(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 690 212**

(51) Int. CI.:

A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/30 (2015.01)
A61K 35/34 (2015.01)
A61K 35/36 (2015.01)
A61K 35/407 (2015.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 35/39 (2015.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2012 PCT/US2012/067464**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13082543**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2012 E 12854438 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2785359**

(54) Título: **Células estromales mesenquimales y usos relacionados con las mismas**

(30) Prioridad:

30.11.2011 US 201161565358 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2018

(73) Titular/es:

ASTELLAS INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE (100.0%)
33 Locke Drive
Marlborough, MA 01752, US

(72) Inventor/es:

LANZA, ROBERT;
KIMBREL, ERIN, ANNE;
CHU, JIANLIN y
KOURIS, NICHOLAS, ARTHUR

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Células estromales mesenquimales y usos relacionados con las mismas

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de terapias basadas en células para reducir las manifestaciones de una patología tal como la caracterizada por una respuesta inmunitaria inadecuada en un sujeto, y también para afectar al origen de una patología de modo que se devuelve la anomalía que define la patología a una situación normal. En particular, la presente invención se refiere a células estromales mesenquimales (MSC) que retienen un fenotipo de células "jóvenes" que da una alta potencia en la reducción de una manifestación de una patología en un sujeto.

Antecedentes de la invención

Muchas patologías se manifiestan clínicamente a través de respuestas inmunitarias indeseadas o excesivas dentro de un hospedante, p. ej., rechazo de trasplantes, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios. Se han desarrollado terapias inmunosupresoras para tratar los síntomas, pero no la causa subyacente de las patologías caracterizadas por respuestas inmunitarias excesivas. Estas terapias son eficaces para modular por disminución la función inmunitaria y, como tales, tienen potenciales acontecimientos adversos graves, que incluyen cáncer e infección oportunista, así como efectos secundarios como cataratas, hiperglucemia, hematomas y nefrotoxicidad de agentes tales como la prednisona, ciclosporina y tacrolimus.

Aunque se han desarrollado terapias que no suprimen todo el sistema inmunitario, también hay limitaciones asociadas con estos regímenes. Estos tratamientos inmunomoduladores se dirigen a un punto de intervención más estrecho dentro del sistema inmunitario y, como tal, tienen efectos secundarios diferentes, a veces menos graves. Los ejemplos de dichas terapias inmunomoduladoras incluyen el uso de anticuerpos, p. ej., anti-CD3 o anti-IL2R. Aunque tiene éxito para inducir un estado intensificado de falta de reacción, la retirada de estas terapias inmunomoduladoras da como resultado una vuelta a la patología no deseada.

Las células madre mesenquimales (MSC) son citoblastos multipotentes con capacidad de autorreproducirse y la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos, entre otros linajes de células mesenquimales. En los últimos años, la intensa investigación sobre la potencial diferenciación multilinaje y las propiedades inmunomoduladoras de las MSC humanas han indicado que estas células se pueden usar para tratar una variedad de afecciones clínicas, que incluyen trastornos inmunológicos así como enfermedades degenerativas. En consecuencia, el número de estudios clínicos con MSC ha aumentado constantemente para una amplia variedad de afecciones: enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), infarto de miocardio y enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, entre otros. Actualmente, los programas clínicos que utilizan MSC se basan en el aislamiento de estas células de fuentes de adultos y sangre del cordón umbilical. Las altas dosis de células necesarias para aplicaciones clínicas de las MSC (hasta varios millones de células por kg de paciente) exigen un protocolo de expansión fiable, reproducible y eficaz, capaz de generar un gran número de células a partir de esos aislados de la fuente del donante.

Sin embargo, para alcanzar los números de células clínicamente significativas para terapia celular y aplicaciones de ingeniería de tejidos, la expansión ex vivo de MSC es obligatoria. Como durante el envejecimiento in vivo, los pases celulares ex vivo secuenciales de MSC de sangre de cordón umbilical, fuentes fetales y de adultos (como médula ósea o tejidos de adiposo) pueden causar estrés replicativo, anomalías cromosómicas u otros defectos celulares estocásticos, dando como resultado la pérdida progresiva del potencial proliferativo, clonogénico y de diferenciación de las MSC expandidas, lo que en última instancia puede poner en peligro la seguridad y eficacia clínica de las MSC. El uso de MSC senescentes en el tratamiento no debe subestimarse puesto que las células pierden parte de su potencial de diferenciación y su perfil secretor también se ve alterado. Se encontró que la senescencia de las MSC durante el cultivo induce la detención del crecimiento celular, con acortamiento de telómeros y se describió una disminución continua del potencial de diferenciación adipogénico para las MSC de la médula ósea (MSC) a lo largo de pases crecientes, mientras que aumentaba la tendencia a la diferenciación en el linaje osteogénico.

Por consiguiente, quedan por resolver algunos problemas esenciales antes de la aplicación clínica de las MSC. Las MSC derivadas de los ESC se pueden generar en cantidades suficientes y de una manera altamente controlable, lo que alivia los problemas con las fuentes dependientes de donantes. Dado que no se requiere el injerto a largo plazo de MSC, básicamente no hay preocupación por el mal apareamiento del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) [7,8]. En la técnica, las MSC derivadas de ESC se han obtenido a través de diversos métodos que incluyen el cocultivo con células murinas OP9 o procedimientos de selección manual [9-13]. Sin embargo, estos métodos son tediosos y generan MSC con bajo rendimiento, calidad variable y falta de potencia. Además, es conveniente maximizar la potencia de las células inyectadas, tanto en términos de poder proporcionar un producto celular con un mejor índice terapéutico, capacidad para ser usado en una dosis menor (número de células) con respecto a MSC derivadas de CB, derivadas de MB o derivadas de tejido adiposo, como/o la capacidad de las MSC para proporcionar una terapia viable para enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias para las que las MSC derivadas de CB, derivadas de MB o derivadas de tejido adiposo no son suficientemente eficaces.

Resumen de las realizaciones preferidas

La presente invención proporciona un método para generar células estromales mesenquimales que comprende cultivar hemangioblastos en condiciones en las que las células se diferencian para producir células estromales mesenquimales. La presente invención se refiere a células estromales mesenquimales (MSC) y a métodos para generar MSC. Los métodos de la presente invención producen números sustanciales de células estromales mesenquimales de alta calidad, caracterizadas por el fenotipo de células jóvenes que imparten una alta potencia. En los métodos de la invención, las MSC derivan de hemangioblastos. Las preparaciones de las MSC objeto son útiles en el tratamiento de patologías, que incluyen respuestas inmunitarias no deseadas, p. ej., enfermedades y trastornos autoinmunitarios, así como enfermedades y trastornos inflamatorios.

En un aspecto, la presente descripción comprende preparaciones mejoradas de MSC generadas a partir de hemangioblastos usando métodos mejorados para cultivar los hemangioblastos. En realizaciones ilustrativas, las células estromales mesenquimales de la presente descripción retienen niveles más altos de potencia y no se agregan o se agregan sustancialmente menos que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de los citoblastos embrionarios (ESC). Las células estromales mesenquimales generadas de acuerdo con uno cualquiera o más de los procedimientos de la presente invención pueden retener niveles más altos de potencia, y pueden no agregarse o pueden agregarse sustancialmente menos que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de las ESC.

Se describen además en la presente memoria preparaciones farmacéuticas que comprenden células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales pueden experimentar al menos 10 duplicaciones de población, p. ej., se producen al menos 10 duplicaciones de población en aproximadamente 22-27 días. Se describen en la presente memoria preparaciones farmacéuticas que comprenden células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales pueden experimentar al menos 15 duplicaciones de población, p. ej., se producen al menos 15 duplicaciones de población en aproximadamente 22-27 días. Las preparaciones farmacéuticas se pueden producir por diferenciación in vitro de hemangioblastos. Las células estromales mesenquimales pueden ser células de primate, p. ej., células humanas. Las células estromales mesenquimales pueden experimentar al menos 15 duplicaciones de población. Por ejemplo, las células estromales mesenquimales experimentan al menos a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más duplicaciones de población. La preparación puede comprender menos de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% o 0,0001% de células pluripotentes. Preferiblemente, la preparación está desprovista de células pluripotentes. La preparación puede comprender al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de células estromales mesenquimales.

En un ejemplo, al menos el 50% de dichas células estromales mesenquimales son positivas para (i) al menos uno de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; (ii) al menos uno de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166, CD274 y HLA-ABC; o (iii) cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales son positivas para (i) al menos dos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; (ii) todos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166, CD274 y HLA-ABC. En otro aspecto más, al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales son (i) positivas para todos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, y HLA-ABC y (ii) no expresan o expresan niveles bajos de al menos uno de CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4, TLR3. Además, al menos 60%, 70%, 80% o 90% de dichas células estromales mesenquimales pueden ser positivas para (i) uno o más de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; o (ii) uno o más de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274 y HLA-ABC.

La preparación farmacéutica puede comprender una cantidad de células estromales mesenquimales eficaz para tratar o prevenir una respuesta inmunitaria no deseada en un sujeto que lo necesite. La preparación farmacéutica puede comprender además otras células, tejidos u órganos para trasplante en un receptor que lo necesite. Los ejemplos de otras células o tejidos incluyen células de RPE, células de piel, células de córnea, células pancreáticas, células de hígado o células cardíacas o tejido que contiene cualquiera de dichas células.

En otro ejemplo, las células estromales mesenquimales no derivan de la médula ósea y la potencia de la preparación en un ensayo de regulación inmunitaria es mayor que la potencia de una preparación de células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea. La potencia se puede analizar mediante un ensayo de regulación inmunitaria que determina la dosis de CE50.

En un ejemplo, la preparación conserva entre aproximadamente 50 y 100% de su capacidad proliferativa después de diez duplicaciones de población.

En otro ejemplo, las células estromales mesenquimales de la preparación farmacéutica no derivan directamente de células pluripotentes y en donde dichas células estromales mesenquimales (a) no se agregan o se agregan

sustancialmente menos que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC; (b) se dispersan más fácilmente cuando se dividen comparadas con las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC; (c) son mayores en número que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC cuando se empieza con números equivalentes de ESC; y/o (d) adquieren marcadores de superficie de células mesenquimales característicos antes que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC.

La presente invención abarca además métodos para generar células estromales mesenquimales que comprenden cultivar células hemangioblastos en condiciones que dan lugar a citoblastos mesenquimales. Los hemangioblastos se pueden cultivar en condiciones sin alimentador. Además, los hemangioblastos se pueden sembrar en una matriz, p. ej., que comprende el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1, factor de crecimiento de fibroblastos bovinos (bFGF) y/o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La matriz se puede seleccionar del grupo que consiste en: laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, sulfato de heparán, Matrigel (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)), un extracto de membrana basal humana, y cualquier combinación de los mismos. La matriz puede comprender una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm.

En un aspecto, las células estromales mesenquimales son de mamífero. Preferiblemente, las células estromales mesenquimales son humanas, caninas o equinas.

En un aspecto, los hemangioblastos se pueden cultivar en un medio que comprende αMEM. En otro aspecto, los hemangioblastos se pueden cultivar en un medio que comprende suero o un reemplazo de suero. Por ejemplo, las células hemangioblastos pueden cultivarse en un medio que comprende, αMEM complementado con 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% de suero de ternero fetal. En realizaciones de ejemplo adicionales, el medio puede comprender porcentajes mayores de suero de ternero fetal, p. ej., más de 20%, p. ej., al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, o incluso porcentajes mayores de suero de ternero fetal. Los hemangioblastos se pueden cultivar en dicha matriz durante al menos aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días.

En un aspecto, los hemangioblastos o células formadoras de hemangio-colonia se diferencian de las células pluripotentes, p. ej., células iPS o blastómeros. Las células pluripotentes pueden derivar de uno o más blastómeros sin la destrucción de un embrión humano. Adicionalmente, los hemangioblastos se pueden diferenciar de células pluripotentes por un método que comprende (a) cultivar dichas células pluripotentes para formar agrupaciones de células. En un aspecto, las células pluripotentes se cultivan en presencia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y/o proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4). Se pueden añadir VEGF y BMP-4 al cultivo de células pluripotentes dentro de las 0-48 horas del inicio de dicho cultivo celular, y dicho VEGF se añade opcionalmente en una concentración de 20-100 nm/ml y dicha BMP-4 se añade opcionalmente en una concentración de 15-100 ng/ml.

En un aspecto, los hemangioblastos se diferencian de las células pluripotentes por un método que comprende además: (b) cultivar dichas células individuales en presencia de al menos un factor de crecimiento en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de dichas agrupaciones de células en hemangioblastos. El al menos un factor de crecimiento añadido en la etapa (b) puede comprender uno o más de los factores de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), factor de citoblastos (SCF), Flt 3L (FL), trombopoyetina (TPO), EPO y/o tPTD-HOXB4. El uno o más de dichos al menos un factor de crecimiento añadido en la etapa (b) se puede añadir a dicho cultivo en el espacio de 36-60 horas desde el inicio de la etapa (a). Preferiblemente, el uno o más de dicho al menos un factor de crecimiento añadido en la etapa (b) se añade a dicho cultivo en el espacio de 40-48 horas desde el inicio de la etapa (a). El al menos un factor añadido en la etapa (b) puede comprender uno o más de bFGF, VEGF, BMP-4, SCF, FL y/o tPTD-HOXB4. La concentración de dichos factores de crecimiento si se añade en la etapa (b) puede variar desde aproximadamente lo siguiente: bFGF es aproximadamente 20-25 ng/ml, VEGF es aproximadamente 20-100 ng/ml, BMP-4 es aproximadamente 15-100 ng/ml, SCF es aproximadamente 20-50 ng/ml, FL es aproximadamente 10-50 ng/ml, TPO es aproximadamente 20-50 ng/ml, y tPTD-HOXB4 es aproximadamente 1,5-5 U/ml.

En otro aspecto, el método comprende además (c) disociar dichas agrupaciones de células, opcionalmente en células individuales. En otro aspecto, el método comprende además (d) cultivar dichos hemangioblastos en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento adicional, en donde dicho al menos un factor de crecimiento adicional está en una cantidad suficiente para expandir los hemangioblastos o las células formadoras hemangio-colonias. Al menos un factor de crecimiento adicional de (d) puede comprender uno o más de: insulina, transferrina, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO), factor de citoblastos (SCF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4) y/o tPTD-HOXB4. Concentraciones de ejemplo en la etapa (d) incluyen insulina aproximadamente 10-100 µg/ml, transferrina aproximadamente 200-2.000 µg/ml, GM-CSF aproximadamente 10-50 ng/ml, IL-3 aproximadamente 10-20 ng/ml, IL-6 aproximadamente 10-1000 ng/ml, G-CSF aproximadamente 10-50 ng/ml, EPO aproximadamente 3-50 U/ml, SCF aproximadamente 20-200 ng/ml, VEGF aproximadamente 20-200 ng/ml, BMP-4 aproximadamente 15-150 ng/ml, y/o

tPTD-HOXB4 aproximadamente 1,5-15 U/ml. El medio en la etapa (a), (b), (c) y/o (d) puede ser un medio exento de suero.

En un aspecto, el método genera al menos 80, 85, 90, 95, 100, 125 o 150 millones de células estromales mesenquimales. Los hemangioblastos se pueden recoger después de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 días de empezar a inducir la diferenciación de dichas células pluripotentes. Las células estromales mesenquimales se pueden generar en al menos 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 días de empezar a inducir la diferenciación de dichas células pluripotentes. En otro aspecto, el método da como resultado que se generen al menos 80, 85, 90, 95, 100, 125 o 150 millones de células estromales mesenquimales a partir de aproximadamente 200.000 hemangioblastos en aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 días de cultivo. Las células estromales mesenquimales se pueden generar a partir de hemangioblastos y/o células formadoras de hemangio-colonia en una relación de hemangioblastos a células estromales mesenquimales de al menos 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:415, 1:425, 1:440; 1:450, 1:365, 1:475, 1:490 y 1:500 en aproximadamente 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 días de cultivo. Las células pueden ser humanas.

La presente descripción también contempla células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos obtenidas mediante los métodos descritos. En un aspecto, la invención incluye células estromales mesenquimales derivadas por diferenciación in vitro de hemangioblastos. Al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales pueden (i) ser positivas para todos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274 y HLA-ABC y (ii) no expresa o expresa niveles bajos de al menos uno de CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4, TLR3. Alternativamente, al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales pueden ser positivas para (i) todos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; o (ii) todos de CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166, CD274 y HLA-ABC. Al menos 60%, 70%, 80% o 90% de estas células estromales mesenquimales pueden ser positivas para (i) al menos uno de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; o (ii) al menos uno de CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274 y HLA-ABC. Preferiblemente, las células estromales mesenquimales no expresan o expresan niveles bajos de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4, TLR3.

En otro aspecto, la descripción abarca una preparación de las células estromales mesenquimales descritas en la presente memoria. La preparación puede comprender menos de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006 %, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002%, o 0,0001% de células pluripotentes. Preferiblemente, la preparación está desprovista de células pluripotentes. La preparación se puede purificar sustancialmente purificada y opcionalmente comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de células estromales mesenquimales humanas. La preparación puede comprender niveles sustancialmente similares de proteína p53 y p21, o en donde los niveles de proteína p53 en comparación con la proteína p21 son 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayores. Las células estromales mesenquimales pueden ser capaces de experimentar al menos 5 duplicaciones de población en cultivo. Preferiblemente, las células estromales mesenquimales son capaces de experimentar al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más duplicaciones de población en cultivo.

En un aspecto, las células estromales mesenquimales de la presente descripción (a) no se agregan o se agregan sustancialmente menos que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC; (b) se dispersan más fácilmente cuando se dividen en comparación con las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC; (c) son mayores en número que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC cuando se empieza con números equivalentes de ESC; y/o (d) adquieren marcadores de superficie de células mesenquimales característicos antes que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC. La descripción contempla una preparación farmacéutica que comprende dichas células estromales mesenquimales, que comprende una cantidad de células estromales mesenquimales eficaces para tratar una respuesta inmunitaria no deseada. La preparación puede comprender una cantidad de células estromales mesenquimales eficaz para tratar una respuesta inmunitaria no deseada y además comprende otras células o tejidos para trasplante en un receptor que lo necesite. Ejemplos de otras células incluyen células o tejidos pancreáticos, neurales, hepáticos, RPE o córneos alogénicos o singénicos que contienen cualquiera de los anteriores. La preparación farmacéutica puede ser útil para tratar un trastorno autoinmunitario o una reacción inmunitaria contra células alogénicas que incluyen, pero no se limitan a esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, neoplasias hematológicas, infarto de miocardio, rechazo de trasplante de órganos, nefropatía crónica de aloinjerto, cirrosis, insuficiencia hepática, insuficiencia cardíaca, GvHD, fractura tibial, disfunción del ventrículo izquierdo, leucemia, síndrome mielodisplásico, enfermedad de Crohn, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteogénesis imperfecta, hipocolesterolemia familiar homocigótica, tratamiento después de meniscectomía, periodontitis en adultos, vasculogénesis en pacientes con isquemia miocárdica grave, lesión de la médula espinal, osteodisplasia, isquemia crítica de las extremidades, enfermedad del pie diabético, síndrome de Sjogren primario, osteoartritis, defectos del cartílago, laminitis, atrofia multisistémica, esclerosis lateral amiotrófica, cirugía cardíaca, lupus eritematoso sistémico, aloinjertos de riñón vivos, trastornos de glóbulos rojos no malignos, quemadura térmica, quemadura por radiación, enfermedad de Parkinson, microfracturas, epidermólisis ampollosa, isquemia coronaria grave, miocardiopatía dilatada idiopática, osteonecrosis de la cabeza femoral, nefritis lúpica, defectos de huecos

óseos, accidente cerebrovascular cerebral isquémico, después del accidente cerebrovascular, síndrome de radiación aguda, enfermedad pulmonar, artritis, regeneración ósea, uveítis o combinaciones de los mismos. Las MSC objeto (que incluyen formulaciones o preparaciones de las mismas) se pueden usar para tratar afecciones respiratorias, en particular aquellas que incluyen componentes inflamatorios o lesiones agudas, tales como el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, síndrome de dificultad respiratoria del adulto postraumático, enfermedad pulmonar de trasplante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, bronquitis obstructiva crónica, bronquitis, una reacción alérgica, daño debido a neumonía bacteriana o viral, asma, exposición a productos irritantes y uso de tabaco. Adicionalmente, las MSC objeto (que incluye formulaciones o preparaciones de las mismas) se pueden usar para tratar la dermatitis atópica, rinitis alérgica, pérdida de audición (en particular la pérdida de audición autoinmunitaria o pérdida de audición inducida por ruido), psoriasis.

Se describen además en la presente memoria kits que comprenden las células estromales mesenquimales o la preparación de células estromales mesenquimales descritas en la presente memoria. Los kits pueden comprender células estromales mesenquimales o preparaciones de células estromales mesenquimales que están congeladas o crioconservadas. Las células estromales mesenquimales o la preparación de células estromales mesenquimales comprendidas en el kit pueden estar contenidas en un vehículo de administración celular.

Además, se describen en la presente memoria métodos para tratar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar una cantidad eficaz de células estromales mesenquimales o una preparación de células estromales mesenquimales descritas en la presente memoria, a un sujeto que lo necesite. El método puede comprender además el trasplante de otras células o tejidos, p. ej., células retinianas, RPE, corneales, neurales, inmunes, de médula ósea, hepáticas o pancreáticas. Las enfermedades o trastornos de ejemplo tratados incluyen, pero no se limitan a esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, neoplasias hematológicas, infarto de miocardio, rechazo de trasplante de órganos, nefropatía crónica de aloinjerto, cirrosis, insuficiencia hepática, insuficiencia cardíaca, GvHD, fractura tibial, disfunción ventricular izquierda, leucemia, síndrome mielodisplásico, enfermedad de Crohn, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteogénesis imperfecta, hipocolesterolemia familiar homocigótica, tratamiento después de meniscectomía, periodontitis en adultos, vasculogénesis en pacientes con isquemia miocárdica grave, lesión de la médula espinal, osteodisplasia, isquemia crítica de las extremidades, enfermedad del pie diabético, síndrome de Sjogren primario, osteoartritis, defectos del cartílago, laminitis, atrofia multisistémica, esclerosis lateral amiotrófica, cirugía cardíaca, lupus eritematoso sistémico refractario, aloinjertos de riñón vivos, trastornos de glóbulos rojos no malignos, quemadura térmica, quemadura por radiación, enfermedad de Parkinson, microfracturas, epidermólisis ampollosa, isquemia coronaria grave, miocardiopatía dilatada idiopática, osteonecrosis de la cabeza femoral, nefritis lúpica, defectos de huecos óseos, accidente cerebrovascular cerebral isquémico, después del accidente cerebrovascular, síndrome de radiación aguda, enfermedad pulmonar, artritis, regeneración ósea, o combinaciones de los mismos. En un aspecto, la enfermedad o trastorno es la uveítis. En otro aspecto, la enfermedad o trastorno es un trastorno autoinmunitario, p. ej., esclerosis múltiple, o una reacción inmunitaria contra células alogénicas.

También se describen en la presente memoria métodos para tratar la pérdida ósea o el daño del cartílago, que comprenden administrar una cantidad eficaz de células estromales mesenquimales o preparación de células estromales mesenquimales descritas en la presente memoria a un sujeto que lo necesita. Las células estromales mesenquimales se pueden administrar en combinación con una célula o tejido alogénico o singénico trasplantado, p. ej., células del epitelio pigmentario de la retina, células retinianas, células corneales o células musculares.

La presente invención comprende métodos de cultivo de hemangioblastos que generan preparaciones de MSC, que retienen la potencia, a pesar de un número creciente de duplicaciones de población. Las preparaciones farmacéuticas de células estromales mesenquimales de la presente descripción demuestran propiedades terapéuticas mejoradas cuando se administran a un hospedante mamífero que necesita dicha administración.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Generación de FM-MA09-MSC a partir de células pluripotentes. Esta figura muestra una vista microscópica de la generación de células estromales mesenquimales a partir de ESC a través de hemangioblastos.

FIG. 2. Un fenotipo de FM-MA09-MSC obtenido a partir de hemangioblastos derivados de células pluripotentes. Esta figura muestra el porcentaje de células positivas para marcadores de superficie de MSC en la población inicial de hemangioblastos (lado izquierdo de la gráfica, hemangioblasto día 7-11) y después de cultivar hemangioblastos en placas recubiertas con Matrigel (lado derecho de la gráfica) y una vista microscópica de las células estromales mesenquimales derivadas de los hemangioblastos (fotografía del panel derecho).

FIG. 3. Fenotipos de células estromales mesenquimales derivadas de diferentes métodos de cultivo. Esta figura muestra el porcentaje de células positivas para marcadores de superficie de MSC después de cultivar citoblastos embrionarios (ESC) humanos en placas recubiertas de gelatina (panel izquierdo), ESC en placas recubiertas con Matrigel (panel central) y hemangioblastos en placas recubiertas con Matrigel (panel derecho).

FIG. 4. Rendimiento de células estromales mesenquimales a partir de células pluripotentes. Esta figura muestra los rendimientos de las células positivas para marcadores de superficie de MSC obtenidas del cultivo de ESC en placas

recubiertas de gelatina (primera columna - sin rendimiento), ESC en placas recubiertas con Matrigel (segunda columna) y hemangioblastos en placas recubiertas con Matrigel (tercera columna).

FIG. 5. Adquisición de marcadores de células estromales mesenquimales. Esta figura representa el tiempo necesario para la adquisición de marcadores de superficie de MSC usando hemangioblastos (línea superior) y ESC (línea inferior).

FIG. 6. Fenotipos de células estromales mesenquimales derivadas de diferentes métodos de cultivo. Esta figura muestra el porcentaje de células positivas para marcadores de MSC y negativas para hematopoyesis y marcadores endoteliales después de cultivo de ESC en placas recubiertas con Matrigel (panel izquierdo) y hemangioblastos en placas recubiertas con Matrigel (panel derecho).

FIG. 7. FM-MA09-MSC muestran capacidad de diferenciación. Esta figura representa la capacidad de diferenciación de las células estromales mesenquimales derivadas de los hemangioblastos diferenciados de MA09 ESC para formar adipocitos y osteocitos.

FIG. 8. Diferenciación condrogénica de MSC. Esta figura representa la diferenciación condrogénica de las células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblasto MA09 ESC mediante la expresión de ARNm de Agrecano (proteoglicano de sulfato de condroitina 1) y colágeno IIa.

FIG. 9. Expresión transitoria de CD309 por FM-MA09-MSC. Esta figura muestra la expresión transitoria del marcador de superficie celular CD309.

FIG. 10 A. La proliferación de células T en respuesta a mitógeno es suprimida por FM-MA09-MSC. Esta figura muestra la supresión por células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblasto de la proliferación de células T causada por estimulación química (PMA/ionomicina).

FIG. 10B. La proliferación de células T en respuesta a las células presentadoras de antígenos es suprimida por FM-MA09-MSC. Esta figura muestra la supresión por células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblasto de la proliferación de células T causada por la exposición a células dendríticas.

FIG. 11. La proliferación de células T en respuesta a las células presentadoras de antígenos es suprimida por FM-MA09-MSC.FIG. 11A muestra que las células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblasto eran capaces de aumentar el porcentaje de Treg doble positivos CD4/CD25 que se inducen en respuesta al estímulo por IL2.

FIG. 11B muestra que las células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblasto inhiben la secreción de Th1 de IFNγ.

FIG. 12. La citoquina proinflamatoria IFNg estimula los cambios en la expresión de marcadores de superficie de FM-MA09-MSC. Esta figura muestra que el interferón gamma estimula cambios en la expresión de marcadores de superficie de MSC y puede potenciar los efectos inmunosupresores de las MSC.

FIG. 13. Mayor potencia, mayores efectos inhibidores de FM-MA09-MSC en comparación con BM-MSC. FM-MA09-MSC ejercen mayores efectos inhibidores sobre la proliferación de células T que las BM-MSC. (A). El aumento de la cantidad de MSC en cocultivo con PBMC produce una reducción dependiente de la dosis en la proliferación de células T en respuesta a PMA e ionomicina. Las FM-MA09-MSC jóvenes (p4) son las más potentes de todos los tipos de células ensayados. (B.) Las FM-MA09-MSC inhiben la proliferación de células T en mayor grado que las BM-MSC en respuesta a PHA. Se cocultivó una relación 5:1 de PBMC:MSC durante 6 días. (C.) FM-MA09-MSC inhiben la proliferación de células T en respuesta a cantidades crecientes de células dendríticas mejor que las BM-MSC. En (A-C), se evaluó el porcentaje de proliferación de células T mediante la incorporación de BrdU en la población de células CD4+ y/o CD8+.

FIG. 14. Las FM-MA09-MSC mejoran la inducción de Treg: las MSC de pase temprano tienen mayores efectos que las MSC de pase tardío. PBMC no adherentes (diferentes donantes) se cultivaron +/- IL2 durante 4 días en ausencia o presencia de FM-MA09-MSC. El porcentaje de Treg doble positivos CD4/CD25 se evaluó por citometría de flujo. Se usaron FM-MA09-MSC jóvenes (p6) o mayores (p16-18). Las barras negras indican el promedio de 6 experimentos. Las MSC como un todo tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la inducción de Treg. ($p = 0,02$)

FIG. 15. Expansión de Treg mejorada por FM-MA09-MSC en comparación con BM-MSC. Las FM-MA09-MSC inducen la expansión de Treg mejor que las BM-MSC. (A.) Número de veces de aumento de Treg doble positivos CD4/CD25. La condición menos IL2 se estableció en 1 y otros grupos se expresan como número de veces de inducción sobre este nivel. MM = MA09-MSC, BM = MSC de médula ósea. "p" = número de pase. (B.) FM MA09-MSC (MM) inducen Treg triple positivos CD4/CD25/FoxP3 mejor que las BM-MSC. (C.) El porcentaje de PBMC que responden que son CD4+ son consistentes entre los diferentes grupos de tratamiento. (D.) El porcentaje de PBMC que responden que son CD25+ varía entre los diferentes grupos de tratamiento. FM-MA09-MSC inducen una mayor expresión de CD25 que las BM-MSC. Esta diferencia puede explicar la diferencia en la inducción de Treg.

FIG. 16. Las FM-MA09-MSC tienen una mayor capacidad proliferativa que las BM-MSC. Las FM-MA09-MSC tienen una mayor capacidad proliferativa que las BM-MSC. Las duplicaciones de la población acumuladas se representan gráficamente frente al número de días en cultivo. Después siembra en placa inicial de hemangioblastos derivados de ESC o células mononucleares derivadas de médula ósea, las células adherentes se consideraron MSC p0. Pases de MSC sucesivos se volvieron a sembrar en placa a una densidad de 7000 células/cm^2 y se recogieron cuando los cultivos tenían aproximadamente 70% de confluencia (cada 3-5 días).

FIG. 17. Procedimiento de generación de FM-MA09-MSC; Efecto Matrigel. La eliminación de células del Matrigel en un pase temprano (es decir, p2) puede ralentizar temporalmente el crecimiento de MSC en comparación con las mantenidas en Matrigel hasta p6.

FIG. 18. BM-MSC y FM-MA09-MSC experimentan condrogénesis. La tinción con safranina O (indicativo de deposición de matriz cartilaginosa) se realizó en cultivos de masa de gránulos insertados en parafina después de 21 días. Las imágenes tienen 40 aumentos.

FIG. 19. En el estado basal, las FM-MA09-MSC secretan menos PGE2 que las BM-MSC, sin embargo, el número de veces de aumento tras la estimulación con IFNγ o TNFα es mayor. (A) Se muestra la cantidad de secreción de prostaglandina E2 (pg/ml) para BM-MSC frente a FM-MA09-MSC en condiciones de estimulación basal o diferentes. Las cantidades de PGE2 están normalizadas respecto al número de células. (B.) Los valores basales de PGE2 se establecen en 1 (línea negra) y la secreción de PGE2 con diversos estímulos se expresa como número de veces de aumento frente al nivel basal.

FIG. 20. Las FM-MA09-MSC mantienen el fenotipo a lo largo del tiempo. Análisis de citometría de flujo de diferentes poblaciones de MSC. (A) La expresión de marcadores de superficie celular de FM-MA09-MSC se mantiene en tres sustratos diferentes y se compara con las BM-MSC. (B) La expresión de marcadores de superficie celular de FM-MA09-MSC se evalúa a lo largo del tiempo (con pases sucesivos, como se indica).

FIG. 21. Los FM-MA09-MSC expresan menos Stro-1 y más CD10 en comparación con los BM-MSC. Análisis de citometría de flujo de diferentes poblaciones de MSC. La expresión de Stro-1 es menor en FM-MA09-MSC que en BM-MSC en el número de pase indicado. La expresión de CD10 es mayor en FM-MA09-MSC que en BM-MSC. Otros marcadores son los mismos para ambas poblaciones de MSC.

FIG. 22. La expresión de Stro-1 y CD10 en 10 lotes diferentes de FM-MA09-MSC de pase temprano muestra de forma consistente expresión baja de Stro-1 y de grado medio de CD10. Análisis de citometría de flujo de diferentes poblaciones de MSC. Se evaluaron diez lotes diferentes de FM-MA09-MSC en el número de pase indicado respecto a la expresión de Stro-1 y CD10. La expresión de Stro-1 es de forma consistente baja en los diferentes lotes de FM-MA09-MSC (promedio de 5-10%). La expresión de CD10 es de forma consistente de nivel de grado medio en los diferentes lotes de FM-MA09-MSC (promedio de aproximadamente 40%).

FIG. 23. Las FM-MA09-MSC mantienen su tamaño a medida que envejecen en el cultivo, mientras que el tamaño de las células BM-MSC aumenta con la edad. Se usaron gráficas de puntos de dispersión frontal/dispersión lateral en la citometría de flujo (mostrados a la izquierda) para capturar el tamaño de las MSC. El porcentaje de células en las células "grandes" del cuadrante superior derecho se vigilaron y se muestran en la gráfica de barras.

FIG. 24. CD10 y CD24 son regulados por aumento en FM-MA09-MSC en comparación con BM-MSC. Se muestra el análisis de expresión génica para BM-MSC y FM-MA09-MSC en el estado basal. Se usó la RT-PCR cuantitativa con sondas Taqman para evaluar la expresión de los genes indicados y se normalizó respecto a dos genes de mantenimiento. Se muestra el promedio de las lecturas cuadruplicadas +/- desviación estándar.

FIG. 25. Aire-1 e IL-11 son regulados por aumento en FM-MA09-MSC en comparación con BM-MSC. Se muestra el análisis de expresión génica para BM-MSC y FM-MA09-MSC en el estado basal. Se usó la RT-PCR cuantitativa con sondas Taqman para evaluar la expresión de los genes indicados y se normalizó respecto a dos genes de mantenimiento. Se muestra el promedio de las lecturas cuadruplicadas +/- desviación estándar.

FIG. 26. Ang-1 y CXCL1 son regulados por aumento en FM-MA09-MSC en comparación con BM-MSC. Se muestra el análisis de expresión génica para BM-MSC y FM-MA09-MSC en el estado basal. Se usó la RT-PCR cuantitativa con sondas Taqman para evaluar la expresión de los genes indicados y se normalizó respecto a dos genes de mantenimiento. Se muestra el promedio de las lecturas cuadruplicadas +/- desviación estándar.

FIG. 27. IL6 y VEGF son regulados por disminución en FM-MA09-MSC en comparación con BM-MSC. Se muestra el análisis de expresión génica para BM-MSC y FM-MA09-MSC en el estado basal. Se usó la RT-PCR cuantitativa con sondas Taqman para evaluar la expresión de los genes indicados y se normalizó respecto a dos genes de mantenimiento. Se muestra el promedio de las lecturas cuadruplicadas +/- desviación estándar.

FIG. 28. FM-MA09-MSC y BM-MSC muestran mayor actividad de la indolamina 2,3-desoxigenasa (IDO) en respuesta a 3 días de estimulación con IFN-γ. Comparación de MSC estimuladas con 50 ng/ml de IFNg durante 3 días, respecto a su capacidad de convertir triptófano en quinurenina (indicativo de la actividad de IDO). Para cada población de MSC, se lisaron y se usaron en el ensayo 1 millón de células.

FIG. 29. Cambios relacionados con la edad en la expresión de FM-MA09-MSC de Aire-1 y proteína priónica (PrP): dos proteínas implicadas en la supresión inmunitaria y la proliferación, respectivamente. Análisis de transferencia Western de la expresión de Aire-1 y PrP en lisados de células enteras FM-MA09-MSC en diferentes números de pase (p). La expresión de actina se muestra como control de carga. Las diferencias en la expresión de Aire-1 y PrP se notan al hacer referencia a los controles de carga de actina.

FIG. 30. FM-MA09-MSC secretan menos IL6 que las BM-MSC en el estado basal. Matrices de citoquinas que muestran controles positivos para la normalización (4 puntos a la izquierda) e IL6 (en recuadro) en medio condicionado de MSC. Las BM-MSC de dos donantes diferentes se comparan con 4 lotes diferentes de FM-MA09-MSC.

FIG. 31. FM-MA09-MSC secretan menos IL6 que las BM-MSC en el estado basal y estimulado con IFNγ. Matrices de citoquinas que muestran controles positivos para la normalización (4 puntos a la izquierda) e IL6 (en recuadro) en medio condicionado de MSC. Se comparan BM-MSC de pase 7 con FM-MA09-MSC de p7 después de 48 horas de tratamiento con IFNγ +/-.

FIG. 32. FM-MA09-MSC secretan menos VEGF que las BM-MSC en el estado basal y estimulado con IFNγ. Matrices de citoquinas que muestran controles positivos para la normalización (4 puntos a la izquierda) y VEGF (en recuadro) en medio condicionado de MSC. Se comparan BM-MSC de pase 7 con FM-MA09-MSC de p7 después de 48 horas de tratamiento con IFNγ +/-.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos para generar células estromales mesenquimales, también se describen preparaciones de células estromales mesenquimales a partir del cultivo de hemangioblastos, métodos para cultivar hemangioblastos, y métodos para tratar una patología usando células estromales mesenquimales.

Los métodos de la presente invención, por los cuales los cultivos de hemangioblastos producen mayores rendimientos de células estromales mesenquimales, en comparación con procedimientos previos, son más eficaces que los procedimientos previos en la producción de células estromales mesenquimales sustancialmente exentas de ESC. Las células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos de la presente invención conservan un nuevo fenotipo juvenil definido por la expresión o su falta de marcadores específicos.

En ciertas realizaciones, la preparación de MSC (tal como cultivos que tienen al menos 10^3, 10^4, 10^5 o incluso 10^6 MSC) puede tener, como promedio, longitudes de telómeros que son al menos 30 por ciento de la longitud de los telómeros de un ESC y/o célula iPS humana (o el promedio de una población de ESC y/o células iPS humanas), y preferiblemente al menos 40, 50, 60, 70, 80 o incluso 90 por ciento de la longitud de los telómeros de un ESC y/o célula iPS humana (o del promedio de una población de ESC y/o células iPS humanas). Por ejemplo, dicho ESC y/o célula iPS humana (o dicha población de ESC y/o células iPS humanas) puede ser una célula o población de células a partir de la cual se diferenciaron dichas células de MSC.

La preparación de MSC, como población, puede tener una longitud del fragmento de restricción terminal (TRF) media que es mayor que 4 kb, y preferiblemente mayor que 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso 13 kb. En una realización de ejemplo, las MSC de la preparación pueden tener un TRF promedio que es de 10 kb o más largo.

En ciertas realizaciones, la preparación de MSC (tal como cultivos que tienen al menos 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 o incluso 10^8 MSC) tiene una vida útil replicativa que es mayor que la vida útil replicativa de las preparaciones de MSC obtenidas de otras fuentes (p. ej., cultivos derivados de tejido humano donado, tales como tejido fetal, de bebé, infantil, adolescente o adulto). La vida útil replicativa se puede evaluar determinando el número de duplicaciones de población o pases en cultivo antes de la senescencia replicativa, es decir, cuando más de 10, 20, 30, 40 o incluso 50 por ciento de las células en cultivo envejecen antes de la siguiente duplicación o pase. Por ejemplo, las preparaciones de MSC objeto pueden tener una vida útil replicativa que es al menos 10 duplicaciones mayor que la de una preparación de MSC derivada de tejido humano donado (en particular derivada de médula ósea de adulto o tejido adiposo adulto), y preferiblemente al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 o incluso 100 duplicaciones de población. En ciertas realizaciones, las preparaciones de MSC pueden tener una vida útil replicativa que permita al menos 8 pases antes de que más de 50% de las células envejezcan y/o se diferencien en tipos de células no MSC (tales como fibroblastos), y más preferiblemente al menos 10, 12, 14, 16, 18 o incluso 20 pases antes de llegar a ese punto. En ciertas realizaciones, la preparación de MSC puede tener una vida útil replicativa que permita al menos 2 veces más duplicaciones o pases en relación con preparaciones de MSC derivadas de médula ósea de adulto y/o preparaciones de MSC derivadas de tejido adiposo (p. ej., número inicial de células equivalente) antes de que más de 50 por ciento de las células envejezcan y/o se diferencian en tipos de células no MSC (tales como fibroblastos), y más preferiblemente al menos 4, 6, 8 o incluso 10 veces más duplicaciones o pases.

