente con CB-SC como se describió anteriormente. Después del cocultivo durante 2-4 días, se recolectaron linfocitos flotantes para la clasificación celular como se describió anteriormente. Las Tregs CD4⁺CD62L⁺ purificadas (Tregs mCD4CD62L, 3×10⁶ células) se administraron por vía intraperitoneal en ratones NOD diabéticos evidentes en 100 µl de PBS/ratón (i.p., cerca del páncreas) para la primera dosis, seguido de una segunda dosis a 2 millones de células en 100 µl de PBS/ratón (i.p., cerca del páncreas) una semana más tarde. Los ratones diabéticos inyectados con el mismo volumen de PBS sirvieron como un control. Debido a una marcada disminución en la viabilidad de los linfocitos después de cultivo *in vitro* en ausencia de CB-SC, las Tregs CD4⁺CD62L⁺ ordenadas de linfocitos de bazo de ratón recién aislados sin cocultivo con CB-SC (Tregs CD4CD62L de control) sirvieron como control adicional. Los niveles de glucosa en sangre y los pesos corporales se monitorearon dos veces por semana hasta la finalización del experimento. Tres semanas después del inicio del tratamiento, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa como se describe a continuación (n = 3 para cada grupo). A las siete semanas después del inicio del tratamiento, los ratones de control fueron sacrificados para patología debido a hiperglucemia severa (> 600 mg/dL) y pérdida de peso corporal (> 20%). Los ratones libres de diabetes después del tratamiento con Tregs mCD4CD62L también se sacrificaron para exámenes histológicos. Para medir la insulina, se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola. El nivel de insulina en sangre se midió usando un kit de ensayo de inmunosorción enzimática (EIA) de insulina de ratón ultrasensible (Alpco Diagnostics, NH) siguiendo los protocolos del fabricante. La sensibilidad del ensayo es 0,019 ng/ml.

Prueba de Tolerancia a la Glucosa Intraperitoneal

Los ratones ayunaron durante la noche (12 h), se pesaron y se inyectaron intraperitonealmente con un bolo de glucosa (2 mg/g de peso corporal). A continuación se extrajo sangre de una vena de la cola a los 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después del desafío con glucosa. Los niveles de glucosa se midieron a partir de sangre de la vena de la cola completa como se describió anteriormente.

30 Inmunohistoquímica

Pancreata se fijó en formaldehído al 10%, se procesó y se incluyó en parafina. Las secciones en serie se cortaron a 5 µm de espesor. La inmunotinción se realizó como se describió previamente con modificaciones menores. Para bloquear la tinción no específica, las secciones se incubaron en un amortiguador que contenía suero de caballo al 2,5% (Vector Laboratories) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios incluyeron anticuerpos anti-insulina policlonales de cobaya Ab (DakoCytomation, Carpinteria, CA), mAb anti-glucagón de ratón (Sigma), mAb anti-TGF-β1 de ratón (número de catálogo MAB240, 25% de reactividad cruzada con forma latente de TGF-β1, sin reactividad cruzada con TGF-β2, < 2% de reactividad cruzada con TGF-β3 y TGF-β5, Sistemas de I & D), mAb anti-SMAD4 de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), mAb anti-Mi67 de conejo y marcador antimacrófago de rata F4/80 mAb (Novus Biologicals, Littleton, CO) y marcador de células dendríticas anti-ratón de hámster CD11c (BD Pharmingen). El segundo Abs incluyó IgG anti-conejillo de Indias de burro AffiniPure rojo-conjugado Texas, IgG anti-conejo de burro AffiniPure conjugado de rodamina, IgG anti-conejo de burro AffiniPure de AMCA, IgG anti-ratón de burro AffiniPure conjugado con FITC e IgG anti-ratón de burro AffiniPure conjugado con Cy5, IgG de hamster Anti-armenio de burro AffiniPure AMCA, e IgG anti-rata de burro AffiniPure Cy5-conjugado (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Para la tinción sin fluorescencia, después de la incubación con anticuerpos primarios, las células se tiñeron con un kit ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El Ab anti-conejo de caballo biotilado y el Ab anti-Guinea de cabra biotilado se adquirieron de Vector Laboratories (Burlingame, CA). Para controles con isotipo coincidente, se adquirió IgG_{1k} de ratón de BD Biosciences, suero de cobaya e IgG de conejo de Santa Cruz Biotechnology. Para portaobjetos pancreáticos, se contratiñó con hematoxilina (Sigma) después de la inmunotinción. Para cada experimento, se usaron anticuerpos con isotipo coincidente como controles negativos. Las células se fotografiaron con una cámara a color Zeiss Axiocam usando el microscopio de histología/fluorescencia digital Zeiss Axioskop para imágenes de inmunotinción HRP, con el microscopio confocal Zeiss LSM 510 META para imágenes de fluorescencia.

Para comparar la masa total de células β después de la inmunotinción con insulina Ab, se midió la masa de células β y se calculó mediante análisis morfométrico de recuento de puntos utilizando el software Image J.

Para puntuar la insulinitis, las secciones pancreáticas de cada grupo experimental se tiñeron con hematoxilina y eosina (tinción con H&E, Sigma). Se examinaron al menos 50 islotes de 200 secciones en serie de cada páncreas para evaluar el grado de infiltración de leucocitos. La insulina se clasificó en cinco categorías según el grado de infiltración de leucocitos en los islotes: sin insulinitis (sin infiltración), insulinitis leve (<25% de infiltración), insulinitis moderada (25% ~50% de infiltración), insulinitis grave (50%~75% de infiltraciones) e insulinitis profunda (> 75% de infiltración).

