

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 709**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 31/60 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2011 PCT/US2011/044731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12012570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2011 E 11810369 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2596097**

54 Título: **Células madre mesenquimales de médula ósea con telomerasa de alta actividad, métodos de producción de las mismas y productos farmacéuticos y métodos de tratamiento basados en las mismas**

30 Prioridad:

20.07.2010 US 366095 P

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

14.05.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(100.0%)**

**USC Stevens Institute for Innovation 1150 South
Olive Street Suite 2300
Los Angeles, CA 90089-2561, US**

72 Inventor/es:

**SHI, SONGTAO;
AKIYAMA, KENTARO y
CHEN, CHIDER**

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 712 709 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre mesenquimales de médula ósea con telomerasa de alta actividad, métodos de producción de las mismas y productos farmacéuticos y métodos de tratamiento basados en las mismas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general a células madre mesenquimales de la médula ósea y, más específicamente, a un subconjunto de BMMSC novedosas que tienen una alta actividad de telomerasa, en que dichas BMMSC son para su utilización en un método para modular el sistema inmunitario de un paciente y métodos para aislar dichas BMMSC.

Antecedentes de la invención

- 10 Las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMMSC) son células madre postnatales jerárquicas capaces de auto renovarse y diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos y células neurales (Bianco et al., 2001; Friedenstein et al., 1974; Owen et al., 1988; Pittenger et al., 1999; Prockop et al., 1997).

- 15 Debido a la heterogeneidad de las BMMSC, no hay un único marcador exclusivo que permita el aislamiento de BMMSC, sino que se utiliza una matriz de moléculas celulares para perfilar las BMMSC. Es ampliamente aceptado que las BMMSC expresan SH2 (CD105), SH3 / SH4 (CD73), integrina β 1 (CD29), CD44, Thy-1 (CD90), CD71, molécula de adhesión de células vasculares-1 (CD 106), molécula de adhesión de células leucocitarias activadas (CD166), STRO-1, GD2, molécula de adhesión de células de melanoma (CD146), Octámero-4 (Oct4) y antígeno-4 embrionario específico de etapa (SSEA4) (Conget et al., 1999; Galmiche et al., 1993; Gronthos et al., 2003; Haynesworth et al., 1992; Martinez et al., 2007; Pittenger et al., 1999; Sacchetti et al., 2007; Shi et al., 2003; Simmons et al., 1991; Sordi et al., 2005). En general, se cree que las BMMSC son negativas para los marcadores de células hematopoyéticas, como CD 14 y CD34, con un nivel muy bajo de actividad de telomerasa (Conget et al., 1999; Covas et al., 2008; Galmiche et al., 1993; Haynesworth et al., 1992; Martinez et al., 2007; Pittenger et al., 1995; Sacchetti et al., 2008; Shi et al., 2002, 2003; Sordi et al., 2005). Estudios recientes han implicado que las BMMSC de ratones podrían expresar las moléculas hematopoyéticas de superficie, CD45 (Chen et al., 2007) y CD34 (Copland et al., 2008).

- 25 Se considera que las BMMSC son progenitores de osteoblastos con la capacidad de regenerar componentes de hueso y médula in vivo. Estos hallazgos han llevado a estudios extensos que utilizan BMMSC para la ingeniería de tejidos mineralizados. La evidencia clínica parece apoyar la noción de que el implante de BMMSC puede mejorar la regeneración de tejido esquelético basado en células (Kwan et al., 2008; Panetta et al., 2009). Recientemente, se ha acumulado evidencia de que las BMMSC producen una variedad de citoquinas y muestran propiedades inmunomoduladoras profundas (Nauta et al., 2007; Uccelli et al., 2007, 2008), quizás al inhibir la proliferación y la función de varias células inmunitarias importantes, como las células asesinas naturales (NK), células dendríticas, linfocitos T y B (Aggarwal y Pittenger, 2005; Nauta et al., 2007; Uccelli et al., 2007, 2008).

- 35 Estas propiedades exclusivas hacen que las BMMSC sean de gran interés para las aplicaciones clínicas en el tratamiento de trastornos inmunes (Nauta y Fibbe, 2007; Bernardo et al., 2009).

- 40 Se cree que las BMMSC se derivan del compartimento estromal de la médula ósea, apareciendo inicialmente como grupos adherentes de colonias individuales (unidad de formación de colonias-fibroblastos [CFU-F]), y posteriormente proliferan en placas de cultivo (Friedenstein et al. 1980). Las BMMSC adherentes son capaces de proliferar y experimentar una diferenciación osteogénica, lo que proporciona la primera evidencia de CFU-F como precursores del linaje osteoblástico (Friedenstein et al., 1980). Durante más de 40 años, el ensayo de CFU-F adherente se ha utilizado como un enfoque eficaz para identificar y seleccionar BMMSC. Hasta la fecha, el ensayo CFU-F ha sido considerado como uno de los estándares de oro para el aislamiento y expansión de BMMSC (Clarke et al., 1989; Friedenstein et al., 1970).