En ciertas realizaciones, la preparación de MSC de la presente descripción (tal como cultivos que tienen al menos 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 o incluso 10^8 MSC) tienen un menor contenido estadísticamente significativo y/o actividad enzimática de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y el envejecimiento en relación con preparaciones de MSC del pase 1 (P1), pase 2 (P2), pase 3 (P3), pase 4 (P4) y/o pase 5 (P5) derivadas de otras fuentes (p. ej., cultivos derivados de tejido humano donado, tales como tejido fetal, de bebé, infantil, adolescente o

adulto), y en particular MSC derivadas de médula ósea y MSC derivadas de tejido adiposo. Por ejemplo, la preparación de MSC objeto tiene un contenido de proteína de subunidad reguladora no ATPasa 11 del proteasoma 26S (PSMD11) que es menor de 75% del contenido en MSC del tejido humano donado (en particular derivado de médula ósea de adulto o tejido adiposo de adulto), e incluso más preferiblemente menos de 60, 50, 40, 30, 20 o incluso 10 por ciento.

En ciertas realizaciones, la preparación de MSC de la presente descripción (tal como cultivos que tienen al menos 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 o incluso 10^8 MSC) tiene un menor contenido estadísticamente significativo y/o actividad enzimática de proteínas implicadas en el metabolismo energético y/o lipídico de la célula en relación con preparaciones de MSC del pase 1 (P1), pase 2 (P2), pase 3 (P3), pase 4 (P4) y/o pase 5 (P5) derivadas de otras fuentes (p. ej., cultivos derivados de tejido humano donado, como tejido fetal, de bebé, infantil, adolescente o adulto), y en particular MSC derivadas de médula ósea y derivadas de tejido adiposo MSC. Para ilustrar, la preparación de MSC objeto tiene un contenido de proteína que es menor que 90 por ciento del contenido en MSC de tejido humano donado (en particular derivado de médula ósea de adulto o tejido adiposo de adulto), y todavía más preferiblemente menos de 60, 50, 40, 30, 20 o incluso 10 por ciento, para una o más proteínas implicadas en rutas metabólicas para la síntesis de ATP o NADPH tales como glucólisis (tal como fructosa-bifosfato aldolasa A, ALDOA, aldo-ceto reductasa familia 1, miembro A1, AKR1A1); gliceraldehído-3-fosfato, GAPDH), el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de TCA) (tal como la isocitrato deshidrogenasa 1, IDH1), la vía de la pentosa fosfato (tal como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, G6PD) y la biosíntesis de UDP-glucosa en la ruta biosintética del ácido glucurónico (tal como UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, UGDH). Para ilustrar mejor, la preparación de MSC objeto tiene un contenido de proteína que es menor de 90 por ciento del contenido en MSC de tejido humano donado (en particular derivado de médula ósea de adulto o tejido adiposo de adulto), e incluso más preferiblemente menos de 60, 50, 40, 30, 20 o incluso 10 por ciento, para una o más proteínas implicadas en el metabolismo lipídico, tal como enoil-CoA hidratasa, cadena corta, 1 (ECHS1) y/o acetil-Coa acetiltransferasa (ACAT2).

En ciertas realizaciones, la preparación de MSC de la presente descripción (tal como cultivos que tienen al menos 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 o incluso 10^8 MSC) tienen un menor contenido estadísticamente significativo y/o actividad enzimática de las proteínas implicadas en la apoptosis de la célula en relación con preparaciones de MSC del pase 1 (P1), pase 2 (P2), pase 3 (P3), pase 4 (P4) y/o pase 5 (P5) derivadas de otras fuentes (p. ej., cultivos derivados de tejido humano donado, tales como tejido fetal, de bebé, infantil, adolescente o adulto), y en particular MSC derivadas de médula ósea y MSC derivadas de tejido adiposo. Para ilustrar, la preparación de MSC objeto tiene un contenido de proteínas que es menor de 90 por ciento del contenido en MSC de tejido humano donado (en particular derivado de médula ósea de adulto o tejido adiposo de adulto), e incluso más preferiblemente menos de 60, 50, 40, 30, 20 o incluso 10 por ciento, para una o más proteínas anexina A1 (ANXA1), A2 (ANXA2), A5 (ANXA5), la proteína 1 del canal selectivo para aniones dependiente de voltaje (VDAC1) y/o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Sin estar limitados por la teoría, se cree que la diferencia estadísticamente significativa en el contenido y/o actividad enzimática de las proteínas implicadas en el metabolismo energético y/o lipídico y/o apoptosis de la célula presentada por las MSC derivadas de hemangioblastos de la presente descripción se puede atribuir, al menos en parte, a la naturaleza homogénea de las preparaciones. Por ejemplo, las MSC derivadas de hemangioblastos de la presente descripción tienen expresión génica de MHC homogénea, es decir, MHC completamente coincidentes, a diferencia de bancos de MSC derivados de adultos, en los que las células derivan de múltiples donantes diferentes, es decir, MHC no coincidentes. Una dosis terapéutica de MSC es de aproximadamente 2-8 millones de células/kg (o aproximadamente 130-500 millones de células por dosis).

Definiciones

"Células pluripotentes" y "citoblastos pluripotentes" como se usan en la presente memoria, se refieren de forma amplia a una célula capaz de proliferación prolongada o prácticamente indefinida in vitro a la vez que retiene su estado indiferenciado, presenta un cariotipo estable (preferiblemente normal) y tiene la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales (es decir, ectodermo, mesodermo y endodermo) bajo las condiciones adecuadas. Típicamente, las células pluripotentes (a) son capaces de inducir teratomas cuando se trasplantan a ratones inmunodeficientes (SCID); (b) son capaces de diferenciación en los tipos de células de las tres capas germinales (p. ej., tipos de células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas); y (c) expresan al menos un marcador celular hES (tal como Oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno de superficie SSEA 3, antígeno de superficie SSEA 4, NANOG, TRA 1 60, TRA 1 81, SOX2, REX1). Las células pluripotentes de ejemplo pueden expresar oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno de superficie SSEA 3, antígeno de superficie SSEA 4, TRA 1 60, y/o TRA 1 81. Las células pluripotentes de ejemplo adicionales incluyen, pero no se limitan a, citoblastos embrionarios, células pluripotentes inducidas (iPS), células pluripotentes producidas a partir de células germinales embrionarias (EG) (p. ej., por cultivo en presencia de FGF-2, LIF y SCF), y células ES partenogenéticas. Las células pluripotentes para usar en los métodos de la invención se producen sin destrucción de un embrión. Por ejemplo, las células pluripotentes inducidas se pueden obtener a partir de células sin destrucción de embrión. Como un ejemplo adicional, las células pluripotentes se pueden producir a partir de un blastómero de biopsia (lo cual se puede llevar a cabo sin dañar el resto del embrión); opcionalmente, el resto del embrión se puede crioconservar, cultivar y/o implantar en un hospedante adecuado. Las células pluripotentes (de cualquier fuente) se pueden modificar genéticamente o modificarse de otro modo para aumentar la longevidad, potencia, movimiento dirigido o para suministrar un factor deseado en células que se diferencian a partir de dichas células pluripotentes (por ejemplo, MSC y hemangioblastos). Como ejemplos no

limitantes de los mismos, las células pluripotentes se pueden modificar genéticamente para expresar Sirt1 (aumentando así la longevidad), expresar uno o más genes de la subunidad de telomerasa opcionalmente bajo el control de un promotor inducible o reprimible, incorporar un marcador fluorescente, incorporar partículas de óxido de hierro y otro de dichos reactivos (que se podría usar para el seguimiento de células por generación de imágenes in vivo, MRI, etc. véase Thu et al., *Nat. Med*. 26 Feb. 2012; 18(3):463-7), expresar bFGF que puede mejorar la longevidad (véase Go et al., *J. Biochem*. 142, 741-748 (2007)), expresar CXCR4 para movimiento dirigido (véase Shi et al., *Haematologica*. julio 2007 92(7):897-904), expresar TRAIL recombinante para inducir apoptosis mediada por caspasa en células de cáncer tipo gliomas (véase Sasportas et al., *Proc Natl Acad Sci* USA. 24 Mar. 2009; 106(12):4822-7), etc.

"Embrión" o "embrionario", como se usa en la presente memoria, se refiere ampliamente a una masa celular en desarrollo que no se ha implantado en la membrana uterina de un hospedante materno. Una "célula embrionaria" es una célula aislada o contenida en un embrión. Esto también incluye blastómeros, obtenidos tan temprano como en la etapa de dos células, y blastómeros agregados.

Los "citoblastos embrionarios" (células ES o ESC) abarcan células pluripotentes producidas a partir de células embrionarias así como células pluripotentes inducidas (descritas con más detalle más adelante). Con frecuencia, dichas células se pasan o se han pasado en serie como líneas celulares. Los citoblastos embrionarios se pueden usar como un citoblasto pluripotente en los procesos de producción de hemangioblastos como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, las células ES se pueden producir por métodos conocidos en la técnica que incluyen la partenogénesis. Como se ha descrito antes más (véase "células pluripotentes), las células ES se pueden modificar genéticamente o modificar de otra forma para aumentar la longevidad, potencia, movimiento dirigido o suministrar un factor deseado en células que se diferencian de dichas células pluripotentes (por ejemplo, MSC, y hemangioblastos).

Las células ES se pueden generar con homocigosidad o hemicigosis en uno o más genes HLA, p. ej., por manipulación genética, detección de pérdida espontánea de heterocigosidad, etc. Las células ES se pueden modificar genéticamente o modificar de otro modo para aumentar la longevidad, potencia, movimiento dirigido o suministrar un factor deseado en células que se diferencian de dichas células pluripotentes (por ejemplo, MSC y hemangioblastos). Los citoblastos embrionarios, independientemente de su fuente o el método particular usado para producirlos, normalmente tienen uno o más de los siguientes atributos: (i) la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales, (ii) expresión de al menos Oct-4 y fosfatasa alcalina, y (iii) la capacidad de producir teratomas cuando se trasplantan en animales inmunocomprometidos.

Los marcadores de células hES de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: fosfatasa alcalina, Oct-4, Nanog, antígeno embrionario 3 específico de estadio (SSEA-3), antígeno embrionario 4 específico de estadio (SSEA-4), TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, Sox2, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen embrionario específico de células 1 (ESG1), asociado al desarrollo de pluripotencia 2 (DPPA2), DPPA4, transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT), SALL4, E-CADHERIN, denominación del clúster 30 (CD30), Cripto (TDGF-1), GCTM-2, Génesis, factor nuclear de célula germinal y factor de citoblastos (ligando SCF o c-Kit). Como un ejemplo adicional, los citoblastos embrionarios pueden expresar Oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno de superficie SSEA 3, antígeno de superficie SSEA 4, TRA 1 60 y/o TRA 1 81.

Las ESC se pueden cocultivar inicialmente con células de células nutrientes embrionarias murinas (MEF). Las células MEF se pueden inactivar mitóticamente por exposición a mitomicina C antes de sembrar ESC en cocultivo, y por lo tanto los MEF no se propagan en cultivo. Además, los cultivos celulares de ESC se pueden examinar mediante microscopio y se pueden recoger y descartar las colonias que contienen morfología de células no ESC, p. ej., usando una herramienta de corte de citoblastos, mediante ablación con láser u otros medios. Típicamente, después del punto de recogida de ESC para la siembra para la formación de cuerpos embrioides no se usan células MEF adicionales.

Los marcadores de células ESC de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: fosfatasa alcalina, Oct-4, Nanog, antígeno embrionario 3 específico de estadio (SSEA-3), antígeno embrionario 4 específico de estadio (SSEA-4), TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, Sox2, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen embrionario específico de células 1 (ESG1), asociado al desarrollo de pluripotencia 2 (DPPA2), DPPA4, transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT), SALL4, E-CADHERIN, denominación del clúster 30 (CD30), Cripto (TDGF-1), GCTM-2, Génesis, factor nuclear de célula germinal y factor de citoblastos (ligando SCF o c-Kit).

"Potencia", como se usa en la presente memoria, se refiere de forma amplia a la concentración, p. ej., molar, de un reactivo (tal como MSC derivadas de hemangioblasto) que produce un efecto definido. La potencia se puede definir en términos de concentración efectiva (CE50), que no implica mediciones del efecto máximo sino, en cambio, el efecto en diferentes sitios a lo largo del eje de concentración de las curvas de respuesta a la dosis. La potencia también se puede determinar a partir de curvas de dosis-respuesta graduales (CE50) o cuantales (DE50, DT50 y DL50); sin embargo, la potencia se mide preferiblemente por la CE50. El término "CE50" se refiere a la concentración de un fármaco, anticuerpo o sustancia tóxica que induce una respuesta a medio camino entre el valor inicial y el efecto máximo después de un tiempo de exposición específico. La CE50 de una curva de respuesta a la

dosis gradual representa por lo tanto la concentración de un compuesto donde se observa 50% de su efecto máximo. La CE50 de una curva de respuesta a la dosis cuantal representa la concentración de un compuesto donde 50% de la población presenta una respuesta, después de una duración de exposición específica. La CE50 se puede determinar usando estudios en animales en los que un modelo animal definido demuestra un cambio fisiológico medible en respuesta a la aplicación del fármaco; ensayos basados en células que usan un sistema celular específico, que además del fármaco, demuestran una respuesta biológica medible; y/o reacciones enzimáticas donde la actividad biológica del fármaco se puede medir por la acumulación de producto después de la reacción química facilitada por el fármaco. Preferiblemente, se usa un ensayo regulador inmunitario para determinar EC50. Los ejemplos no limitantes de dichos ensayos reguladores inmunitarios incluyen citoquina intracelular, citotoxicidad, capacidad reguladora, capacidad de señalización celular, capacidad proliferativa, evaluaciones apoptóticas y otros ensayos.

"Células madre mesenquimales" (MSC) como se usa en la presente memoria se refiere a citoblastos multipotentes con capacidad de autorreproducirse y la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos, entre otros linajes de células mesenquimales. Además de estas características, las MSC se pueden identificar mediante la expresión de uno o más marcadores como se describe adicionalmente en la presente memoria. Dichas células se pueden usar para tratar una variedad de afecciones clínicas, que incluyen trastornos inmunológicos así como enfermedades degenerativas tales como enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), infarto de miocardio y enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, entre otros. Excepto cuando el contexto indique lo contrario, las MSC pueden incluir células de fuentes de adultos y sangre del cordón umbilical. Las MSC (o una célula a partir de la cual se generan, tal como una célula pluripotente) se puede modificar genéticamente o modificar de otro modo para aumentar la longevidad, potencia, movimiento dirigido, o para suministrar un factor deseado en las MSC o células que se diferencian de dichas MSC. Como ejemplos no limitantes de los mismos, las células MSC se pueden modificar genéticamente para expresar Sirt1 (aumentando así la longevidad), expresar uno o más genes de la subunidad de telomerasa opcionalmente bajo el control de un promotor inducible o reprimible, incorporar un marcador fluorescente, incorporar partículas de óxido de hierro u otro reactivo de este tipo (que se podría usar para el seguimiento de células mediante imágenes in vivo, MRI, etc., véase Thu et al., *Nat. Med*. 26 de febrero de 2012; 18 (3): 463-7), expresar bFGF que puede mejorar la longevidad (véase Go et al., *J. Biochem*. 142, 741-748 (2007)), expresar CXCR4 para el movimiento dirigido (véase Shi et al., *Haematologica*, julio de 2007; 92 (7): 897-904), expresar TRAIL recombinante para inducir la apoptosis mediada por caspasa en células de cáncer como gliomas (véase, Sasportas et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 24 de Mar. de 2009; 106(12):4822-7), etc.

"Terapia", "terapéutico", "trata", "tratar" o "tratamiento", como se usan en la presente memoria, se refiere de forma amplia a tratar una enfermedad, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos, y/o aliviar la enfermedad, causando la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos. La terapia abarca profilaxis, prevención, tratamiento, cura, remedio, reducción, mitigar y/o proporcionar alivio de una enfermedad, signos y/o síntomas de una enfermedad. La terapia abarca un alivio de los signos y/o síntomas en pacientes con signos y/o síntomas de enfermedad en curso (p. ej., debilidad muscular, esclerosis múltiple). La terapia también abarca "profilaxis" y "prevención". La profilaxis incluye prevenir la enfermedad que ocurre después del tratamiento de una enfermedad en un paciente o reducir la incidencia o gravedad de la enfermedad en un paciente. El término "reducido", para el propósito de la terapia, se refiere de forma amplia a la reducción clínica significativa en los signos y/o síntomas. La terapia incluye el tratamiento de recaídas o signos y/o síntomas recurrentes (p. ej., degeneración retiniana, pérdida de la visión). La terapia abarca pero no se limita a evitar la aparición de signos y/o síntomas en cualquier momento, sino que reduce también los signos y/o síntomas existentes y elimina signos y/o síntomas existentes. La terapia incluye el tratamiento de una enfermedad crónica ("mantenimiento") y enfermedad aguda. Por ejemplo, el tratamiento incluye tratar o prevenir las recaídas o la reaparición de signos y/o síntomas (p. ej., debilidad muscular, esclerosis múltiple).

Con el fin de mantener el cumplimiento normativo, los bancos de MSC deben mantener un suministro suficiente de células, p. ej., para proporcionar un número suficiente de células para tratar de al menos unos pocos cientos a 10.000 pacientes, los bancos de MSC deben tener al menos 50 mil millones de MSC. La presente invención abarca bancos de MSC crioconservadas y/o que cumplen la normativa GMP. En un aspecto, la preparación de MSC de la presente invención comprende al menos 10^{10} MSC derivadas de hemangioblastos. En otro aspecto, la presente invención proporciona una preparación de MSC que comprende al menos 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} o 10^{14} MSC derivadas de hemangioblastos.

"Normalizar una patología", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a revertir la estructura y/o función anormal que resulta de una enfermedad a un estado más normal. La normalización sugiere que al corregir las anomalías en la estructura y/o función de un tejido, órgano, tipo de célula, etc. que resultan de una enfermedad, la evolución de la patología se puede controlar y mejorar. Por ejemplo, después del tratamiento con las ESC-MSC de la presente invención, las anomalías del sistema inmunitario como resultado de trastornos autoinmunitarios, p. ej., MS, se pueden mejorar, corregir y/o invertir.

Citoblastos pluripotentes inducidos

Otros citoblastos pluripotentes de ejemplo incluyen citoblastos pluripotentes inducidos (células iPS) generados reprogramando una célula somática mediante la expresión o inducción de la expresión de una combinación de

factores ("factores de reprogramación"). Las células iPS se pueden generar usando células somáticas fetales, postnatales, de recién nacidos, juveniles o de adulto. Las células iPS se pueden obtener de un banco de células. Alternativamente, las células iPS se pueden generar de nuevo (por procedimientos conocidos en la técnica) antes de comenzar la diferenciación a células RPE u otro tipo de célula. La fabricación de células iPS puede ser una etapa inicial en la producción de células diferenciadas. Las células iPS se pueden generar específicamente usando material de un paciente particular o donante compatible con el objetivo de generar células de RPE compatibles con el tejido. Las células iPS se pueden producir a partir de células que no son sustancialmente inmunogénicas en un receptor previsto, p. ej., producidas a partir de células autólogas o de células histocompatibles para un receptor previsto. Como se ha descrito antes (véase "células pluripotentes"), las células pluripotentes, incluidas las células iPS, se pueden modificar genéticamente o modificar de otro modo para aumentar la longevidad, potencia, movimiento dirigido o suministrar un factor deseado en células que se diferencian a partir de dichas células pluripotentes (por ejemplo, MSC y hemangioblastos).

Como un ejemplo adicional, los citoblastos pluripotentes inducidos se pueden generar reprogramando una célula somática u otra célula, poniendo en contacto la célula con uno o más factores de reprogramación. Por ejemplo, el(los) factor(es) de reprogramación pueden ser expresados por la célula, p. ej., a partir de un ácido nucleico exógeno añadido a la célula, o a partir de un gen endógeno en respuesta a un factor tal como una molécula pequeña, microARN o similar, que promueve o induce la expresión de ese gen (véase Suh y Blelloch, *Development* 138, 1653-1661 (2011); Miyosh et al., *Cell Stem Cell* (2011), doi: 10.1016/j.stem.2011.05.001; Sancho-Martinez et al., *Journal of Molecular Cell Biology* (2011) 1 - 3, Anokye - Danso et al., *Cell Stem Cell* 8, 376 - 388, 8 de abril de 2011; Orkin y Hochedlinger, *Cell* 145, 835 - 850, 10 de junio de 2011, cada uno de los cuales se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad). Los factores de reprogramación se pueden proporcionar de una fuente exógena, p. ej., añadiéndolos a los medios de cultivo, y se pueden introducir en las células por métodos conocidos en la técnica tales como acoplamiento a péptidos de entrada celular, agentes de transfección de proteínas o ácidos nucleicos, lipofección, electroporación, sistema de suministro de partículas biolístico (pistola de genes), microinyección y similares. Las células iPS se pueden generar usando células somáticas fetales, postnatales, de recién nacido, juveniles o de adulto. En ciertas realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar células somáticas a citoblastos pluripotentes incluyen, p. ej., una combinación de Oct4 (a veces denominado Oct 3/4), Sox2, c-Myc y Klf4. En otras realizaciones, los factores que se pueden usar para reprogramar células somáticas a citoblastos pluripotentes incluyen, p. ej., una combinación de Oct-4, Sox2, Nanog y Lin28. En otras realizaciones, las células somáticas se reprograman expresando al menos 2 factores de reprogramación, al menos tres factores de reprogramación o cuatro factores de reprogramación. En otras realizaciones, se identifican factores de reprogramación adicionales y se usan solos o en combinación con uno o más factores de reprogramación conocidos para reprogramar una célula somática a un citoblasto pluripotente. Las células iPS típicamente se pueden identificar mediante la expresión de los mismos marcadores que los citoblastos embrionarios, aunque una línea celular iPS particular puede variar en su perfil de expresión.

El citoblasto pluripotente inducido se puede producir expresando o induciendo la expresión de uno o más factores de reprogramación en una célula somática. La célula somática es un fibroblasto, tal como un fibroblasto dérmico, fibroblasto sinovial o fibroblasto pulmonar, o una célula somática no fibroblástica. La célula somática se reprograma expresando al menos 1, 2, 3, 4, 5 factores de reprogramación. Los factores de reprogramación se pueden seleccionar de Oct 3/4, Sox2, NANOG, Lin28, c Myc y Klf4. La expresión de los factores de reprogramación se puede inducir poniendo en contacto las células somáticas con al menos un agente, tal como un agente molécula orgánica pequeña, que induce la expresión de factores de reprogramación.

La célula somática también se puede reprogramar usando un procedimiento combinatorio en donde se expresa el factor de reprogramación (p. ej., usando un vector viral, plásmido y similares) y se induce la expresión del factor de reprogramación (p. ej., usando una molécula orgánica pequeña). Por ejemplo, los factores de reprogramación se pueden expresar en la célula somática por infección usando un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral. Además, los factores de reprogramación se pueden expresar en la célula somática usando un vector no integrativo, tal como un plásmido episomal. Véase, p. ej., Yu et al., *Science*. 8 de mayo de 2009; 324 (5928): 797-801, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Cuando los factores de reprogramación se expresan usando vectores no integradores, los factores pueden expresarse en las células usando electroporación, transfección o transformación de las células somáticas con los vectores. Por ejemplo, en células de ratón, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, c myc y Klf4) usando vectores virales integradores es suficiente para reprogramar una célula somática. En células humanas, la expresión de cuatro factores (Oct3/4, Sox2, NANOG y Lin28) usando vectores virales integradores es suficiente para reprogramar una célula somática.

Una vez que los factores de reprogramación se expresan en las células, las células se pueden cultivar. A lo largo del tiempo, aparecen en la placa de cultivo las células con características de ES. Las células se pueden elegir y subcultivar basándose, p. ej., en la morfología de ES, o basándose en la expresión de un marcador seleccionable o detectable. Las células se pueden cultivar para producir un cultivo de células que se parece a las células ES, estas son supuestas células iPS. Las células iPS típicamente pueden identificarse por la expresión de los mismos marcadores que otros citoblastos embrionarios, aunque una línea celular iPS particular puede variar en su perfil de expresión. Los ejemplos de células iPS pueden expresar oct-4, fosfatasa alcalina, antígeno de superficie SSEA 3, antígeno de superficie SSEA 4, TRA 1 60 y/o TRA 1 81.

Para confirmar la pluripotencia de las células iPS, las células se pueden ensayar en uno o más ensayos de pluripotencia. Por ejemplo, se puede ensayar en las células la expresión de marcadores de células ES; se puede evaluar en las células la capacidad de producir teratomas cuando se trasplantan a ratones SCID; se puede evaluar en las células la capacidad de diferenciarse para producir tipos celulares de las tres capas germinales. Una vez que se obtiene una célula iPS pluripotente, se puede usar para producir células hemangioblastos y MSC.

Hemangioblastos

Los hemangioblastos son multipotentes y sirven como precursor común de los linajes de células tanto hematopoyéticas como endoteliales. Durante el desarrollo embrionario, se cree que surgen como un tipo de célula de transición que aparece durante el desarrollo temprano del mesodermo y coloniza las islas de sangre primitivas (Choi et al. *Development* 125 (4): 725-732 (1998). Una vez allí, los hemangioblastos son capaces de dar lugar a células hematopoyéticas tanto primitivas como definitivas, HSC y células endoteliales (Mikkola et al., *J. Hematother, Stem Cell Res* 11 (1): 9 - 17 (2002).

Los hemangioblastos se pueden obtener in vitro tanto de ESC de ratón (Kennedy et al., *Nature* (386): 488 - 493 (1997); Perlingeiro et al., *Stem Cells* (21): 272 - 280 (2003)) como de ESC humanas (ref. 14, 15, solo por referencia, Yu et al., Blood 2010 116: 4786-4794). Otros estudios afirman haber aislado hemangioblastos de la sangre del cordón umbilical (Bordoni et al, *Hepatology* 45 (5) 1218-1228), haciendo circular células CD34-lin-CD45-CD133 de la sangre periférica (Ciraci et al, *Blood* 118: 2105-2115) y del útero de ratón (Sun et al., *Blood* 116 (16): 2932-2941 (2010)). Se han obtenido hemangioblastos derivados de ESC tanto humanos como de ratón a través del cultivo y diferenciación de agrupaciones de células cultivadas en cultivo líquido, seguido del crecimiento de las células en medio semisólido que contiene diversas citoquinas y factores de crecimiento (Kennedy, Perlingeiro, ref 14, 15)); véase también, la patente de EE.UU. nº 8.017.393,

Para los fines de esta solicitud, el término hemangioblastos también incluye las células formadoras de hemangio-colonias descritas en la patente de EE.UU. nº 8.017.393, que además de ser capaz de diferenciarse en linajes de células hematopoyéticas y endoteliales, son capaces de convertirse en células de músculo liso y que no son positivas para CD34, CD31, KDR y CD133. Los hemangioblastos útiles en los métodos descritos en la presente memoria se pueden derivar u obtenerse de cualquiera de estos métodos conocidos. Por ejemplo, los cuerpos embrioides se pueden formar cultivando células pluripotentes en condiciones no unidas, p. ej., sobre un sustrato de baja adherencia o en una "gota colgante". En estos cultivos, las células ES pueden formar agregados o agrupaciones de células denominadas cuerpos embrioides. Véase Itskovitz-Eldor et al., *Mol. Med*. febrero 2000; 6 (2): 88-95,

Típicamente, los cuerpos embrioides se forman inicialmente como agregados sólidos o agrupaciones de células pluripotentes, y a lo largo del tiempo algunos de los cuerpos embrioides van a incluir cavidades llenas de líquido, los primeros se denominan en la bibliografía EB "simples" y los últimos cuerpos embrioides "quísticos". *Ídem.* Las células en estos EB (tanto formas sólidas como quísticas) se pueden diferenciar y a lo largo del tiempo producir números crecientes de células. Opcionalmente, los EB después se pueden cultivar como cultivos adherentes y dejar que formen crecimientos. Del mismo modo, las células pluripotentes que se dejan crecer en exceso y forman una población de células de múltiples capas se pueden diferenciar a lo largo del tiempo.

En una realización, los hemangioblastos se generan mediante las etapas que comprenden (a) cultivar una línea de ESC durante 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días para formar agrupaciones de células, y (b) inducir dichas agrupaciones de células para que se diferencien en hemangioblastos. En una realización adicional, las agrupaciones de células en la etapa (b) se cultivan en un medio basado en metilcelulosa exento de suero rico en citoquinas (14, 15).

En una realización, los hemangioblastos se generan mediante las etapas que comprenden (a) cultivar una línea de ESC durante 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días para formar agrupaciones de células, y (b) inducir dichas agrupaciones de células para que se diferencien en hemangioblastos por cultivo en un medio basado en metilcelulosa, exento de suero y rico en citoquinas.

En otra realización, los hemangioblastos se generan induciendo cualquier célula pluripotente como se describe en la presente memoria. En una realización adicional, los hemangioblastos se generan a partir de células iPS usando factores añadidos de forma exógena u otros métodos conocidos en la técnica tales como proteínas o microARN (véase Zhou et al., *Cell Stem Cell* (4): 1-4, 2009; Miyoshi et al. *Cell Stem Cell* (8): 1-6, 2011; Danso et al., *Cell Stem Cell* (8): 376 - 388, 2011).

En otro aspecto, la descripción proporciona preparaciones de células estromales mesenquimales (MSC) y métodos para generar MSC usando hemangioblastos. Las MSC pueden diferir de las MSC preexistentes en uno o más aspectos, como se describe con más detalle en la presente memoria. En una realización, los hemangioblastos se recogen después de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días en cultivo usando un medio de metilcelulosa exento de suero más uno o más ingredientes seleccionados del grupo que comprende penicilina/estreptomicina (pen/strp), complemento de crecimiento EX-CYTE® (un concentrado soluble en agua que comprende 9,0-11,0 g/l de colesterol y 13,0-18,0 g/l de lipoproteínas y ácidos grasos a pH 7-8,4), ligando Flt3 (FL), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de fibroblastos básico

(bFGF), factor derivado de citoblastos (SCF), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interleuquina 3 (IL3) e interleuquina 6 (IL6), induciendo una célula pluripotente seleccionada del grupo que comprende blastocistos, ICM en placa, uno o más blastómeros u otras partes de un embrión previo a la etapa de implantación o de estructura embrionaria, independientemente de si se produce por fertilización, transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), partenogénesis, androgénesis u otros medios sexuales o asexuales, y células derivadas por reprogramación (células iPS). En una realización preferida de la presente invención, los hemangioblastos se recogen entre 6-14 días, de cultivo en, por ejemplo, metilcelulosa exenta de suero más los ingredientes de la realización anterior. En una realización preferida, los ingredientes están presentes en dicho medio en las siguientes concentraciones: ligando Flt3 (FL) 50 ng/ml, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) 50 ng/ml, trombopoyetina (TPO) 50 ng/ml y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) 20 ng/ml, factor derivado de citoblastos (SCF) 50 ng/ml, factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) 20 ng/ml, interleuquina 3 (IL3) 20 ng/ml, interleuquina 6 (IL6) 20 ng/ml, FL 50 ng/ml, VEGF 50 ng/ml, TPO 50 ng/ml, y bFGF 30 ng/ml.

En otra realización, una agrupación de células compuestas sustancialmente de hemangioblastos se vuelven a sembrar en placa y se cultivan durante al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22., 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 días formando una preparación de células estromales mesenquimales. En una realización, las células estromales mesenquimales se generan mediante las etapas que comprenden (a) cultivar ESC durante 8-12 días, (b) recoger los hemangioblastos que forman agrupaciones de células, (c) volver a sembrar en placa los hemangioblastos de la etapa (b), y (d) cultivar los hemangioblastos de la etapa (c) durante entre 14 y 30 días.

En una realización, los hemangioblastos se recogen, se vuelven a sembrar en placa y se cultivan en medio líquido en condiciones sin alimentación en donde no está contenida en el cultivo una capa de células de alimentación tales como fibroblastos embrionarios de ratón, células OP9 u otros tipos de células conocidos por los expertos en la técnica. En una realización preferida, los hemangioblastos se cultivan en una matriz extracelular. En una realización preferida adicional, los hemangioblastos se cultivan en una matriz extracelular, en donde dicha matriz comprende una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) que gelifica a temperatura ambiente para formar una membrana basal reconstituida (Matrigel). En una realización todavía más preferida, los hemangioblastos se generan de acuerdo con las etapas que comprenden (a) cultivar dichos hemangioblastos en Matrigel durante al menos 7 días, (b) transferir los hemangioblastos de la etapa (a) a una placa de cultivo tisular no recubierta y cultivar adicionalmente dichos hemangioblastos de la etapa (b) durante aproximadamente 7 a 14 días). Los hemangioblastos se pueden cultivar en un sustrato que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en: factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento tipo insulina 1, factor de crecimiento de fibroblastos bovinos (bFGF), y/o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), extracto de membrana basal humana (BME) (p. ej., Cultrex BME, Trevigen) o una matriz EHS, laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno (p. ej. colágeno I, colágeno IV) y sulfato de heparán. Dicha matriz o componentes de la matriz pueden ser de origen mamífero, o más específicamente humano. En una realización, los hemangioblastos se cultivan en un medio líquido que comprende suero sobre una placa recubierta con Matrigel, en donde el medio de cultivo puede comprender ingredientes seleccionados de αMEM (Sigma-Aldrich) complementado con suero de ternero fetal al 10-20% (αMEM+ FCS al 20%), αMEM complementado con suero AB humano inactivado con calor al 10-20% e IMDM complementado suero AB humano inactivado con calor al 10-20%.

Células estromales mesenquimales generadas por cultivo de hemangioblastos

Una realización de la presente invención comprende células estromales mesenquimales mejoradas. Las células estromales mesenquimales de la presente invención se pueden generar a partir de hemangioblastos usando procedimientos mejorados de cultivo de hemangioblastos.

Las células estromales mesenquimales de la presente invención pueden retener niveles de potencia más altos y pueden no agregarse o pueden agregarse sustancialmente menos que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC. En una realización de la presente invención, una preparación de células estromales mesenquimales generadas de acuerdo con uno cualquiera o más de los procedimientos de la presente invención retiene niveles más altos de potencia, y no se agregan o se agregan sustancialmente menos que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de ESC.

Una realización de la presente invención proporciona procedimientos de cultivo de hemangioblastos que generan preparaciones de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales retienen un fenotipo juvenil. Las preparaciones farmacéuticas de células estromales mesenquimales de la presente descripción pueden demostrar propiedades terapéuticas mejoradas cuando se administran a un hospedante mamífero que necesita tratamiento.

Una realización de la presente descripción proporciona una preparación de células estromales mesenquimales generadas cultivando hemangioblastos humanos. Una realización adicional de la presente invención proporciona un procedimiento para generar una preparación de células estromales mesenquimales cultivando hemangioblastos humanos. Una realización de un procedimiento de la presente invención, en donde dichos hemangioblastos

humanos se cultivan en condiciones sin alimentación y luego se siembran en una matriz. Todavía otra realización de la presente invención, en donde dicha matriz se selecciona del grupo que comprende factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a insulina 1, factor de crecimiento de fibroblastos bovinos (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicanos, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, sulfato de heparán, una preparación soluble a partir de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), Matrigel y un extracto de membrana basal humana. En otra realización más, dicha matriz puede ser de origen mamífero o humano.

En otra realización, los hemangioblastos se cultivan en un medio que comprende suero o un sustituto de suero, tal como αMEM complementado con suero de ternero fetal al 20%. En una realización adicional, los hemangioblastos se cultivan en una matriz durante aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días. En una realización adicional más de la presente descripción, se genera una preparación de células estromales mesenquimales mediante las etapas que comprenden (a) cultivar hemangioblastos en Matrigel durante aproximadamente 7 días, (b) transferir los hemangioblastos de la etapa (a) fuera del Matrigel y cultivar los hemangioblastos en una placa de cultivo tisular no recubierta durante 9-100 días adicionales, aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 días.

En una realización de la presente descripción, se genera una preparación de células estromales mesenquimales cultivando hemangioblastos en un medio que comprende suero o un sustituto de suero tal como un aMEM complementado con suero de ternera fetal al 20%. En una realización adicional de la presente invención, dichos hemangioblastos se cultivan en una matriz durante aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días.

En una realización de la presente invención, los hemangioblastos se diferencian de ESC. En una realización adicional de la presente invención, los hemangioblastos de la realización anterior se diferencian de ESC en donde dichos ESC se seleccionan del grupo que comprende iPS y blastómeros.

Una realización de la presente descripción comprende una preparación de células estromales mesenquimales generadas por un procedimiento en donde los hemangioblastos se diferencian de ESC. En una realización adicional de la presente invención, los hemangioblastos de la realización anterior se diferencian de ESC en donde dichos ESC se seleccionan del grupo que comprende iPS y blastómeros.

En una realización de la presente invención, los hemangioblastos se diferencian de ESC siguiendo las etapas que comprenden (a) cultivar los ESC, por ejemplo, en presencia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y/o proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4) para formar agrupaciones de células; (b) cultivar dichas agrupaciones de células en presencia de al menos un factor de crecimiento (p. ej., factor de crecimiento de fibroblastos básico (FCFb), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), factor de citoblastos (SCF), Flt 3L (FL), trombopoyetina (TPO) y/o tPTD-HOXB4) en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de dichas agrupaciones de células en hemangioblastos; y (c) cultivar dichos hemangioblastos en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento adicional (p. ej., insulina, transferrina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO), factor de citoblastos (SCF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), y tPTD-HOXB4), en donde dicho al menos un factor de crecimiento adicional se proporciona en una cantidad suficiente para expandir dichas agrupaciones de células en dicho cultivo y en donde se añade opcionalmente cobre en cualquiera de las etapas (a)-(c).

En una realización de la presente invención, se genera una preparación de células estromales mesenquimales cultivando hemangioblastos, en donde dichos hemangioblastos se diferencian de ESC siguiendo las etapas que comprenden (a) cultivar ESC en presencia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4) en las 0-48 horas de inicio de dicho cultivo para formar agrupaciones de células; (b) cultivar dichas agrupaciones de células en presencia de al menos un factor de crecimiento seleccionado del grupo que comprende el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), factor de citoblastos (SCF), Flt 3L (FL), trombopoyetina (TPO) y tPTD-HOXB4, en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de dichas agrupaciones de células en hemangioblastos; y (c) cultivar dichos hemangioblastos en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento adicional seleccionado del grupo que comprende insulina, transferrina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO), factor de citoblastos (SCF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), y tPTD-HOXB4, en donde dicho al menos un factor de crecimiento adicional se proporciona en una cantidad suficiente para expandir dichas agrupaciones de células en dicho cultivo celular.

En otra realización, se genera una preparación de citoblastos mesenquimales mediante las etapas que comprenden (a) recoger hemangioblastos después de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días de inducción de los ESC para diferenciarse en dichos hemangioblastos, y (b) recoger las células estromales mesenquimales que se generan en aproximadamente 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 días de la inducción de dichos hemangioblastos de la etapa (a) para diferenciarse en dichas células mesenquimales.

En otra realización más, se genera una preparación de al menos 80, 85, 90, 95, 100, 125 o 125 millones de células estromales mesenquimales a partir de aproximadamente 200.000 hemangioblastos en aproximadamente 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 días de cultivo de los hemangioblastos, en donde dicha preparación de células estromales mesenquimales comprende menos de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1 %, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% o 0,0001% de citoblastos embrionarios humanos. En otra realización más, se generan al menos 80, 85, 90, 100, 125 o 150 millones de células estromales mesenquimales a partir de aproximadamente 200.000 hemangioblastos en aproximadamente 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 días de cultivo de los hemangioblastos

En una realización de un procedimiento de la presente descripción, se purifica sustancialmente una preparación de células estromales mesenquimales con respecto a citoblastos embrionarios humanas. En una realización adicional de un procedimiento de la presente descripción, se purifica sustancialmente una preparación de células estromales mesenquimales con respecto a citoblastos embrionarios humanos de modo que dicha preparación comprende al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de células estromales mesenquimales.

En otra realización de la presente descripción, una preparación de células estromales mesenquimales generadas por uno cualquiera o más de los procedimientos de la presente descripción no forma teratomas cuando se introduce en un hospedante.

En otra realización de la presente descripción, al menos el 50% de una preparación de células estromales mesenquimales son positivas para CD105 o CD73 en aproximadamente 7-20 (p. ej., 15) días de cultivo. En una realización preferida de la presente descripción, al menos el 50% de una preparación de células estromales mesenquimales generadas de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención son positivas para CD105 o CD73 después de aproximadamente 7-15 días de cultivo. En una realización adicional de la presente descripción, al menos el 80% de una preparación de células estromales mesenquimales son positivas para CD105 y CD73 en aproximadamente 20 días de cultivo. En otra realización más de la presente descripción, al menos el 80% de una preparación de células estromales mesenquimales generadas de acuerdo con uno cualquiera o más de los procedimientos de la presente invención, son positivas para CD105 y CD73 en aproximadamente 20 días de cultivo.

En un aspecto ilustrativo, la presente descripción proporciona una preparación farmacéutica adecuada para usar en un paciente mamífero, que comprende al menos 10^6 células estromales mesenquimales y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células estromales mesenquimales tienen capacidad de reproducción para experimentar al menos 10 duplicaciones de población en cultivo celular con menos del 25 por ciento de las células que sufran muerte celular, senescencia o diferenciación en células que no son MSC en la décima duplicación.

En un aspecto ilustrativo, la presente descripción proporciona una preparación farmacéutica adecuada para usar en un paciente mamífero que comprende al menos 10^6 células estromales mesenquimales y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células estromales mesenquimales tienen capacidad de replicación para experimentar al menos 5 pases en cultivo celular con menos del 25 por ciento de las células que sufren muerte celular, senescencia o diferenciación en fibroblastos en el 5º pase.

En un aspecto ilustrativo, la presente descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende al menos 10^6 células estromales mesenquimales y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células estromales mesenquimales se diferencian de una célula hemangioblasto.