Para determinar la apoptosis de los leucocitos infiltrados, se aplicó y realizó un kit de detección de muerte celular in situ (fluoresceína) (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) utilizando el protocolo recomendado por el fabricante. Las criosecciones (8 µm de grosor) de pancreata congelada de ratones diabéticos tratados con Treg mCD4CD62L y el grupo de control se prepararon usando Microtome Cryostat HM 500 OM (Microm International GmbH). Para determinar qué tipo celular se volvió apoptótico, utilizamos diferentes marcadores, incluido el mAb CD4 conjugado con PE para células T CD4⁺, mAb CD8 conjugado con PE para células T CD8⁺, mAb B220 conjugado con PE para células B y mAb F4/80 de rata anti-ratón para macrófagos, respectivamente en combinación con tinción con TUNEL. Los mAbs para CD4, CD8 y B220 fueron de eBioscience. Las criosecciones se detectaron inicialmente con el kit de detección de muerte celular in situ (Roche), seguido de inmunotinción con diferentes Abs monoclonales e imágenes con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META. Después de la doble tinción, las células positivas se cuantificaron directamente en el microscopio confocal y/o en las imágenes. Criosecciones incubadas con solución marcada sin mezcla de reacción TUNEL y/o IgG con isotipo coincidente sirvieron como controles negativos.

15 **Ensayo de Citoquinas**

Los niveles de citoquinas en plasma de ratón se cuantificaron utilizando kits comerciales de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Compramos el kit ELISA IFN- γ y de ratón de Biolegend Inc. (San Diego, CA), los kits ELISA IL-4 e IL-10 de ratón de Assay Designs (Ann Arbor, MI) y el kit ELISA TGF- β 1 de Promega (Madison, WI).

20 **Ejemplo 2,**

Regulación de Linfocitos T Reguladores de Ratón

25 Para investigar el potencial terapéutico de Tregs en T1D, empleamos un modelo experimental de ratón diabético no obeso (NOD). Inicialmente, probamos el cocultivo de linfocitos derivados de bazo de ratón CB-SC y NOD y descubrimos que el cocultivo con CB-SC no estimulaba significativamente la proliferación de linfocitos de ratón en diferentes proporciones de linfocitos CB-SC (1:5, 1:10 y 1:20) FIG. 4A, $p=0,25$, $p=0,15$, $p=0,16$ respectivamente), que es similar al cocultivo de CB-SC y linfocitos humanos. Los datos representaron la media \pm d.s. de cuatro experimentos
30 independientes.

A continuación, analizamos los cocultivos de CB-SC y linfocitos de para detectar la presencia de Tregs, incluyendo Tregs CD4⁺CD25⁺ convencionales y Treg CD4⁺Foxp3⁺ y Treg CD4⁺CD62L⁺. No encontramos diferencias significativas en Treg CD4⁺CD25⁺ y Treg CD4⁺Foxp3⁺ en linfocitos de bazo de ratón totales que se cultivaron solos o con CB-SC.

35 En contraste, el porcentaje de Treg CD4⁺CD62L⁺ se incrementó aproximadamente 5 veces después del cocultivo con CB-SC, FIG. 4B. La citometría de flujo adicional reveló que solo una proporción muy pequeña de estas Tregs CD4⁺CD62L⁺ fue CD4⁺CD25⁺CD62L⁺Foxp3⁺ positiva (FIG. 4C) y este porcentaje no fue diferente entre los linfocitos cocultivados con o sin CB-SC (0,11 \pm 0,04% vs 0,10 \pm 0,03%, $P=0,44$). Posteriormente nos centramos en Tregs CD4⁺CD62L⁺, que se vieron afectadas principalmente por el cocultivo con CB-SC (Tregs CD4⁺CD62L⁺ moduladas por
40 CB-SC designadas, Tregs mCD4CD62L). Los datos en B-C son representativos de tres a cinco experimentos.

Para documentar la modulación de Tregs CD4⁺CD62L⁺ por CB-SC después de cocultivo *in vitro*, las citocinas intracelulares relacionadas con las respuestas inmunitarias T (Th)1 y Th2 auxiliares se midieron usando análisis de flujo (FIG. 4D). Los resultados demostraron que el nivel de IL-4 estaba significativamente regulado por disminución
45 ($p=0,004$), mientras que los niveles de IL-10, IL-12 y TGF- β 1 estaban regulados por incremento en Tregs mCD4CD62L en comparación con Tregs CD4CD62L de control ($p=0,001$, $p=0,0001$, y $p=0,006$ respectivamente). Por el contrario, la expresión de IFN- γ no cambió después del cocultivo con CB-SC (FIG. 4D, $p=0,5$). A continuación, investigamos la expresión de genes relacionados con células Th1-Th2-Th3 mediante el uso de una matriz cuantitativa de PCR en tiempo real en las Tregs CD4⁺CD62L⁺ purificadas después del cocultivo con CB-SC. Los resultados demostraron que
50 las Tregs mCD4CD62L mostraban una marcada regulación por disminución de genes relacionados con células Th, incluidas múltiples citocinas y sus receptores, quimiocinas y sus receptores, moléculas de la superficie celular, junto con moléculas de la vía de señalización y factores de transcripción. Estos datos indican claramente que el co-cultivo *in vitro* con CB-SC provoca modificaciones sustanciales de la expresión génica en Tregs CD4⁺CD62L⁺ de ratón, específicamente para genes de citocinas y quimiocinas relacionados con la función.

55 **Tregs CD4⁺CD62L⁺ moduladas por CB-SC Corrigen la Hiper glucemia en Ratones**

A continuación, se trataron ratones NOD diabéticos (hembras, a las 24-28 semanas de edad) con Tregs mCD4CD62L (total 5 millones de células/ratón, i.p., n=8 ratones) durante 5-20 días después del diagnóstico de T1D para determinar
60 su potencial terapéutico. Las Tregs CD4CD62L de control en la misma cantidad de células (i.p., n=5 ratones) y el vehículo PBS (total 200 µl/ratón, i.p., n=5 ratones) sirvieron como controles. Notablemente, encontramos que el tratamiento con mCD4CD62L Tregs restableció la euglucemia en estos ratones diabéticos (6/8 ratones) (FIG. 5A). Sin