- 45 Yamaza et al. (Yamaza et al. (2008) PLOS ONE, vol 3, nº 7, página E2615) describe el tratamiento de BMMSC humanas con aspirina e informa sobre un incremento en la actividad de la telomerasa. En otra publicación, Yamaza et al. (Yamaza et al. (2010), Stem Cell Res. Ther., vol. 1, nº 1, página 5) describen la utilización de BMMSC humanas adherentes al plástico para el tratamiento de lupus eritematosos sistémicos (SLE) con evidencia de un efecto terapéutico en ratones MLR/lpr.

Resumen de la invención

5 Las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMMSC) son una población heterogénea de células precursoras postnatales con la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células y ofrecer tratamientos alternativos para una variedad de enfermedades. Hemos demostrado que el ensayo de CFU-F adherente estándar recopila la mayoría de las BMMSC, pero distintas subpoblaciones de BMMSC se mantienen en la suspensión de cultivo.

Un aspecto de la presente invención está dirigido a nuevos subconjuntos de BMMSC con un potencial terapéutico mejorado, tal como se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para aislar las nuevas BMMSC de la presente invención, tal como se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

15 Otro aspecto de la presente invención incluye células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas que tienen una alta actividad de telomerasa, tal como se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. La actividad alta de la telomerasa se define más ampliamente como una población de BMMSC que tienen mayor actividad de la telomerasa que las BMMSC regulares, pero preferiblemente el subconjunto aislado de las BMMSC humanas tiene una actividad de la telomerasa al menos dos veces más alta que las BMMSC regulares. Las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas de la invención son CD34⁺.

20 Las células madre mesenquimales de la médula ósea humana aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen: (1) BMMSC aisladas derivadas de células no adherentes en el cultivo de plástico (en lo sucesivo, denominadas "tBMMSC"); (2) BMMSC CD34⁺ aisladas, preferentemente, BMMSC CD34⁺ / CD73⁺; y (3) CD-BMMS-BMMSC humanas que han sido tratadas con un agente de inducción de telomerasa (por ejemplo, TAT-BMMSC).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, la composición farmacéutica puede comprender además un vehículo.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al aislamiento de tBMMSC de una población heterogénea de células precursoras postnatales. Las tBMMSC son capaces de adherirse a las placas recubiertas con matriz de células extracelular (MEC) y mostrar las características de las células madre mesenquimales con distinción con respecto a las células hematopoyéticas tal como lo demuestra la coexpresión de CD73 o CD105 con CD34, formando un grupo de colonias únicas en las ECM y no logran diferenciarse en el linaje de células hematopoyéticas.

30 En el presente documento también se describe un método para convertir BMMSC CD 34 - regulares en tBMMSC mediante el tratamiento de BMMSC con telomerasa, incluida la aspirina y sus compuestos relacionados con una estructura química similar.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a BMMSC de la invención para su utilización en métodos para modular el sistema inmune. Los métodos de la presente invención implican administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas de acuerdo con la presente invención.

40 En formas de realización preferentes, la presente invención se refiere a las BMMSC para su utilización en métodos para modular el lupus eritematoso sistémico (SLE) a través de, sin limitarse por la teoría, altos niveles de producción de óxido nítrico (NO). Dichos métodos incluyen administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas de acuerdo con la presente invención. Esta alta producción de NO en las células madre mesenquimales de la médula ósea humana aisladas de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, tBMMSC, está regulada positivamente por la actividad de la telomerasa junto con la señalización de Wnt / beta-catenina. Además, mostramos que las tBMMSC inducidas por el activador de la telomerasa también exhiben una función inmunomoduladora significativamente mejorada, lo que sugiere una
45 viabilidad de inducir BMMSC inmuoactivadas para mejorar las terapias basadas en células para los trastornos inmunes.

Estos y otros aspectos de la presente invención se describen con referencia a las figuras, descripción, ejemplos y otras divulgaciones tal como se describe en el presente documento.

Breve descripción de las figuras.