En un aspecto ilustrativo, la presente descripción proporciona un banco de células criogénicas que comprende al menos 10^8 células estromales mesenquimales, en donde las células estromales mesenquimales tienen capacidad de reproducción para experimentar al menos 10 duplicaciones de población en cultivo celular con menos de 25% de las células que sufren muerte celular, senescencia o diferenciación en fibroblastos en la décima duplicación de población.

En un aspecto ilustrativo, la presente descripción proporciona una preparación celular purificada que comprende al menos 10^6 células estromales mesenquimales y menos de uno por ciento de cualquier otro tipo de célula, en donde las células estromales mesenquimales tienen capacidad de reproducción para experimentar al menos 10 duplicaciones de población en cultivo celular con menos del 25 por ciento de las células que sufren muerte celular, senescencia o diferenciación en células que no son MSC en la décima duplicación de población.

Las células estromales mesenquimales se pueden diferenciar de una fuente de citoblastos pluripotentes, tal como una línea de citoblastos embrionarios o una línea de citoblastos pluripotentes inducidos. Por ejemplo, todas las células estromales mesenquimales de la preparación o banco se pueden diferenciar de una fuente común de citoblastos pluripotentes. Además, las células estromales mesenquimales se pueden diferenciar de una fuente de citoblastos pluripotentes, hacer pases en cultivo para expandir el número de células estromales mesenquimales, y aislar del cultivo después de menos de veinte duplicaciones de población.

Las células estromales mesenquimales pueden ser genotípicamente idénticas en HLA. Las células estromales mesenquimales pueden ser genómicamente idénticas.

Al menos 30% de las células estromales mesenquimales pueden ser positivas para CD10. Además, al menos 60% de las células estromales mesenquimales pueden ser positivas para los marcadores CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44 y CD166 y HLA-ABC. En una realización ilustrativa, menos de 30% de las células estromales mesenquimales pueden ser positivas para los marcadores CD31, CD34, CD45, CD133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 y TLR3.

Las células estromales mesenquimales pueden tener tasas de replicación para experimentar al menos 10 duplicaciones de población en cultivo celular en menos de 25 días. Las células estromales mesenquimales pueden tener una longitud media del fragmento de restricción terminal (TRF) que puede ser mayor de 8 kb. Las células estromales mesenquimales pueden tener un menor contenido y/o actividad enzimática estadísticamente significativa, relativa a las preparaciones de células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea que han experimentado cinco duplicaciones de población, de proteínas implicadas en uno o más de (i) la regulación del ciclo celular y envejecimiento celular, (ii) energía celular y/o metabolismo lipídico, y (iii) apoptosis. Las células estromales mesenquimales pueden tener un mayor contenido y/o actividad enzimática estadísticamente significativa de las proteínas implicadas en la estructura del citoesqueleto y la dinámica celular relacionada con las mismas, con respecto a las preparaciones de células estromales mesenquimales derivadas de la médula ósea. Las células estromales mesenquimales no pueden experimentar más de un aumento de 75 por ciento de las células que tienen un valor de dispersión de luz frontal, medida por citometría de flujo, mayor de 5.000.000 en 10 duplicaciones de población en cultivo. Las células estromales mesenquimales pueden, en estado de reposo, expresar ARNm que codifica Interleuquina-6 en un nivel que puede ser inferior al diez por ciento del nivel de ARNm de IL-6 expresado por preparaciones de células estromales mesenquimales, en un estado de reposo, derivado de médula ósea o tejido adiposo.

La preparación puede ser adecuada para la administración a un paciente humano. La preparación puede ser adecuada para la administración a un mamífero no humano de veterinario.

En un aspecto ilustrativo, la descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales pueden experimentar al menos 10 duplicaciones de población y en donde las 10 duplicaciones de población ocurren en aproximadamente 27 días, más preferiblemente menos de aproximadamente 26 días, preferiblemente menos de 25 días, más preferiblemente menos de aproximadamente 24 días, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 23 días, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 22 días o menos.

En un aspecto ilustrativo, la descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales pueden experimentar al menos 15 duplicaciones de población.

Dichas células estromales mesenquimales pueden experimentar al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más duplicaciones de población.

En un aspecto ilustrativo, la descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales pueden experimentar al menos 15 duplicaciones de población, al menos 20 duplicaciones de población, o al menos 25 duplicaciones de población en cultivo.

Las células estromales mesenquimales se pueden producir por diferenciación in vitro de hemangioblastos. Las células estromales mesenquimales pueden ser células de primate u otras células de mamífero. Las células estromales mesenquimales pueden ser células humanas.

Dichas duplicaciones de población ocurren en aproximadamente 35 días, más preferiblemente en aproximadamente 34 días, preferiblemente en 33 días, más preferiblemente en 32 días, todavía más preferiblemente en 31 días, o todavía más preferiblemente en aproximadamente 30 días.

La preparación puede comprender menos de aproximadamente 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5 %, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% o 0,0001% de células pluripotentes.

La preparación puede estar desprovista de células pluripotentes.

La preparación puede comprender al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de células estromales mesenquimales.

Al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales pueden ser positivas para (i) al menos uno de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; (ii) al menos uno de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-

1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166, CD274 y HLA-ABC; (iii) CD105, CD73 y/o CD90 o (iv) cualquier combinación de los mismos. Al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales pueden ser positivas para (i) al menos dos de CD105, CD73 y/o CD90 (ii) al menos dos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; o (iii) todos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274 y HLA-ABC. Al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales (i) pueden ser positivas para todos de CD105, CD73 y CD90; (ii) positivas para todos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274 y HLA-ABC y/o (ii) pueden ser negativas para, o menos de 5% o menos de 10% de las células expresan CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 y/o TLR3. Al menos 60%, 70%, 80% o 90% de dichas células estromales mesenquimales pueden ser positivas para (i) uno o más de CD105, CD73 y CD90 (ii) uno o más de CD10, CD24, IL-11, AIRE -1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; o (iii) uno o más de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274 y HLA-ABC.

La preparación farmacéutica puede comprender una cantidad de células estromales mesenquimales eficaces para tratar una respuesta inmunitaria no deseada en un sujeto que lo necesita.

La preparación farmacéutica puede comprender otras células, tejido u órgano para trasplante en un receptor que lo necesite. Las otras células o tejido pueden ser células de RPE, células de piel, células de córnea, células pancreáticas, células de hígado, células cardíacas o tejido que contiene cualquiera de dichas células. Dichas células estromales mesenquimales pueden no derivar de la médula ósea y la potencia de la preparación en un ensayo de regulación inmunitaria puede ser mayor que la potencia de una preparación de células estromales mesenquimales derivadas de la médula ósea. La potencia se puede ensayar mediante un ensayo de regulación inmunitaria que determina la dosis de CE50. La preparación puede retener entre aproximadamente 50 y 100% de su capacidad proliferativa después de diez duplicaciones de población.

Dichas células estromales mesenquimales pueden no derivar directamente de células pluripotentes y en donde dichas células estromales mesenquimales (a) no se agregan o se agregan sustancialmente menos que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de las células pluripotentes; (b) se dispersan más fácilmente cuando se dividen en comparación con las células estromales mesenquimales derivadas directamente de células pluripotentes; (c) pueden ser mayores en número que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de las células pluripotentes cuando comienzan con números equivalentes de células pluripotentes; y/o (d) adquieren marcadores característicos de superficie de células mesenquimales más temprano que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de células pluripotentes.

Dichas células estromales mesenquimales pueden ser de mamífero. Dichas células estromales mesenquimales pueden ser humanas, caninas, bovinas, de primates no humanos, murinas, felinas o equinas.

En un aspecto ilustrativo, la presente descripción proporciona un método para generar células estromales mesenquimales que comprende cultivar hemangioblastos en condiciones que dan lugar a citoblastos mesenquimales. Dichos hemangioblastos se pueden cultivar en condiciones sin alimentación. Dichos hemangioblastos se pueden poner en una matriz. Dicha matriz puede comprender uno o más de: factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a insulina 1, factor de crecimiento de fibroblastos bovinos (bFGF) y/o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Dicha matriz se puede seleccionar del grupo que consiste en: laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, sulfato de heparán, Matrigel (una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)), un extracto de membrana basal humana, y cualquier combinación de los mismos. Dicha matriz puede comprender una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm.

Dichas células estromales mesenquimales pueden ser de mamífero. Dichas células estromales mesenquimales pueden ser humanas, caninas, bovinas, de primate no humano, murino, felino o equino.

Dichos hemangioblastos se pueden cultivar en un medio que comprende αMEM. Dichos hemangioblastos se pueden cultivar en un medio que comprende suero o un sustituto de suero. Dichos hemangioblastos se pueden cultivar en un medio que comprende, αMEM complementado con 0%, 0,1% -0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10 %, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% de suero de ternero fetal. Dichos hemangioblastos se pueden cultivar en dicha matriz durante al menos aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días.

Dichos hemangioblastos se pueden diferenciar de células pluripotentes.

Dichas células pluripotentes pueden ser células iPS o células pluripotentes derivadas de uno o más blastómeros sin la destrucción de un embrión humano.

Dichos hemangioblastos se pueden diferenciar de células pluripotentes por un método que comprende (a) cultivar dichas células pluripotentes para formar agrupaciones de células. Las células pluripotentes se pueden cultivar en presencia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y/o proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4). En la etapa (a), las células pluripotentes se pueden cultivar en presencia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y/o

proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4). Dichos VEGF y BMP-4 se pueden añadir al cultivo de células pluripotentes en las 0-48 horas de inicio de dicho cultivo celular, y dicho VEGF se puede añadir opcionalmente en una concentración de 20-100 nm/ml y dicho BMP-4 se puede añadir opcionalmente en una concentración de 15-100 ng/ml. Dichos VEGF y BMP-4 se pueden añadir al cultivo celular de la etapa (a) en las 0-48 horas de inicio de dicho cultivo celular, y dicho VEGF se puede añadir opcionalmente en una concentración de 20-100 nm/ml y dicha BMP-4 se puede añadir opcionalmente en una concentración de 15-100 ng/ml. Dichos hemangioblastos se pueden diferenciar de las células pluripotentes por un método que puede comprender además: (b) cultivar dichas agrupaciones de células en presencia de al menos un factor de crecimiento en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de dichas agrupaciones de células en hemangioblastos. Dicho al menos un factor de crecimiento añadido en la etapa (b) puede comprender uno o más del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), factor de citoblastos (SCF), Flt 3L (FL), trombopoyetina (TPO), EPO y/o tPTD-HOXB4.

Dicho al menos un factor de crecimiento añadido en la etapa (b) puede comprender uno o más de: aproximadamente 20-25 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), aproximadamente 20-100 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), aproximadamente 15-100 ng/ml de proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), aproximadamente 20-50 ng/ml de factor de citoblastos (SCF), aproximadamente 10-50 ng/ml de Flt 3L (FL), aproximadamente 20-50 ng/ml de trombopoyetina (TPO), EPO, y/o 1,5-5 U/ml de tPTD-HOXB4.

Se puede añadir uno o más de dichos al menos un factor de crecimiento opcionalmente añadido en la etapa (b) a dicho cultivo en las 36-60 horas o 40-48 horas desde el inicio de la etapa (a).

Uno o más de dichos al menos un factor de crecimiento añadido en la etapa (b) se pueden añadir a dicho cultivo en las 48-72 horas desde el inicio de la etapa (a).

Dicho al menos un factor añadido en la etapa (b) puede comprender uno o más de bFGF, VEGF, BMP-4, SCF y/o FL.

El método puede comprender además (c) disociar dichas agrupaciones de células, opcionalmente en células individuales.

El método puede comprender además (d) cultivar dichos hemangioblastos en un medio que comprende al menos un factor de crecimiento adicional, en donde dicho al menos un factor de crecimiento adicional puede estar en una cantidad suficiente para expandir los hemangioblastos.

En la etapa (d), dicho al menos un factor de crecimiento adicional puede comprender uno o más de: insulina, transferrina, factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO), factor de citoblastos (SCF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4) y/o tPTD-HOXB4.

En la etapa (d), dicho al menos un factor de crecimiento adicional puede comprender uno o más de: aproximadamente 10-100 µg/ml de insulina, aproximadamente 200-2.000 µg/ml de transferrina, aproximadamente 10-50 ng/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), aproximadamente 10-20 ng/ml de interleuquina-3 (IL-3), aproximadamente 10-1000 ng/ml de interleuquina-6 (IL-6), aproximadamente 10-50 ng/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), aproximadamente 3-50 U/ml de eritropoyetina (EPO), aproximadamente 20-200 ng/ml de factor de citoblastos (SCF), aproximadamente 20-200 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), aproximadamente 15 -150 ng/ml de proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4), y/o aproximadamente 1,5-15 U/ml de tPTD-HOXB4.

Dicho medio en la etapa (a), (b), (c) y/o (d) puede ser un medio exento de suero.

El método como se ha descrito antes puede comprender además (e) inactivar mitóticamente las células estromales mesenquimales.

Se pueden generar al menos 80, 85, 90, 95, 100, 125 o 150 millones de células estromales mesenquimales.

Dichos hemangioblastos se pueden recoger después de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 días del inicio de la inducción de la diferenciación de dichas células pluripotentes.

Dichas células estromales mesenquimales se pueden generar en al menos 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 días del inicio de la inducción de la diferenciación de dichas células pluripotentes.

El método puede dar como resultado que se generen al menos 80, 85, 90, 95, 100, 125 o 150 millones de células estromales mesenquimales a partir de aproximadamente 200.000 hemangioblastos en aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23., 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 días de cultivo.

Las células estromales mesenquimales se pueden generar a partir de hemangioblastos en una proporción de hemangioblastos a células estromales mesenquimales de al menos 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:415, 1:425, 1. :440; 1:450, 1:365, 1:475, 1:490 y 1:500 dentro de aproximadamente 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 días de cultivo como hemangioblastos.

Dichas células pueden ser humanas.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos obtenidas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona células estromales mesenquimales derivadas por diferenciación in vitro de hemangioblastos.

Al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales (i) pueden ser positivas para todos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274, y HLA-ABC y (ii) pueden ser negativas para, o menos de 5% o menos de 10% de las células expresan CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 y/o TLR3.

Al menos 50% de dichas células estromales mesenquimales pueden ser positivas para (i) todos de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; o (ii) todos de CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166, CD274 y HLA-ABC.

Al menos 60%, 70%, 80% o 90% de dichas células estromales mesenquimales pueden ser positivas para (i) al menos uno de CD10, CD24, IL-11, AIRE-1, ANG-1, CXCL1, CD105, CD73 y CD90; o (ii) al menos uno de CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD 44, CD166, CD274 y HLA-ABC.

Las células estromales mesenquimales pueden no expresar o menos de 5% o menos de 10% de las células pueden expresar al menos uno de CD31, 34, 45, 133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 o TLR3.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una preparación de células estromales mesenquimales como se ha descrito anteriormente.

Dicha preparación puede comprender menos de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006 %, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002%, o 0,0001% de células pluripotentes.

La preparación puede estar desprovista de células pluripotentes.

Dicha preparación puede estar sustancialmente purificada y opcionalmente puede comprender al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de células estromales mesenquimales humanas.

La preparación puede comprender niveles sustancialmente similares de proteína p53 y p21 o en donde los niveles de proteína p53 en comparación con la proteína p21 pueden ser 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayores.

Las células estromales mesenquimales o las MSC en la preparación pueden ser capaces de experimentar al menos 5 duplicaciones de población en cultivo, o pueden ser capaces de experimentar al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más duplicaciones de población en cultivo.

Dichas células estromales mesenquimales (a) pueden no agregarse o agregarse sustancialmente menos que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de células pluripotentes; (b) pueden dispersarse más fácilmente cuando se dividen en comparación con las células estromales mesenquimales derivadas directamente de células pluripotentes; (c) pueden ser mayores en número que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de las células pluripotentes cuando empiezan con números equivalentes de células pluripotentes; y/o (d) adquieren marcadores característicos de superficie de células mesenquimales antes que las células estromales mesenquimales derivadas directamente de células pluripotentes.

En otro aspecto, la descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende cualquier célula estromal mesenquimal o preparación de células estromales mesenquimales como se ha descrito anteriormente.

La preparación farmacéutica puede comprender una cantidad de células estromales mesenquimales eficaces para tratar una respuesta inmunitaria no deseada.

La preparación farmacéutica puede comprender una cantidad de células estromales mesenquimales eficaces para tratar una respuesta inmunitaria no deseada y puede comprender además otras células o tejidos para trasplante en un receptor que lo necesite.

Dichas otras células o tejidos pueden ser células alogénicas o singénicas pancreáticas, neurales, hepáticas, RPE, corneales o tejidos que contienen cualquiera de los anteriores.

La preparación farmacéutica se puede usar para tratar un trastorno autoinmunitario o una reacción inmunitaria contra células alogénicas, o se puede usar en el tratamiento de la esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, neoplasias hematológicas, infarto de miocardio, rechazo de trasplante de órganos, nefropatía crónica por aloinjerto, cirrosis, insuficiencia hepática, insuficiencia cardíaca, GvHD, fractura tibial, disfunción del ventrículo izquierdo, leucemia, síndrome mielodisplásico, enfermedad de Crohn, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteogénesis imperfecta, hipocolesterolemia familiar homocigótica, tratamiento después de la meniscectomía, periodontitis en adultos, vasculogénesis en pacientes con isquemia miocárdica grave, lesión de la médula espinal, osteodisplasia, isquemia crítica de extremidades, enfermedad del pie diabético, síndrome de Sjogren primario, osteoartritis, defectos del cartílago, laminitis, atrofia multisistémica, esclerosis lateral amiotrófica, cirugía cardíaca, lupus eritematoso sistémico, aloinjertos de riñón vivos, trastornos no malignos de los glóbulos rojos, quemaduras térmicas, quemaduras por radiación, enfermedad de Parkinson, microfracturas, epidermólisis ampollosa, isquemia coronaria grave, miocardiopatía dilatada idiopática, osteonecrosis de la cabeza femoral, nefritis lúpica, defectos de huecos óseos, accidente cerebrovascular cerebral isquémico, después del accidente cerebrovascular, síndrome de radiación aguda, enfermedad pulmonar, artritis, regeneración ósea, uveítis o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la descripción proporciona un kit que comprende cualquiera de las células estromales mesenquimales o cualquier preparación de células estromales mesenquimales como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la descripción proporciona un kit que comprende las células estromales mesenquimales o la preparación de células estromales mesenquimales como se ha descrito anteriormente, en donde dichas células o preparación de células se pueden congelar o crioconservar.

En otro aspecto, la descripción proporciona un kit que comprende las células estromales mesenquimales o la preparación de células estromales mesenquimales como se ha descrito anteriormente, en donde dichas células o preparación de células pueden estar contenidas en un vehículo de suministro celular.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar una cantidad eficaz de células estromales mesenquimales o una preparación de células estromales mesenquimales como se ha descrito anteriormente a un sujeto que lo necesita.

El método puede comprender además el trasplante de otras células o tejidos. Las células o tejidos pueden comprender células retinianas, RPE, corneales, neurales, inmunitarias, de médula ósea, hepáticas o pancreáticas. La enfermedad o trastorno se puede seleccionar de esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, neoplasias hematológicas, infarto de miocardio, rechazo de trasplante de órganos, nefropatía crónica por aloinjerto, cirrosis, insuficiencia hepática, insuficiencia cardíaca, GvHD, fractura de la tibia, disfunción del ventrículo izquierdo, leucemia, síndrome mielodisplásico, enfermedad de Crohn, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, osteogénesis imperfecta, hipocolesterolemia familiar homocigótica, tratamiento después de la meniscectomía, periodontitis en adultos, vasculogénesis en pacientes con isquemia miocárdica grave, lesión de la médula espinal, osteodisplasia, isquemia crítica de las extremidades, enfermedad del pie diabético, síndrome de Sjogren primario, osteoartritis, defectos del cartílago, atrofia multisistémica, esclerosis lateral amiotrófica, cirugía cardíaca, lupus eritematoso sistémico, aloinjertos de riñón vivos, trastornos no malignos de los glóbulos rojos, quemaduras térmicas, enfermedad de Parkinson, microfracturas, epidermólisis ampollosa, isquemia coronaria grave, miocardiopatía dilatada idiopática, osteonecrosis de la cabeza femoral, nefritis lúpica, defectos de huecos óseos, accidente cerebrovascular cerebral isquémico, después del accidente cerebrovascular, síndrome de radiación aguda, enfermedad pulmonar, artritis, regeneración ósea, uveítis o combinaciones de los mismos.

La enfermedad o trastorno puede ser uveítis. Dicha enfermedad o trastorno puede ser un trastorno autoinmunitario o una reacción inmunitaria contra células alogénicas. El trastorno autoinmunitario puede ser esclerosis múltiple.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar la pérdida ósea o el daño del cartílago que comprende administrar una cantidad eficaz de células estromales mesenquimales o preparación de células estromales mesenquimales a un sujeto que lo necesita.

Las células estromales mesenquimales se pueden administrar en combinación con una célula o tejido alogénico o singénico trasplantado. La célula trasplantada alogénica puede comprender una célula del epitelio pigmentario de la retina, célula retinal, un célula corneal o célula muscular.

En otro aspecto, la descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende células estromales mesenquimales mitóticamente inactivadas. Las células estromales mesenquimales pueden diferenciarse de una célula de hemangioblasto.

La composición farmacéutica puede comprender al menos 10^6 células estromales mesenquimales y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende células mesenquimales mitóticamente inactivadas producidas mediante el método anterior.

La preparación puede ser adecuada para la administración a un paciente humano. La preparación puede ser adecuada para la administración a un mamífero no humano de veterinario.

La preparación farmacéutica puede estar desprovista de células pluripotentes.

La preparación farmacéutica puede comprender una cantidad de células estromales mesenquimales eficaz para tratar una respuesta inmunitaria no deseada en un sujeto que lo necesita.

La preparación farmacéutica puede comprender una cantidad de células estromales mesenquimales eficaz para tratar una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en: afecciones respiratorias inflamatorias, afecciones respiratorias debidas a una lesión aguda, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, síndrome de dificultad respiratoria del adulto postraumático, enfermedad pulmonar de trasplante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, bronquitis obstructiva crónica, bronquitis, una reacción alérgica, daño debido a neumonía bacteriana, daño debido a neumonía viral, asma, exposición a irritantes, uso de tabaco, dermatitis atópica, rinitis alérgica, pérdida de audición, pérdida de audición autoinmunitaria, pérdida de audición inducida por ruido, psoriasis y cualquier combinación de los mismos.

Preparación de células estromales mesenquimales

En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde el fenotipo deseado de dichas células estromales mesenquimales se presenta más temprano comparado con las células estromales mesenquimales por cultivo de ESC. (Véase la FIG. 5). En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde el fenotipo deseado de dichas células estromales mesenquimales se presenta más temprano comparado con las células estromales mesenquimales por cultivo de ESC, y en donde dicho fenotipo deseado se define por la expresión de al menos dos marcadores seleccionados del grupo que comprende CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 y HLA-abc.

Una realización adicional de la presente descripción comprende una preparación de células estromales mesenquimales, en donde el fenotipo de dichas células estromales mesenquimales se define por la expresión de al menos dos marcadores seleccionados del grupo que comprende CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 y HLA-ABC. Otra realización más de la presente descripción comprende una preparación de células estromales mesenquimales, en donde el fenotipo de dichas células estromales mesenquimales se define por la expresión de al menos dos marcadores seleccionados del grupo que comprende CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, y en donde dichas células estromales mesenquimales no expresan CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD38, CD61, CD62E y CD133.

En una realización de la presente descripción, aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) presentan un fenotipo definido por la expresión de los marcadores CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 y HLA-abc después de aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días en cultivo. En una realización de la presente invención al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) presentan un fenotipo definido por la expresión de al menos dos marcadores seleccionados del grupo que comprende CD9, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 y HLA-abc y una falta de expresión de CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD38, CD61, CD62E, CD133 y Stro-1 después de aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días en cultivo. La realización anterior, en donde dicho fenotipo se define adicionalmente por los marcadores seleccionados del grupo que comprende AIRE-1, IL-11, CD10, CD24, ANG-1 y CXCL1.

Se proporciona un procedimiento preferido de la presente descripción, en donde el número de células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos es de aproximadamente 8×10^7, $8{,}5 \times 10^7$, 9×10^7, $9{,}5 \times 10^7$, 1×10^8, $1{,}25 \times 10^8$, o $1{,}5 \times 10^8$ células estromales mesenquimales derivadas de aproximadamente 2 x 105 hemangioblastos en aproximadamente 30 días de cultivo de células estromales mesenquimales. En una realización alternativa de la presente invención, se pueden generar células estromales mesenquimales a partir de hemangioblastos en una relación de hemangioblastos a células estromales mesenquimales de aproximadamente 1:200, 1:400, 1:415, 1:425, 1:440; 1:450, 1:465, 1:475, 1:490 y 1:500, en aproximadamente 30 días de cultivo de células estromales mesenquimales.

En una realización preferida de la presente invención, el número de células estromales mesenquimales obtenidas por cultivo de hemangioblastos es mayor que el número de células estromales mesenquimales obtenidas directamente de ESC. En una realización preferida adicional de la presente invención, el número de las células estromales mesenquimales obtenidas por cultivo hemangioblastos es al menos 5 veces, 10 veces, 20 veces, 22 veces mayor que el número de células estromales mesenquimales obtenido directamente de los ESC que el número de células estromales mesenquimales obtenidas directamente de los ESC (véase la figura 4).

En otra realización de la presente descripción, una preparación de las células estromales mesenquimales objeto no forma teratomas cuando se introduce en un hospedante mamífero.

Una realización de la presente descripción proporciona una preparación de células estromales mesenquimales generadas cultivando hemangioblastos usando cualquiera de las realizaciones del procedimiento de la presente invención. Una realización de la presente descripción comprende una preparación de células estromales mesenquimales generadas cultivando hemangioblastos usando cualquiera de las realizaciones del procedimiento de la presente invención, en donde el fenotipo de dicha preparación se define por la presencia de cualquiera o todos los marcadores seleccionados del grupo que comprende AIRE-1, IL-11, CD10, CD24, ANG-1 y CXCL1. Una realización adicional de la presente descripción comprende una preparación de células estromales mesenquimales generadas cultivando hemangioblastos usando cualquiera de las realizaciones del procedimiento de la presente invención, en donde el fenotipo de dicha preparación se define por la presencia de cualquiera o todos los marcadores seleccionados del grupo que comprende AIRE-1, IL-11, CD10, CD24, ANG-1 y CXCL1, y en donde dicha preparación presenta una expresión reducida de IL-6, Stro-1 y VEGF.

En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación comprende niveles sustancialmente similares de proteína p53 y p21, o en donde los niveles de p53 en comparación con p21 son 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayores. En una realización de la presente invención, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación comprende niveles sustancialmente similares de proteína p53 y p21, o en donde los niveles de p53 en comparación con p21 son 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayores. En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación farmacéutica comprende niveles sustancialmente similares de proteína p53 y p21, o en donde los niveles de p53 en comparación con p21 son 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayores

En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación comprende un porcentaje sustancialmente similar de células positivas para la proteína p53 y p21, o en donde el porcentaje de células positivo para p53 en comparación con p21 es 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayores. En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) en donde dicha preparación comprende un porcentaje sustancialmente similar de células positivas para la proteína p53 y p21, o en donde el porcentaje de células positivas para p53 en comparación con p21 es 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayores. En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación farmacéutica comprende un porcentaje sustancialmente similar de proteína p53 y p21, o en donde el porcentaje de células positivas para p53 en comparación con p21 es 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayores.

En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación comprende un porcentaje sustancialmente similar de células que tienen niveles base de marcadores de envejecimiento seleccionados del grupo que comprende S100A1, VIM, MYADM, PIM1, ANXA2, RAMP, MEG3, IL13R2, S100A4, TREM1, DGKA, TPBG, MGLL, EML1, MYO1B, LASS6, ROBO1, DKFZP586H2123, LOC854342, DOK5, UBE2E2, USP53, VEPH1, SLC35E1, ANXA2, HLA-E, CD59, BHLHB2, UCHL1, SUSP3, CREDBL2, OCRL, OSGIN2, SLEC3B, IDS, TGFBR2, TSPAN6, TM4SF1, MAP4, CAST, LHFPL2, PLEKHM1, SAMD4A, VAMP1, ADD1, FAM129A, HPDC1, KLF11, DRAM, TREM140, BHLHB3, MGC17330, TBC1D2, KIAA1191, C5ORF32, C15ORF17, FAM791, CCDC104, PQLC3, EIF4E3, C7ORF41, DUSP18, SH3PX3, MYO5A, PRMT2, C8ORF61, SAMD9L, PGM2L1, HOM-TES-103, EPOR, y TMEM112 o del grupo que comprende S100A1, VIM, MYADM, PIM1, ANXA2, RAMP, MEG3, IL13R2, S100A4, TREM1, DGKA, TPBG, MGLL, EMLI, MYO1B, LASS6, ROBO1, DKFZP586H2123, LOC854342, DOK5, UBE2E2, USP53, VEPH1, y SLC35E1, o en donde el porcentaje de células positivas para los marcadores de envejecimiento seleccionados del grupo que comprende S100A1, VIM, MYADM, PIM1, ANXA2, RAMP, MEG3, IL13R2, S100A4, TREM1, DGKA, TPBG, MGLL, EML1, MYO1B, LASS6, ROBO1, DKFZP586H2123, LOC854342, DOK5, UBE2E2, USP53, VEPH1, SLC35E1, ANXA2, HLA-E, CD59, BHLHB2, UCHL1, SUSP3, CREDBL2, OCRL, OSGIN2, SLEC3B, IDS, TGFBR2, TSPAN6, TM4SF1, MAP4, CAST, LHFPL2, PLEKHM1, SAMD4A, VAMP1 ADD1, FAM129A, HPDC1, KLF11, DRAM, TREM140, BHLHB3, MGC17330, TBC1D2, KIAA1191, C5ORF32, C15ORF17, FAM791, CCDC104, PQLC3, EIF4E3, C7ORF41, DUSP18, SH3PX3, MYO5A, PRMT2, C8ORF61, SAMD9L, PGM2L1, HOM-TES-103, EPOR, TMEM112 o del grupo que comprende S100A1, VIM, MYADM, PIM1, ANXA2, RAMP, MEG3, IL13R2, S100A4, TREM1, DGKA, TPBG, MGLL, EML1, MYO1B, LASS6, ROBO1, DKFZP586H2123, LOC854342, DOK5, UBE2E2, USP53, VEPH1, y SLC35E1, es 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que el valor base. En una realización de la presente invención, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación comprende un porcentaje sustancialmente similar de células que tienen niveles base de marcadores de envejecimiento seleccionados del grupo que comprende HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1CRIP1, SULT1A3, STMN1, CCT8, SFRS10, CBX3, CBX1, FLJ11021, DDX46, ACADM, KIAA0101, TYMS, BCAS2, CEP57, TDG, MAP2K6, CSRP2, GLMN, HMGN2, HNRPR, EIF3S1, PAPOLA, SFRS10, TCF3, H3F3A,

LOC730740, LYPLA1, UBE3A, SUM02, SHMT2, ACP1, FKBP3, ARL5A, GMNN, ENY2, FAM82B, RNF138, RPL26L1, CCDC59, PXMP2, POLR3B, TRMT5, ZNF639, MRPL47, GTPBP8, SUB1, SNHG1, ATPAF1, MRPS24, C16ORF63, FAM33A, EPSTL1, CTR9, GAS5, ZNF711, MTO1, y CDP2, o en donde el porcentaje de células positivas para los marcadores seleccionados del grupo que comprende HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1, SULT1A3, STMN1, CCT8, SFRS10, CBX3, CBX1, FLJ11021, DDX46, ACADM, KIAA0101, TYMS, BCAS2, CEP57, TDG, MAP2K6, CSRP2, GLMN, HMGN2, HNRPR, EIF3S1, PAPOLA, SFRS10, TCF3, H3F3A, LOC730740, LYPLA1, UBE3A, SUM02, SHMT2, ACP1, FKBP3, ARL5A, GMNN, ENY2, FAM82B, RNF138, RPL26L1, CCDC59, PXMP2, POLR3B, TRMT5, ZNF639, MRPL47, GTPBP8, SUB1, SNHG1, ATPAF1, MRPS24, C16ORF63, FAM33A, EPSTL1, CTR9, GAS5, ZNF711, MTO1, y CDP2 es 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces menor que el valor base.

En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación comprende un porcentaje sustancialmente similar de células que tienen niveles base de marcadores de envejecimiento seleccionados del grupo que comprende HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1, SULT1A3, STMN1, CCT8, SFRS10, CBX3, CBX1, FLJ11021, DDX46, ACADM, KIAA0101, TYMS, BCAS2, CEP57, TDG, MAP2K6, CSRP2, GLMN, HMGN2, HNRPR, EIF3S1, PAPOLA, SFRS10, TCF3, H3F3A, LOC730740, LYPLA1, UBE3A, SUM02, SHMT2, ACP1, FKBP3, ARL5A, GMNN, ENY2, FAM82B, RNF138, RPL26L1, CCDC59, PXMP2, POLR3B, TRMT5, ZNF639, MRPL47, GTPBP8, SUB1, SNHG1, ATPAF1, MRPS24, C16ORF63, FAM33A, EPSTL1, CTR9, GAS5, ZNF711, MTO1, y CDP2, o del grupo que comprende HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1 y SULT1A3 o en donde el porcentaje de células positivas para los marcadores de envejecimiento seleccionados del grupo que comprende HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1, SULT1A3, STMN1, CCT8, SFRS10, CBX3, CBX1, FLJ11021, DDX46, ACADM, KIAA0101, TYMS, BCAS2, CEP57, TDG, MAP2K6, CSRP2, GLMN, HMGN2, HNRPR, EIF3S1, PAPOLA, SFRS10, TCF3, H3F3A, LOC730740, LYPLA1, UBE3A, SUM02, SHMT2, ACP1, FKBP3, ARL5A, GMNN, ENY2, FAM82B, RNF138, RPL26L1, CCDC59, PXMP2, POLR3B, TRMT5, ZNF639, MRPL47, GTPBP8, SUB1, SNHG1, ATPAF1, MRPS24, C16ORF63, FAM33A, EPSTL1, CTR9, GAS5, ZNF711, MTO1, y CDP2 o del grupo que comprende HoxB3, HoxB7, MID1, SNAPC5, PPARG, ANXA2, TIPIN, MYLIP, LAX1, EGR1, CRIP1, SULT1A3 es 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces menor que el valor base.

En otra realización, las MSC derivadas de hemangioblastos tienen fenotipos de células más jóvenes en comparación con las MSC derivadas de adultos. En una realización, las MSC objeto son capaces de experimentar al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más duplicaciones de población en cultivo. Por el contrario, las células estromales mesenquimales derivadas de adultos típicamente experimentan 2-3 duplicaciones en cultivo. En otra realización, las MSC derivadas de hemangioblastos tienen longitudes de telómeros más largas, mayores efectos inmunosupresores, menos vacuolas, se dividen más rápido, se dividen más fácilmente en cultivo, mayor expresión de CD90, menos linaje determinado, o combinaciones de los mismos, en comparación con las MSC derivadas de adulto. En otra realización, las MSC derivadas de hemangioblastos tiene una mayor expresión de transcritos que promueven la proliferación celular (es decir, tienen una mayor capacidad proliferativa) y menor expresión de transcritos implicados en la diferenciación celular terminal comparado con las MSC derivadas de adulto.

En una realización de la presente descripción, se genera una preparación de células estromales mesenquimales por uno o más de los procedimientos de la presente invención, en donde dichas células estromales mesenquimales son capaces de experimentar al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más duplicaciones de población en cultivo.

En otra realización de la presente descripción, una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) es capaz de experimentar al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más duplicaciones de población en cultivo. En otra realización de la presente invención, una preparación de las células estromales mesenquimales objeto es capaz de experimentar al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más duplicaciones de población en cultivo, en donde después de dichas duplicaciones de población menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1% de células estromales mesenquimales han experimentado senescencia replicativa. En una realización adicional, dicha preparación es una preparación farmacéutica.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, o 60 duplicaciones en cultivo,

En otra realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 duplicaciones en cultivo, en donde menos de 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1% de dichas células estromales mesenquimales han experimentado senescencia replicativa, en donde dichas células estromales mesenquimales retienen un fenotipo y potencia juveniles, y en donde dicha preparación es una preparación farmacéutica. Dicha preparación puede comprender un número eficaz de

células estromales mesenquimales para el tratamiento de enfermedades, tales como un trastorno inmunológico, enfermedad degenerativa u otra enfermedad susceptible de tratamiento usando MSC.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 duplicaciones en cultivo, en donde menos de 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1% de dichas células estromales mesenquimales han experimentado senescencia replicativa después de dichas duplicaciones, en donde dichas células estromales mesenquimales retienen un fenotipo y potencia juveniles, y en donde dicha preparación es una preparación farmacéutica. Dicha preparación puede comprender un número eficaz de células estromales mesenquimales para el tratamiento de enfermedades, tales como un trastorno inmunológico, enfermedad degenerativa u otra enfermedad susceptible de tratamiento usando MSC.

En otra realización de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dichas células estromales mesenquimales se han sometido a aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40., 45, 50, 55 o 60 duplicaciones en el cultivo. La realización anterior en donde menos de 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5% 1% de dichas células estromales mesenquimales han experimentado senescencia replicativa, en donde dichas células estromales mesenquimales conservan un fenotipo y potencia juveniles, en donde dicha preparación es una preparación farmacéutica, en donde dicha preparación farmacéutica comprende un número eficaz de células estromales mesenquimales, y en donde se conserva dicha preparación farmacéutica.

En otra realización, la presente descripción proporciona un kit que comprende una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales. En otra realización, la presente descripción proporciona un kit que comprende una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dicha preparación está conservada. En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende una preparación farmacéutica de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos). En otra realización, la presente descripción proporciona un kit que comprende una preparación farmacéutica de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación está conservada.

En otra realización, la presente descripción proporciona un método para tratar una patología administrando una cantidad eficaz de células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos, a un sujeto que lo necesite. Dicha patología puede incluir, pero no se limita a, un trastorno autoinmunitario, uveítis, pérdida ósea o daño del cartílago.

Las células estromales mesenquimales obtenidas cultivando hemangioblastos tienen características mejoradas en comparación con las MSC derivadas directamente de ESC. Por ejemplo, las MSC derivadas de ESC se agregan más, son más difíciles de dispersar cuando se dividen, no generan casi tantos MSC cuando empiezan con números equivalentes de ESC y tardan más en adquirir marcadores de superficie celular de MSC características en comparación con los MSC derivados de hemangioblastos. Véase el ejemplo 2 y figuras 3-6.

En una realización, la presente descripción proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación es eficaz para normalizar una patología. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación es eficaz para reducir respuestas inmunitarias excesivas o no deseadas. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación es eficaz para mejorar un trastorno autoinmunitario. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona la normalización de una patología administrando a un hospedante una cantidad eficaz de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos). Una realización adicional de la presente descripción proporciona la normalización de una patología, en donde dicha normalización de una patología se caracteriza por efectos seleccionados del grupo que comprende liberación de citoquinas por dichas MSC, estimulando un aumento en el número de células T reguladoras, inhibiendo una cierta cantidad de la liberación de IFN gamma de células Th1 y estimulando una cierta cantidad de secreción de IL4 a partir de células Th2. En una realización adicional, la administración de una preparación de las células estromales mesenquimales en cuestión (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) da como resultado la liberación desde dichas células estromales mesenquimales de citoquinas seleccionadas del grupo que comprende factor de crecimiento transformante beta, indolamina 2,3dioxigenasa, protaglandina E2, factor de crecimiento de hepatocitos, óxido nítrico, interleuquina 10, interleuquina 6, factor estimulante de colonias de macrófagos, y antígeno leucocitario humano soluble (HLA) G5.

En una realización adicional de la presente descripción, la administración de una preparación de las células estromales mesenquimales objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) da como resultado la liberación desde dichas células estromales mesenquimales de citoquinas seleccionadas del grupo que comprende el factor de crecimiento transformante beta, indolamina 2,3-dioxigenasa, prostaglandina E2, factor de crecimiento de hepatocitos, óxido nítrico, interleuquina 10, interleuquina 6, factor estimulante de colonias de macrófagos, antígeno leucocitario humano soluble (HLA) G5, interleuquina 4, 8, 11, factor estimulante de colonias de granulocitos y

macrófagos, factor de crecimiento del endotelio vascular, factor de crecimiento insulínico 1, proteína de biosíntesis de fosfatidilinositol-glucano de clase F, proteína quimioatractora de monocitos 1, factor derivado del estroma 1, factor de necrosis tumoral 1, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento de fibroblastos básico, angiopoyetina 1 y 2, monoquina inducida por interferón gamma, proteína inducible por interferón 10, factor neurotrófico derivado del cerebro, receptor alfa de interleuquina 1, ligando 1 y 2 de quimioquina.

Preparaciones farmacéuticas de MSC

Las MSC de la presente descripción se pueden formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las MSC de la invención se pueden administrar solas o como un componente de una formulación farmacéutica, en donde dichas MSC se pueden formular para administración de cualquier manera conveniente para usar en medicina. Una realización proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales que comprende dichas células estromales mesenquimales en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables seleccionadas del grupo que consiste en: dispersiones, suspensiones, emulsiones, polvos estériles opcionalmente reconstituidos en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de usar, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos o agentes de suspensión y espesantes.