embargo, el tratamiento con las Tregs CD4CD62L de control o PBS no logró reducir la hiperglucemia en ratones diabéticos (5/5, 5/5 ratones respectivamente) (FIG. 5B). Los ratones diabéticos que se habían vuelto euglucémicos después del tratamiento con Tregs mCD4CD62L también mostraron una prueba mejorada de tolerancia a la glucosa (IPGTT), similar a la de los ratones NOD no diabéticos a las 7 semanas (FIG. 5B). Sin embargo, los ratones diabéticos tratados con PBS o Tregs CD4CD62L de control mantuvieron altos niveles de glucosa (> 500 mg/dL) sin ninguna regulación descendente observable (FIG. 5B). Además, monitoreamos los niveles de insulina en sangre 6 semanas después del tratamiento con Tregs mCD4CD62L. Los resultados mostraron que la insulina en ratones diabéticos tratados con el Tregs CD4CD62L de control o vehículo PBS era indetectable por ELISA (sensibilidad de 0,019 ng/ml para el kit ELISA, FIG. 5C). Estos ratones tuvieron que ser sacrificados debido a hiperglucemia severa (BG > 600 mg/dL) y pérdida de peso corporal (> 20%) según el protocolo aprobado por el Comité de Cuidado Animal (FIG. 5D). En contraste, los niveles de insulina en sangre en ratones NOD diabéticos tratados con Tregs mCD4CD62L aumentaron significativamente (FIG. 5D, $p=0,0025$).

A los 45 días después del tratamiento, sometimos pancreata a un análisis histológico y evaluamos la masa total de células β seguida de inmunotinción con insulina Ab en secciones pancreáticas en serie. El análisis morfométrico demostró que el tratamiento con Tregs mCD4CD62L aumentó significativamente la masa total de células β (FIG. 5E, $p=0,0026$). En contraste, la masa de células β fue notablemente más baja después del tratamiento con PBS del vehículo o el tratamiento con Tregs CD4CD62L de control (FIG. 5E). Para comprender el mecanismo del aumento en la masa total de células β , determinamos la expresión de un marcador nuclear de proliferación celular Ki67 en islotes pancreáticos. La inmunotinción doble con insulina y Ki67 Abs reveló que 20 ± 8 células β /islote expresaron Ki67 en islotes pancreáticos de ratones tratados con Treg mCD4CD62L (FIG. 5F), que fue mucho mayor que en islotes pancreáticos de ratones tratados con Tregs CD4CD62L de control ($1\pm 0,4$) ($p=0,0014$). Esto sugiere que la proliferación *de novo* de células β explica el notable aumento en la masa total de células β . Además, la doble inmunotinción con insulina marcadora de células β y glucagón marcador de células α reveló que los islotes pancreáticos en ratones diabéticos tratados con Tregs mCD4CD62L mostraron un patrón similar de distribución de células α y β como el observado en islotes normales de ratones diabéticos NOD. Sin embargo, la arquitectura de los islotes se destruyó por completo con la desaparición casi completa de las células β en los ratones diabéticos tratados con Tregs CD4CD62L de control. Por lo tanto, el tratamiento con Tregs mCD4CD62L puede corregir la hiperglucemia de ratones T1D promoviendo la regeneración de células β y la reconstrucción de la arquitectura de las células de los islotes.

Reversión de Insulinitis y Disfunción Inmune en ratones NOD

Para establecer si las Tregs mCD4CD62L ejercen una influencia inmunosupresora en las células T efectoras autorreactivas, realizamos un análisis histológico pancreático y puntuamos la insulinitis a los 45 días después del tratamiento. Las evaluaciones histológicas mostraron que aproximadamente el 80% de las células β de los islotes (insulinitis profunda) se destruyeron en ratones NOD diabéticos antes del tratamiento. Seis semanas después del tratamiento, encontramos que en ratones diabéticos que recibieron Tregs mCD4CD62L, el 36% de los islotes no tenían o tenían pocos signos de infiltración de células inflamatorias; el 20% de los islotes presentaban insulinitis leve; el 15% de los islotes presentaban insulinitis moderada; el 18% de los islotes tenía insulinitis grave y solo el 11% de los islotes presentaba insulinitis profunda (FIGs. 6A y 6B). Los islotes libres de insulinitis eran de menor tamaño y positivos para el marcador de proliferación Ki67 (datos no mostrados), lo que sugiere que estos islotes pueden haberse generado recientemente. Por el contrario, todos los islotes pancreáticos en ratones diabéticos que recibieron Tregs CD4CD62L de control mostraron infiltración masiva de células inflamatorias y destrucción severa de la arquitectura pancreática (FIG. 6B), y tenían pocas o ninguna célula positiva a la insulina presente. De manera similar, el examen histológico pancreático demostró que esos dos ratones (2/8 ratones) que eran resistentes al tratamiento con Tregs mCD4CD62L también mostraron insulinitis profunda (datos no mostrados) después de 45 días de observación. Los datos representativos son de 6 ratones diabéticos (6/8 ratones) sensibles al tratamiento con Treg mCD4CD62L con euglucemia. Los islotes pancreáticos se puntuaron para el porcentaje de infiltración de células mononucleares después de la inmunotinción de insulina y la contratinción con hematoxilina.

Para comprender el mecanismo molecular subyacente a la reducción de la insulinitis, medimos los niveles plasmáticos de citocinas Th1/Th2 mediante ELISA. Encontramos que la citocina Th1 IFN- γ y la citocina Th2 IL-4 se redujeron considerablemente en el plasma de ratones diabéticos tratados con Treg mCD4CD62L en relación con los ratones diabéticos tratados con Treg CD4CD62L de control ($P=0,017$, FIG. 6C, $P=0,018$, FIG. 6D, respectivamente). En contraste, los ratones diabéticos que recibieron Tregs mCD4CD62L mostraron un aumento marcado en el nivel de IL-10 en plasma en comparación con los tratados con Tregs CD4CD62L de control ($P=0,016$) y ratones no diabéticos NOD a la edad de 6 semanas ($P=0,014$). Los datos se muestran como media \pm d.s. de los niveles de citocinas en plasma de ratón de tres experimentos. Además, el nivel plasmático de TGF- β 1 fue significativamente elevado en ratones diabéticos tratados con Treg mCD4CD62L en comparación con ratones diabéticos tratados con Treg CD4CD62L de control ($P=0,041$). Estos datos sugieren que tanto IL-10 como TGF- β 1 pueden contribuir a una inducción de tolerancia inmune después del tratamiento con Tregs mCD4CD62L. Estos datos demuestran que la exposición al CB-SC indujo cambios profundos en las Tregs mCD4CD62L que ayudaron a restaurar la arquitectura

"normal" de los islotes y la función de las células β , lo que resultó en la supresión de la diabetes.