La Figura 1 muestra que las tBMMSC son capaces de adherirse a una placa de cultivo recubierta con ECM. (A) El modelo hipotético indica que todas las células nucleares (ANC) de médula ósea se sembraron a 15×10^6 en placas de cultivo de 10 cm y se incubaron durante 2 días en el medio de cultivo regular a 37 °C con 5% de CO₂, y posteriormente las células no adheridas de la suspensión de cultivo se trasplantaron a ratones inmunocomprometidos por vía subcutánea utilizando fosfato tricálcico de hidróxido de apatito (HA) como vehículo durante 8 semanas. El hueso recién formado (B) por los osteoblastos (flechas abiertas) y el tejido conjuntivo asociado (C) se detectaron en estos trasplantes de células no adheridas mediante tinción con H&E. Ampliación original; X 200. Barra = 100 µm. (B) Modelo hipotético de aislamiento de tBMMSC. Las ANC primarias se sembraron a 15×10^6 en placas de cultivo de 10 cm, las BMMSC normalmente se adhieren a las placas de plástico dentro de los 2 días, sin embargo, una pequeña parte de las BMMSC en las ANC primarias no se adhirió a las placas de cultivo y permanecieron en la suspensión celular. Las suspensiones celulares que contenían BMMSC no adheridas putativas se recogieron y se transfirieron a las placas cultivadas recubiertas con ECM producida por BMMSC con la generación de agrupaciones de colonias individuales (CFU-F). Estas BMMSC unidas a ECM (tBMMSC) se subcultivaron en placas de cultivo de plástico regulares para experimentos adicionales. (C) El número de CFU-F adheridas al plástico generadas a partir de 1.5×10^6 ANC de médula ósea completa es más de 7 veces mayor que la derivada de tBMMSC adherentes a BMMSC-ECM. (D) El análisis citométrico de flujo indica que las tBMMSC expresan altos niveles de marcadores de células madre mesenquimales CD73 (81.8%), Sca-1 (87.74%), Oct4 (40.7%) y SSEA4 (24.56%) en comparación con las BMMSC regulares (CD73: 70.8%, Sca-1: 52.16%, Oct4: 14.08%). Sin embargo, parece que las tBMMSC y las BMMSC expresan un nivel similar de SSEA-4. (E) Las tasas de proliferación de SSEA4⁺ tBMMSC y BMMSC regulares se evaluaron mediante el ensayo de incorporación de BrdU durante 24 horas. El número de células positivas se indicó como un porcentaje del número total de cada población. El porcentaje de células positivas aumenta significativamente en tBMMSC en comparación con el grupo de control. (F) Las tBMMSC muestran un aumento significativo en las duplicaciones de la población en comparación con las BMMSC regulares.

La Figura 2 muestra que las tBMMSC expresan CD34 y poseen una alta actividad de telomerasa. (A) El análisis por citometría de flujo mostró que las BMMSC regulares no expresan CD34, pero son positivas para la tinción del anticuerpo CD45 (21.35%). Sin embargo, las tBMMSC expresan tanto CD34 (23.37%) como CD45 (31.22%). (B) El análisis de citometría de flujo también mostró que las tBMMSC CD34⁺ fueron positivas a la tinción de anticuerpos anti CD73 (13.8%) y Oct4 (13.41%). Ninguno de los grupos de tinción se utilizó como controles negativos. (C, D) El análisis de transferencia Western indica que las tBMMSC expresan CD34 y las moléculas de superficie mesenquimal CD73 y CD105. En contraste, las BMMSC regulares solo expresan CD73 y CD105 (C). Las tBMMSC expresan CD34 en el paso 1-5 (D). Se utilizó β-actina como control de carga de la muestra. BMC: médula ósea entera ANC. (E, F) La inmunotinción confirma que las tBMMSC son doblemente positivas para CD34 / CD73 (triángulo, E) y CD34 / CD105 (triángulos, F). Las BMMSC regulares son negativas para la tinción del anticuerpo CD34 y solo positivas para la tinción del anticuerpo anti CD73 (E) y CD 105 (F). Barra = 100 µm. (G) Las tBMMSC tienen un nivel de actividad de telomerasa significativamente más alto que las BMMSC. Se utilizaron células HEK293T (293T) como control positivo y se utilizaron células HEK293T inactivas por calor (H.I.) como control negativo medido por un kit ELISA Tele TAGGG Telomerase PCR. (H) La transferencia Western verifica que las tBMMSC expresan la transcriptasa inversa (TERT) de la telomerasa y las BMMSC son negativas para la tinción de anticuerpos anti TERT. (I) Hay un 3.77% de células que son doblemente positivas para la tinción de anticuerpos anti CD34 y CD73 en ANC de médula ósea completa, estas células CD34⁺ / CD73⁺ se pueden separar de la médula ósea usando un clasificador de citometría de flujo. (J) Las células CD34⁺ / CD73⁺ forman CFU-F en cultivos BMMSC-ECM a una frecuencia similar a la de las tBMMSC. (K) CD34⁺ / CD73⁺ Las BMMSC muestran una mayor actividad de la telomerasa que las BMMSC regulares. Las células HEK293T se utilizaron como control positivo (293T) y las células HEK293T inactivas por calor se utilizaron como control negativo (H.I.) medido por un kit de ELISA Telo TAGGG Telomerase PCR. (L) Las BMMSC CD34⁺ / CD73⁺ también muestran una producción significativa de NO en comparación con las BMMSC regulares. Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes. Barras de escala = 50 µm. *** P < 0,001. La barra gráfica representa la media ± SD.