En una realización de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 duplicaciones de población. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 duplicaciones de población. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado entre aproximadamente 25 y aproximadamente 60 duplicaciones de población. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado menos de aproximadamente 10 duplicaciones de población. En una realización más adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado menos de aproximadamente 20 duplicaciones de población. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado menos de aproximadamente 30 duplicaciones de población, en donde dichas células estromales mesenquimales no han experimentado senescencia replicativa. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado menos de aproximadamente 30 duplicaciones de población, en donde menos de aproximadamente 25% de dichas células estromales mesenquimales han experimentado senescencia replicativa. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado menos de aproximadamente 30 duplicaciones de población, en donde menos de aproximadamente 10% de dichas células estromales mesenquimales han experimentado senescencia replicativa. En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales, en donde dichas células estromales mesenquimales han experimentado menos de aproximadamente 30 duplicaciones de población, en donde menos de aproximadamente 10% de dichas células estromales mesenquimales han experimentado senescencia replicativa, y en donde dichas células estromales mesenquimales expresan los marcadores seleccionados del grupo que comprende AIRE-1, IL-11, CD10, CD24, ANG-1 y CXCL1.

Las concentraciones para inyecciones de preparaciones farmacéuticas de MSC pueden tener cualquier cantidad que sea eficaz y, por ejemplo, estar sustancialmente exentas de ESC. Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden comprender los números y tipos de MSC descritos en la presente memoria. En una realización particular, las preparaciones farmacéuticas de MSC comprenden aproximadamente 1×10^6 de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) para la administración sistémica a un hospedante que lo necesite, o aproximadamente 1×10^4 de dichas MSC cultivando hemangioblastos para administración local a un hospedante que lo necesite.

Las composiciones ilustrativas de la presente descripción pueden ser formulaciones adecuadas para usar en el tratamiento de un paciente humano, tales como exentas de pirógenos o esencialmente exentas de pirógenos, y exentas de patógenos. Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas para usar en esta descripción pueden estar en una forma fisiológicamente aceptable, exentas de pirógenos, exentas de patógenos.

La preparación que comprende MSC usada en los métodos descritos en la presente memoria se puede trasplantar en una suspensión, gel, coloide, suspensión o mezcla. Además, en el momento de la inyección, las MSC crioconservadas pueden volver a suspenderse con solución salina equilibrada disponible en el mercado para alcanzar la osmolalidad y concentración deseadas para la administración por inyección (es decir, de bolo o intravenosa).

Un aspecto de la descripción se refiere a una preparación farmacéutica adecuada para usar en un paciente mamífero, que comprende al menos 10^6, 10^7, 10^8 o incluso 10^9 células estromales mesenquimales y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otro aspecto de la descripción se refiere a una preparación farmacéutica que comprende al menos 10^6, 10^7, 10^8 o incluso 10^9 células estromales mesenquimales y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células estromales mesenquimales se diferencian de una célula de hemangioblasto. En otro aspecto más de la descripción se proporciona un banco de células criogénicas que comprende al menos 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12} o incluso 10^{13} células estromales mesenquimales. En otro aspecto más de la descripción se proporciona una preparación celular purificada exenta de, sustancialmente exenta de células no humanas y/o productos animales no humanos, que comprende al menos 10^6, 10^7, 10^8 o incluso 10^9 células estromales mesenquimales y menos de 1% de cualquier otro tipo de célula, más preferiblemente menos de 0,1%, 0,01% o incluso 0,001% de cualquier otro tipo de célula. Ciertas composiciones descritos y banco incluyen, pero no se limitan a los citados en los siguientes párrafos:

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales tienen capacidad replicativa para experimentar al menos 10 duplicaciones de población en cultivo celular con menos de 25, 20, 15, 10 o incluso 5 por ciento de las células que experimentan muerte celular, senescencia o diferenciación en células no MSC (tales como fibroblastos, adipocitos y/u osteocitos) en la 10ª duplicación.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales tienen capacidad replicativa para experimentar al menos 15 duplicaciones de población en cultivo celular con menos de 25, 20, 15, 10 o incluso 5 por ciento de las células que experimentan muerte celular, senescencia o diferenciación en células no MSC (tales como fibroblastos, adipocitos y/o usteocitos) en la 15ª duplicación.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales tienen capacidad replicativa para experimentar al menos 20 duplicaciones de población en cultivo celular con menos de 25, 20, 15, 10 o incluso 5 por ciento de las células que experimentan muerte celular, senescencia o diferenciación en células no MSC (tales como fibroblastos, adipocitos y/u osteocitos) en la 20ª duplicación.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales tienen capacidad replicativa para experimentar al menos 5 pases en cultivo celular con menos de 25, 20, 15, 10 o incluso 5 por ciento de las células que experimentan muerte celular, senescencia o diferenciación en células que no son MSC (tales como los fibroblastos, adipocitos y/u osteocitos) en el 5º pase.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales tienen capacidad replicativa para experimentar al menos 10 pases en cultivo celular con menos de 25, 20, 15, 10 o incluso 5 por ciento de las células que experimentan muerte celular, senescencia o diferenciación en células que no son MSC (tales como fibroblastos, adipocitos y/u osteocitos) en el 10º pase.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales se diferencian de una fuente de citoblastos pluripotentes, tal como un citoblasto pluripotente que expresa OCT-4, fosfatasa alcalina, Sox2, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA -1-80 (tal como, y línea de citoblastos embrionarios o línea de citoblastos pluripotentes inducidos), e incluso más preferiblemente a partir de una fuente común de citoblastos pluripotentes.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales son genotípicamente idénticas en HLA.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales son genómicamente idénticas.

En ciertas realizaciones, al menos 30%, 35%, 40%, 45% o incluso 50% de las células estromales mesenquimales son positivas para CD10.

En ciertas realizaciones, al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o incluso 90% de las células estromales mesenquimales son positivas para los marcadores CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD166 y CD274 y HLA-ABC.

En ciertas realizaciones, menos de 30%, 25%, 20%, 15% o incluso 10% de las células estromales mesenquimales son positivas para los marcadores CD31, CD34, CD45, CD133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 y TLR3.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales tienen tasas de replicación para experimentar al menos 10 duplicaciones de población en cultivo celular en menos de 25, 24, 23, 22, 21 o incluso 20 días.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales tienen una longitud media de fragmento de restricción terminal (TRF) que es mayor que 7 kb, 7,5 kb, 8 kb, 8,5 kb, 9 kb, 9,5 kb, 10kb, 10,5 kb, 11 kb, 11,5 kb o incluso 12 kb.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales no experimentan más de un 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50% o incluso 45% de porcentaje de aumento de células que tienen un valor de dispersión de luz frontal, medido por citometría de flujo, mayor de 5.000.000 a lo largo de 10, 15 o hasta 20 duplicaciones de población en cultivo.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales, en un estado de reposo, expresan ARNm que codifica Interleuquina-6 en un nivel que es menor de 10%, 8%, 6%, 4% o incluso 2% del nivel de ARNm de IL-6 expresado por preparaciones de células estromales mesenquimales, en un estado de reposo, derivadas de sangre de cordón, médula ósea o tejido adiposo.

En ciertas realizaciones, las células estromales mesenquimales son al menos 2, 4, 6, 8, 10, 20, 50 o incluso 100 veces más potentes que las MSC derivadas de sangre de cordón, médula ósea o tejido adiposo.

En ciertas realizaciones, un millón de las células estromales mesenquimales, cuando se inyectan en un modelo de ratón MOG35-55 EAE (tal como ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido MOG35-55), en promedio, reducirán una puntuación clínica de 3,5 a menos de 2,5, e incluso más preferiblemente reducirá la puntuación clínica a menos de 2, 1,5 o incluso menos de 1.

En ciertas realizaciones, la preparación es adecuada para administrar a un paciente humano, y más preferiblemente está exenta de pirógenos y/o exenta de productos animales no humanos.

En otras realizaciones, la preparación es adecuada para la administración a un mamífero de veterinario no humano, tal como un perro, gato o caballo.

Enfermedades y afecciones que se pueden tratar usando MSC derivadas del cultivo de hemangioblastos

Las MSC han demostrado ser terapéuticas para una variedad de enfermedades y afecciones. En particular, las MSC migran a sitios de lesiones, ejercen efectos inmunosupresores y facilitan la reparación de tejidos dañados. Se proporciona una realización de la presente descripción, en donde una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales reduce las manifestaciones de una patología. Se proporciona una realización de la presente descripción, en donde una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales se administra a un hospedante que padece una patología. En una realización adicional de la presente descripción, una preparación farmacéutica de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) reduce las manifestaciones de una patología seleccionada del grupo que comprende cicatrización de heridas, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), enfermedad, enfermedad ocular crónica, degeneración de la retina, glaucoma, uveítis, infarto agudo de miocardio, dolor crónico, hepatitis y nefritis. En una realización adicional de la presente descripción, una preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales por cultivo de hemangioblastos reduce las manifestaciones de la laminitis equina. Como ejemplo adicional, las MSC se pueden administrar en combinación con una célula o tejido alogénico trasplantado (p. ej., una preparación que comprende células que se han diferenciado de células ES, tales como células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), precursores de oligodendrocitos, de retina, córnea, músculo tal como músculo esquelético, liso o cardíaco o cualquier combinación de los mismos, u otros) disminuyendo así la probabilidad de una reacción inmunitaria contra la célula o tejido trasplantado y evitando potencialmente la necesidad de otra inmunosupresión. Las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) descritas en la presente memoria se pueden usar en aplicaciones similares. Una realización de un procedimiento de la presente descripción, en donde la administración de una preparación farmacéutica de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) a un hospedante reduce la necesidad de terapia futura. Se proporciona una realización de un procedimiento de la presente invención, en donde la administración de una preparación farmacéutica de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) a un hospedante reduce la necesidad de terapia futura, en donde dicha terapia suprime la función inmunitaria.

En una realización de la presente descripción, se administra una preparación farmacéutica de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) a un hospedante para el tratamiento de una patología. En una realización de la presente descripción, se administra una preparación farmacéutica de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) a un hospedante para el tratamiento de patologías seleccionadas de la lista que comprende cicatrización de heridas, esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, neoplasias hematológicas, infarto de miocardio, trasplante de tejidos y órganos, rechazo de tejidos y órganos, nefropatía crónica por aloinjerto, cirrosis, insuficiencia hepática, insuficiencia cardíaca, GvHD, fractura de la tibia, disfunción del ventrículo izquierdo, leucemia, síndrome mielodisplásico, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus tipo I o tipo II, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, hipertensión pulmonar, dolor crónico, osteogénesis imperfecta, hipocolesterolemia familiar homocigótica, tratamiento después de meniscectomía, periodontitis en adultos, vasculogénesis en pacientes con isquemia miocárdica grave, lesión de la médula espinal, osteodisplasia, isquemia crítica de las extremidades asociada con diabetes mellitus, enfermedad del pie diabético, síndrome de Sjogren primario, osteoartritis, defectos del cartílago (p. ej., defectos de cartílago articular), laminitis, atrofia multisistémica, esclerosis lateral amiotrófica, cirugía cardíaca, lupus eritematoso sistémico refractario, aloinjertos de riñón vivos, trastornos de glóbulos rojos no malignos, quemadura térmica, quemadura por radiación, enfermedad de Parkinson, microfracturas (p. ej. en pacientes con lesión del cartílago articular de la rodilla de defectos), epidermólisis ampollosa, isquemia coronaria grave, miocardiopatía dilatada idiopática, osteonecrosis de la cabeza femoral, nefritis lúpica, defectos de huecos óseos, accidente cerebrovascular cerebral isquémico, después del accidente cerebrovascular, síndrome de radiación aguda, enfermedad pulmonar, artritis y regeneración ósea.

En una realización adicional de la presente invención, se administra una preparación farmacéutica de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) a un hospedante para el tratamiento de patologías

autoinmunitarias seleccionadas de la lista que comprende leucoencefalitis hemorrágica necrosante aguda, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, nefritis anti-GBM/anti-TBM, síndrome antifosfolípido (APS), angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, disautonomía autoinmunitario, hepatitis autoinmunitaria, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), miocarditis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, urticarial autoinmunitaria, neuropatías axonales y neuronales, enfermedad de Balo, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), ostomielitis multifocal recurrente crónica (CRMO), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial/penfigoide benigno de las mucosas, enfermedad de Crohn, síndrome de Cogans, enfermedad de aglutininas frías, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis de Coxsackie, enfermedad de CREST, crioglobulinemia mixta esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, esofagitis eosinofílica, fascitis eosinofílica, eritema nodoso, encefalomielitis alérgica experimental, síndrome de Evans, fibromialgia, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, granulomatosis con poliangitis (GPA), es decir de Wegener, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestationis, hipogammaglobulinemia, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía IgA, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, lipoproteínas inmunorreguladoras, miositis por cuerpos de inclusión, diabetes insulinodependiente (tipo 1), cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil, síndrome de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, enfermedad por IgA lineal (LAD), lupus (SLE), enfermedad de Lyme, enfermedad de Meniere, crónica, poliangitis microscópica, enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, esclerosis múltiple, miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (Devic), neutropenia, penfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, reumatismo palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos autoinmunitarios pediátricos Asociados con estreptococos), degeneración cerebelosa paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, Pars planitis (uveítis periférica), pénfigo, neuropatía periférica, encefalomielitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunitarios tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome de infarto posmioccárdico, síndrome pospericardiotomía, dermatitis por progesterona, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis pulmonar idiopática, pioderma gangrenoso, aplasia eritrocítica pura, fenómeno de Raynaud, distrofia simpática refleja, síndrome de Reiter, policondritis recidivante, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, escleritis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, autoinmunidad espermática y testicular, síndrome de persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, oftalmia simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica (TTP), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa, enfermedad del tejido conectivo indiferenciado (UCTD), uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculobulosas, vitíligo y granulomatosis de Wegener (ahora denominada granulomatosis con poliangeítis (GPA).

Regímenes de tratamiento que usan MSC derivadas del cultivo de hemangioblastos

Las MSC y las preparaciones farmacéuticas que comprenden las MSC descritas en la presente memoria se pueden usar para tratamientos basados en células. En particular, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir las enfermedades y afecciones descritas en la presente memoria que comprenden administrar una cantidad eficaz de una preparación farmacéutica que comprende MSC, en donde las MSC se obtienen del cultivo de hemangioblastos.

Las MSC de la presente invención se pueden administrar usando modalidades conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, inyección por vía intravenosa, intramiocárdica, transendocárdica, intravítrea o vía intramuscular o implante local dependiendo de la patología particular que se está tratando.

Las células estromales mesenquimales de la presente invención se pueden administrar por implante local, en donde se usa un dispositivo de suministro. Los dispositivos de suministro de la presente invención son biocompatibles y biodegradables. Un dispositivo de suministro de la presente invención se puede fabricar usando materiales seleccionados del grupo que comprende fibras biocompatibles, hilos biocompatibles, espumas biocompatibles, poliésteres alifáticos, poli(aminoácidos), copoli(éter-ésteres), poli(oxalatos de alquileno), poliamidas, policarbonatos derivados de tirosina, poli(iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amina, poli(anhídridos), polifosfacenos, biopolímeros; homopolímeros y copolímeros de lactida, glicolida, épsilon-caprolactona, para-dioxanona, carbonato de trimetileno; homopolímeros y copolímeros de lactida, glicólido, épsilon-caprolactona, para-dioxanona, carbonato de trimetileno, colágeno fibrilar, colágeno no fibrilar, colágenos no tratados con pepsina, colágenos combinados con otros polímeros, factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular, fragmentos de péptidos biológicamente relevantes, factor de crecimiento de hepatocitos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento insulínico, factor de diferenciación de crecimiento, factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares, nicotinamida, péptidos tipo glucagón, tenascina-C, laminina, agentes anti-rechazo, analgésicos, antioxidantes, agentes antiapoptóticos, agentes antiinflamatorios y agentes citostáticos.

El régimen de tratamiento particular, la vía de administración y la terapia adyuvante se pueden adaptar en función de la patología particular, la gravedad de la patología y la salud general del paciente. La administración de las preparaciones farmacéuticas que comprenden MSC puede ser eficaz para reducir la gravedad de las manifestaciones de una patología o y/o evitar una mayor degeneración de la manifestación de una patología.

Una modalidad de tratamiento de la presente descripción puede comprender la administración de una única dosis de MSC. Alternativamente, las modalidades de tratamiento descritas en la presente memoria pueden comprender un periodo de terapia en donde las MSC se administran múltiples veces durante un período de tiempo. Los periodos de tratamiento de ejemplo pueden comprender tratamientos semanales, quincenales, mensuales, trimestrales, bianuales o anuales. Alternativamente, el tratamiento puede proceder en fases en donde se requieren dosis múltiples inicialmente (p. ej., dosis diarias durante la primera semana), y posteriormente se necesitan dosis menores y menos frecuentes.

En una realización, la preparación farmacéutica de células estromales mesenquimales obtenidas cultivando hemangioblastos se administra a un paciente una o más veces periódicamente a lo largo de la vida de un paciente. En una realización adicional de la presente descripción, se administra una preparación farmacéutica de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) una vez al año, una vez cada 6-12 meses, una vez cada 3-6 meses, una vez cada 1-3 meses., o una vez cada 1-4 semanas. Alternativamente, una administración más frecuente puede ser deseable para ciertas afecciones o trastornos. En una realización de la presente descripción, una preparación farmacéutica de las MSC objeto (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos) se administra mediante un dispositivo una vez, más de una vez, periódicamente a lo largo de la vida del paciente, o según sea necesario para el paciente particular y la patología del paciente que se trata. De manera similar, se contempla un régimen terapéutico que cambia a lo largo del tiempo. Por ejemplo, puede ser necesario un tratamiento más frecuente desde el comienzo (p. ej., tratamiento diario o semanal). Con el tiempo, a medida que mejora la afección del paciente, puede ser necesario un tratamiento menos frecuente o incluso ningún tratamiento adicional.

De acuerdo con la presente descripción, las enfermedades o afecciones se pueden tratar o prevenir mediante administración intravenosa de las citoblastos mesenquimales descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, se inyectan aproximadamente 20 millones, aproximadamente 40 millones, aproximadamente 60 millones, aproximadamente 80 millones, aproximadamente 100 millones, aproximadamente 120 millones, aproximadamente 140 millones, aproximadamente 160 millones, aproximadamente 180 millones, aproximadamente 200 millones, aproximadamente 220 millones, aproximadamente 240 millones, aproximadamente 260 millones, aproximadamente 280 millones, aproximadamente 300 millones, aproximadamente 320 millones, aproximadamente 340 millones, aproximadamente 360 millones, aproximadamente 380 millones, aproximadamente 400 millones, aproximadamente 420 millones, aproximadamente 440 millones, aproximadamente 460 millones, aproximadamente 480 millones aproximadamente 500 millones, aproximadamente 520 millones, aproximadamente 540 millones, aproximadamente 560 millones, aproximadamente 580 millones, aproximadamente 600 millones, aproximadamente 620 millones, aproximadamente 640 millones, aproximadamente 660 millones, aproximadamente 680 millones, aproximadamente 700 millones, aproximadamente 720 millones, aproximadamente 740 millones, aproximadamente 760 millones, aproximadamente 780 millones, aproximadamente 800 millones, aproximadamente 820 millones, aproximadamente 840 millones, aproximadamente 860 millones, aproximadamente 880 millones, aproximadamente 900 millones, aproximadamente 920 millones, aproximadamente 940 millones, aproximadamente 960 millones, o aproximadamente 980 millones de células por vía intravenosa. En algunas realizaciones, se inyectan aproximadamente mil millones, aproximadamente 2 mil millones, aproximadamente 3 mil millones, aproximadamente 4 mil millones o aproximadamente 5 mil millones de células o más por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el número de células está en el intervalo entre aproximadamente 20 millones y aproximadamente 4 mil millones de células, entre aproximadamente 40 millones y aproximadamente mil millones de células, entre aproximadamente 60 millones y aproximadamente 750 millones de células, entre aproximadamente 80 millones y aproximadamente 400 millones de células, entre aproximadamente 100 millones y aproximadamente 350 millones de células, y entre aproximadamente 175 millones y aproximadamente 250 millones de células.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender además la etapa de vigilar la eficacia del tratamiento o prevención usando métodos conocidos en la técnica.

Kits

La presente descripción proporciona kits que comprenden cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria. Una preparación de células estromales mesenquimales puede estar contenida en un dispositivo de suministro fabricado de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, e incluye métodos de la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2002/0103542, solicitud de patente europea EP 1454641, o conservada de acuerdo a métodos conocidos por un experto en la técnica, e incluyen métodos de la patente de EE.UU. 8.198.085, solicitud PCT WO2004/098285 y publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2012/0077181. En una realización de la presente invención, un kit que comprende una preparación de al menos 8×10^7, $8{,}5 \times 10^7$, 9×10^7, $9{,}5 \times 10^7$, 1×10^8, $1{,}25 \times 10^8$, o $1{,}25 \times 10^8$ MSC derivadas del cultivo de hemangioblastos. En otra realización, se proporciona un kit que comprende una preparación de aproximadamente 8×10^7, $8{,}5 \times 10^7$, 9×10^7, $9{,}5 \times 10^7$, 1×10^8, $1{,}25 \times 10^8$, o $1{,}25 \times 10^8$ MSC objetos (p. ej., generadas cultivando hemangioblastos), en donde dicha preparación es una preparación farmacéutica. En una realización adicional más de la presente invención, se

proporciona un kit que comprende una preparación farmacéutica de aproximadamente 8 x 10^7, 8,5 x 10^7, 9 x 10^7, 9,5 x 10^7, 1 x 10^8, 1,25 x 10^8 o 1,25 x 10^8 MSC objeto (p. ej., generadas por cultivo de hemangioblastos), en donde dicha preparación farmacéutica está conservada. En otra realización más de la presente invención, se proporciona un kit que comprende una preparación farmacéutica de aproximadamente 8 x 10^7, 8,5 x 10^7, 9 x 10^7, 9,5 x 10^7, 1 x 10^8, 1,25 x 10^8 o 1,25 x 10^8 MSC objeto (p. ej., generadas por cultivo de hemangioblastos), en donde dicha preparación farmacéutica está contenida en un vehículo de suministro celular.

Adicionalmente, los kits pueden comprender MSC crioconservadas o preparaciones de MSC crioconservadas, MSC congeladas o preparaciones de MSC congeladas, MSC congeladas descongeladas o preparaciones de MSC congeladas descongeladas.

Combinaciones de diferentes realizaciones y conceptos

Se entenderá que las realizaciones y conceptos descritos en la presente memoria se pueden usar en combinación. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método para generar MSC que comprende generar hemangioblastos a partir de ESC, cultivar los hemangioblastos durante al menos cuatro días, recoger los hemangioblastos, volver a sembrar los hemangioblastos en una placa revestida con Matrigel y cultivar los hemangioblastos como se describe en la presente memoria durante al menos catorce días, en donde el método genera al menos 85 millones de MSC que están sustancialmente exentas de ESC.

Ejemplos de referencia

Los siguientes ejemplos no están destinados a limitar la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1 - Generación de MSC a partir de hemangioblastos

Los hemangioblastos se generaron a partir la línea de ESC derivada de un solo blastómero, de calidad clínica, MA09 [16], como sigue:

Primero, se generaron agrupaciones de células de etapas tempranas a partir de ESC MA09 cultivados en medio exento de suero complementado con una combinación de morfogenes y citoquinas hematopoyéticas tempranas, específicamente proteína morfogenética ósea-4 (BMP-4), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de citoblastos (SCF), trombopoyetina (Tpo) y ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con fms (FL). Más específicamente, los ESC de un pocillo de una placa tratada de cultivo tisular de 6 pocillos se sembraron en un pocillo de una placa de adherencia ultrabaja de 6 pocillos (Corning) en 3 ml de medio Stemline II (Sigma) complementado con 50 ng/ml de VEGF y 50 ng/ml de BMP-4 (R & D) y se incubaron a 37ºC con 5% de CO2. Se formaron agrupaciones de células en las primeras 24 horas. Después de 40-48 horas, la mitad del medio (1,5 ml) se sustituyó por medio Stemline II de nueva aportación complementado con 50 ng/ml de VEGF, 50 ng/ml de BMP-4 y 20-22,5 ng/ml de bFGF, y la incubación continuó durante 40-48 horas adicionales (es decir, 3,5-4 días en total).

Las agrupaciones de células se disociaron y cultivaron en placas celulas individuales en medio de crecimiento de colonias de blastos semisólido exento de suero (BGM). Específicamente, las agrupaciones de células se disociaron con tripsina al 0,05%-EDTA 0,53 mM (Invitrogen) durante 2-5 minutos. La suspensión celular se pipeteó hacia arriba y hacia abajo y después se añadió DMEM + FCS al 10% para inactivar la tripsina. Después las células se pasaron a través de un filtro de 40 µm para obtener una suspensión de células individuales. Después las células se contaron y se volvieron a suspender en medio Stemline II a 1-1,5 x 10^6 células/ml.

La suspensión de células individuales (0,3 ml, 3 a 4,5 x 10^5 células) se mezcló con 2,7 ml de medio de crecimiento hemangioblasto (H4536 basado en receta media como se ha descrito antes) con una breve mezcla con vórtice, y se dejó reposar durante 5 min. La mezcla de células se transfirió después a un pocillo de una placa de adherencia ultrabaja de seis pocillos usando una jeringa (3 ml) unida a una aguja de 18 G, y se incubó a 37ºC con 5% de CO2.

Algunas de las células se desarrollaron en colonias de blastos similares a uvas (BC). Específicamente, las BC eran visibles a los 3 días (típicamente contenían menos de 10 células al comienzo del día 3), y después de 4-6 días, los hES-BC similares a uvas se identificaron fácilmente al microscopio (que contenían más de 100 células por BC). El número de BC presentes en el cultivo aumentó gradualmente en el transcurso de varios días. Después de 6-7 días, las BC se podían recoger usando un capilar de vidrio con la boca.

Los hemangioblastos se pueden recoger entre los días 7-12 de cultivo y se pueden volver a sembrar en placas en placas de cultivo tisular revestidas con Matrigel en αMEM + FCS al 20%. El análisis por citometría de flujo muestra que los niveles de expresión de 5 marcadores de superficie celular que se encuentran típicamente en las MSC son relativamente bajos en la población de hemangioblastos de partida. (FIG. 2, panel izquierdo, promedio de 4 experimentos +/- desviación estándar). Sin embargo, después de tres semanas de cultivo en condiciones de crecimiento de MSC, surge una población de células adherentes homogénea con >90% de tinción positiva para estos 5 marcadores característicos de MSC (FIG. 2, panel derecho-22-23 días, promedio de 4 experimentos +/- desviación estándar). Según las condiciones de cultivo de MSC, la cantidad de tiempo que tardan en diferenciarse las células para adquirir marcadores de superficie de MSC puede variar dependiendo de la línea ESC específica

usada, el día de la recogida de hemangioblastos y el número de hemangioblastos sembrados en placa sobre Matrigel. En algunos experimentos, los marcadores surgen en 90% de las células entre 7 y 14 días, mientras que en otros experimentos, estas células pueden tardar de 22 a 24 días en adquirir estos marcadores de MSC.

En relación con los experimentos anteriores, la FIG. 1 muestra la generación de FM-MA09-MSC a partir de células pluripotentes y una vista al microscopio de la generación de células estromales mesenquimales a partir de ESC a través de hemangioblastos. Además, la FIG. 2 contiene un fenotipo de FM-MA09-MSC obtenido de hemangioblastos derivados de células pluripotentes producidos como se ha descrito antes. Esta figura muestra el porcentaje de células positivas para marcadores de superficie de MSC en la población inicial de hemangioblastos (lado izquierdo de la gráfica, hemangioblastos día 7-11) y después de cultivar hemangioblastos en placas revestidas con Matrigel (lado derecho de la gráfica) y una vista al microscopio del mesenquimal células estromales derivadas de los hemangioblastos (fotografía del panel derecho). Además, en relación con los experimentos anteriores, la FIG. 17 representa el procedimiento de generación de FM-MA09-MSC; y los efectos de Matrigel, es decir, que la eliminación de células de Matrigel en un pase temprano (es decir, p2) puede ralentizar temporalmente el crecimiento de MSC en comparación con los mantenidos en Matrigel hasta p6.

La FIG. 18 muestra además que las BM-MSC y FM-MA09-MSC obtenidas experimentan condrogénesis.

Ejemplo 2 - Comparación de la diferenciación de ESC y MSC derivadas de hemangioblastos

Este ejemplo describe la comparación de la diferenciación de ESC en MSC por dos métodos: diferenciación directa (en donde los ESC se cultivaron directamente en gelatina o Matrigel) o el método de hemangioblastos (en donde los ESC se diferenciaron primero en hemangioblastos y después se cultivaron en placa en Matrigel, como se ha descrito en el ejemplo 1). La diferenciación directa en gelatina dio lugar a células similares a MSC, pero las células carecían de expresión de CD105, lo que sugiere una adopción incompleta del destino de MSC (FIG. 3, panel izquierdo). Cuando los ESC se cultivaron en placas directamente en Matrigel, las células resultantes expresaban CD105 como se esperaba para las MSC (FIG. 3, panel central). Sin embargo, en comparación con las MSC producidas por el método de hemangioblastos, las células MSC directamente diferenciadas crecieron en agregados, eran más difíciles de dispersar cuando se dividían y no generaban tantas MSC cuando se partía de números equivalentes de ESC (FIG. 4).

Las MSC diferenciadas directamente de ESC también tardaban más en adquirir marcadores característicos de superficie celular de MSC (FIG. 5). Una vez obtenidas las MSC, la inmunofenotipificación extendida muestra que las MSC de ambos métodos son positivas para otros marcadores que se encuentran típicamente en MSC, como HLA-ABC, mientras que son negativas para marcadores asociados a hematopoyesis tales como CD34 y CD45 (FIG. 6) Estos resultados sugieren que el uso de una etapa intermedia de hemangioblastos permite una producción robusta de MSC homogéneas a partir de ESC. Dados estos hallazgos, se llevarán a cabo estudios adicionales sobre MSC con MSC derivadas de hemangioblastos.

Además, los experimentos cuyos resultados están contenidos en Figuras 3-6, 13, 15, 16, 19, y 21-27 (descrito antes) comparan diferentes propiedades de ESC-MSC o BM-MSC frente a MSC derivadas de hemangioblastos y ponen de manifiesto que estas células presentan diferencias significativas que pueden afectar a la eficacia terapéutica de estas células y composiciones derivadas de las mismas. En particular, la FIG. 3 muestra el porcentaje de células positivas para marcadores de superficie de MSC después de cultivar citoblastos embrionarios humanos (ESC) en placas recubiertas de gelatina (panel izquierdo), ESC en placas recubiertas de Matrigel (panel central) y hemangioblastos en placas recubiertas con Matrigel (panel derecho). Adicionalmente, la FIG. 4 muestra el rendimiento MSC a partir de células pluripotentes, la FIG. 5 ilustra la adquisición de marcadores de células estromales mesenquimales, y la FIG. 6 muestra fenotipos de células estromales mesenquimales derivadas de diferentes métodos de cultivo, que incluyen la expresión de marcadores de MSC y la falta de expresión de marcadores de hematopoyesis y endoteliales. Además, se analizaron FM-MA09-MSC para detectar diferencias notables (en relación con BM-MSC) en la potencia y los efectos inhibidores (FIG. 13), estimulación de la expansión de Treg (FIG. 15), capacidad proliferativa (FIG. 16), secreción de PGE2 (FIG. 19), expresión de Stro-1 y CD10 (Figs. 21-22), mantenimiento del tamaño durante el pase (FIG. 23), expresión de CD10 y CD24 (FIG. 24), expresión de Aire-1 e IL-11 (FIG. 25), expresión de Ang-1 y CXCL1 (FIG. 26), y la expresión de IL6 y VEGF (FIG. 27).

Ejemplo 3 - Las MSC derivadas de hemangioblastos se diferencian en otros tipos de células

Las MSC, por definición, deberían ser capaces de generar adipocitos, osteocitos y condrocitos. Usando métodos convencionales, la FIG. 7 muestra la capacidad de las MSC derivadas de hemangioblastos para diferenciarse en adipocitos y osteocitos, mientras que la FIG. 8 muestra su potencial para diferenciarse hacia condrocitos mediante la expresión de genes específicos de condrocitos y la FIG. 18 muestra su potencial para diferenciarse hacia condrocitos mediante la tinción con safranina O de cultivos de masa de sedimentos.

Se espera que las MSC derivadas de los hemangioblastos se diferencien en adipocitos, osteocitos y condrocitos. Estas vías de diferenciación se pueden examinar usando métodos previamente descritos en la técnica. Véase Karlsson et al., *Stem Cell Research* 3: 39-50 (2009) (para la diferenciación de las MSC derivadas de hemangioblastos y derivadas directamente de ESC en adipocitos y osteocitos). En particular, FM-MA09-MSC

presenta capacidades de diferenciación que incluyen la capacidad de diferenciarse en adipocitos y osteocitos (FIG. 7). Para la diferenciación de condrocitos, los métodos se han adaptado de Gong et al., *J. Cell. Physiol*. 224: 664-671 (2010) para estudiar este procedimiento y continuar examinando la adquisición de genes específicos de condrocitos (p. ej., agrecano y colágeno IIa) así como la deposición de glucosaminoglucanos a través de tinción con safranina O, azul alcián y/o azul de tolueno. En particular, la diferenciación condrogénica de las células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblasto MA09 ESC se detectó por la expresión de ARNm de agrecano (sulfato de proteoglicano condroitina 1) y colágeno IIa (FIG. 8) Se ha descrito en la bibliografía que ninguno de estos tres tipos de células, adipocitos, osteocitos o condrocitos derivados de MSC expresará la molécula HLA DR inmunoestimuladora (Le Blanc 2003, Gotherstrom 2004, Liu 2006). La inmunotinción y/o la citometría de flujo se realizarán en estos tipos de células MSC completamente diferenciadas para confirmar estas observaciones descritas. Es importante confirmar esto para que la diferenciación de las MSC en un entorno in vivo no induzca una respuesta inmunitaria del receptor hospedante. De estos tres tipos de células, la diferenciación condrogénica puede ser de particular interés debido a su potencial para usarse en terapias de reemplazo de cartílago para lesiones deportivas, dolor articular en el envejecimiento, osteoartritis, etc. Para dichas terapias, puede no ser necesario que las MSC estén completamente diferenciadas en condrocitos con el fin de usarlas terapéuticamente.

Ejemplo 4 - Confirmación de que las MSC derivadas de hemangioblastos están sustancialmente exentas de ESC

Las MSC también deberían estar desprovistas de la tendencia de los ESC a formar teratomas. Se confirmó que las MSC contenían cariotipos normales (datos no mostrados) en el pase 12 (~50 días en cultivo). Para confirmar que las MSC derivadas de blastos no contienen cantidades en trazas de ESC, se realizaron ensayos de formación de teratoma en ratones NOD/SCID. Se inyectan 5 x 10^6 MSC por vía subcutánea en el músculo del muslo izquierdo de 3 ratones. Los CE CT2 se usaron como controles positivos y los ratones se vigilarán en el transcurso de 6 semanas para comparar la formación de teratoma en ratones a los que se inyectó MSC frente a ESCC. No se formaron teratomas en los ratones a los que se inyectó MSC.

Ejemplo 5 - Reducción de las puntuaciones de EAE por MSC derivadas de hemangioblastos

Se realizó un estudio piloto para tratar la encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratones C57BL/6 de 6-8 semanas con ESC-MSC derivadas de hemangioblasto. Se indujo la EAE mediante inyección sc en los flancos de los ratones en el día 0 con 100 pl de una emulsión de 50 pg de péptido MOG(35-55) y 250 pg de *M. tuberculosis* en aceite adyuvante (CFA), también se inyectó por vía ip a los ratones 500 ng de toxina pertussis. Seis días después, a los ratones se les inyectó por vía ip ya sea un millón de ESC-MSC en PBS (n = 3) o el vehículo como control (n = 4). Se registraron las puntuaciones clínicas de los animales durante 29 días después de la inmunización. Se observó una reducción notable de las puntuaciones de la enfermedad (datos no mostrados).

Ejemplo 6 - Confirmación de la eficacia de ESC-MSC derivadas de hemangioblastos en el tratamiento con EAE y uso de modelos animales adicionales de enfermedad

A. El ensayo de ESC-MSC en modelos de EAE en ratones confirma su efecto anti-EAE.

Para confirmar los resultados obtenidos en el ejemplo 5, se realizan ensayos adicionales con un mayor número de animales, diferentes dosis de células, diferentes protocolos de administración y más controles. Se registran la puntuación clínica y la tasa de mortalidad. También se evaluará el grado de infiltración de linfocitos en el cerebro y la médula espinal de los ratones. En general, se cree que los efectos de MSC anti-EAE implican actividades inmunosupresoras tales como la supresión de células Th17 y se espera que reduzcan el grado de infiltración de linfocitos en el SNC.

B. Comparación de ESC-MSC con médula ósea (BM)-MSC de ratón, BM-MSC humanas y UCB-MSC humanas.

Las BM-MSC de ratón fueron las primeras en usarse para el tratamiento de EAE y han sido estudiados a fondo [1]. Las ESC-MSC (dada su naturaleza xenogénica) se pueden comparar directamente con las BM-MSC murinas para la eficacia anti-EAE. Se ha demostrado que las UCB-MSC humanas también tienen actividad inmunosupresora [19]. La actividad anti-EAE de las UCB-MSC humanas y de las BM-MSC humanas también se puede comparar con la de ESC-MSC en los modelos de ratón de EAE. La edad o número de pases de estos diferentes tipos de células puede influir en su comportamiento anti-EAE, por lo que también se evaluarán las consecuencias de la edad en la eficacia de las MSC en el sistema de modelo de ratón de EAE.

C. Optimización de la dosis, la vía y el tiempo de administración de ESC-MSC.

La inyección de ESC-MSC puede reducir las puntuaciones de EAE como se registró en los 29 días posteriores a la inmunización. Para estudiar la prevención y cura de la enfermedad a largo plazo, las ESC-MSC se pueden administrar en diferentes dosis, rutas y tiempos.

Las MSC se han generado a partir de ESC H1gfp y se confirmó que todavía expresan GFP en el estado de MSC. Se puede inyectar a los ratones de EAE estas GFP + ESC-MSC y su distribución se puede seguir in vivo utilizando un sistema de obtención de imágenes Xenogen In Vivo. Mediante estos procedimientos, se analizarán diferentes dosis, vías y tiempos de administración de ESC-MSC y se proporcionará información sobre el mecanismo de acción de la

actividad anti-EAE de las MSC (es decir, efectos paracrinos o endocrinos), longevidad de las MSC dentro de los ratones y la biodistribución y rutas de eliminación/aclaramiento de MSC.

Los efectos anti-EAE se pueden ver reflejados por una o más de las puntuaciones clínicas reducidas, el aumento de la supervivencia y/o la infiltración de linfocitos y desmielinización del SNC atenuados. Diferentes líneas de ESC pueden tener diferentes capacidades intrínsecas para generar MSC. Por lo tanto, se pueden usar múltiples líneas de ESC en este estudio y la adquisición de marcadores de MSC se puede controlar a lo largo del tiempo y comparar para cada línea de ESC. Para reducir todavía más las variaciones entre los experimentos con ESC-MSC, se pueden preparar stocks grandes de ESC-MSC congeladas en partes alícuotas y cada stock de partes alícuotas se puede usar en múltiples experimentos.

D. Confirmación de la eficacia de las MSC derivadas de hemangioblastos en otros modelos de enfermedad.

Como se ha mencionado antes, las MSC también pueden tener actividad terapéutica contra otros tipos de trastornos autoinmunitarios, como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y el trastorno ocular uveítis. Existen modelos animales para estas enfermedades y son bien conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Pizarro et al 2003, Duijvestein et al 2011, Liang et al 2011, Copland et al 2008). Los estudios in vivo se pueden extender para incluir una evaluación de la utilidad terapéutica de las MSC en uno o más de estos sistemas de modelos animales. Dichos modelos pueden permitir examinar el perfil de secreción de citoquinas de las MSC humanas aislando y seleccionando las citoquinas humanas del suero de animales inyectados. En particular, el modelo de uveítis puede ser útil ya que una inyección intravítrea local puede permitir estudiar los efectos de las MSC en un entorno no sistémico.

Las MSC también pueden tener una gran utilidad terapéutica en el tratamiento de afecciones de osteoartritis, incluidas aquellas que implican la pérdida de cartílago articular y la inflamación de las articulaciones afectadas (Noth et al, 2008). Los modelos para examinar la osteoartritis, la pérdida de cartílago y la inflamación de las articulaciones son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Mobasheri et al 2009). En algunos de estos estudios, las BM-MSC humanas se encapsulan en estructuras o microesferas semisólidas y se trasplantan a una articulación afectada en sujetos humanos para determinar si las MSC tienen un efecto terapéutico local, no sistémico en términos de reducción de la inflamación y/o restauración del cartílago (Wakitani et al 2002). Dichos métodos ayudarán a determinar la utilidad terapéutica de las MSC derivadas de hemangioblastos ESC de los autores de la invención para tratar afecciones degenerativas de las articulaciones.

La vida útil de las MSC inyectadas es muy corta [8], lo que indica que no se requiere la supervivencia a largo plazo de las células trasplantadas. Por lo tanto, las ESC-MSC inactivadas mitóticamente (p. ej., Irradiadas o tratadas con mitomicina C) también se pueden ensayar para determinar un efecto anti-EAE u otro efecto anti-enfermedad en los modelos animales mencionados antes. Si es así, es posible que no se necesiten ESC-MSC vivas, disminuyendo todavía más la preocupación sobre la bioseguridad por la posible contaminación residual de ESC en las ESC-MSC trasplantadas.