TGF- β 1 es una de las citocinas mejor caracterizadas que contribuyen a la inducción de la supresión inmune y al mantenimiento de la auto-tolerancia. Dilucidar el mecanismo molecular *de novo* subyacente a la protección de las células de los islotes β después del tratamiento con Tregs mCD4CD62L, determinamos la expresión de TGF- β 1 en islotes pancreáticos por inmunohistoquímica además de la medición de TGF- β 1 en plasma. Los resultados demostraron que TGF- β 1 se presentó a un nivel más alto en islotes pancreáticos de ratones diabéticos tratados con Treg CD4CD62L en comparación con ratones diabéticos tratados con Treg CD4CD62L de control. La tinción de células positivas para TGF- β 1 mostró dos patrones: uno se distribuyó entre las células β del islote, con un número de células positivas promedio de 14 ± 9 células/islote, y otro se ubicó alrededor de las células β del islote. Es importante destacar que encontramos que estas células positivas para TGF- β 1 circundantes (negativas para el marcador de macrófagos F4/80, pero positivas para el marcador de células dendríticas CD11c, datos no mostrados), junto con su TGF- β 1 liberado en la matriz (tinción débil), formó un anillo que rodea los islotes pancreáticos. Este anillo puede proteger a los islotes de nueva generación contra el ataque al inducir la apoptosis de los linfocitos efectores auto-agresivos, según lo determinado por tinción de la terminación de desoxinucleotidil transferasa dUTP (TUNEL) (58 ± 23 TUNEL)⁺ leucocitos infiltrados en el grupo tratado con Treg mCD4CD62L vs. 9 ± 3 TUNEL⁺ leucocitos infiltrados en el grupo tratado con Treg CD4CD62L de control, $p=0,02$). Para aclarar qué tipo celular se volvió apoptótico, realizamos una doble tinción con diferentes marcadores celulares, incluido CD4 para células T CD4⁺, CD8 para células T CD8⁺, B220 para células B y F4/80 para macrófagos, respectivamente, en combinación con tinción con TUNEL. Descubrimos que el tratamiento con Tregs mCD4CD62L aumentó la apoptosis de las células T infiltradas, las células B y los macrófagos en comparación con el tratamiento de Treg CD4CD62L de control ($p=0,0034$, $p=0,024$, $p=0,041$ y $p=0,032$ respectivamente). Sin embargo, en comparación con los otros tres tipos celulares, las células T CD4⁺ mostraron un porcentaje mucho mayor de células apoptóticas (FIG. 7). Por lo tanto, estos datos sugieren que el tratamiento con Tregs mCD4CD62L mejora la expresión de TGF- β 1 en islotes pancreáticos que pueden contribuir a la protección local de los islotes pancreáticos de nueva generación contra la destrucción de células inmunitarias autorreactivas. Los datos representaron la media \pm d.s. de cinco experimentos.

Ejemplo 3

30 Modulación inmune in vitro

CB-SC puede modular la función de Tregs CD4+CD62L⁺ que conducen a la prevención y reversión de la diabetes tipo 1 causada por autoinmunidad (T1D) en el modelo de ratón NOD. Examinamos la modulación inmune de CB-SC en Tregs CD4+CD62L⁺ de pacientes con T1D en presencia de mitógeno PHA (FIG. 8A y FIG. 8B). Los resultados de tinción de citocinas intracelulares demostraron que el nivel de IL-5 estaba significativamente regulado por disminución ($p=0,007$), mientras que IL-10 y TGF-1 estaban regulados por incremento en Tregs CD4+CD62L⁺ después del cocultivo con CB-SC en comparación con el tratamiento de control con PHA ($p=0,0018$ y $p=0,019$ respectivamente), consistente con las Tregs CD4+CD62L⁺ del ratón NOD. En contraste, las expresiones IL-4, IL-12 e IFN no cambiaron después del cocultivo con CB-SC (FIG. 8A). Además, el factor de transcripción Foxp3, un marcador específico para Tregs, también se reguló al alza 2,7 veces después del tratamiento con PHA+CB-SC en comparación con el tratamiento de control con PHA (FIG. 8B). Por lo tanto, estos datos indican que CB-SC puede modular las Tregs CD4+CD62L⁺ de pacientes con diabetes tipo 1.

Para determinar el potencial terapéutico de CB-SC en T1D, exploramos la modulación directa de CB-SC en clones de células T CD4+específicas de células de islote GAD generados a partir de pacientes con T1D. Los resultados demostraron que la proliferación de este clon de células T estimulado con células presentadoras de antígeno (APC) y diferentes dosis de péptido GAD disminuyeron marcada y específicamente en presencia de CB-SC en comparación con el grupo control en ausencia de CB-SC (FIG 8C). Por lo tanto, esto indica que CB-SC tiene el potencial de eliminar las células T patógenas. Los datos se muestran como desviación estándar media de tres experimentos independientes.

Carboxipeptidasa M (CPM) y receptor de brandiquinina B1

Encontramos que CB-SC expresaba carboxipeptidasa M de membrana (CPM), receptor de brandiquinina B1 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (FIG. 9A). Se demostró que la generación de sustrato de arginina mediada por carboxipeptidasa M para iNOS mejora la producción de NO en macrófagos y células endoteliales. Los resultados mostraron que la producción de NO aumentó en presencia del activador B1R des-Arg 10-bradiquinina (DALKD), pero se inhibió en combinación con el inhibidor específico de iNOS 1400W o un antagonista selectivo del receptor B1 [Des-Arg10, Leu9] kallidin (DAKD) (FIG. 9B y FIG. 9C). El bloqueo con el inhibidor específico de carboxipeptidasa de tipo B, el ácido 2-mercaptometil-3-guanidinoetilpropanoico (MGTA) podría bloquear la producción de NO en CB-SC y revertir la supresión de CB-SC en los linfocitos alogénicos, similar al uso del inhibidor iNOS 1400W.