E. Resultados

Se espera que las MSC de fuentes derivadas de diferentes donantes (BM-MSC de ratón, BM-MSC humanas y UCB-MSC humanas) alberguen efectos anti-EAE. Sin embargo, sus efectos pueden variar entre los experimentos ya que las MSC provienen de fuentes limitadas por el donante. Por el contrario, las ESC-MSC de la presente descripción pueden tener efectos más consistentes. Debido a que muchos marcadores de superficie celular se usan para caracterizar MSC y no todas las MSC expresan todos los marcadores, se puede usar un subconjunto de marcadores, p. ej., CD73+ y CD45-, para comparar la eficacia de las MSC de diferentes fuentes.

Se espera que ESC-MSC tengan utilidad terapéutica en modelos animales de la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y uveítis ya que estas contienen componentes autoinmunitarios y reacciones inflamatorias.

Las MSC inactivadas mitóticamente (p. ej., MSC inactivadas irradiadas o por mitomicina C o ESC-MSC) pueden retener, al menos parcialmente, la función inmunosupresora ya que todavía secretan citoquinas y expresan marcadores de superficie celular que están relacionados con la función [29]. Sin embargo, su efecto puede verse disminuido debido a su acortada vida útil in vivo. Si es así, la dosis de células irradiadas u otras células mitóticamente inactivas y la frecuencia de administración pueden aumentar para mejorar la función inmunosupresora. Las MSC inactivadas mitóticamente y ESC-MSC pueden retener, al menos parcialmente, la función inmunosupresora ya que todavía secretan citoquinas y expresan marcadores de superficie celular que están relacionados con la función [29]. Sin embargo, su efecto puede verse disminuido debido a su acortada vida útil in vivo. Si es así, la dosis de células mitóticamente inactivadas y la frecuencia de administración se pueden aumentar para potenciar la función inmunosupresora.

Se realizó un segundo estudio piloto para tratar la EAE. Ratones C57BL/6 de ocho a diez semanas de edad se inmunizaron con el péptido MOG35-55 en adyuvante completo de Freund mediante inyección subQ. Esto se hizo junto con la inyección intraperitoneal de toxina pertussis. Seis días más tarde, se inyectaron por vía intraperitoneal 1 millón de células pluripotentes-células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos vivas (o 2 millones irradiadas) por ratón. La gravedad de la enfermedad se puntuó en una escala de 0-5 mediante la vigilancia del movimiento de las extremidades/cuerpo del ratón, como se ha publicado previamente. Los resultados demuestran

una reducción significativa en la puntuación clínica en comparación con el control de vehículo con células pluripotentes-células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos en el pase 4 y células pluripotentes-células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos irradiadas (datos no mostrados). La puntuación para ambos estudios piloto se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo: una puntuación de 1 indica cola flácida, 2 indica parálisis parcial de patas traseras, 3 es la parálisis completa de patas traseras, 4 es la parálisis completa de patas traseras y parcial de delanteras, 5 está moribundo.

Además, la eficacia de las MSC de acuerdo con la invención y los productos derivables de las mismas para usar en diferentes terapias se puede confirmar en otros modelos animales, p. ej., otros modelos de trasplante o autoinmunitarios dependiendo de la indicación terapéutica contemplada.

Ejemplo 7 - Investigación de componentes funcionales de las ESC-MSC

Las MSC se pueden definir como células adherentes plásticas que expresan los siguientes marcadores de superficie celular: CD105, CD73, CD29, CD90, CD166, CD44, CD13 y HLA de clase I (ABC), mientras que al mismo tiempo ser negativa para CD34, CD45, CD14, CD19, CD11b, CD79a y CD31 cuando se cultivan en un estado no inducido (p. ej., cultivo en αMEM normal + FCS al 20% sin citoquinas). En estas condiciones, deben expresar HLA-G intracelular y ser negativas para CD40 y HLA de clase II (DR). Funcionalmente, dichas células también deben ser capaces de diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos tal como se evalúa mediante ensayos de cultivo in vitro estándar. Después de 7 días de estimulación con interferón gamma (IFNγ), las MSC deben expresar HLA-G en su superficie celular, así como CD40 y HLA-clase II (DR) en su superficie celular. A pesar de estos requisitos, las MSC derivadas de cualquier fuente pueden contener cierta heterogeneidad y, debido a la pluripotencia de los ESC, es posible que los cultivos de MSC derivados de ESC puedan contener células de cualquier linaje de las tres capas germinales. Aunque el sistema de cultivo descrito en la presente memoria indica que >90% de las células presenta de forma rutinaria el inmunofenotipo y características funcionales antes mencionados, pueden existir pequeña(s) subpoblación(es) de las células dentro del cultivo de MSC que carecen de expresión de uno o más de los marcadores de superficie celular de MSC o expresan uno o más de los marcadores que deberían estar ausentes. Se examinará la extensión de dichas subpoblaciones dentro de los cultivos de MSC para determinar el grado de heterogeneidad contaminante. La citometría de flujo multicolor (8+ colores simultáneamente) se puede realizar en un citómetro de flujo BD LSR II con el fin de determinar la superposición entre los marcadores mencionados anteriormente. Esto también puede ayudar a determinar con precisión el perfil exacto de marcadores de superficie celular que se requiere para la mayor actividad inmunosupresora.

A. Caracterización de la etapa de diferenciación, subpoblaciones y estado de activación de ESC-MSC en relación con sus efectos inmunosupresores.

Hay una ventana de tiempo grande (p. ej., al menos desde el día 14 al 28 en el medio de diferenciación de MSC) para recoger las ESC-MSC (véase, p. ej., FIG. 1). Varios estudios han indicado que las MSC tienden a perder sus funciones inmunosupresoras y pueden envejecer puesto que se hacen pases continuamente y envejecen durante largos períodos de cultivo. Como tal, las células se pueden recoger en diferentes puntos de tiempo de actividad con el fin de determinar si un número específico de días en medio MSC proporciona una mayor actividad inmunosupresora. De hecho, las MSC recogidas en un punto de tiempo temprano (p. ej., 14 días en condiciones de cultivo de MSC) pueden contener células precursoras que todavía no han adquirido completamente todos los marcadores de superficie celular de MSC característicos, pero que albergan efectos inmunosupresores muy potentes. Para definir las poblaciones de precursores de MSC potencialmente útiles, se está siguiendo la expresión de una amplia variedad de marcadores de superficie celular durante todo el proceso de diferenciación de MSC, desde el día 7 hasta el día 28. Se ha observado que al menos 50% del cultivo adquirirá el marcador de superficie celular CD309 (otros nombres incluyen VEGFR2, KDR) en el espacio de 14 días de las condiciones de cultivo de MSC. CD309 está ausente en gran medida de la población inicial de hemangioblasto (FIG. 9, primer punto de tiempo, hemangioblastos MA09 recogidos los d7 y 8), pero aumenta en las primeras dos semanas de las condiciones de cultivo de MSC y luego disminuyen de nuevo a menos de 5% de las células en el día 28 (figura 9, segundo, tercero y cuarto puntos de tiempo). Se ha encontrado que este patrón ocurre no solo con las MSC derivadas de hemangioblastos MA09 sino también con las de ESC MA01, H1gfp y H7. En estos experimentos, los hemangioblastos son rutinariamente negativos (menos del 5% de las células tienen tinción positiva) para CD309, independientemente de su fecha de recolección (días 6-14). Sin embargo, el porcentaje de MSC en desarrollo que adquieren expresión de CD309 se puede reducir cuando se desarrollan a partir de hemangioblastos más viejos (p. ej., blastos de d10 o d12). De manera similar, se ha observado que las propiedades de expansión de las MSC derivadas de hemangioblastos pueden diferir dependiendo de la fecha de recogida de los hemangioblastos. Las MSC que se desarrollan a partir de hemangioblastos más jóvenes (día 6 o 7) no continúan expandiéndose tan sólidamente como las MSC que se desarrollan a partir de hemangioblastos más viejos (d8-12). La fecha óptima de la recolección de hemangioblastos puede ser una intermedia (días 8-10) ya que pueden permitir la adquisición adecuada de CD309 como un marcador sustituto del desarrollo de MSC mientras todavía se mantiene una capacidad sólida para expandirse hasta el día 28 y más. Se está trabajando para optimizar estos aspectos del desarrollo de precursores de MSC.

Excepto CD105, CD90 y CD73 que han demostrado ser los marcadores más típicos para las MSC (indicado por la Sociedad Internacional de Terapia Celular como la clasificación mínima de MSC (Dominici et al., *Cytotherapy* 8 (4):

315-317 (2006)), muchas otras moléculas de superficie celular no mencionadas anteriormente tales como CD49a, CD54, CD80, CD86, CD271, VCAM e ICAM también se han propuesto o usado como marcadores de MSC [22]. Por lo tanto, es posible que las ESC-MSC puedan contener subpoblaciones que expresar diferentes combinaciones de otros marcadores durante la diferenciación de los hemangioblastos, que pueden tener diferentes actividades inmunosupresoras. Las subpoblaciones se pueden clasificar (p. ej., usando FACS) basándose en uno o más marcadores (individualmente o en combinación) para el análisis para comparar su actividad inmunosupresora usando métodos in vitro o in vivo.

B. Optimización de las condiciones de diferenciación y expansión para obtener grandes cantidades de ESC-MSC funcionales.

Aunque que los experimentos preliminares han indicado que las MSC pueden mantenerse en IMDM + suero humano inactivado por calor al 10%, todavía no se ha ensayado su derivación en este medio. Se pueden ensayar diferentes condiciones de cultivo para determinar si los componentes de cultivo de sustitución (p. ej., medio base, fuente de suero, productos de reemplazo de suero, lisado de plaquetas de suero humano) pueden enriquecer las subpoblaciones efectivas descritas en la presente memoria. Se evaluará el medio basal diferente, incluyendo el sistema de cultivo sin animales y un cultivo definido (sin FBS) para cultivar ESC y preparar MSC. Específicamente, se usará StemPro® MSC SFM de Invitrogen y el kit MSCM bala de Lonza para examinar si un sistema de cultivo definido exento de suero generaría ESC-MSC con la calidad y la cantidad deseadas. Además, se pueden usar varios factores de crecimiento tales como FGF, PDGF y TGFI3, así como productos químicos pequeños que regulan las rutas de señalización o estructuras celulares para aumentar la calidad y cantidad de las ESC-MSC.

C. Resultados

Las ESC-MSC expresan los marcadores típicos CD73 (ecto-5'-nucleotidasa [26]), CD90 y CD105. También, la FIG. 20 muestra que las FM-MA09-MSC producidas de acuerdo con la invención mantienen su fenotipo a lo largo del tiempo (basado en la expresión del marcador detectado durante el análisis de citometría de flujo de diferentes poblaciones de MSC a lo largo del tiempo y de pases sucesivos).

Ejemplo 8 - Mecanismo de inmunosupresión por ESC-MSC

A. Estudio de cómo las ESC-MSC pueden suprimir las respuestas inmunitarias adaptativas mediadas por las células T.

Una respuesta general de las células T dentro de las PBMC es la proliferación cuando se inducen con estimuladores mitóticos tales como fitohemaglutinina (PHA) o acetato-miristato de forbol (PMA)/ionomicina o cuando se encuentran con células presentadoras de antígeno (APC) tales como células dendríticas. Esto se ilustra mejor mediante la proliferación general de las células T CD4+ y CD8+ en un ensayo de reacción de leucocitos mixtos (MLR). Estudios previos indican que las MSC pueden suprimir la proliferación de células T en un ensayo de MLR.

Se examinó la capacidad de las MSC derivadas de ESC-hemangioblastos de los autores de la invención para inhibir la proliferación de células T causada por estimulación química (PMA/ionomicina, figuras 10a y 13a) (PHA, figura 13b) o exposición a APC (células dendríticas, figuras 10b y 13c). Se observó que las MSC amortiguaban la respuesta proliferativa de las células T debido a la estimulación química o al co-cultivo con APC y que esta supresión ocurría de una manera dependiente de la dosis (Figura 10b, gráfico de la derecha) Además, se encontró que las MSC mitóticamente inactivadas (figura 10b) eran capaces de suprimir la proliferación de células T en un grado equivalente al de las MSC vivas, lo que sugiere que las MSC mitóticamente inactivadas pueden ser realmente útiles in vivo para la inmunosupresión.

Existen diversos subconjuntos funcionales de células T y llevan a cabo funciones específicas implicadas en respuestas proinflamatorias, respuestas antiinflamatorias o inducción de anergia de células T. Las células T reguladoras (Treg) se pueden considerar células T inmunosupresoras de origen natural y, en un contexto normal, son responsables de atenuar las respuestas de células T autorreactivas hipersensibles. Normalmente, representan solo una pequeña proporción de las células T del cuerpo, pero en su prevalencia pueden influir diferentes factores ambientales. Se ha demostrado que las MSC inducen tolerancia periférica a través de la inducción de células Treg [33-35].

En un ensayo corto de cocultivo de 5 días, se encontró que, de forma similar a estudios anteriores, las MSC derivadas de hemangioblastos podían aumentar el porcentaje de Tregs positivos dobles CD4/CD25 que se inducen en respuesta al estímulo de IL2 (figura 11a, 14, 15a). El cocultivo de una población mixta de células T a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no adherentes con MSC (en una relación de 10PBMC:1 MSC) muestra que la inducción de Treg casi se duplicó cuando se incluyeron MSC en el cultivo inducido por IL2. Este grado de inducción de Treg es similar al observado en el estudio muy citado de Aggarwal et al., publicado en *Blood*, 2005. Se ha examinado la cantidad de FoxP3 inducida dentro de la población doble positiva CD4/CD25 para confirmar que estos son realmente Treg verdaderos (figura 15b). Se usó la citometría de flujo intracelular para estudiar la inducción de FoxP3 en ausencia y presencia de MSC en los cultivos de células T inducidas por IL2. Tanto las PBMC no adherentes como las poblaciones de células T CD4+ purificadas se pueden usar para estudiar la

inducción de Treg en estos ensayos. Sin pretender estar limitados por la teoría, se cree que las ES-MSC son más eficaces para inducir Treg porque aumentan la expresión de CD25 más eficazmente que las BM-MSC (FIG. 15b).

Se cree que las células Th1 y Th17 tienen una función importante en la EM y en otras enfermedades autoinmunitarias. La diferenciación y función de las células T CD4+ Th1 y Th17 se analizarán en primer lugar y principalmente usando ensayos in vitro; también se pueden examinar en el modelo de EAE o en otros modelos animales que se puedan usar. Los efectos de las MSC en la inducción de Th1 in vitro se han empezado a examinar. Las condiciones de cultivo que promueven la especificación de Th1 a partir de células T CD4+ vírgenes son conocidas en el campo (Aggarwal et al.). Estas condiciones de cultivo (que incluyen anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y anti-CD4 junto con IL3 e IL12 humanas) se han usado para inducir células Th1 a partir de PBMC no adherentes, vírgenes, en ausencia o presencia de MSC (10 PBMC:1 MSC). Después de 48 horas de cocultivo, las células no adherentes se aislaron, enjuagaron, y estimularon con PMA/ionomicina durante 16 horas en un nuevo pocillo. Después de la inducción de 16 horas, se recogieron los líquidos sobrenadantes y se analizó la secreción de la citoquina Th1, IFNγ. Tal como se anticipó, se encontró que las PBMC cultivadas con MSC en las condiciones de inducción de Th1 de 48 horas no producían tanto IFNγ como las cultivadas sin MSC. Esto indica que las MSC pueden suprimir una función principal de células Th1, es decir, la secreción de IFNγ. (figura 11b) Se llevarán a cabo estudios similares que diferencial células Th17 in vitro y determinando los efectos de las MSC en la secreción de IL17 proinflamatoria usando un ensayo ELISA en los líquidos sobrenadantes de cultivos.

Se sabe que las células Th2 secretan citoquinas que tienen efectos antiinflamatorios, tales como IL4. Las MSC pueden potenciar la diferenciación de Th2 y secreción de IL4. De forma similar al experimento descrito antes para las células Th1, se usarán condiciones inductoras de Th2 en un sistema de cultivo de 48 horas para estimular la diferenciación de Th2 a partir de PBMC que contienen células T vírgenes. Los efectos del co-cultivo de MSC sobre la secreción de IL4 se examinarán usando un ensayo ELISA.

Recientemente, los estudios han sugerido que las células T CD8 también juegan un papel fundamental en los modelos de EAE y en el mecanismo subyacente de la EM [30]. Los autores de la invención examinarán si el cocultivo con ESC-MSC in vitro puede afectar a la función de las células T CD8. Para hacer esto, las PBMC no adherentes o las células T CD8+ purificadas se expondrán al péptido MBP110-118 asociado a la EAE mediante el uso de APC. Esto hará que surja una población de células T CD8+ específicas de antígeno y dicha población se puede expandir usando perlas de expansión CD3/CD28 (Invitrogen). La existencia de las células T CD8+ específicas de antígeno se puede verificar usando un reactivo pentámero específico para el péptido MBP (Proimmune) en citometría de flujo. Se llevará a cabo la reestimulación con APC cargadas con MBP110-118 con el fin de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno, que incluye tanto la expansión de las células T CD8+ específicas de antígeno como la secreción de IFNγ. Se comparará la respuesta de las células T cultivadas en ausencia o presencia de MSC para determinar si las MSC pueden suprimir la inducción de estas células T específicas de antígeno asociadas a la EAE citotóxicas. Para ello se emplearán citometría de flujo específica de pentámeros, incorporación de BrdU y ensayos ELISA.

B. Determinación de si los factores inflamatorios y las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) contribuyen al efecto inmunosupresor de ESC-MSC.

Se ha demostrado que TGFbeta, PGE2, IDO, óxido nítrico (NO) e ICAM son importantes para la función inmunosupresora de las MSC [7]. La secreción de estas moléculas y la expresión de ICAM por ESC-MSC se examinarán usando ensayos ELISA y citometría de flujo.

Se ha mostrado que la citoquina proinflamatoria, IFNγ es necesaria para la activación de MSC [23], y diversos agonistas para receptores tipo Toll (TLR) tales como LPS y poli(I:C) pueden inducir diferentes subconjuntos de MSC. [24]. Por ejemplo, recientemente se ha mostrado que las MSC activadas por IFNγ tienen una mayor eficacia terapéutica en un modelo de colitis en ratones que las MSC no tratadas (Duijvestein et al., 2011). Los efectos de IFNγ en las propiedades de MSC han comenzado a examinarse. Las ESC-MSC se han tratado in vitro con IFNγ durante hasta siete días y se han producido cambios notables en la expresión de marcadores de superficie celular. Estos descubrimientos son consistentes con observaciones hechas en estudios previos (Gotherstrom et al., 2004, Rasmusson et al., 2006, Newman et al., 2009) y confirman que las ESC-MSC derivadas de hemangioblastos funcionan de manera similar a las MSC aisladas del cuerpo. Por ejemplo, en un estado de reposo, las MSC típicamente no expresan mucho (<10%) HLA G en su superficie celular mientras que albergan reservas intracelulares de esta clase especial de marcador de HLA inmunotolerante. Después de 7 días de tratamiento con IFNγ, se puede detectar fácilmente HLA G en la superficie celular (figura 12) y también puede ser inducido a ser secretado (todavía no ensayado). Además, el tratamiento con IFNγ produce una regulación por aumento de la expresión de CD40 y la expresión de HLA DR en la superficie celular (figura 12). Estos cambios se proponen para mejorar sus efectos inmunosupresores. Por ejemplo, se determinará si el pretratamiento de MSC con IFNγ potencia su capacidad para inducir poblaciones de Treg, suprimir la secreción de Th1 de IFNγ, o potenciar la secreción de IL4 de células Th2 mediante el uso de ensayos de cocultivo in vitro descritos antes. El IFNγ también puede influir en la capacidad de las MSC para inhibir la proliferación general de células T en ensayos de MLR. Los efectos del TNFα, LPS, y/o poli I:C en estos tipos de propiedades inmunosupresoras MSC también se pueden ensayar.

C. Resultados

Se demostró que la población doblemente positiva CD4/CD25 de Treg inducida por MSC también expresa el factor de transcripción, FoxP3, ya que se ha descrito que las Treg funcionales regulan por aumento su expresión en respuesta a estímulos inductores (FIG. 15b).

Se espera que las MSC inhiban, en cierta medida, la secreción proinflamatoria de IL17 por células Th17 y que las MSC también puedan potenciar significativamente la secreción de IL4 por las células Th2 antiinflamatorias. Dichas observaciones se han realizado en estudios previos y ayudarán a confirmar la verdadera funcionalidad de las MSC derivadas de hemangioblastos.

Las ESC-MSC deberían inhibir al menos parcialmente la activación inducida por antígeno de las células T CD8+. La función de células NK, macrófagos y células dendríticas después de cocultivo con ESC-MSC también se puede examinar. Se examinarán los efectos de ESC-MSC en la maduración, citotoxicidad y/o producción específica de citoquinas por estos otros tipos de células inmunitarias.

Por ejemplo, los experimentos en la FIG. 11A muestran que las células estromales mesenquimales derivadas de hemangioblastos aumentan el porcentaje de Treg positivas dobles CD4/CD25 que se inducen en respuesta al estímulo de IL2. Además, los experimentos en la FIG. 12 muestran que la citoquina proinflamatoria IFNg estimula cambios en la expresión del marcador de superficie de FM-MA09-MSC y que el interferón gamma estimula cambios en la expresión del marcador de superficie de MSC y puede potenciar los efectos inmunosupresores de MSC.

Además, los experimentos en la FIG. 14 muestran que las FM-MA09-MSC potencian la inducción de Treg, y en particular que las MSC de pase temprano tenían mayores efectos que las MSC de pase tardío. Las PBMC no adherentes (diferentes donantes) se cultivaron con o sin IL2 durante 4 días en ausencia o presencia de FM-MA09-MSC. El porcentaje de Treg positivas dobles CD4/CD25 se evaluó por citometría de flujo. Se usaron FM-MA09-MSC jóvenes (p6) o viejas (p16-18). Las barras negras indican el promedio de 6 experimentos. Las MSC como un todo tenían un efecto estadísticamente significativo en la inducción de Treg. ($p = 0,02$).

Ejemplo 9 - Las ESC-MSC tienen mayor potencia y mayores efectos inhibidores que las BM-MSC

Se llevó a cabo un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) para determinar si las diferentes poblaciones de MSC tienen diferentes capacidades para inhibir la proliferación de células T. Los resultados sugieren que las ESC-MSC son más potentes que las BM-MSC en su capacidad para inhibir la proliferación de células T en respuesta a cualquiera de los estímulos mitogénicos ("MLR unidireccional") (véanse las FIG. 13a y 13b) o a células presentadoras de antígeno (células dendríticas, CD, MLR "bidireccional") (véase la FIG. 13c).

El ensayo de MLR "unidireccional" se realizó como sigue: Se adquirieron PBMC humanas de AllCells. Tras descongelar un vial congelado, las PBMC se cultivaron en placa durante al menos 1 hora o toda la noche en IMDM + suero humano inactivado por calor al 10% para adherir selectivamente monocitos. Las células no adherentes (que contienen células T) se usaron como fuente bruta de células T respondedoras. Las MSC derivadas de ESC o las MSC derivadas de BM se usaron como inhibidores. Estas MSC bien estaban vivas o bien detenidas mitóticamente con mitomicina C. Las PBMC no adherentes y las MSC se mezclaron juntas en proporciones variables y se dejaron cocultivar durante 5 días. El día 3, se añadieron los mitógenos, forbol-12-miristato 13-acetato (PMA) y ionomicina o fitohemaglutinina (PHA) a los cultivos para inducir la proliferación de células T. El día 4, se añadió bromodesoxiuridina (BrdU). El día 5, la proliferación de células T se evaluó por tinción citométrica de flujo con anticuerpos dirigidos contra CD4, CD8 y BrdU usando el kit de incorporación de BrdU (B & D Biosystems). La proliferación de células T se evaluó como el % de células CD4+ y/o CD8+ que habían incorporado BrdU en su ADN (es decir, BrdU+) (mostrado en las FIG. 13a y 13b).

En la MLR "bidireccional", las MSC derivadas de ESC o MSC derivadas de BM se usaron como inhibidores, se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no adherentes como fuente bruta de células T respondedoras y se usaron células dendríticas derivadas de monocitos (DC) como estimuladores. Para derivar CD, se aislaron monocitos adherentes a plástico de PBMC. Se cultivaron en placa PBMC durante al menos 1 hora o toda la noche en IMDM + suero humano inactivado por calor al 10% (HuSer al 10%) para adherir monocitos selectivamente. Las células no adherentes se eliminaron y las células adherentes se cultivaron en IMDM + HuSer al 10% durante 4 días con SCF, FL, GM-CSF, IL3 e IL4. En esta variación del ensayo, no se añade mitógeno el día 3. Se añade BrdU simplemente 16-24 horas antes de recoger las células para la citometría de flujo como antes. Tanto las MSC como las DC se inactivaron mitóticamente con mitomicina C en este ensayo (se muestra en la FIG. 13c).

Ejemplo 10 - Inducción mejorada de la expansión de Treg por ESC-MSC jóvenes en comparación con BM-MSC y ESC-MSC viejas.

Se llevaron a cabo experimentos de cocultivo con PBMC y MSC para determinar si la presencia de MSC puede inducir la expansión de células T reguladoras (Treg) dentro de la población de PBMC. Los resultados sugieren que las ESC-MSC jóvenes indujeron la expansión de Treg mejor que tanto las BM-MSC como las ESC-MSC viejas (véase la FIG. 14 y FIG. 15).

Se establecieron co-cultivos con PBMC no adherentes y diferentes tipos de MSC (derivadas de ESC "jóvenes" (~p5-6), derivadas de ESC "viejas" (~p12 o superior) derivadas de BM) en una relación 10:1 (PBMC:MSC). Los cocultivos

se incubaron en IMDM + suero humano inactivado por calor al 10% + 300 unidades/ml de IL2 humana recombinante durante 4 días. La presencia de Treg se determinó por el porcentaje de PBMC que se tiñeron positivamente para CD4, CD25 y FoxP3 usando un kit de tinción de citometría de flujo intracelular FoxP3 (Biolegend).

Ejemplo 11 - ESC-MSC tienen mayor capacidad proliferativa

Las tasas de crecimiento de diferentes poblaciones de MSC se vigilaron a lo largo del tiempo para determinar si la fuente de MSC afecta su capacidad proliferativa. Los resultados muestran que las MSC derivadas de ESC tienen una mayor capacidad proliferativa que las MSC derivadas de BM. Los resultados también sugieren que cultivar ESC-MSC en un sustrato (tal como Matrigel) durante un período de tiempo más largo (hasta 6 pases) puede ayudar a mantener una mayor tasa de crecimiento que si las células se retiran del sustrato en un pase más temprano, tal como p2 (véase la FIG. 16 y FIG. 17).

Se sembraron hemangioblastos derivados de ESC sobre plástico de cultivo tisular recubierto con Matrigel con 50.000 células/cm^2 en αMEM + FBS Hyclone al 20% + l-glutamina + aminoácidos no esenciales (= medio de crecimiento de MSC como p0. Se sembraron células mononucleares de médula ósea en plástico de cultivo tisular normal con 50.000 células/cm^2 en medio de crecimiento de MSC como p0. Las células se recogieron con tripsina-EDTA al 0,05% (Gibco) cuando alcanzaron ~50-60% de confluencia en p0 o 70-80% de confluencia de p1 en adelante (por lo general cada 3-5 días). Tras la recolección, las células se centrifugaron, se contaron y se volvieron a sembrar con 7.000 células/cm^2. Las ESC-MSC se retiraron del Matrigel y posteriormente se cultivaron en plástico de cultivo tisular normal empezando en p3, salvo que se indique lo contrario. Las duplicaciones de población acumuladas a lo largo del tiempo se representan gráficamente para mostrar la tasa de crecimiento celular a medida que las MSC se mantienen en cultivo.

Ejemplo 12- Las ESC-MSC sufren diferenciación condrogénica

Para determinar el potencial condrogénico de diferentes poblaciones de MSC, se sembraron ESC-MSC o BM-MSC como cultivos de masa de sedimentos y se indujeron a diferenciarse en condrocitos con medio de diferenciación (o se mantuvieron en medios de crecimiento de MSC normales como controles negativos). Los resultados sugieren que las ESC-MSC experimentan condrogénesis de manera similar a la de las BM-MSC. Los sedimentos tanto de ESC-MSC como de BM-MSC ponen de manifiesto la deposición de matriz cartilaginosa (proteoglicanos) mediante tinción con Safranina O (véase FIG. 18).

Para formar un cultivo de sedimento condrogénico, se centrifugaron 2,5 x 10^5 células ESC-MSC a 500 xg durante 5 minutos en un tubo cónico de 15 ml. Se aspiró el medio de cultivo y se añadieron 0,5 ml de medio de cultivo condrogénico, que consistía en DMEM-HG (Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con piruvato de sodio 1 mM (Life Technologies), ácido ascórbico 2-fosfato 0,1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), dexametasona 0,1 µM (Sigma-Aldrich), ITS al 1% (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA), TGF-β3 10 ng/ml (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o medio de cultivo (control) al sedimento. Los cultivos de sedimentos se mantuvieron durante 21 días con cambios de medio cada 2-3 días. Al final de los 21 días, los sedimentos se fijaron con paraformaldehído al 4% y se enviaron a MassHistology (Worcester, Massachusetts) para la inclusión en parafina, seccionado y tinción con Safranina O usando procedimientos convencionales.

Ejemplo 13 - Secreción potenciada de prostaglandina E2 (PGE2) con estimulación con IFN-γ o TNF-α

Las ESC-MSC ejercen efectos inmunomoduladores en parte a través de la secreción de PGE2. El medio condicionado recogido de FM ESC-MSC y BM-MSC muestra que las BM-MSC secretan niveles más altos de PGE2 en el estado basal que las FM ESC-MSC. Los experimentos para determinar la secreción de PGE2 en condiciones estimuladas (diferentes concentraciones de IFN-γ y/o TNF-α) muestran que las FM ESC-MSC aumentan en gran medida su secreción de PGE2 en respuesta a la estimulación (véase FIG. 19). De hecho, el número de veces de inducción para la secreción de PGE2 desde un estado basal a estimulado es mucho mayor para FM ESC-MSC que para BM-MSC. Sin embargo, las cantidades brutas reales de la secreción de PGE2 (en pg/ml) en condiciones estimuladas son similares para FM ESC-MSC y BM-MSC.

Las ESC-MSC se cultivaron con 7,5 x 10^6 células/cm_2 en placas de 6 pocillos (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ). Los cultivos se mantuvieron en medio de cultivo durante 24 horas, seguido de estimulación con 10, 50, 100 o 200 ng/ml de IFN-γ y/o 10, 25, 50 ng/ml de TNF-α (Peprotech). El líquido sobrenadante se recogió después de 3 días de inducción y se almacenó a -20ºC. Las ESC-MSC se recogieron y se contaron para normalizar los niveles de PGE2 respecto al número de células. La concentración de PGE_2 se midió con kits de ELISA (R&D PGE2 Parameter o kit Prostaglandin E2 Express EIA, Cayman Chemicals) y se usa según el protocolo del fabricante.

Ejemplo 14 - Evaluación fenotípica de ESC-MSC

La expresión de diferentes marcadores de superficie celular se evaluó en diferentes poblaciones de MSC para determinar sus inmunofenotipos individuales. Las MSC derivadas de ESC se pueden diferenciar en varios sustratos. Se examinó un panel de marcadores de superficie celular para determinar su perfil de expresión en MSC que se habían derivado en tres matrices diferentes (Matrigel, fibronectina o colágeno I) frente a su expresión en BM-MSC. Los resultados muestran patrones de expresión similares para estos marcadores, independientemente del sustrato

usado para su diferenciación inicial. Eran más de 95% positivos para CD13, 29, 44, 73, 90, 105, 166 y HLA-ABC, mientras que negativos para CD31, 34, 45, HLA-DR, FGFR2, CD271 (véase la FIG. 20A). La expresión de Stro-1 varió, entre aproximadamente 5% para ESC-MSC a aproximadamente 30% para BM-MSC.

Las MSC disminuyen el crecimiento y duplicación de población con el aumento del número de pases. El objetivo de este experimento era observar la expresión del marcador de superficie para una serie de marcadores de MSC diferentes desde el pase 3 al 17 en FM-ESC-MSC. Las células en todos los pases de FM-ESC-MSC dieron tinción positiva para CD90, CD73, CD105, HLA-ABC, CD166, CD13 y CD44. Las células eran negativas para CD34, CD45, TLR3, HLA-DR, CD106, CD133 y CD271 (véase FIG. 20B).

Para cada número de línea/pase, se siguió el mismo protocolo. Las células se cultivaron en matraces T75 o T175, en medio de MSC. Las células se pasaron cada 3-4 días. El pase de células consistía en lavar matraces con PBS, recoger células usando medio de disociación celular TryPLE Express y lavar con medio de MSC. Las células se contaron para la viabilidad con azul tripán y se tomaron partes alícuotas de 50-100.000 células viables por condición. Se usaron los siguientes anticuerpos: CD34-Fitc, CD34-PE, CD44-Fitc, CD73-PE, CD106-PE, CD45-APC (BD); HLA-DR-APC, CD90-Fitc, HLA-ABC-Fitc, CD133-APC, CD29 (ebioscience); CD166-PE, CD105-APC, CD13-PE, CD13-APC, CD271-Fitc, CD10-Fitc, Stro-1-AF647, CD10 (Biolegend); TLR3-Fitc (Santa Cruz Biotech). El yoduro de propidio también se añadió como un marcador de viabilidad. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, se centrifugaron, se pasaron a través de un tamiz de células de 40 µm, y se analizaron con un citómetro de flujo Accuri C6. Para cada tipo de célula, las células se seleccionaron en la población de MSC (FSC frente a SSC), PI negativo. El porcentaje de positivos se determinó seleccionando las gráficas del histograma y usando la población de células no teñidas como control negativo. véase, Wagner W, et al. "Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process". PLoS ONE (2008). 3(5): e2213. doi:10.1371/journal.pone.0002213; y Musina, R, et al. "Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues." *Cell Technologies in Biology and Medicine* (2005) Abril. 1 (2), 504-509.

Además, las FM ESC-MSC tiene un mayor nivel de expresión de CD10 y menos expresión de Stro-1 que FM ESC-MSC y BM-MSC (véase FIG. 21). Este patrón de expresión de bajo nivel de Stro-1 (5-10% de las células) y medio CD10 (~40% de las células) se confirmó en 10 lotes diferentes de FM-MA09-MSC (véase FIG. 22). La citometría de flujo también se usó en diferentes poblaciones para evaluar el tamaño celular (véase FIG. 23). Los resultados muestran que a medida que las células se mantienen en cultivo durante periodos de tiempo más largos, el tamaño celular de las BM-MSC aumenta, mientras que las MSC derivadas de FM ES mantienen el tamaño celular. El tamaño de las células se determinó mediante gráficas de puntos de dispersión de luz frontal frente a lateral en citometría de flujo. Se usó una ventana de cuadrantes para dividir la gráfica en 4 regiones. El cuadrante superior derecho contiene las células grandes, es decir, las células en esa zona tienen una gran dispersión frontal (volumen de célula) y también una alta dispersión lateral (granularidad).

Las ESC-MSC se recogieron, como se ha mencionado antes, y se lavaron en 1x DPBS (Life Technologies). Se lavaron 75-100 x 10^5 células con tampón de flujo (FBS al 3%; Atlas Biologicals, Fort Collins, CO.), seguido de incubación con 100 µl de tampón de flujo que contiene ya sea el anticuerpo primario o anticuerpo de control de isotipo durante 45 min sobre hielo. Las células se lavaron con 2 ml de tampón de flujo y se incubaron en 100 µl de tampón de flujo que contenía anticuerpo secundario durante 45 minutos sobre hielo. Las células se lavaron por última vez y se volvieron a suspender en tampón de flujo que contenía yoduro de propidio y se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6 (Accuri Cytometers Inc., Ann Arbor, MI).

Ejemplo 15 Análisis de expresión génica en ESC-MSC

El propósito de estos estudios era determinar las similitudes y diferencias de expresión de ARNm entre FM-ESC-MSC y BM-MSC. En el primer conjunto de experimentos (experimentos basales), se compararon las diferencias relativas de expresión del ARNm de células de FM-ESC-MSC y BM-MSC por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR). Se usaron sondas Taqman (Life Technologies) para los diferentes genes para determinar la expresión relativa respecto al control endógeno, GAPDH, usando el método ΔΔCt. De una lista de 28 genes, los siguientes genes eran regulados por aumento en los experimentos basales en FM-ESC-MSC frente a BM-MSC: AIRE, ANGPT1 (ANG-1), CXCL1, CD10, CD24 e IL11 (véase FIGS. 24-26). La IL6 y VEGF eran regulados por disminución en FM-ESC-MSC frente a BM-MSC (véase FIG. 27) No había diferencias significativas para los siguientes genes entre las fuentes de MSC: ALCAM, FGF7, HGF, LGALS1, NT5E y TNFSF1B (datos no mostrados). Los siguientes genes no se detectaron en ninguna de las fuentes de MSC: ANGPT2, CD31, CD34, CD45, HLA-G, IL2RA, IL3, IL12B (datos no mostrados). Como control negativo, se analizó en todas las MSC la expresión de los marcadores hematopoyéticos progenitores, CD34, CD41 y CD45. A partir de estos experimentos, se determinó que las FM-ESC-MSC expresan algunos genes en niveles más altos o más bajos que las BM-MSC equivalentes.

También se investigó a las MSC a un entorno que imita una respuesta inmunitaria tratando las MSC con células T y después añadiendo el estimulante, fitohemaglutinina (PHA). Las ESC-MSC se cultivaron en presencia de células T (no estimuladas) o células T más PHA (estimuladas) durante dos días antes de añadir PHA 2,5 µg/ml durante 2 días adicionales antes de recoger el ARN. La expresión génica de las ESC-MSC no estimuladas y estimuladas se está comparando actualmente con los niveles de ARNm de BM-MSC no estimuladas y estimuladas.

Para experimentos basales: Las FM-ESC-MSC y BM-MSC se cultivaron durante 4 días a una densidad inicial de aproximadamente 500.000 células en una placa de 10 cm en las condiciones descritas previamente. Además, un control negativo para experimentos basales eran progenitores hematopoyéticos derivados de ESC MA09.

Para experimentos de estimulación: Las FM-ESC-MSC y BM-MSC se cultivaron durante 3-4 días a una densidad inicial de aproximadamente 500.000 células en una placa de 10cm en las condiciones descritas previamente. Las MSC se expusieron después a las células T durante 2 días y después a +/- exposición a PHA 2,5 µg/ml. Como control, se cultivaron MSC en presencia de células T sin PHA, y por separado, también se cultivaron células T más PHA (sin MSC). Se aspiró el medio, se enjuagó 2 veces en PBS y se aspiró en seco. El ARN se aisló usando el kit RNAeasy (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ARN se analizaron usando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La síntesis de ADC se realizó usando SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix para qRT-PCR (Life Technologies) usando 1 microgramo de ARN como el material de partida. El ADNc se diluyó aproximadamente 30 veces para 5 microlitros/pocillo. Se mezclaron ADNc diluido, 1 microlitro de sonda de QPCR Taqman (Life Technologies), y 15 microlitros de SSO Fast Mastermix (Biorad), por pocillo. La QPCR se realizó en Biorad CFX 96. Los datos se analizaron usando CFX manager 2.1 (Biorad). Las cantidades relativas de expresión de ARNm se determinaron usando el control endógeno, GAPDH, y el método ΔΔCt.

Ejemplo 16 - Actividad enzimática de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en ESC-MSC

La indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es una enzima implicada en la conversión de triptófano en quinurenina. Las MSC activadas con IFNγ producen IDO y esto puede ser en parte responsable de su capacidad para suprimir la proliferación de células T ya que la IDO interfiere con el metabolismo de las células T. En este estudio, se está ensayando la actividad de IDO de BM-MSC en comparación con ESC-MSC. La expresión de IDO se mide antes y después de la estimulación de células con IFNγ o cocultivando con células T. Los experimentos muestran que todas las poblaciones de MSC aumentan considerablemente la actividad de IDO después de la estimulación con IFNgamma (véase FIG. 28).

Las células se estimularon por adición de IFNγ (50 ng/ml) a los medios, o mediante cocultivo con células T durante 3 días; la medición de la expresión de IDO se lleva a cabo usando un ensayo espectrofotométrico. Después de la estimulación, se recogieron células, y se lisaron 1-2 x 10^6 células. Los lisados se recogen y se mezclan 1:1 con tampón 2x IDO (PBS con ascorbato 40 mM, azul de metileno 20 µM, catalasa 200 µg/ml y L-triptófano 800 µM) y se incuban durante 30 minutos a 37ºC. La reacción se detuvo por adición de ácido tricloroacético al 30%, y se incubó durante 30 minutos a 52ºC. Los lisados se centrifugaron, y los líquidos sobrenadantes se mezclaron 1: 1 con reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído al 0,8% en ácido acético, recién preparado). Después del desarrollo del color, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 492 nm. Los valores de DO se compararon con una referencia de quinurenina de 0-1000 µM para evaluar la conversión de triptófano en quinurenina.

Véase, Meisel R et. al. "Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation". *Blood*. (2004) Jun 15; 103 (12): 4619-21.

Véase, Braun, D et. al. "A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation". *Blood*. (2005) Oct 1; 106 (7): 2375-81.