Para examinar los efectos de contacto entre células y la contribución de CPM y B1R a la modulación inmune de CB-SC en Tregs humanas, realizamos experimentos de cocultivo en presencia del inhibidor específico de CPM MGTA y el inhibidor específico de B1R DALKD. Los linfocitos en placa en pocillos trans sirvieron como controles. Los resultados demostraron que el bloqueo de CPM y/o B1R podría disminuir el porcentaje positivo de Tregs CD4+CD25+CD62L+CD69+(FIG. 9D). Los datos son representativos de cinco experimentos.

Expresión del regulador autoinmune (Aire) en CB-SC

El Aire juega un papel importante en la tolerancia inmune al mediar la expresión ectópica de autoantígenos periféricos y la delección de células T autorreactivas. Para explorar los mecanismos moleculares subyacentes a la modulación inmune de CB-SC, encontramos que CB-SC expresa Aire tanto en los niveles de genes (FIG. 10A) como de proteínas (FIG. 10B). Esto sugiere que Aire en CB-SC puede contribuir a la modulación inmune. Los datos son representativos de tres preparaciones de CB-SC.

Para explorar la acción de Aire en CB-SC, se han administrado tres pares de siRNA específico de Aire para derribar la expresión del gen de Aire usando Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) (FIG.11A). Los datos son representativos de cinco preparaciones de CB-SC. Western blot reveló que el 70% de la proteína Aire puede ser eliminada en presencia de 50 nM siRNA aire en comparación con el siRNA de control negativo (FIG. 11B). En particular, Western blot también demostró que las proteínas CPM y PD-L1 también estaban reguladas por disminución en presencia de siRNA aire. Western blot también muestra la regulación descendente de la proteína CPM y PD-L1 (FIG. 11B). Esto implica que Aire puede regular sus expresiones génicas a niveles transcripcionales. Los datos son representativos de tres experimentos.

Para examinar más a fondo la contribución de Aire a la modulación inmune, probamos el marcador Treg humano Foxp3 en presencia de Aire siRNA y control negativo siRNA. El análisis de flujo demostró que la expresión de Foxp3 disminuyó notablemente en presencia de siRNA Aire en relación con siRNA de control ($p=0,028$, FIG. 11C). Por lo tanto, estos datos indican que la expresión de Aire en CB-SC contribuye a la modulación inmune. Los datos representaron DS media de tres experimentos.

Si bien la presente invención se ha descrito en términos de procedimientos y composiciones específicos, se entiende que los expertos en la materia tendrán variaciones y modificaciones al considerar la presente invención. Los expertos en la materia apreciarán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, otras características y ventajas de la invención basadas en las realizaciones descritas anteriormente. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ingeniería genética e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un biorreactor para modular los linfocitos y suprimir las células T autorreactivas, que comprende:
 - 5 una cámara que tiene al menos una superficie de sustrato cargada positivamente e hidrófoba; una población de células madre que no se deriva de la masa celular interna de un blastocisto unido a la superficie del sustrato, donde las células madre están **caracterizadas por**: (a) mostrar características de células madre embrionarias; (b) mostrar características de células hematopoyéticas como positivas para el antígeno común de leucocitos CD45; (c) no expresar el marcador CD34; (d) mostrar baja inmunogenicidad; o (e) expresar un regulador autoinmune;
 - 10 un conducto de entrada para introducir linfocitos en la cámara para el cultivo conjunto con las células madre, y los linfocitos están libres de plasma antes de ser introducidos en la cámara, y un conducto de salida para extraer los linfocitos tratados después del cocultivo con las células madre,
 - 15 donde las células madre son capaces de, y están configuradas para, modular los linfocitos y suprimir las células T autorreactivas cocultivando con los linfocitos introducidos que están libres de plasma.
2. El biorreactor de la reivindicación 1, donde la superficie del sustrato comprende al menos una capa de lámina, una pluralidad de microportadores, una capa de membrana permeable o poliestireno hidrófobo.
- 20 3. El biorreactor de la reivindicación 1, donde las células madre exhiben una confluencia de al menos 50%, al menos 80% o al menos 90% en la superficie del sustrato.
4. El biorreactor de la reivindicación 1, donde la cámara está construida para permitir o impedir el contacto
 - 25 célula a célula entre las células madre y los linfocitos.
5. El biorreactor de la reivindicación 1, donde las células madre se obtienen de sangre del cordón umbilical o sangre periférica.
- 30 6. El biorreactor de la reivindicación 1, donde las células madre son alogénicas o autólogas a los linfocitos.
7. El biorreactor de la reivindicación 1, donde una población de al menos 10^6 células madre están presentes dentro de la cámara.
- 35 8. El biorreactor de la reivindicación 1, donde la cámara tiene múltiples superficies de sustrato cargadas positivamente e hidrófobas, con las células madre unidas a las múltiples superficies de sustrato.
9. Un sistema para inhibir un trastorno autoinmune, que comprende:
 - 40 un conducto de fluido para extraer sangre de un sujeto;
 - un aparato de aféresis para separar linfocitos de la sangre extraída;
 - un biorreactor que comprende una cámara que tiene al menos una superficie de sustrato hidrofílica y cargada positivamente, una población de células madre que no se deriva de la masa celular interna de un blastocisto unido a la superficie del sustrato, un conducto de entrada para introducir linfocitos en la cámara y un conducto de salida
 - 45 configurado para extraer linfocitos tratados después del cocultivo con las células madre; y un conducto de fluido configurado para devolver los linfocitos tratados al sujeto,

donde las células madre están **caracterizadas por**: (a) mostrar características de células madre embrionarias; (b) mostrar características de células hematopoyéticas como positivas para el antígeno común de leucocitos CD45; (c) no expresar el marcador CD34; (d) mostrar baja inmunogenicidad; o (e) expresar un regulador autoinmune;
- 50 10. El sistema de la reivindicación 9, donde la superficie del sustrato del biorreactor comprende al menos una capa de lámina, una pluralidad de microportadores, una capa de membrana permeable o poliestireno hidrófobo.
- 55 11. El sistema de la reivindicación 9, donde las células madre unidas a la superficie del sustrato exhiben una confluencia de al menos 50%, al menos 80% o al menos 90%.
12. El sistema de la reivindicación 9, donde la cámara del biorreactor está construida para permitir o impedir el contacto célula a célula entre las células madre y los linfocitos.
- 60 13. El sistema de la reivindicación 9, donde las células madre unidas a la superficie del sustrato se obtienen de sangre del cordón umbilical o sangre periférica.

14. El sistema de la reivindicación 9, donde las células madre unidas a la superficie del sustrato son alogénicas o autólogas a los linfocitos.
- 5 15. El sistema de la reivindicación 9, donde las células madre unidas a la superficie del sustrato se cultivan a una población de al menos 10^7 células dentro de la cámara.
16. El sistema de la reivindicación 9, donde los linfocitos introducidos en la cámara son células mononucleares de sangre periférica o médula ósea.
- 10 17. El sistema de la reivindicación 9, donde las células madre se cultivan en múltiples capas superficiales de sustrato dentro de la cámara.
18. El sistema de la reivindicación 9, donde el sistema es un sistema de circuito cerrado.
- 15 19. Procedimiento para educar a las células inmunes autorreactivas utilizando células madre, **caracterizado porque** el procedimiento comprende o consta de las siguientes etapas
- Extraer sangre de un sujeto que necesita tratamiento de un trastorno autoinmune debido a células T autorreactivas y aislar linfocitos de la sangre extraída.
 - Cultivar una población de células madre que no se deriva de la masa celular interna de un blastocisto en el biorreactor de la reivindicación 1,
 - Exponer los linfocitos aislados a las células madre cultivadas introduciendo los linfocitos aislados en el reactor y cocultivando los linfocitos y las células madre, preferiblemente el biorreactor, de modo que las células T reguladoras (Treg) se activen para suprimir las células T autorreactivas.
- 20
- 25