Ejemplo 17 - Niveles de expresión de Aire-1 y proteína priónica en ESC-MSC

Los niveles de expresión de Aire-1 y proteína priónica (Prp) se siguieron usando análisis de transferencia Western para determinar si existen diferencias entre diferentes poblaciones de MSC (basado en la fuente celular, el método de derivación o el número de pases de las MSC). Aire-1 ayuda a inducir la transcripción de antígenos restringidos a tejidos periféricos raros (PTA) que posteriormente son presentados en MHC y mitigan la respuesta de las células T vecinas. Aire-1 también puede suprimir la expresión del factor 1 de activación de células T temprano (ETA-1) para inhibir la respuesta inflamatoria de células T. Se ha demostrado que la proteína priónica (PrP) mejora la proliferación y la autorrenovación de diferentes poblaciones de citoblastos (hematopoyéticas, neurales, etc.) y su expresión se puede correlacionar con las características de crecimiento de diferentes poblaciones de MSC en cultivo. Los resultados muestran disminución relacionada con la edad en ambas proteínas (después de considerar el control de carga, actina para cada muestra). FM MA09-MSC parecen mantener la expresión de Aire-1 y PrP a lo largo del tiempo (véase FIG. 29).

Los lisados de células completas de MSC se realizaron con geles de acrilamida de SDS-PAGE al 12% según los protocolos estándar. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se bloquearon con leche al 5% en PBS + tween 20 al 0,05%. Las membranas se probaron con anticuerpos dirigidos contra Aire-1 (Santa Cruz Biotechnology) o proteína priónica (Abcam), seguido de anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Se usó un reactivo quimioluminiscente mejorado para desarrollar la señal antes del análisis en un Biorad GelDoc Imaging System.

Véase, Parekkadan et al. *Molecular Therapy* 20 (1): 178-186 (2011).

Véase, Mohanty et al. *Stem Cells* 30: 1134 a 1143 (2012).

Ejemplo 18 - Secreción de citoquinas de ESC-MSC

Se sabe que las MSC secretan una variedad de citoquinas y factores de crecimiento tanto en el estado basal como en respuesta a diferentes estímulos. Se analizaron más de 20 factores diferentes secretados usando matrices de citoquinas. Los resultados muestran que hay algunas diferencias clave entre ESC-MSC y BM-MSC con respecto a los factores secretados en los estados basal y estimulado. Las BM-MSC expresan niveles más altos de VEGF e IL6 que ESC-MSC tanto en el estado basal como estimulado por IFNγ (véase FIGS. 30-32).

Se sembraron en placa números equivalentes de MSC y se recogió el medio condicionado de las MSC 3-4 días después de la siembra. El CM se centrifugó brevemente para eliminar los restos celulares y luego se congeló a -20ºC. El CM se descongeló para análisis en matrices de membrana adaptadas de RayBiotech (Norcross, GA) o en diversos sistemas de R&D (Minneapolis, Minnesota) de matrices de citoquinas preparadas de acuerdo a los protocolos del fabricante.

Ejemplo 19 - Cultivo de células ES humanas para la diferenciación de MSC

El propósito de este experimento era evaluar diferentes medios de crecimiento usados para el cultivo de hESC antes de la diferenciación en MSC.

Las células ES humanas se cultivaron generalmente en células alimentadoras de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) irradiadas o tratadas con mitomicina C en medio de crecimiento de células ES humanas (medio DMEM de inactivación génica o medio base DMEM/F12 (1:1), sustituto sérico al 20%, l-glutamina, aminoácidos no esenciales y bFGF 10 ng/ml). Los pases se llevan a cabo usando tripsina/EDTA al 0,05%. Alternativamente, las hESC se cultivaron en alimentadores de MEF en medio Primate y se pasaron usando una solución de disociación (ambas se adquirieron en ReproCELL). Los resultados mostraron que el medio Primate proporcionó consistentemente colonias hde ESC de aspecto "mejor" (colonias más redondas, más compactas, menos diferenciación espontánea) en comparación con las células cultivadas en el medio de crecimiento celular ES humano que contenía DMEM de inactivación génica.

Referencias citadas

1. Zappia, E., et al., *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy.* Blood, 2005. 106(5): p. 1755-61.

2. Gerdoni, E., et al., *Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Ann Neurol, 2007. 61(3): p. 219-27.

3. Lanza, C., et al., *Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in viva* J Neurochem, 2009. 110(5): p. 1674-84.

4. Rafei, M., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis.* Mol Ther, 2009. 17(10): p. 1799-803.

5. Rafei, M., et al., *Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th 17 T cells in a* CC *chemokine ligand 2-dependent manner.* J Immunol, 2009. 182(10): p. 5994-6002.

6. Constantin, G., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis.* Stem Cells, 2009. 27(10): p. 2624-35.

7. Uccelli, A. y D.J. Prockop, *Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases?* Curr Opin Immunol, 2010. 22(6): p. 768-74.

8. Ohtaki, H., et al., *Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(38): p. 14638-43.

9. Barberi, T., et al., *Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells.* PLoS Med, 2005. 2(6): p. e161.

10. Hwang, N.S., et al., *In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(52): p. 20641-6.

11. Olivier, E.N., A.C. Rybicki, y E.E. Bouhassira, *Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells.* Stem Cells, 2006. 24(8): p. 1914-22.

12. Brown, S.E., W. Tong, y P.H. Krebsbach, *The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells.* Cells Tissues Organs, 2009. 189(1-4): p. 256-60.

13. Karlsson, C., Emanuelsson, K., Wessberg, F., Kajic, K., Axell, M. Z., Eriksson, P. S., Lindahl, A., Hyllner, J., y Strehl, R., *Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors-Potential in regenerative medicine.* Stem Cell Res., 2009. 3(1): 39-50.

14. Lu, S. J., Feng, Q., Caballero, S., Chen, Y., Moore, M. A., Grant, M. B., y Lanza, R., *Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells*, Nat. Methods 4 (2007) 501-509.

15. Lu, S. J., Luo, C., Holton, K., Feng, Q., Ivanova, Y., y Lanza, R., *Robust generation of hemangioblastic progenitors from human embryonic stem cells*, Regen. Med. 3 (2008) 693-704.

16. Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.-J., y Lanza, R., *Human embryonic stem-cell lines derived from single blastomeres*, Nature 444 (2006) 481-485.

17. Madsen, L.S., et al., *A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor.* Nat Genet, 1999. 23(3): p. 343-7.

18. Stromnes, I.M. y J.M. Goverman, *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis.* Nat Protoc, 2006. 1(4): p. 1952-60.

19. Liang, J., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis.* Mult Scler, 2009. 15(5): p. 644-6.

20. Costa, M., et al., *The ESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny.* Nat Methods, 2005. 2(4): p. 259-60.

21. Pomper, M.G., et al., *Serial imaging of human embryonic stem-cell engraftment and teratoma formation in live mouse models.* Cell Res, 2009. 19(3): p. 370-9.

22. Phinney, D.G. y D.J. Prockop, *Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views.* Stem Cells, 2007. 25(11): p. 2896-902.

23. Ryan, J.M., et al., *Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells.* Clin Exp Immunol, 2007. 149(2): p. 353-63.

24. DelaRosa, O. y E. Lombardo, *Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential.* Mediators Inflamm, 2010. 2010: p. 865601.

25. English, K., et al., *IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells.* Immunol Lett, 2007. 110(2): p. 91-100.

26. Barry, F., et al., *The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. 289(2): p. 519-24.

27. Alhadlaq, A. y J.J. Mao, *Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics.* Stem Cells Dev, 2004. 13(4): p. 436-48.

28. Mikami, Y., et al., *CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages.* Stem Cells Dev, 2010.

29. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.* Blood, 2002. 99(10): p. 3838-43.

30. Johnson, T.A., F.R. Jirik, y S. Fournier, *Exploring the roles of CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of autoimmune demyelination.* Semin Immunopathol, 2010. 32(2): p. 197-209.

31. Huseby, E.S., C. Ohlen, y J. Goverman, *Cutting edge: myelin basic protein-specific cytotoxic*

T cell tolerance is maintained in vivo by a single dominant epitope in H-2k mice. J Immunol, 1999. 163(3): p. 1115-8.

32. Tang, Q. y J.A. Bluestone, *Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity.* Immunol Rev, 2006. 212: p. 217-37.

33. Boumaza, I., et al., *Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia.* J Autoimmun, 2009. 32(1): p. 33-4

34. Maccario, R., et al., *Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype.* Haematologica, 2005. 90(4): p. 516-25.

35. Locatelli, F., R. Maccario, y F. Frassoni, *Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?* Haematologica, 2007. 92(7): p. 872-7.

36. Wan, Y.Y. y R.A. Flavell, *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(14): p. 5126-31.

37. Duijvestein et al. Stem Cells 29 (10): 1549-1558 (2011)

38. Liang et al. Cell Transplant 20 (9): 1395-1408 (2011)

39. Pizarro et al. Trends Mol Med 9 (5): 218-222 (2003)

40. Copland et al. IOVS 49 (12): 5458-5465 (2008)

41. Wakitani et al. Osteoarthritis and Cartilage 10: 199-206 (2002)

42. Mobasheri et al. Histol. Histopathol 24 (3): 347-366 (2009)

43. Noth et al. Nat Clin Pract Rheumato 4(7): 371-380 (2008)

44. Gotherstrom et al. Am J Obstet Gynecol 190(1): 239-45 (2004)

45. Rasmusson et al. Exp. Cell Research 312(12): 2169-79 (2006)

46. Newman et al. Inflamm Allergy Drug Targets 8(2): 110-123 (2009)

47. Le Blanc et al. Exp. Hematol. 31: 890-896 (2003)

48. Liu et al. J. of Immunol. 176: 2864-2871 (2006)

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar células estromales mesenquimales que comprende cultivar hemangioblastos en condiciones en las que las células se diferencian para producir células estromales mesenquimales.

2. El método de la reivindicación 1, en donde las células estromales mesenquimales se definen por la expresión de AIRE-1, IL-11, CD 10, CD24, ANG-1 y CXCL1.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde los hemangioblastos se cultivan en condiciones exentas de alimentador.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las células estromales mesenquimales son células humanas.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los hemangioblastos se cultivan en una matriz.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la matriz comprende uno o más de factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a insulina 1, factor de crecimiento de fibroblastos bovino (bFGF) y/o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

7. El método de la reivindicación 5 o 6, en donde la matriz se selecciona del grupo que consiste en: laminina, fibronectina, vitronectina, proteoglicano, entactina, colágeno, colágeno I, colágeno IV, sulfato de heparán, una preparación soluble de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un extracto de membrana basal humana, y cualquier combinación de los mismos.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde los hemangioblastos se cultivan sobre la matriz durante al menos aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los hemangioblastos se cultivan en un medio que comprende αMEM.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde los hemangioblastos se cultivan en un medio que comprende suero o un sustituto de suero.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde los hemangioblastos se diferencian de células pluripotentes.

12. El método de la reivindicación 11, en donde los hemangioblastos se diferencian de células pluripotentes por un método que comprende cultivar dichas células pluripotentes para formar agrupaciones de células.

13. El método de la reivindicación 12, en donde las células pluripotentes se cultivan en presencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y/o la proteína morfogénica ósea 4 (BMP-4).

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el método da como resultado al menos 80, 85, 90, 95, 100, 125, o 150 millones de células estromales mesenquimales que se generan a partir de aproximadamente 200.000 hemangioblastos en aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 días de cultivo.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde las células estromales mesenquimales expresan niveles bajos de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD133, FGFR2, CD271, Stro-1, CXCR4 y TLR3.

FIG. 1

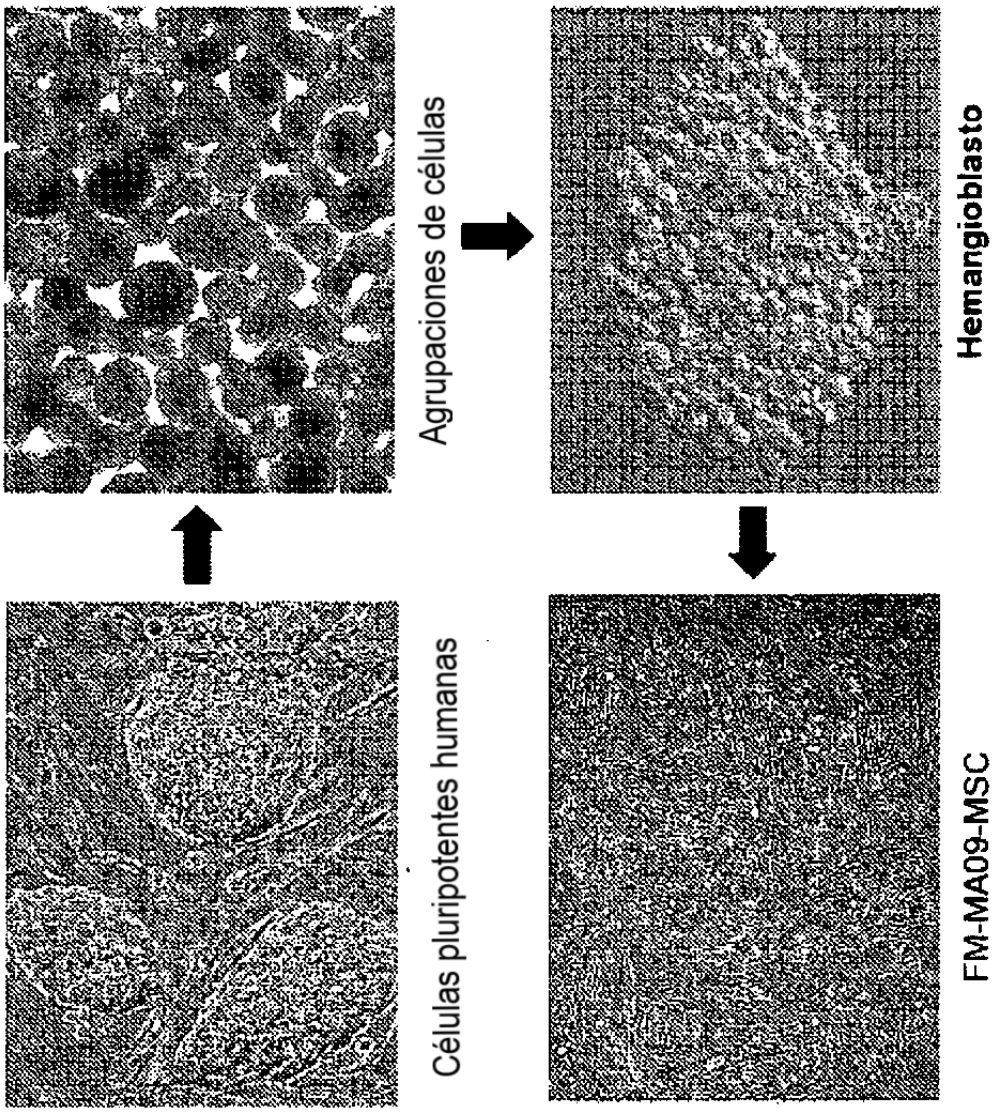

Agrupaciones de células
Hemangioblasto
Células pluripotentes humanas
FM-MA09-MSC

FIG. 2

FM-MA09-MSC, 10x

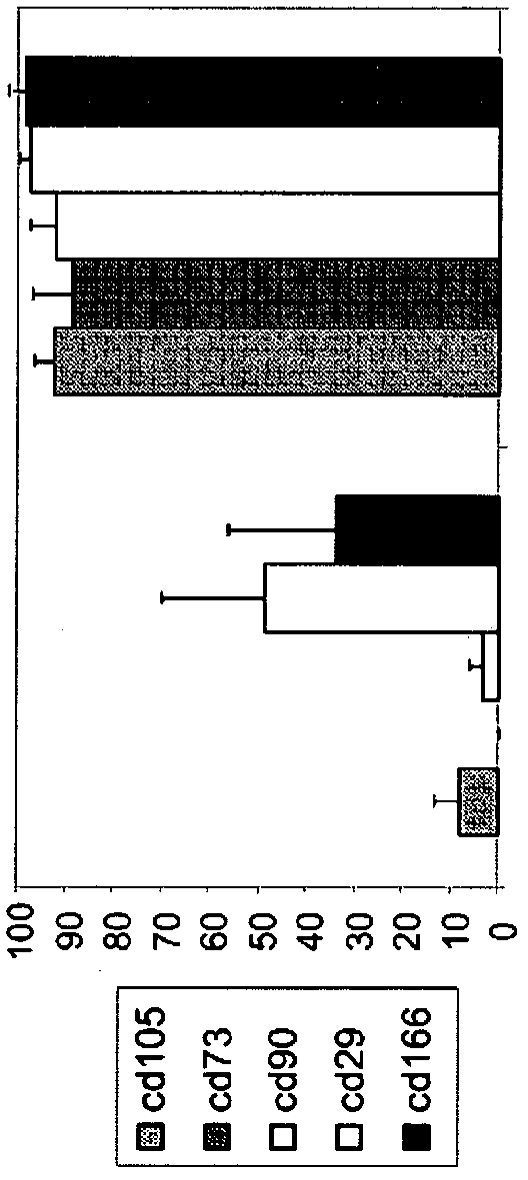


FIG. 3

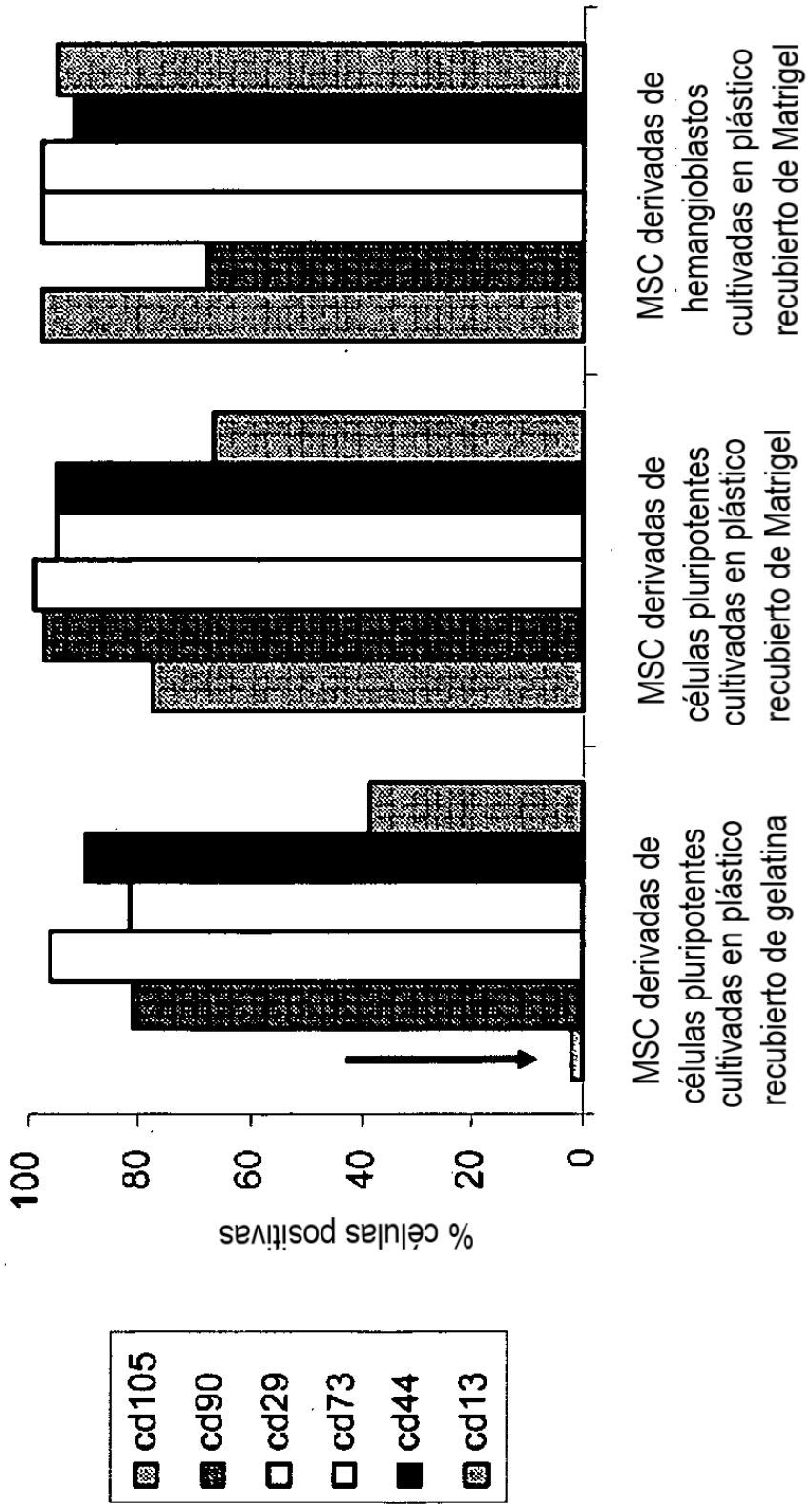

% células positivas
0
20
40
60
80
100
cd105
cd90
cd29
cd73
cd44
cd13
MSC derivadas de células pluripotentes cultivadas en plástico recubierto de gelatina
MSC derivadas de células pluripotentes cultivadas en plástico recubierto de Matrigel
MSC derivadas de hemangioblastos cultivadas en plástico recubierto de Matrigel

FIG. 4

	MSC derivadas de células pluripotentes cultivadas en plástico recubierto de gelatina	MSC derivadas de células pluripotentes cultivadas en plástico recubierto de Matrigel	MSC derivadas de hemangioblastos cultivadas en plástico recubierto de Matrigel
Número de células pluripotentes de partida:	300.000	350.000	~200.000
Rendimiento:	n/a	4 millones	85 millones
Rendimiento recogido a los:	n/a	48 días	44 días

FIG. 5

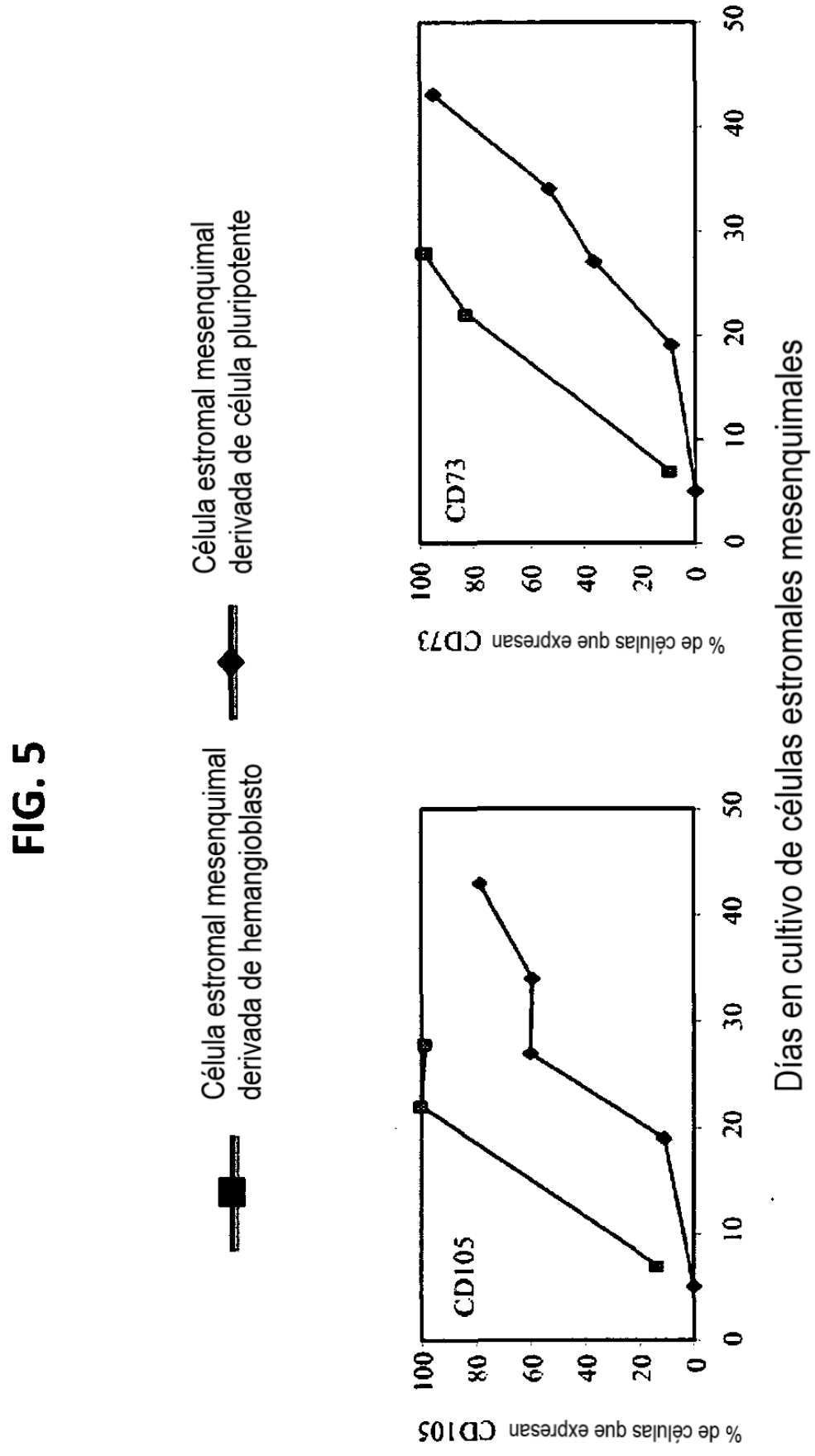

Célula estromal mesenquimal derivada de hemangioblasto
Célula estromal mesenquimal derivada de célula pluripotente
CD105
CD73
% de células que expresan CD105
% de células que expresan CD73
0
10
20
30
40
50
0
20
40
60
80
100
Días en cultivo de células estromales mesenquimales

FIG. 6

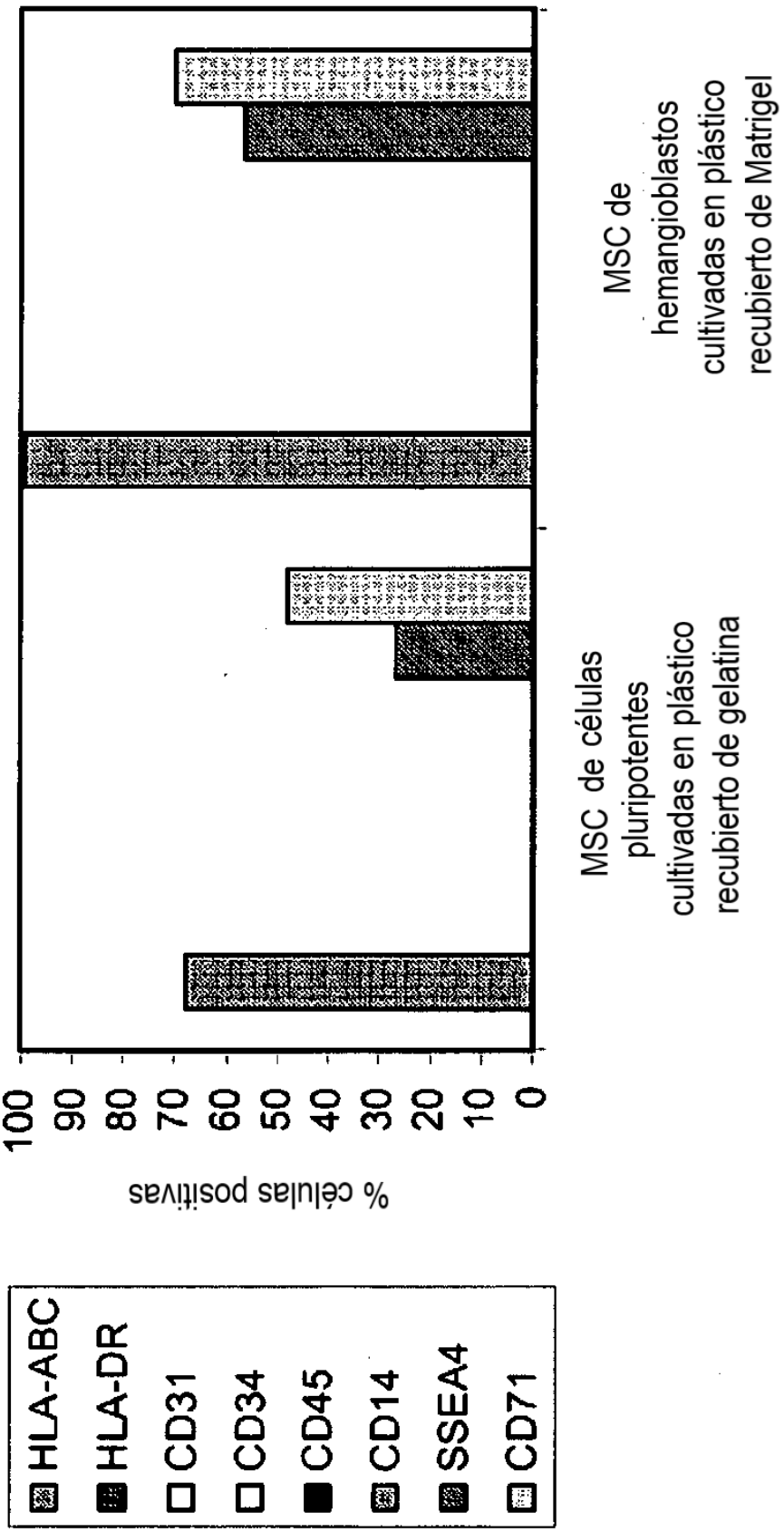

HLA-ABC
HLA-DR
CD31
CD34
CD45
CD14
SSEA4
CD71
% células positivas
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
MSC de células pluripotentes cultivadas en plástico recubierto de gelatina
MSC de hemangioblastos cultivadas en plástico recubierto de Matrigel

FIG. 7

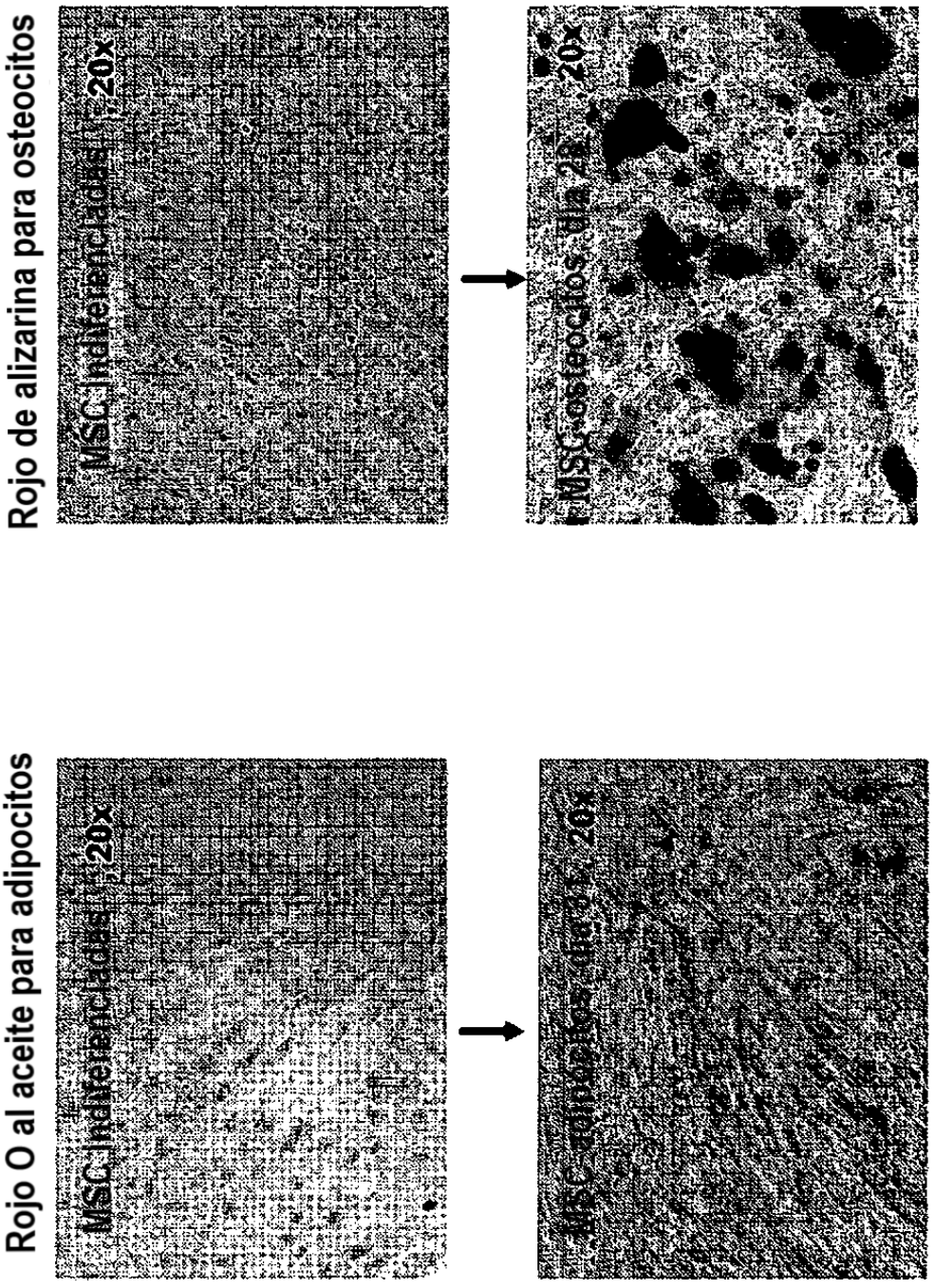

Rojo de alizarina para osteocitos
MSC indiferenciadas 20x
MSC osteocitos día 28 20x
Rojo O al aceite para adipocitos
MSC indiferenciadas 20x
MSC adipocitos día 28 20x

FIG. 8

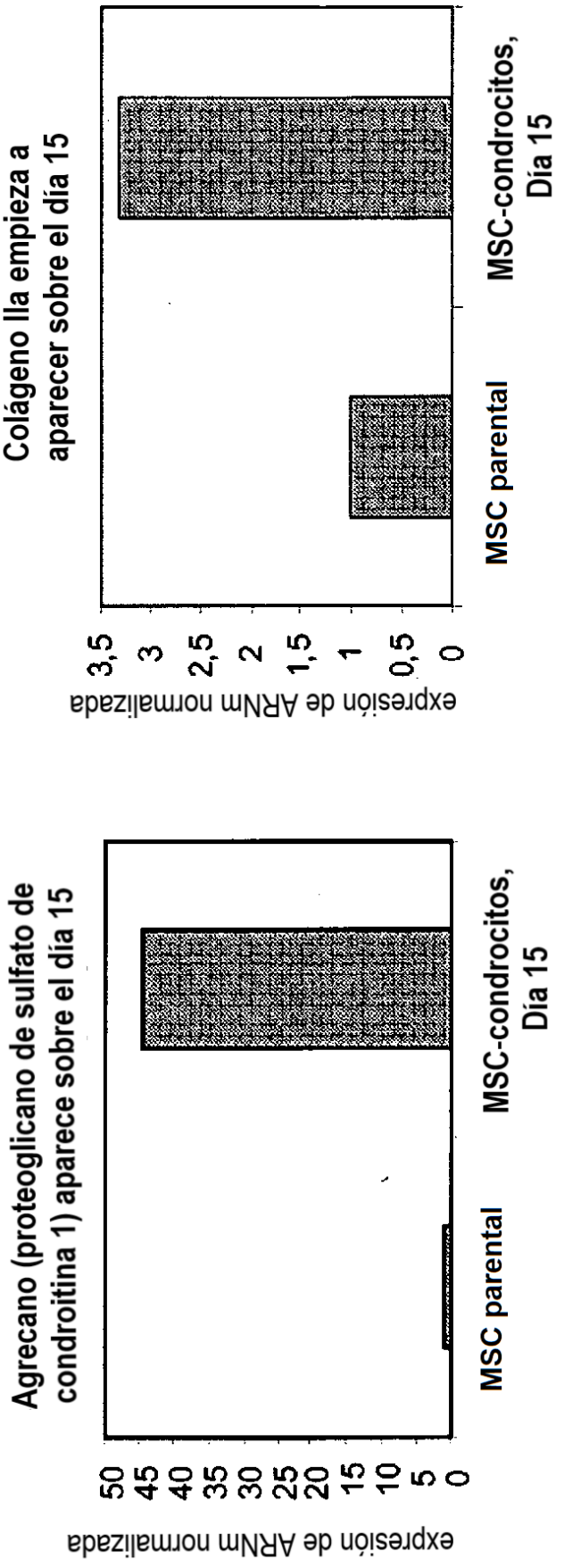

Colágeno lla empieza a aparecer sobre el día 15
expresión de ARNm normalizada
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
MSC parental
MSC-condrocitos, Día 15
Agrecano (proteoglicano de sulfato de condroitina 1) aparece sobre el día 15
expresión de ARNm normalizada
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
MSC parental
MSC-condrocitos, Día 15

FIG. 9

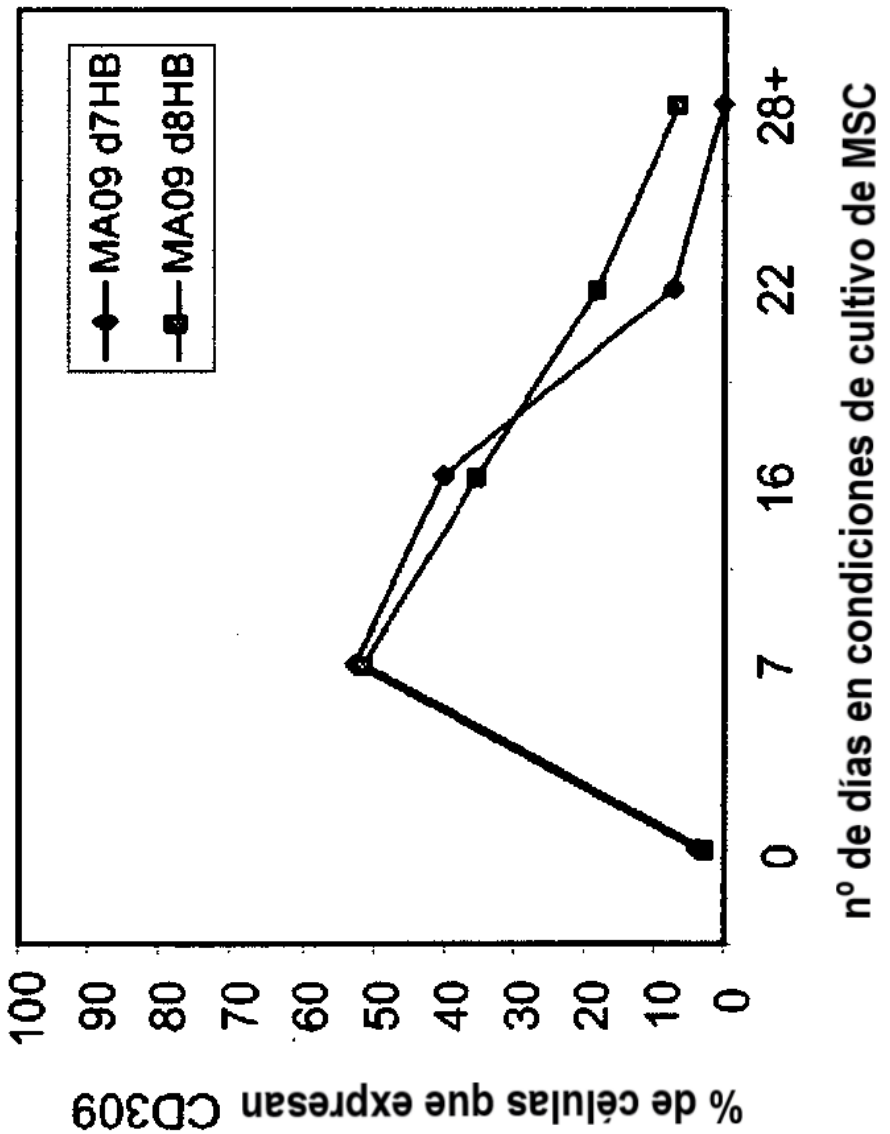

MA09 d7HB
MA09 d8HB
% de células que expresan CD309
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
7
16
22
28+
nº de días en condiciones de cultivo de MSC

FIG. 10A

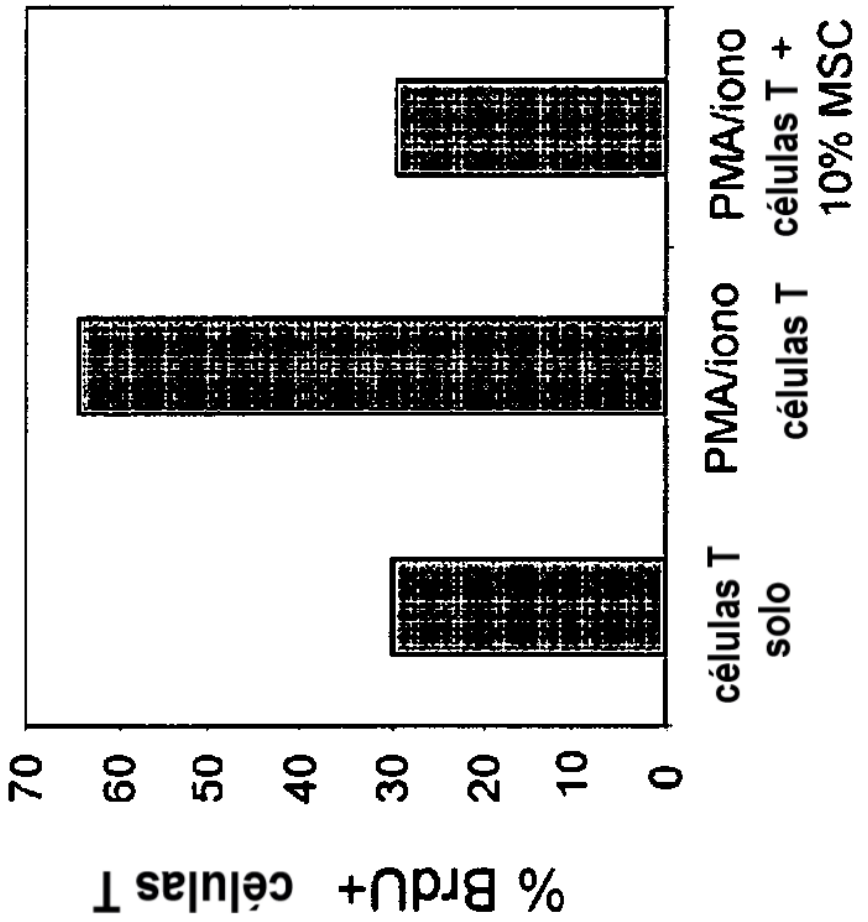

% BrdU+ células T
70
60
50
40
30
20
10
0
células T solo
PMA/iono células T
PMA/iono células T + 10% MSC