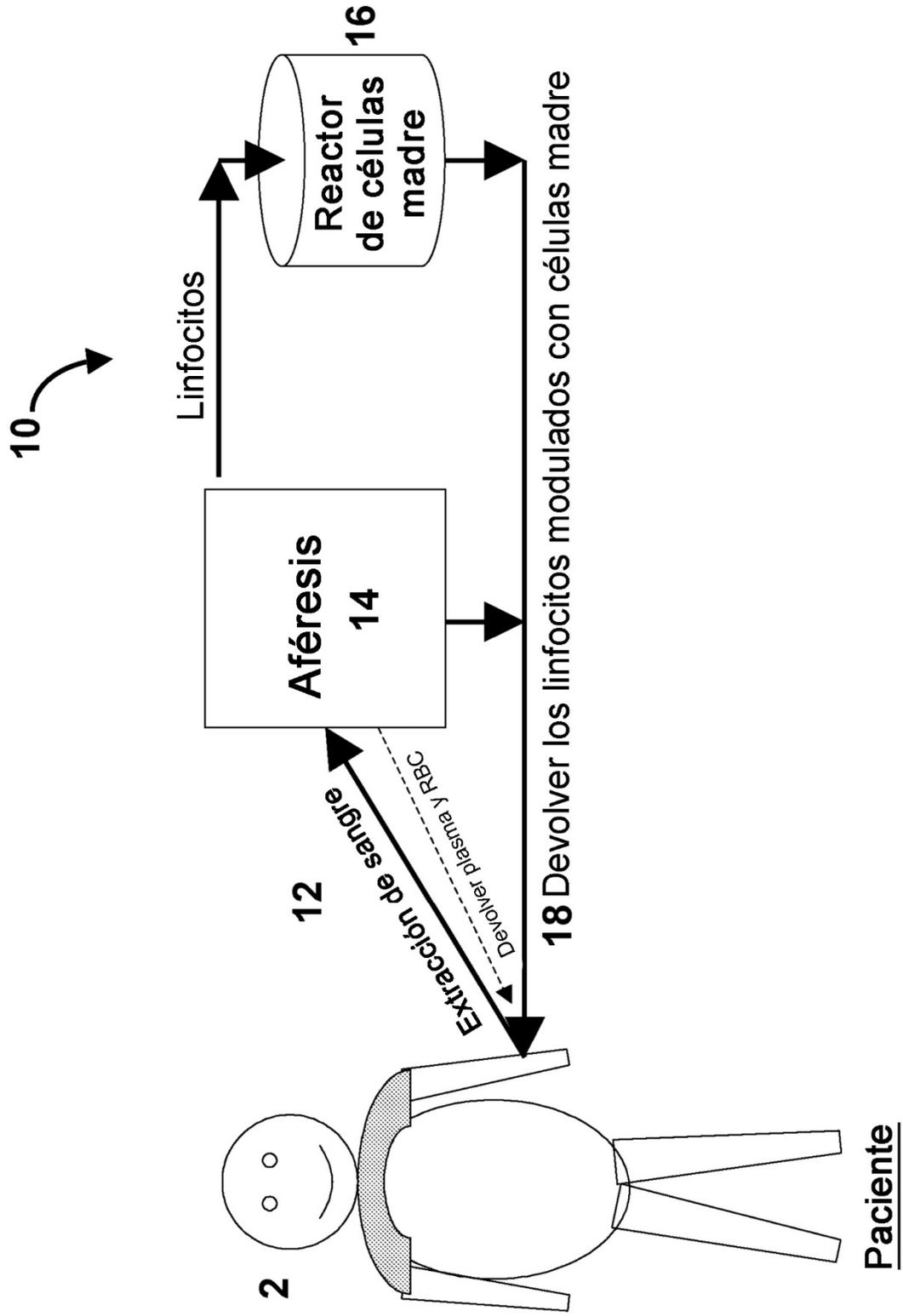


Figura 1

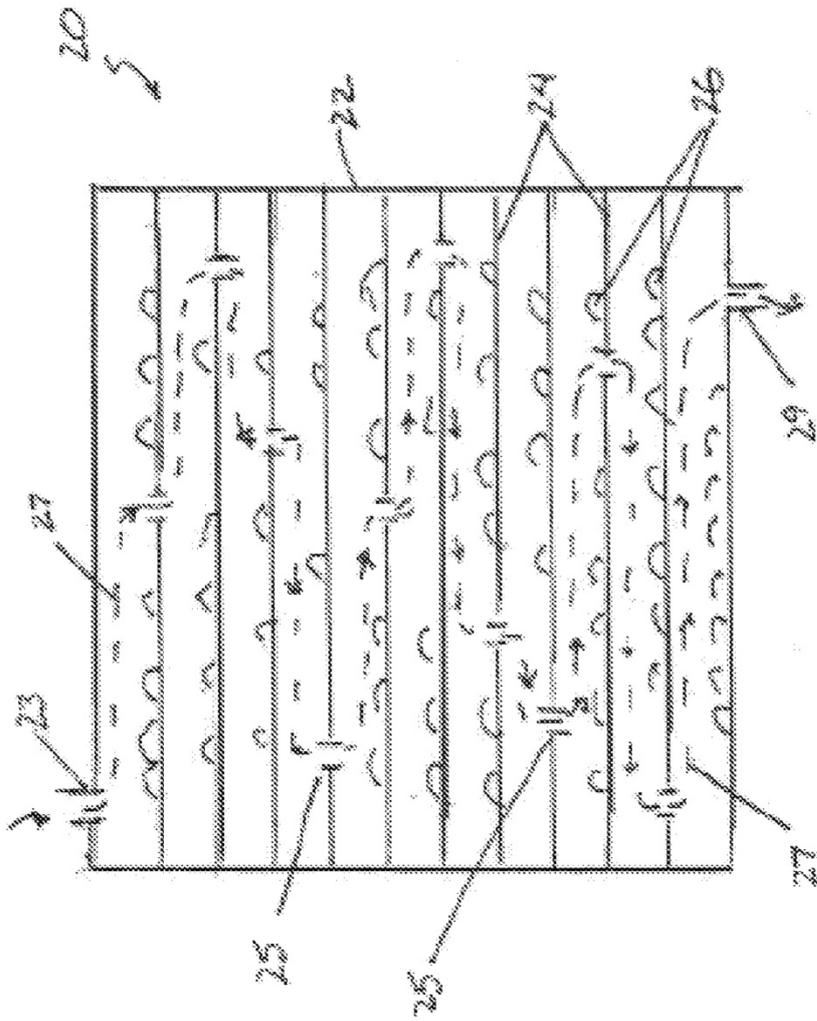


Figura 2

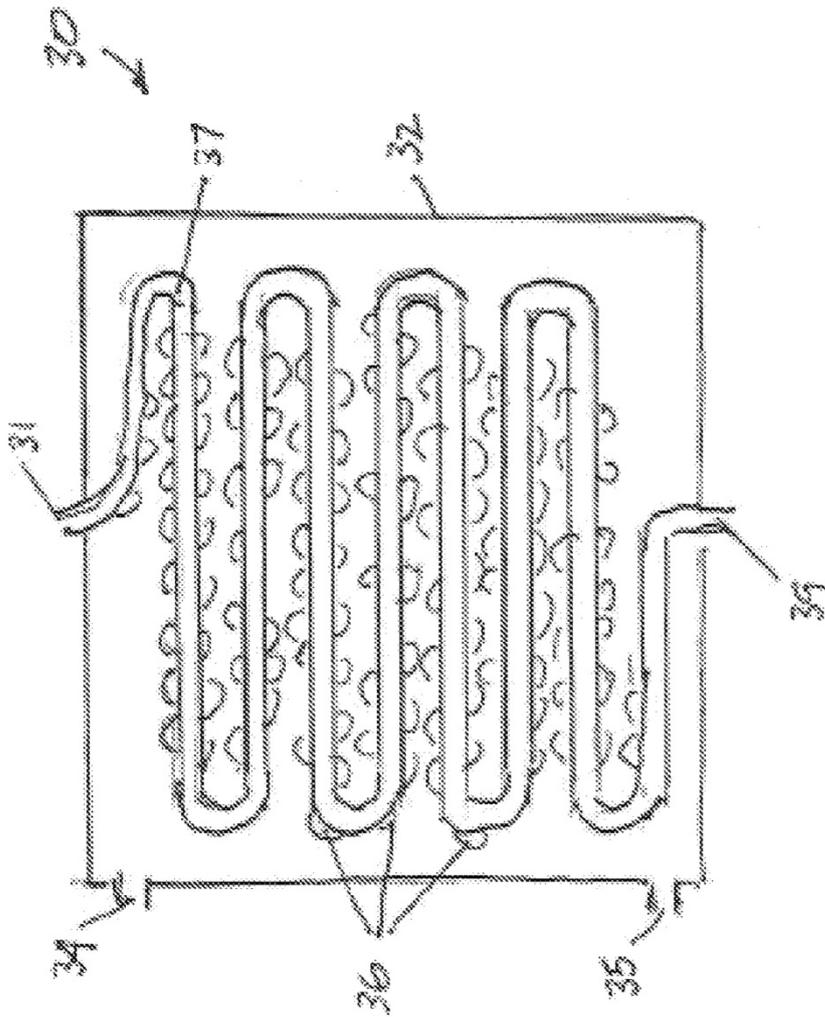


Figura 3

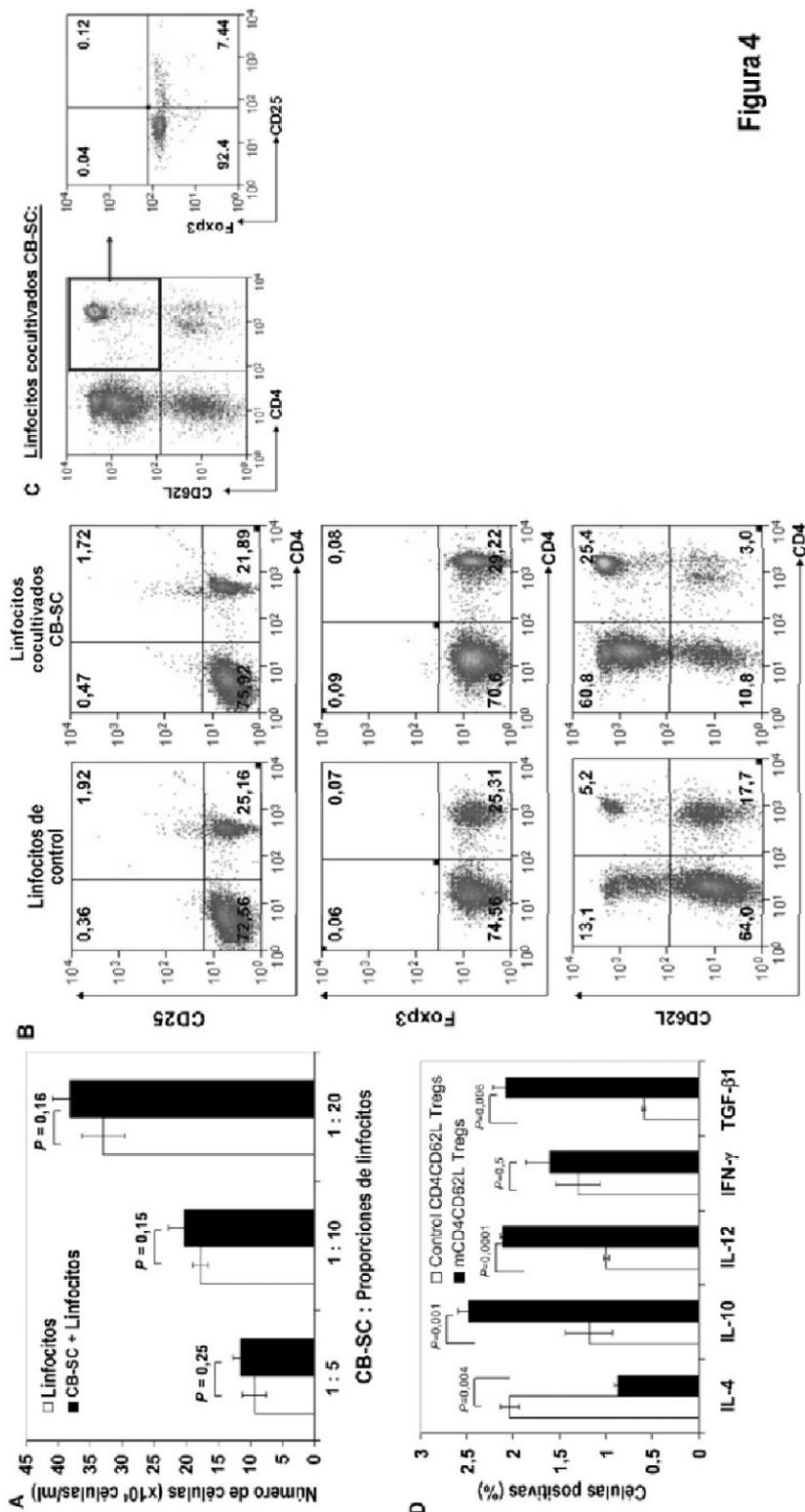


Figura 4

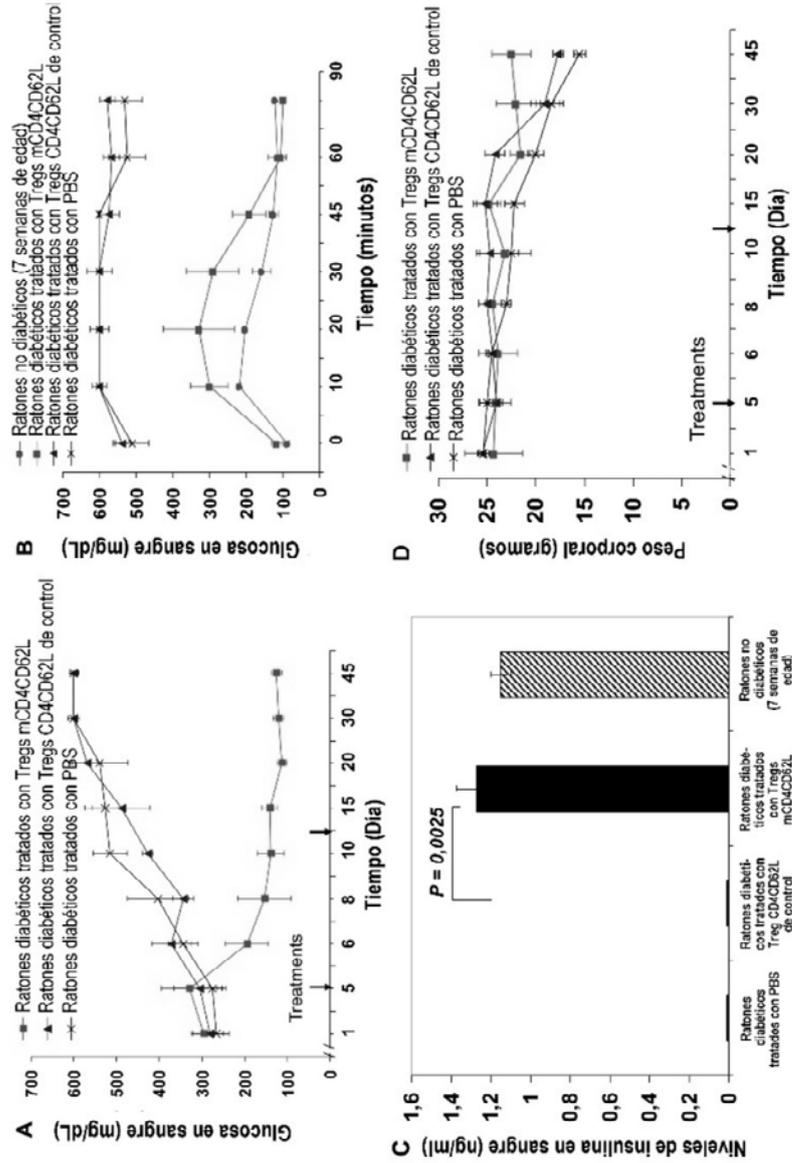


Figura 5