FIG. 10B

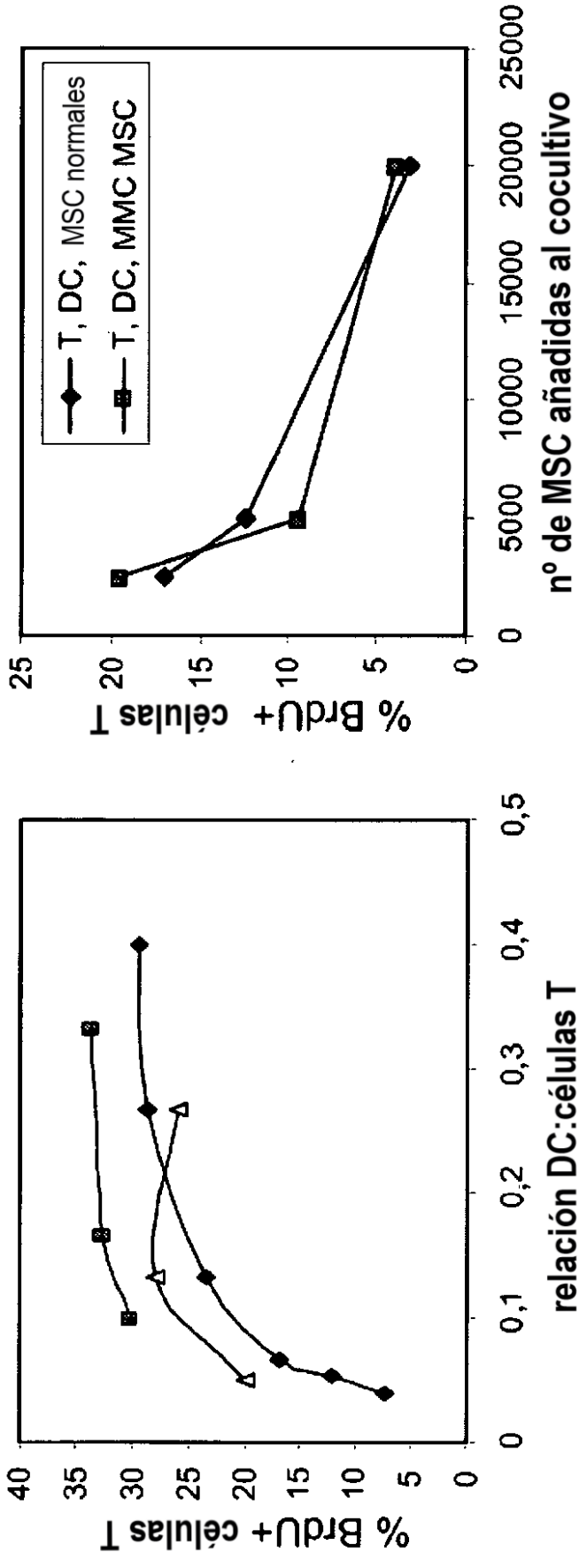

% BrdU+ células T
nº de MSC añadidas al cocultivo
T, DC, MSC normales
T, DC, MMC MSC
0
5000
10000
15000
20000
25000
0
5
10
15
20
25
% BrdU+ células T
relación DC:células T
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0
5
10
15
20
25
30
35
40

FIG. 11

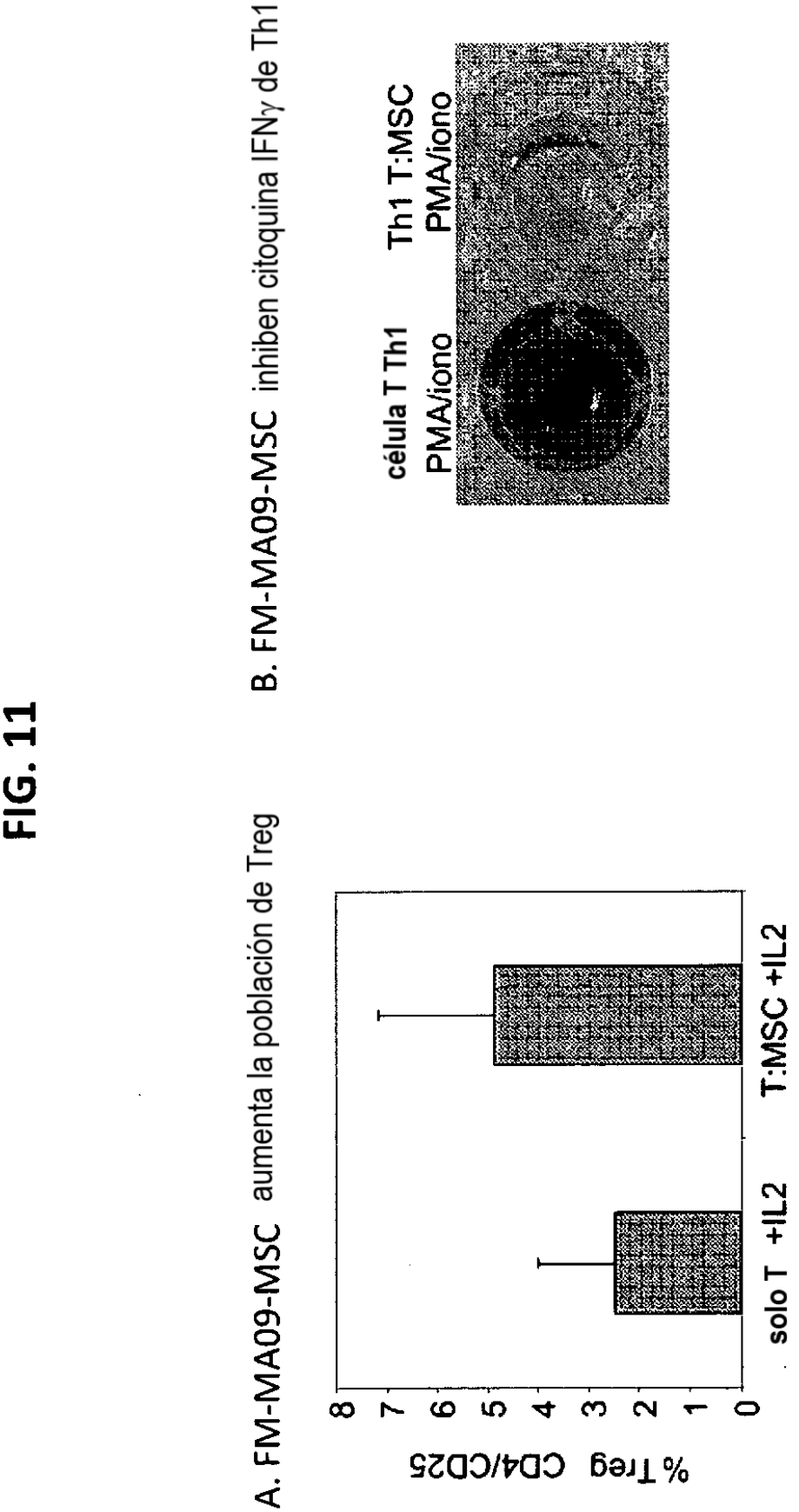

A. FM-MA09-MSC aumenta la población de Treg
% Treg CD4/CD25
8
7
6
5
4
3
2
1
0
solo T +IL2
T:MSC +IL2
B. FM-MA09-MSC inhiben citoquina IFNγ de Th1
célula T Th1 PMA/iono
Th1 T:MSC PMA/iono

FIG. 12

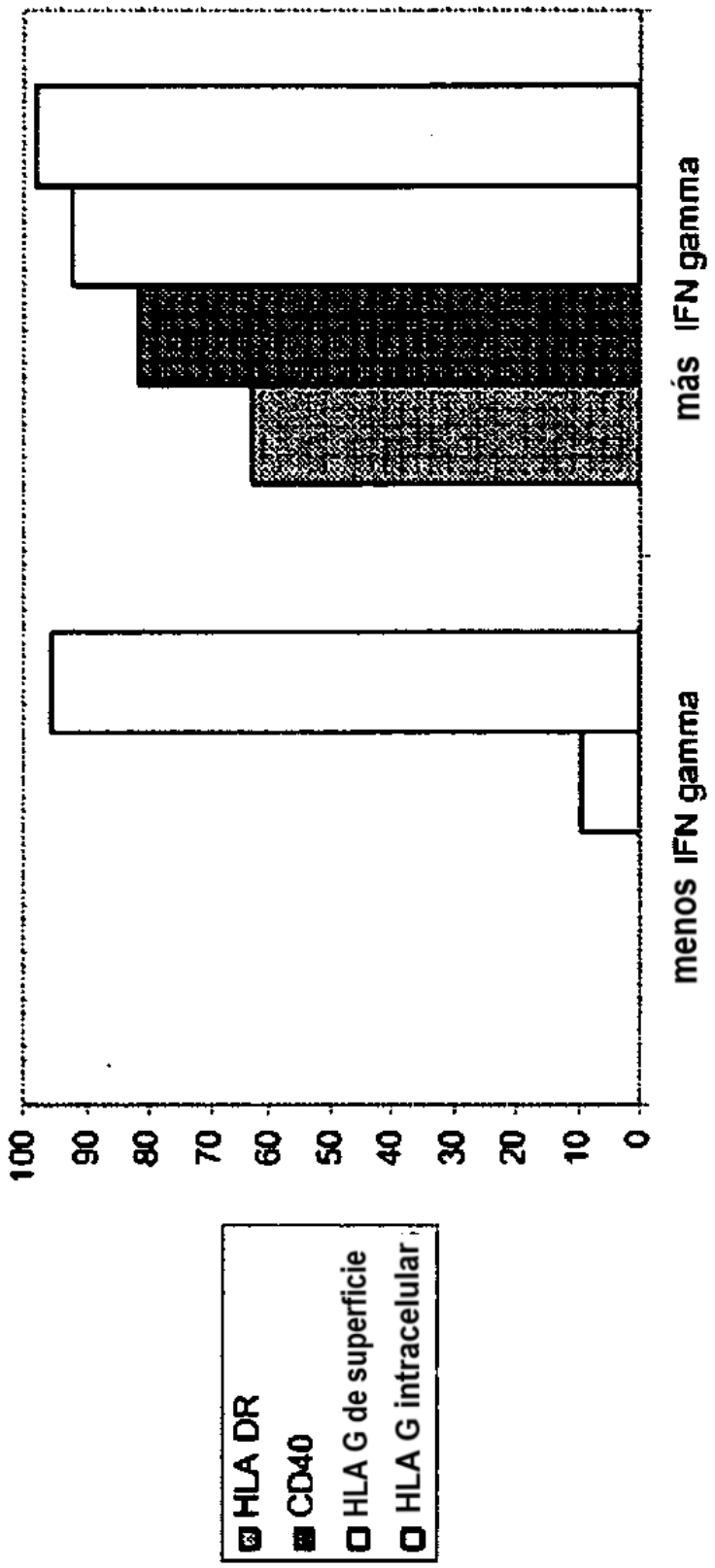

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
menos IFN gamma
más IFN gamma
HLA DR
CD40
HLA G de superficie
HLA G intracelular

FIG. 13

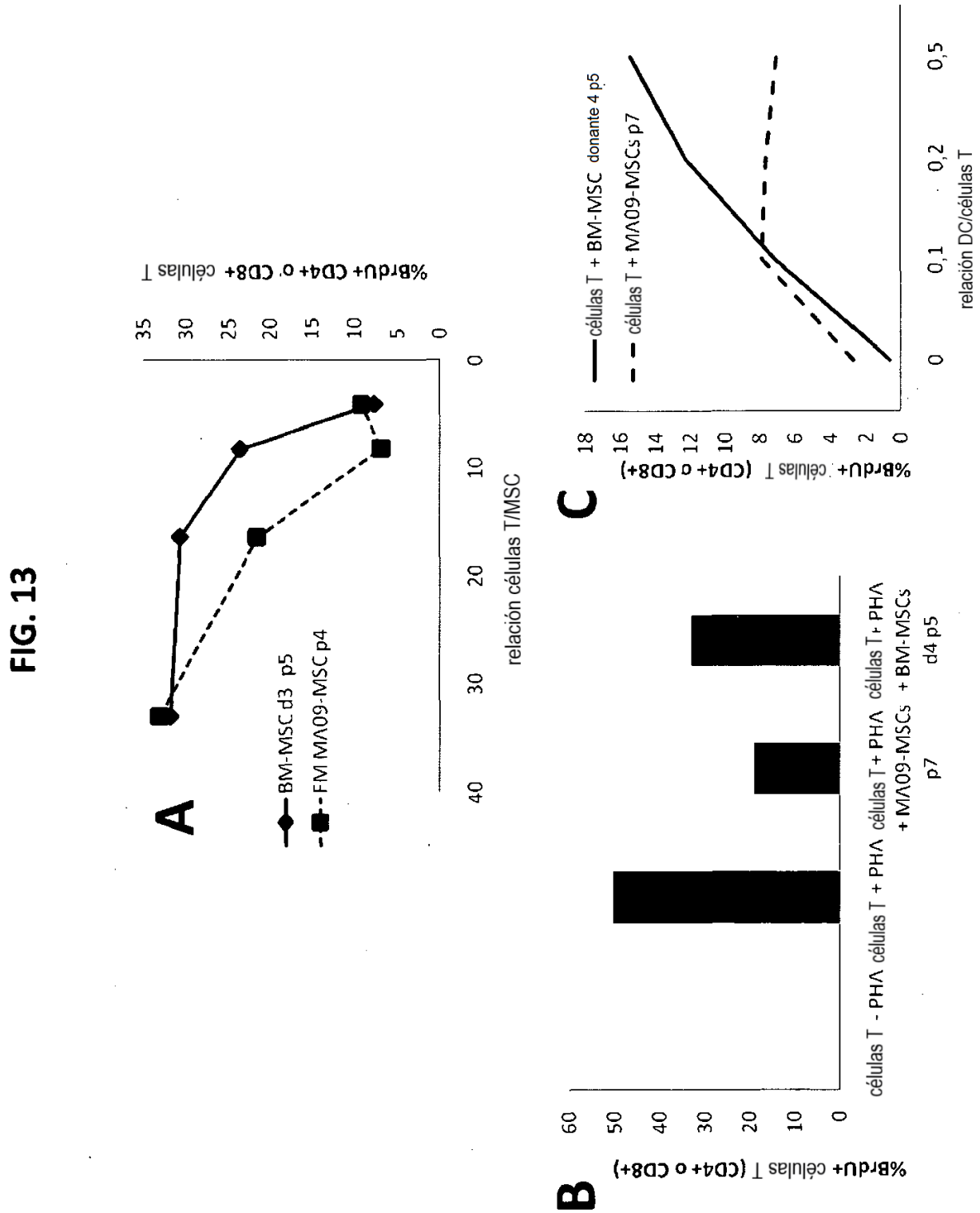

A
%BrdU+ CD4+ o CD8+ células T
35
30
25
20
15
10
5
0
0
10
20
30
40
relación células T/MSC
BM-MSC d3 p5
FM MA09-MSC p4
B
%BrdU+ células T (CD4+ o CD8+)
60
50
40
30
20
10
0
células T - PHA
células T + PHA
células T + PHA + MA09-MSCs p7
células T + PHA + BM-MSCs d4 p5
C
%BrdU+ células T (CD4+ o CD8+)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
0,1
0,2
0,5
relación DC/células T
células T + BM-MSC donante 4 p5
células T + MA09-MSCs p7

FIG. 14

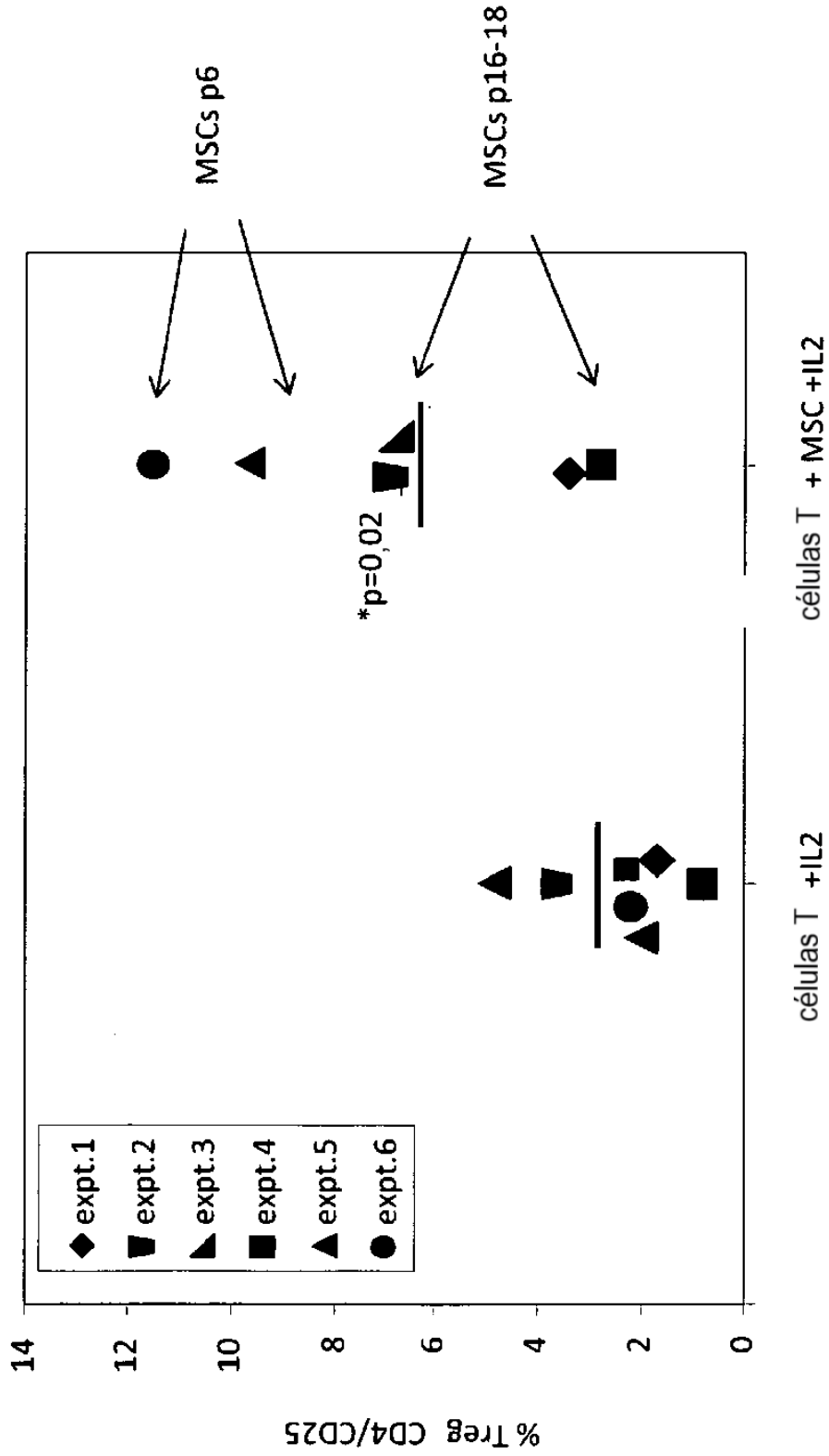

MSCs p6
MSCs p16-18
*p=0,02
células T +IL2
células T + MSC +IL2
% Treg CD4/CD25
0
2
4
6
8
10
12
14
expt.1
expt.2
expt.3
expt.4
expt.5
expt.6

FIG. 15

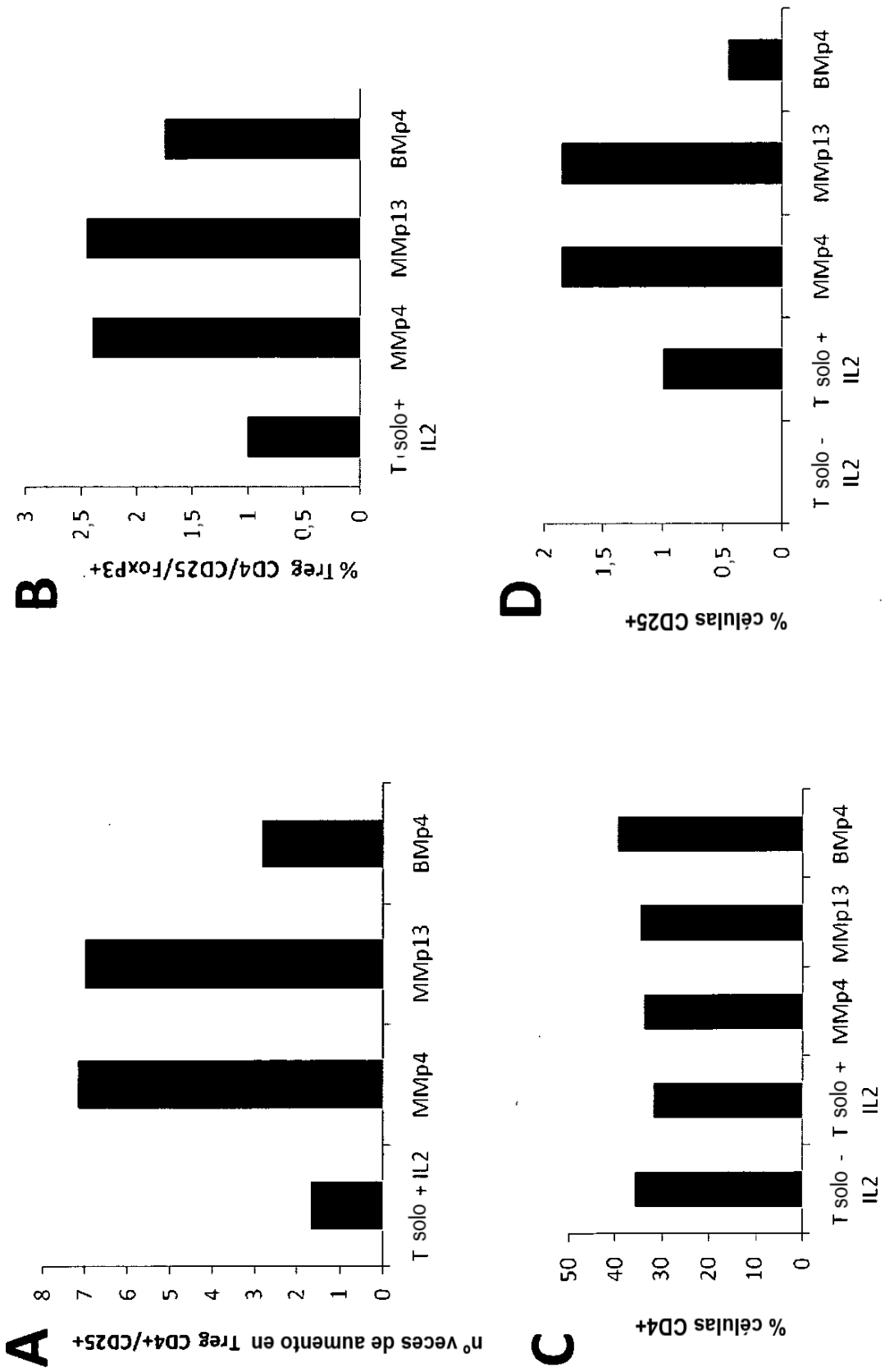

A
nº veces de aumento en Treg CD4+/CD25+
8
7
6
5
4
3
2
1
0
T solo + IL2
MMp4
MMp13
BMp4
B
% Treg CD4/CD25/FoxP3+
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
T solo+ IL2
MMp4
MMp13
BMp4
C
% células CD4+
50
40
30
20
10
0
T solo - IL2
T solo + IL2
MMp4
MMp13
BMp4
D
% células CD25+
2
1,5
1
0,5
0
T solo - IL2
T solo + IL2
MMp4
MMp13
BMp4

FIG. 16

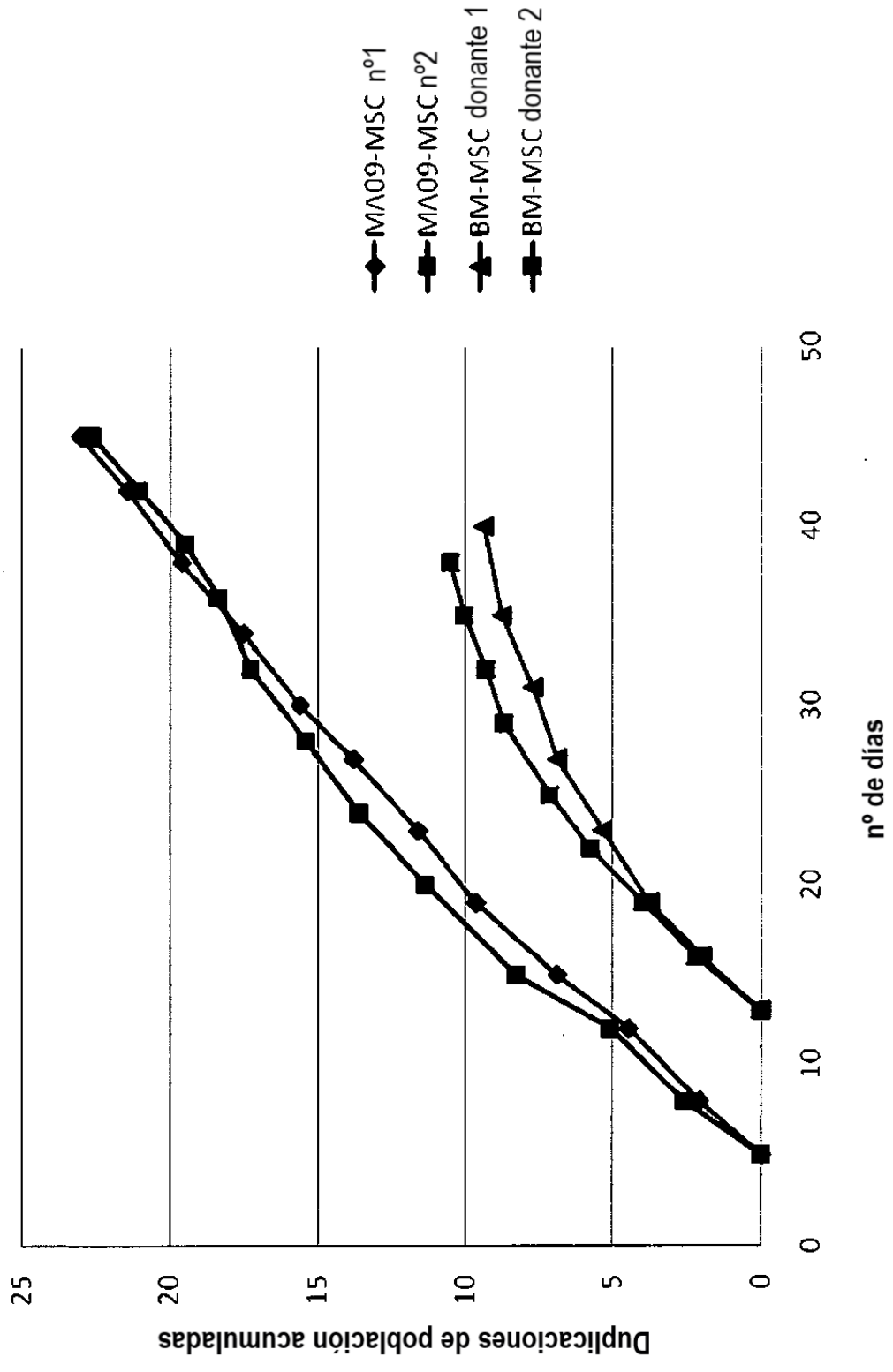

MA09-MSC n°1
MA09-MSC n°2
BM-MSC donante 1
BM-MSC donante 2
Duplicaciones de población acumuladas
0
5
10
15
20
25
0
10
20
30
40
50
nº de días

FIG. 17

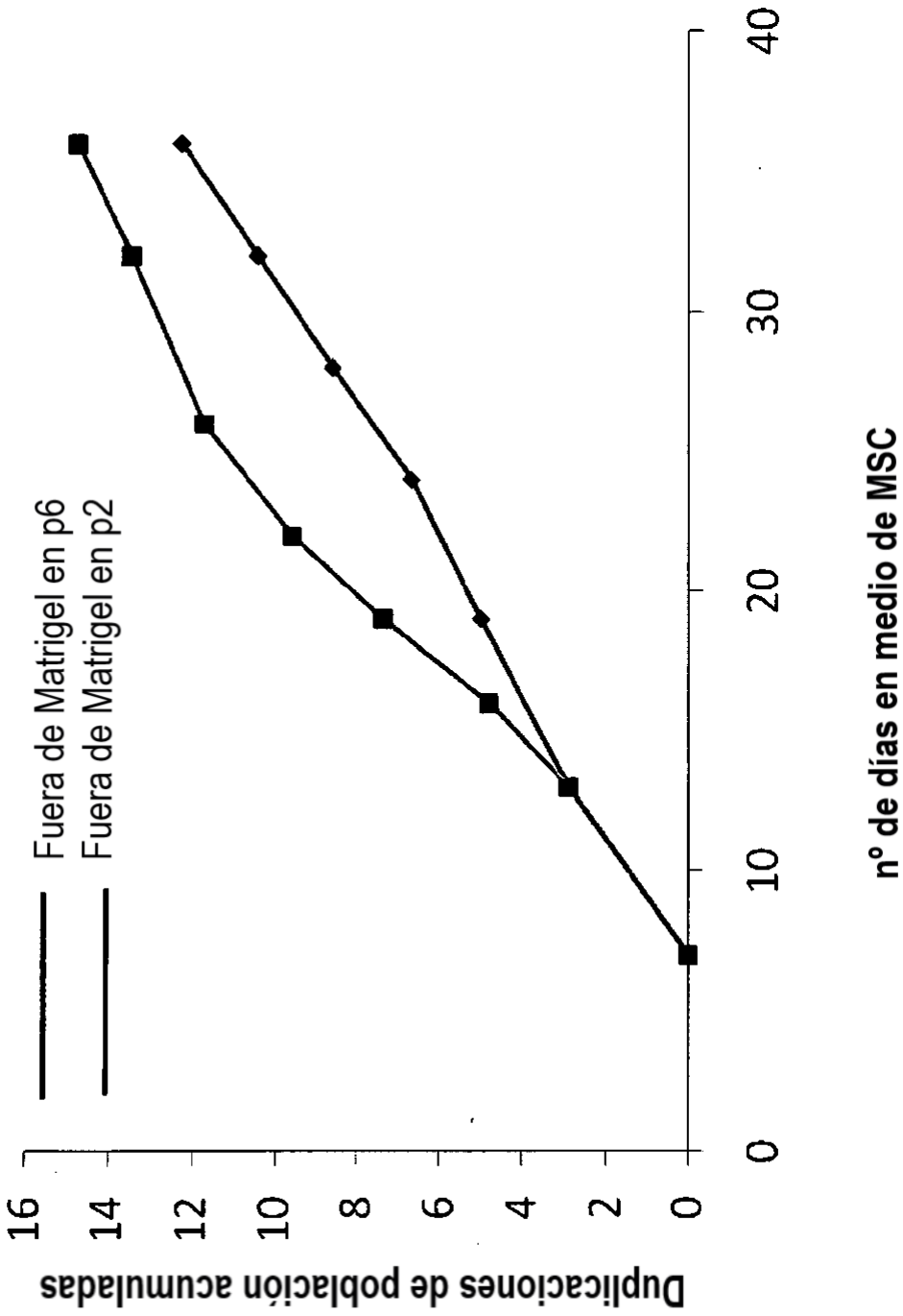

Duplicaciones de población acumuladas
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
10
20
30
40
nº de días en medio de MSC
Fuera de Matrigel en p6
Fuera de Matrigel en p2

FIG. 18

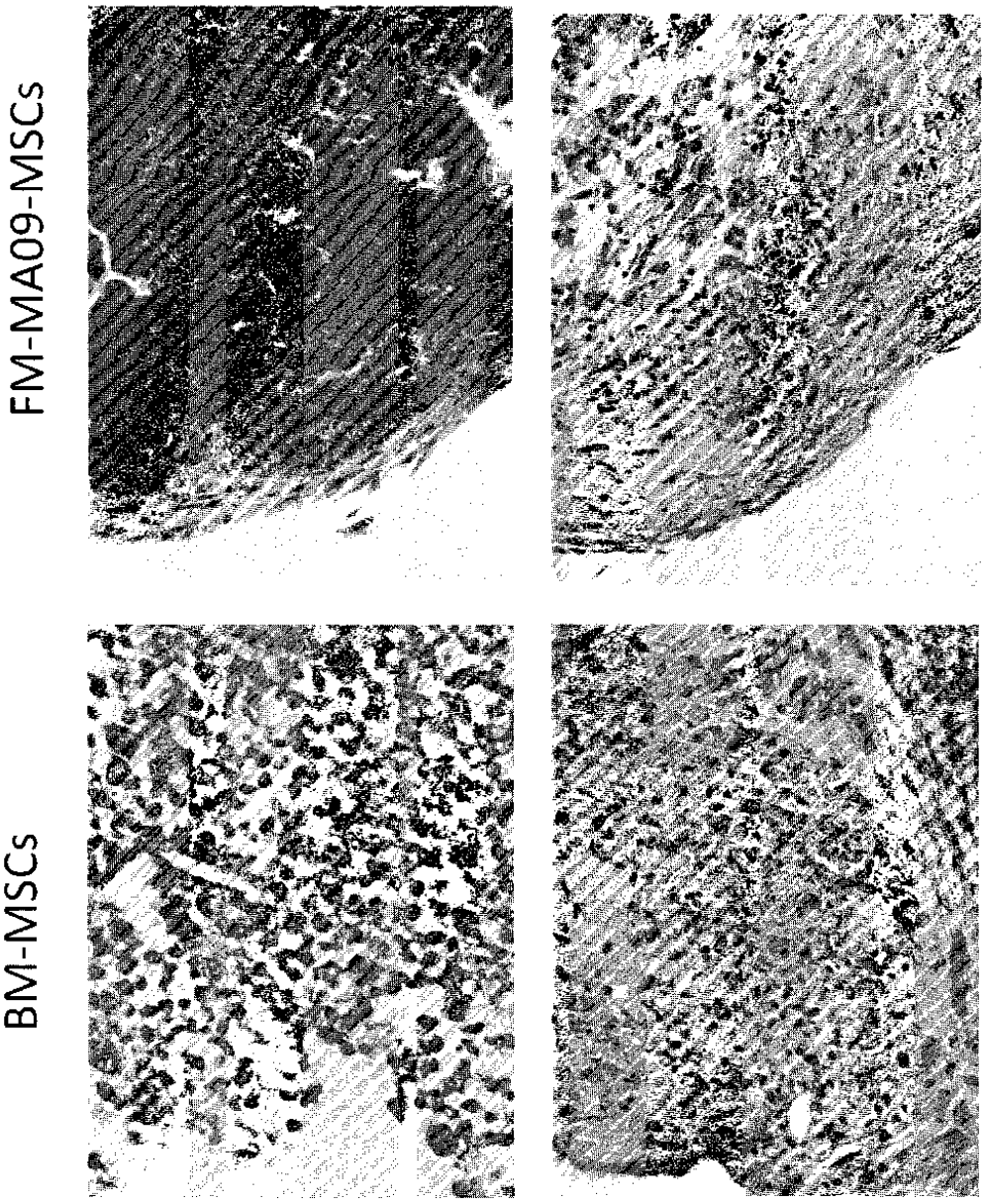

BM-MSCs
FM-MA09-MSCs
21 días Control (no estimulado) 40X
21 días (estimulación condrogénica) 40X

FIG. 19

A
Prostaglandina E2 (pg/mL)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
BM-MSCs
MA09-MSCs
0,0
2,0
10,0
50,0
100,0
0,10
0,25
0,50
2,10
50,10
50,25
100,50
IFNγ, TNFα (ng/mL)
B
nº veces aumento de PGE2
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
BM-MSCs
MA09-MSCs
2,0
10,0
50,0
100,0
0,10
0,25
0,50
2,10
50,10
50,25
100,...
IFNγ, TNFα (ng/mL)

FIG. 20

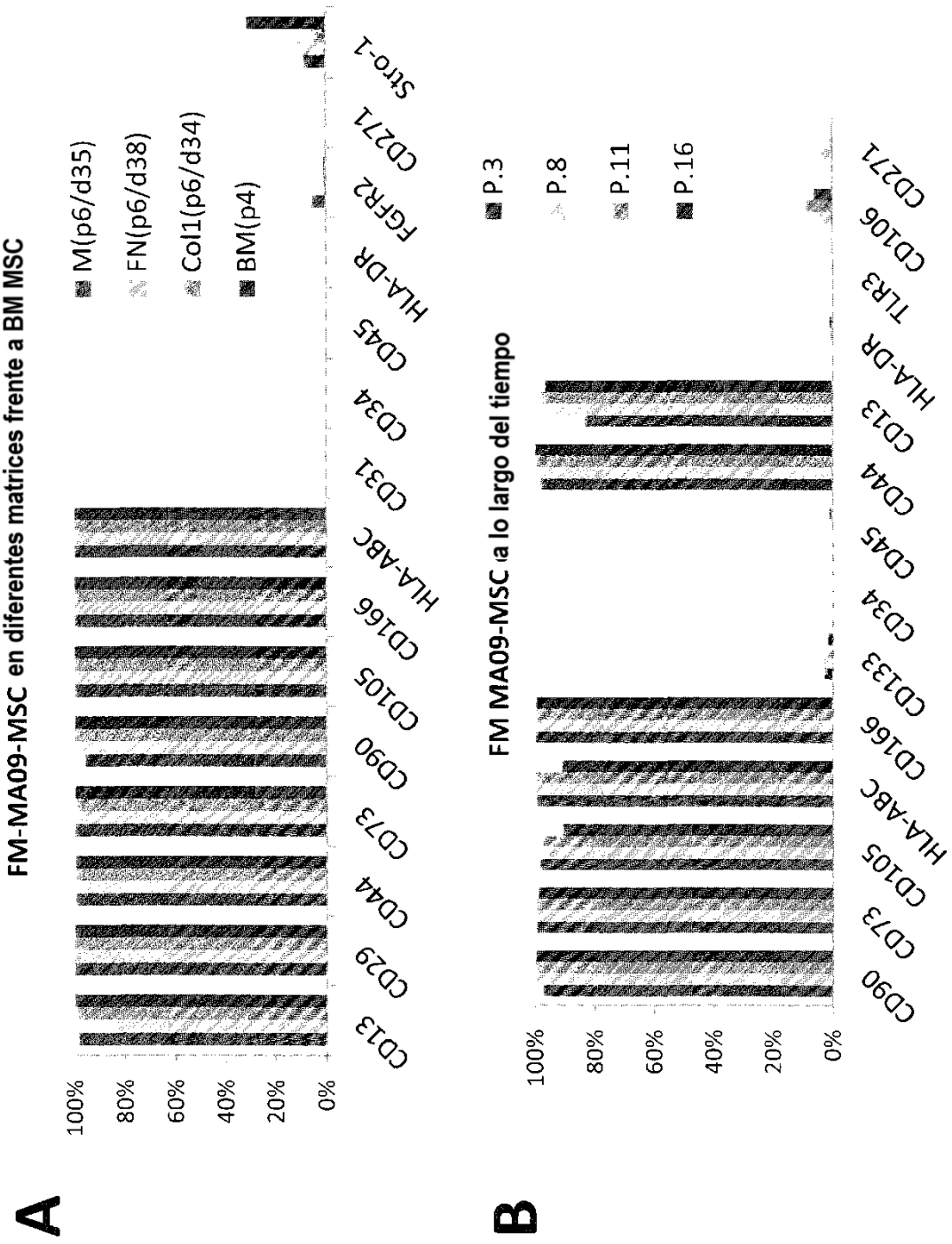

A
FM-MA09-MSC en diferentes matrices frente a BM MSC
M(p6/d35)
FN(p6/d38)
Col1(p6/d34)
BM(p4)
100%
80%
60%
40%
20%
0%
CD13
CD29
CD44
CD73
CD90
CD105
CD166
HLA-ABC
CD31
CD34
CD45
HLA-DR
FGFR2
CD271
Sirio-1
B
FM MA09-MSC a lo largo del tiempo
P.3
P.8
P.11
P.16
100%
80%
60%
40%
20%
0%
CD90
CD73
CD105
HLA-ABC
CD166
CD133
CD34
CD45
CD44
CD13
HLA-DR
TLR3
CD106
CD271

FIG. 21

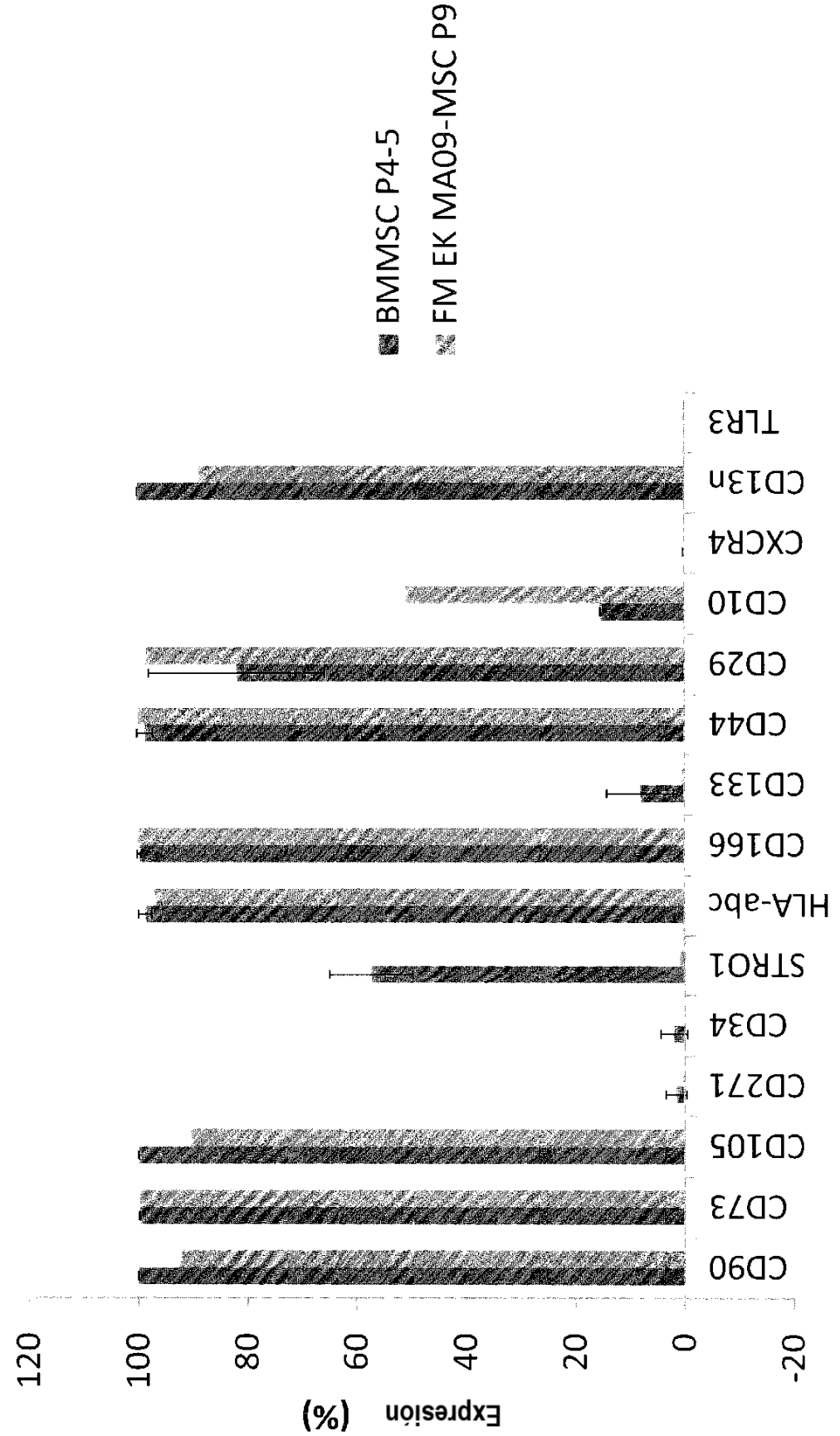

BMMSC P4-5
FM EK MA09-MSC P9
Expresión (%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
CD90
CD73
CD105
CD271
CD34
STRO1
HLA-abc
CD166
CD133
CD44
CD29
CD10
CXCR4
CD13n
TLR3

FIG. 22

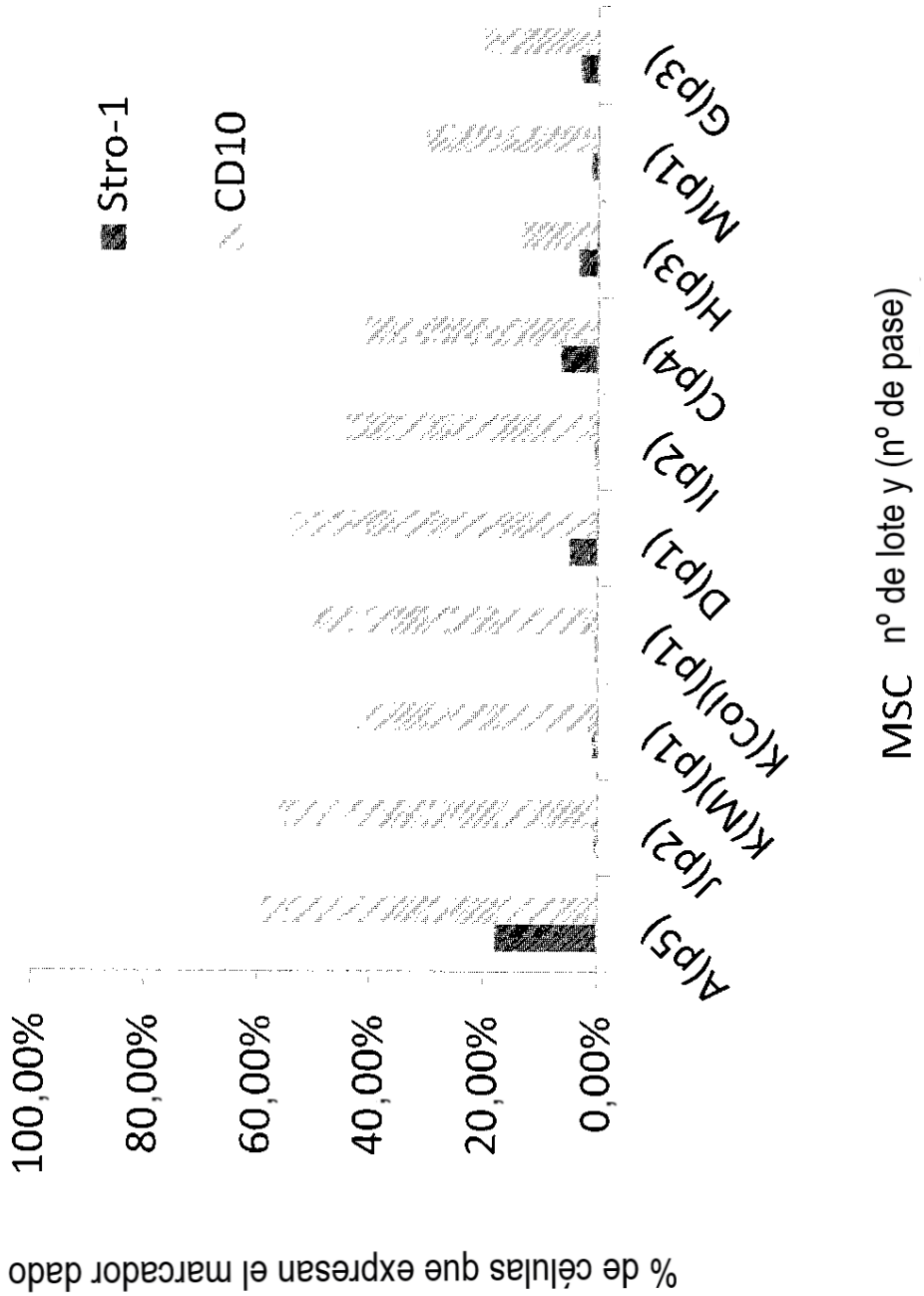

Stro-1
CD10
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
% de células que expresan el marcador dado
A(p5)
J(p2)
K(M)(p1)
K(Col)(p1)
D(p1)
I(p2)
C(p4)
H(p3)
M(p1)
G(p3)
MSC nº de lote y (nº de pase)

FIG. 23

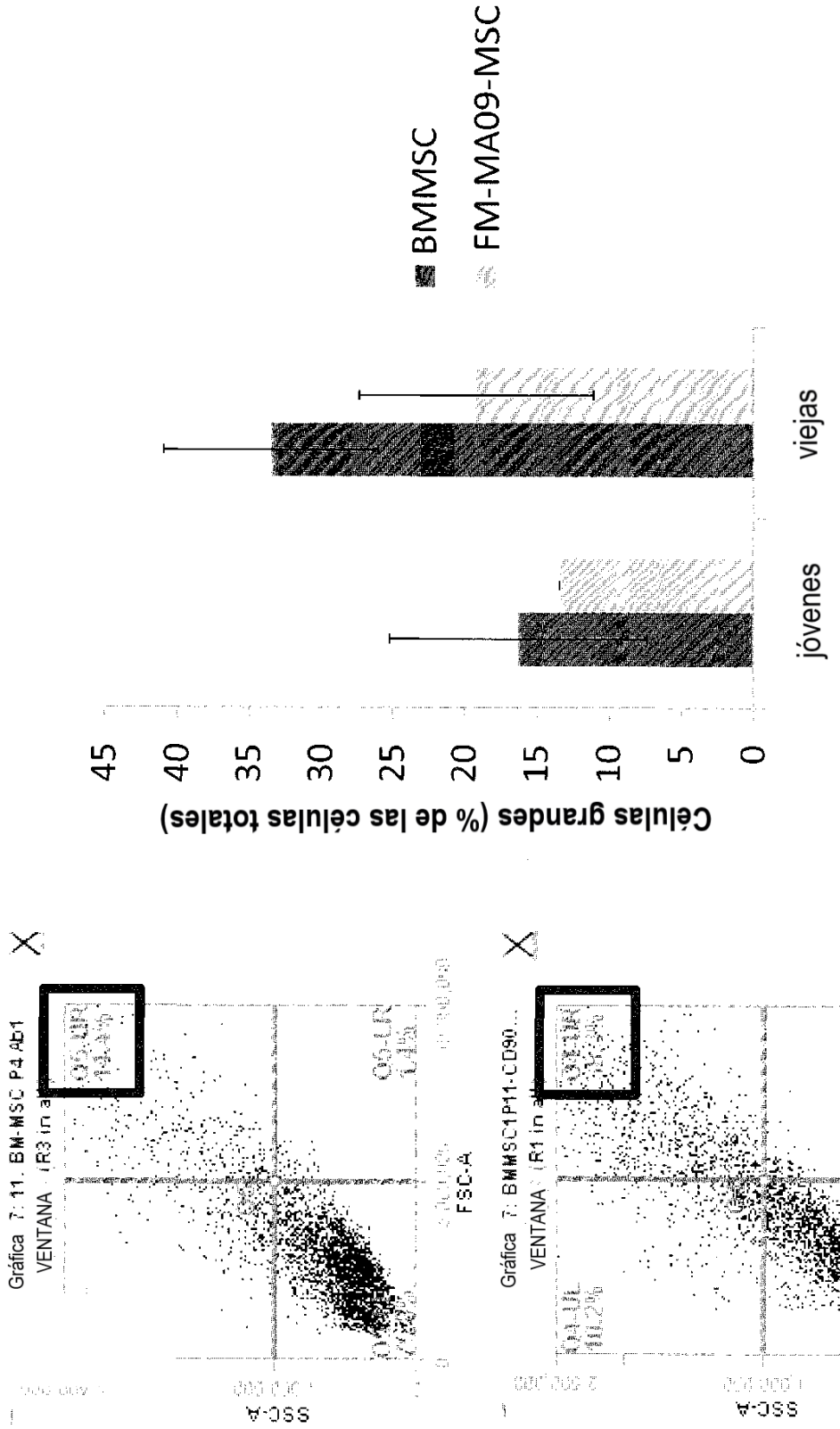

Células grandes (% de las células totales)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
BMMSC
FM-MA09-MSC
jóvenes
viejas
Gráfica 7: 11. BM-MSC P4 Ab1
VENTANA (R3 in a
SSC-A
FSC-A
Gráfica 7: BMMSC1P11-CD90...
VENTANA (R1 in a
SSC-A
FSC-A

FIG. 24

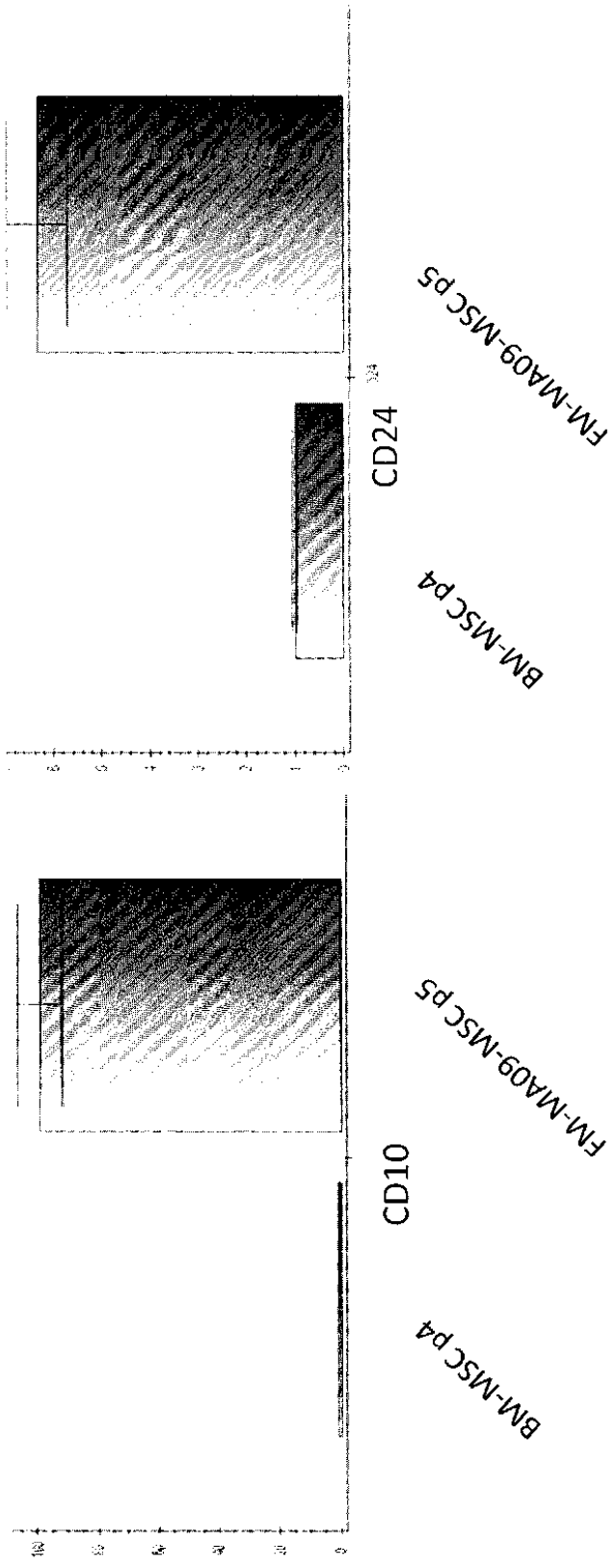

nº veces de expresión normalizada
CD10
CD24
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5

FIG. 25

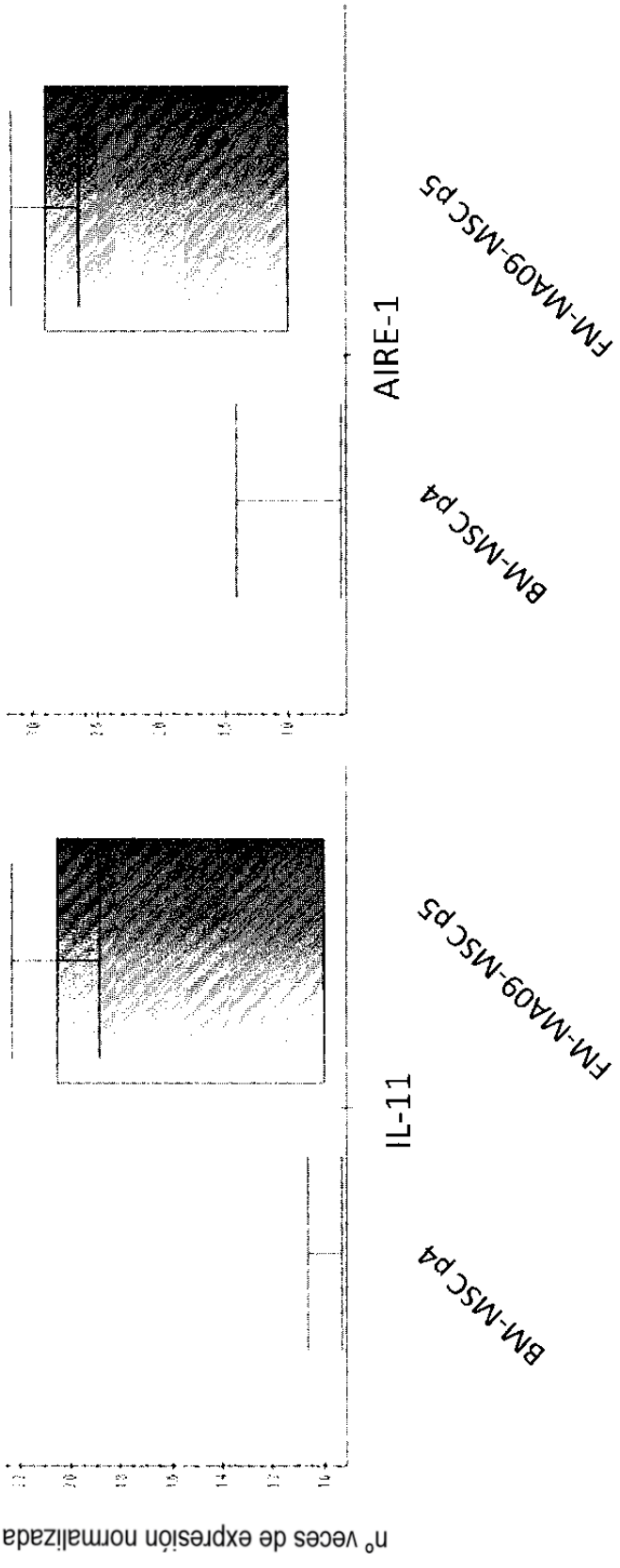

nº veces de expresión normalizada
IL-11
AIRE-1
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5

FIG. 26

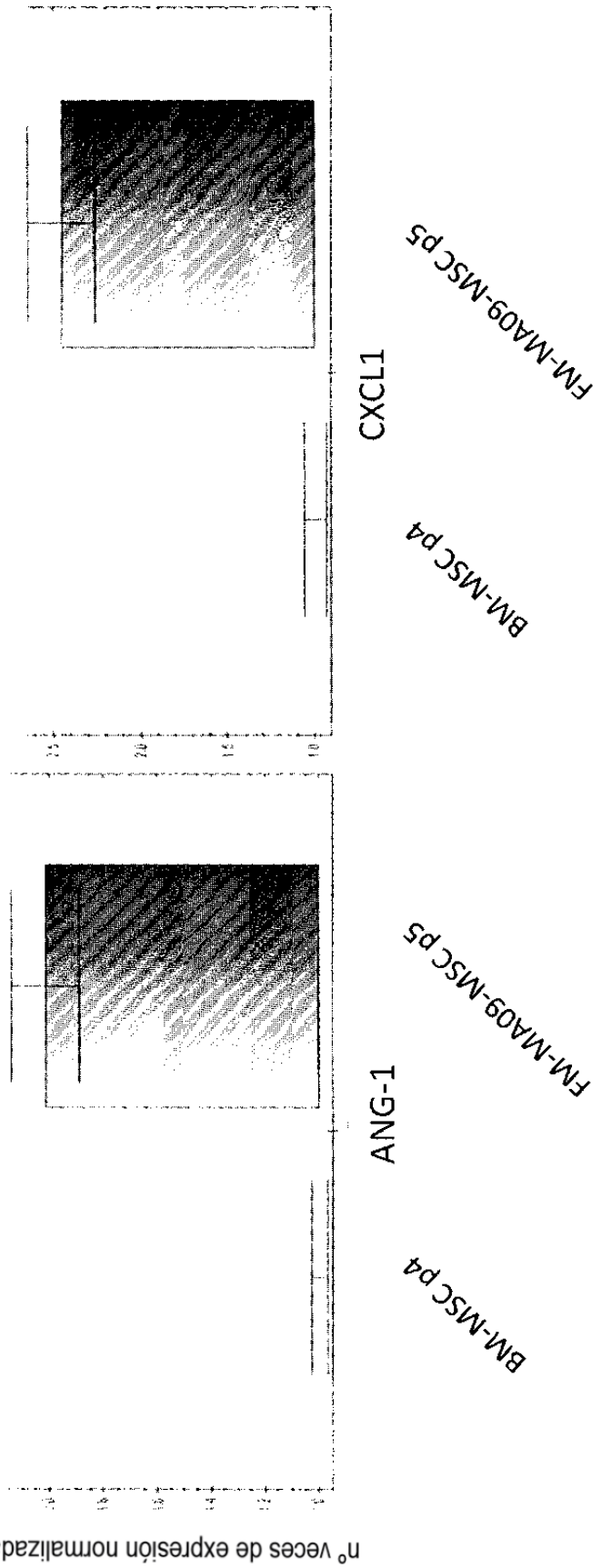

nº veces de expresión normalizada
ANG-1
CXCL1
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5
BM-MSC p4
FM-MA09-MSC p5

FIG. 27

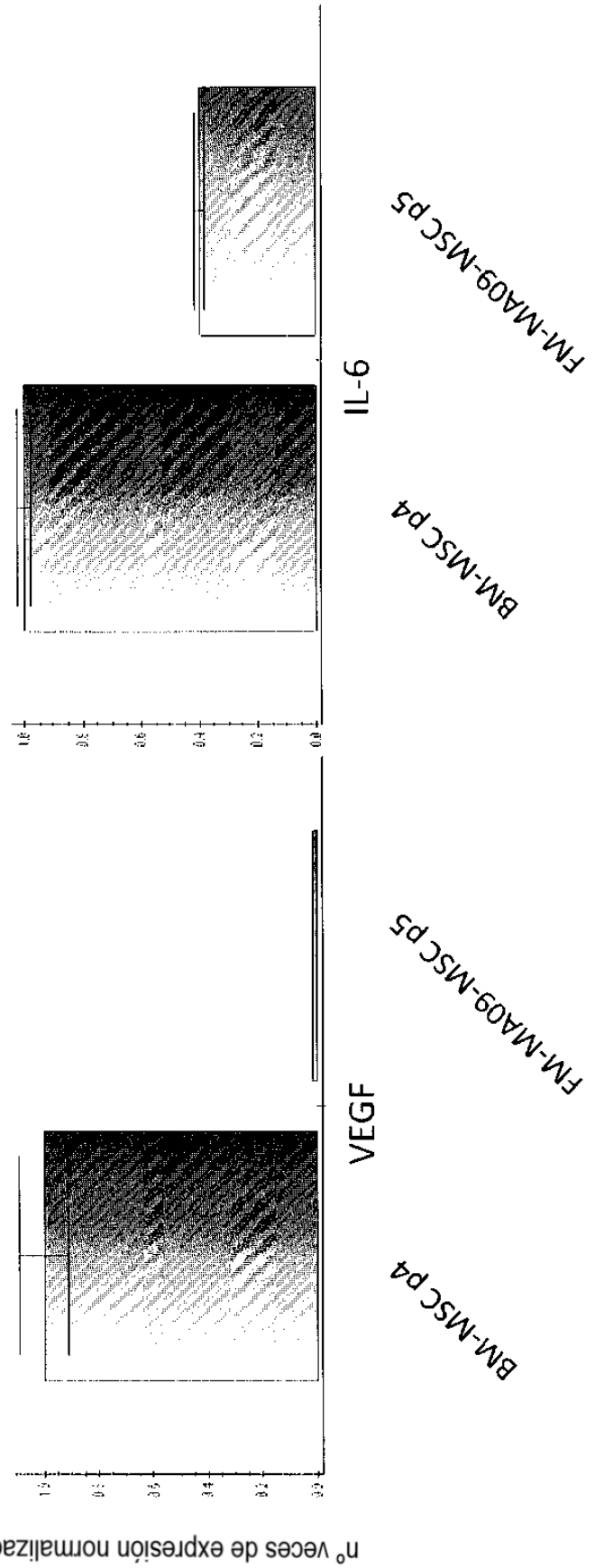

nº veces de expresión normalizada
VEGF
IL-6
BM-MSC P4
FM-MA09-MSC P5
BM-MSC P4
FM-MA09-MSC P5

FIG. 28

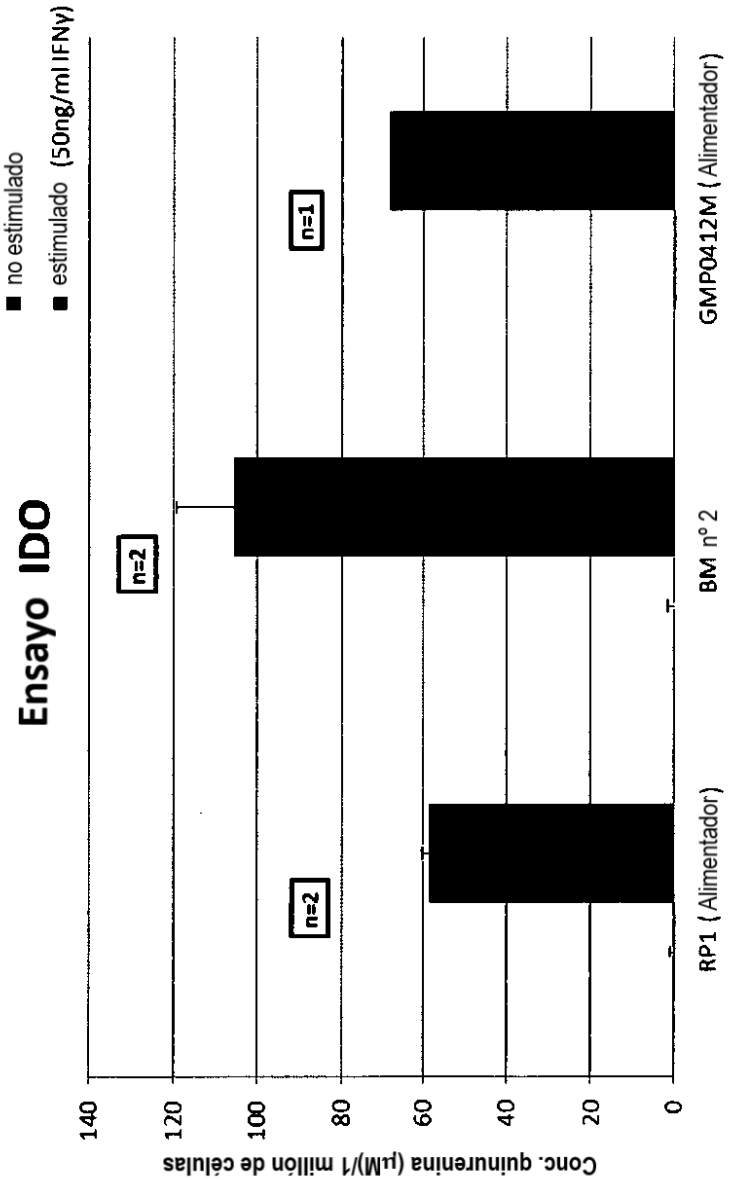
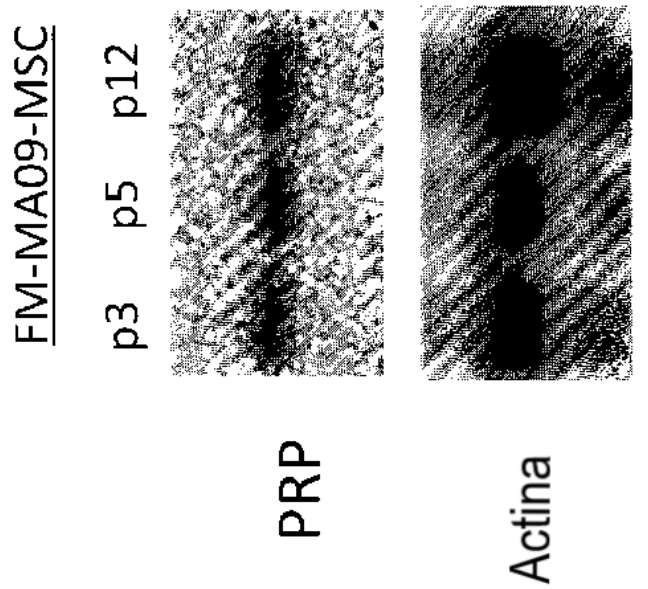


Figura: Comparación de MSC estimuladas con IFNγ 50 ng/ml durante 3 días, con la concentración de quinurenina resultante. Para cada línea celular, se lisaron 1x10^6 células y se ensayó la expresión de IDO

FIG. 29


FM-MA09-MSC
p3
p5
p12
PRP
Actina

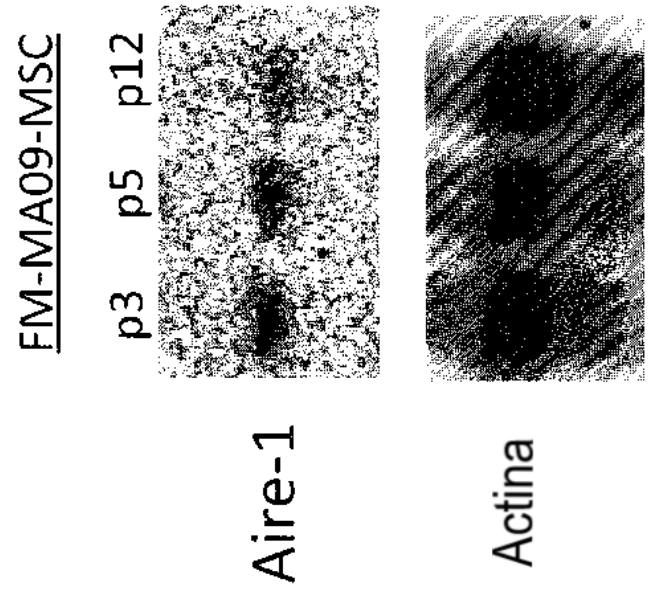

FM-MA09-MSC
p3
p5
p12
Aire-1
Actina

FIG. 30

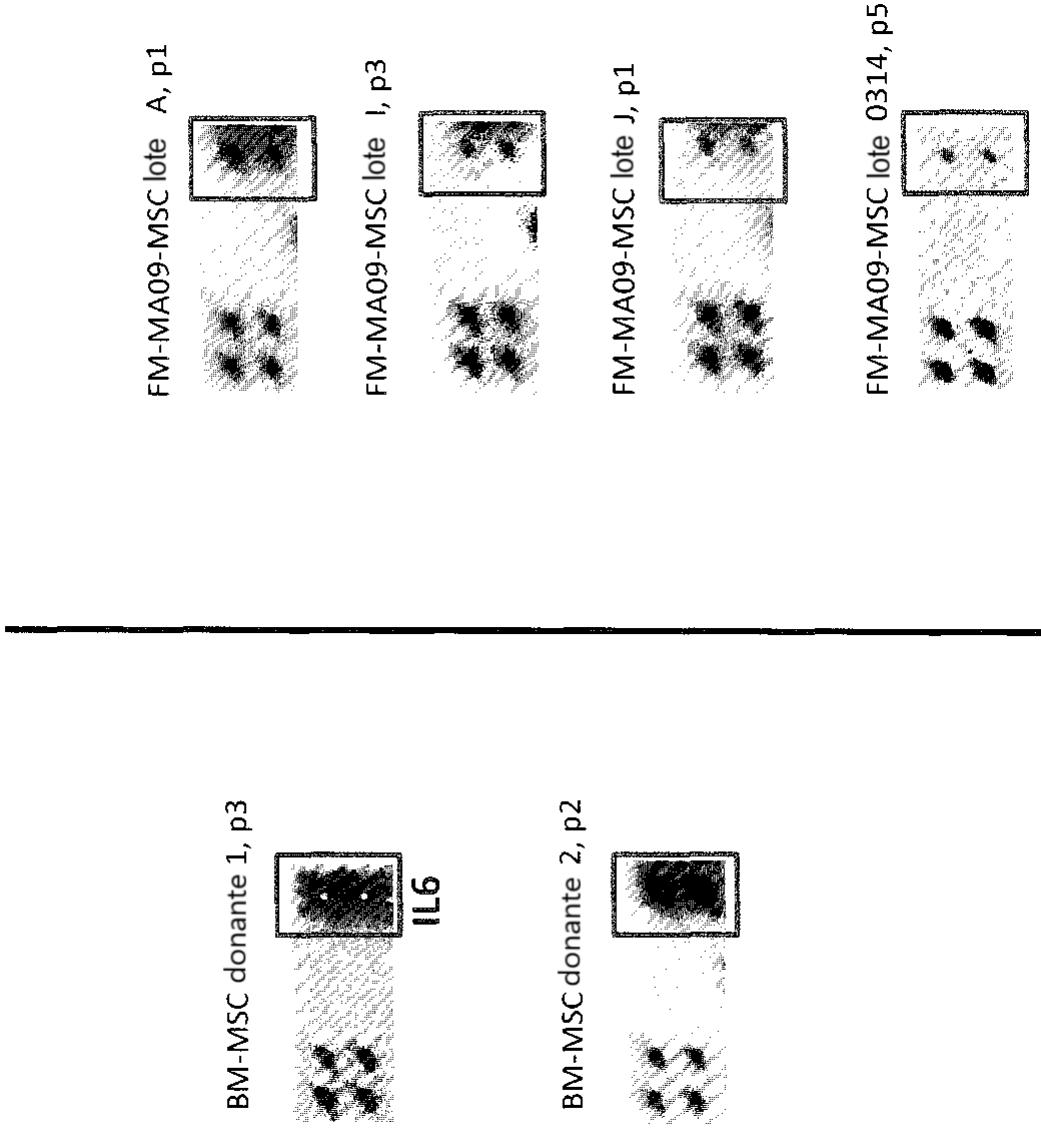

FM-MA09-MSC lote A, p1
FM-MA09-MSC lote I, p3
FM-MA09-MSC lote J, p1
FM-MA09-MSC lote 0314, p5
BM-MSC donante 1, p3
IL6
BM-MSC donante 2, p2

FIG. 31

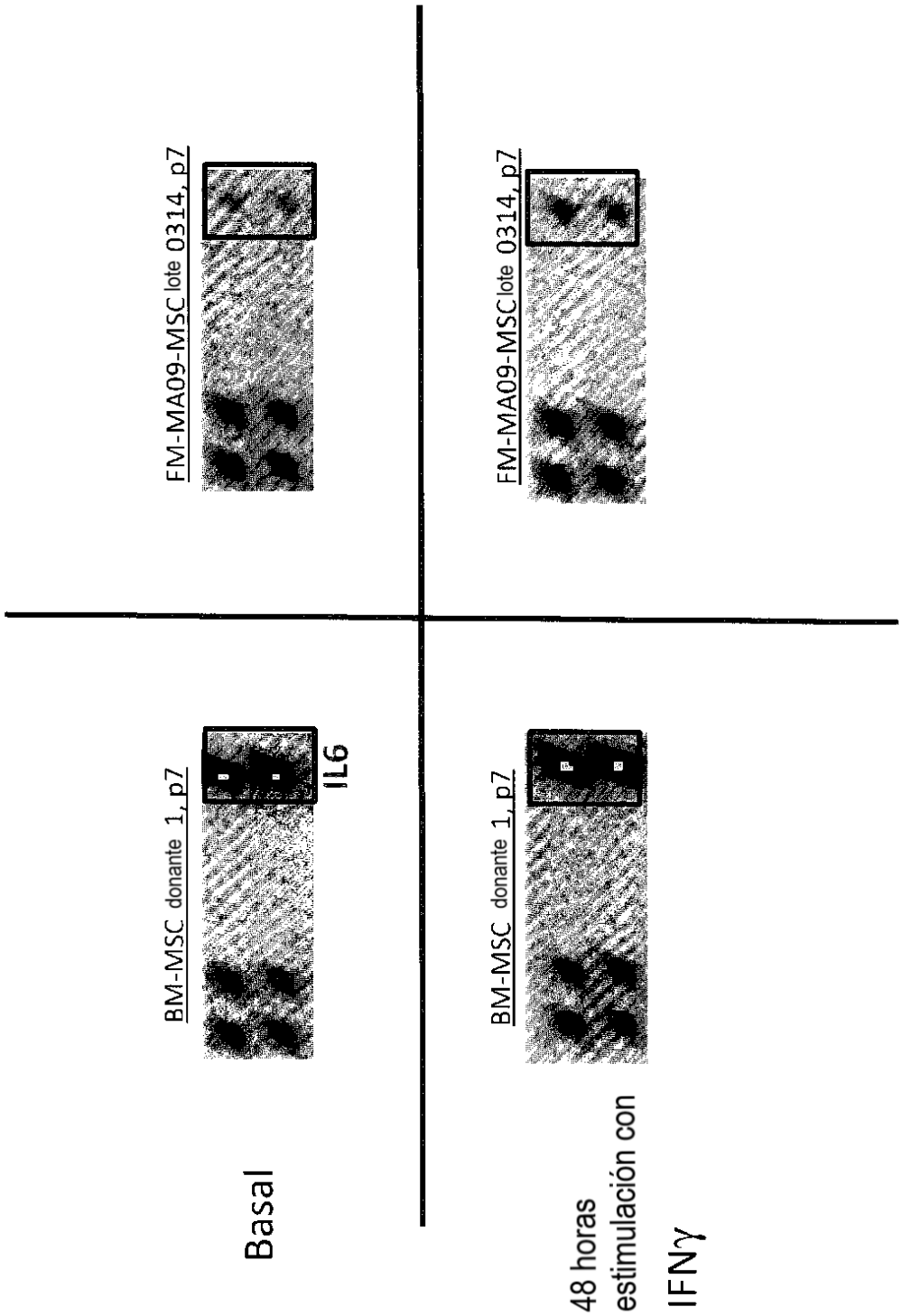
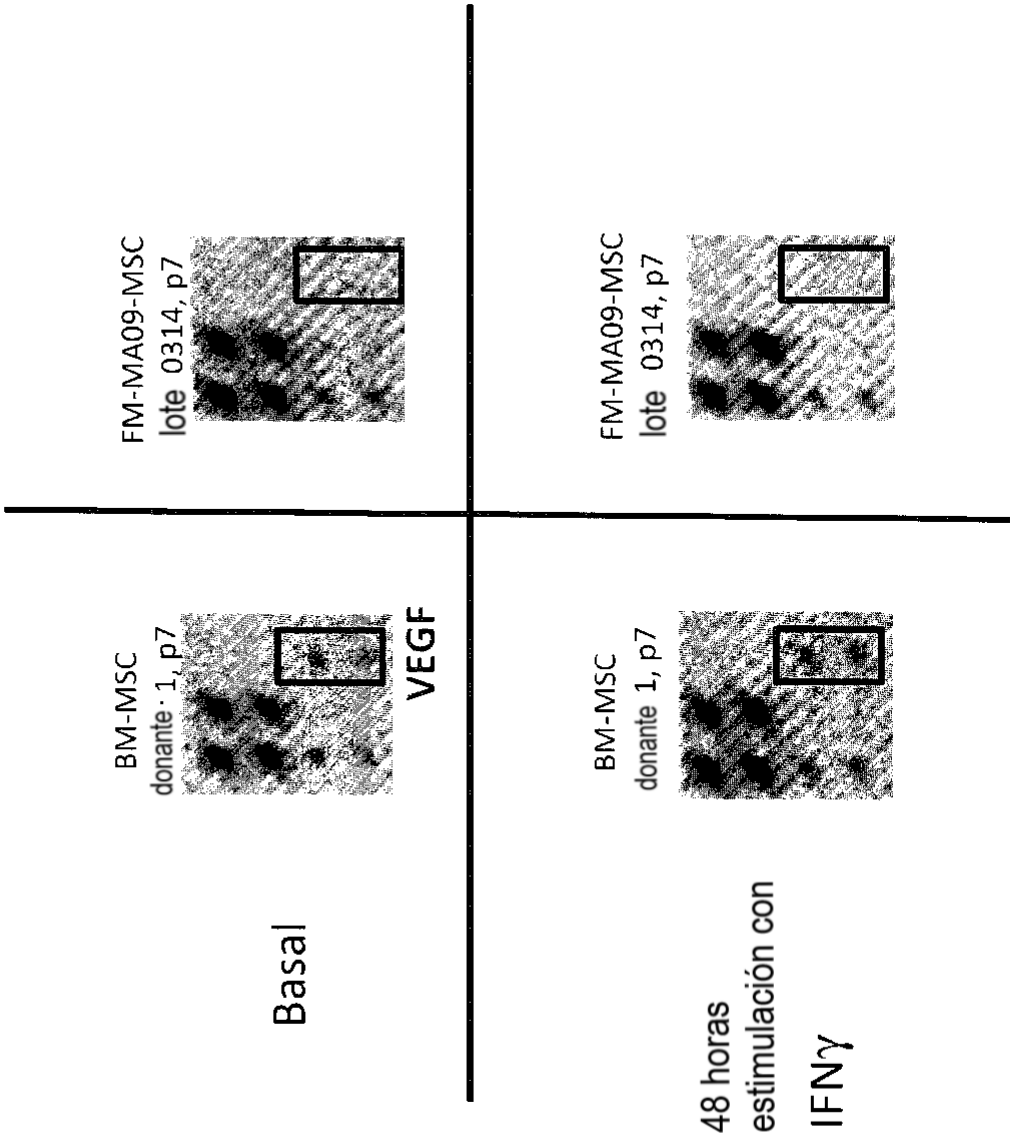

FM-MA09-MSC lote 0314, p7
FM-MA09-MSC lote 0314, p7
BM-MSC donante 1, p7
BM-MSC donante 1, p7
IL6
Basal
48 horas
estimulación con
IFNγ

FIG. 32


FM-MA09-MSC
lote 0314, p7
FM-MA09-MSC
lote 0314, p7
BM-MSC
donante 1, p7
BM-MSC
donante 1, p7
Basal
VEGF
48 horas
estimulación con
IFNγ