La Figura 3 muestra que el tratamiento con aspirina eleva la expresión de CD34 en BMMSC. (A) El análisis citométrico de flujo indicó que la BMMSC tratada con aspirina (TAT-BMMSC) muestra una expresión positiva de CD34 cuando se compara con la expresión negativa de CD34 en una BMMSC regular (BMMSC). Los niveles de expresión de CD45 en TAT-BMMSC fueron más bajos que en BMMSC y tBMMSC. (B) Las TAT-BMMSC expresan niveles altos significativos de Scall, Oct4 y CD34 en comparación con BMMSC, pero a un nivel mucho más bajo que las tBMMSC. Sin embargo, las TAT-BMMSC expresan un nivel mucho menor de CD45 en comparación con las tBMMSC y BMMSC regulares. (C) El análisis de transferencia Western mostró que las tBMMSC y las BMMSC tratadas con aspirina expresan CD34, pero las BMMSC no se expresan para CD34. Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes. ** P < 0.01; *** P < 0.005. La barra gráfica representa la media ± SD.

La Figura 4 muestra la diferenciación hematopoyética de las tBMMSC. (A) Las BMMSC, las tBMMSC y las BMMSC tratadas con aspirina se cultivaron en una placa de cultivo de baja adhesión de 35 mm (2×10^4 / placa) en medio de diferenciación hematopoyética con o sin eritropoyetina (EPO; 3U / mL) durante 7 días. Se utilizaron células de médula ósea y células de médula ósea completas con linaje negativo (células de Linaje) como controles positivos. Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes. (B) Los ratones que recibieron BMMSC regulares (BMMSC, n = 5) o PBS sin células (Control, n = 8) no pudieron sobrevivir más allá de 14 días. El grupo completo de infusión de células de la médula ósea (células BM completas, n = 3) es un grupo de control positivo con supervivencia durante los 110 días posteriores a la irradiación. Las tBMMSC pueden prolongar la vida útil de los ratones irradiados con dosis letales (tBMMSC, n = 10). Curvas de supervivencia de Kaplan-meier.

La Figura 5 muestra que las tBMMSC muestran propiedades inmunomoduladoras reguladas al alza. (A) Los niveles de NO en el sobrenadante de tBMMSC y el cultivo regular de BMMSC (cada 0.2×10^6 / pocillo en una placa de 24 pocillos) fueron significativamente mayores en el grupo de tBMMSC tratado con INF- γ (25 ng / ml) / IL-1 β (5 ng / ml) que en las BMMSC regulares. (B) Las células de bazo activadas por anticuerpos (SP) anti-CD3 y anti-CD28 (cada una de $1 \mu\text{g}$ / ml) (1×10^6 / cámara) en las cámaras superiores se cocultivaron con o sin tBMMSC o BMMSC regulares (1×10^5 / cámara) en la cámara inferior utilizando un sistema de transferencia de pocillos. Tres días después del co-cultivo, se analizó la viabilidad celular de las células SP activadas utilizando un kit 8 de recuento de células (B-D). El cultivo de tBMMSC mostró una reducción significativa en la viabilidad celular de las células SP activadas en comparación con las células cultivadas sin BMMSC (BMMSC⁻) y con las BMMSC regulares (B). Los efectos de la reducción de la viabilidad de las células del bazo mediante tBMMSC, pero no las BMMSC regulares, se eliminaron en los grupos tratados con L-NMMA inhibidor general de NOS (1 mM) (C) y tratados con (0.2 mM) 1400W de inhibidor específico de iNOS (D). Tres días después del co-cultivo, las células SP activadas en la cámara superior se tiñeron para detectar células apoptóticas tal como se describe en Materiales y Métodos (E-J). Tanto las tBMMSC como las BMMSC regulares fueron capaces de inducir una cantidad significativa de células apoptóticas tempranas de Anexina V (⁺) y células apoptóticas tardías y muertas de Anexina V (⁺) 7AAD (⁺) (H) en comparación con los grupos de control negativos (BMMSC⁻). Parece ser que las tBMMSC tienen un efecto más significativo que las BMMSC regulares en la inducción de células apoptóticas tempranas (E) y tardías (H). Tanto L-NMMA como 1400W fueron capaces de abolir las células anexas de Annexin V (⁺) (F, I) y Annexin V (⁺) 7AAD (G, J) inducidas por tBMMSC y BMMSC (G, J). Parece que el tratamiento con 1400W tiene una inhibición más significativa en la apoptosis temprana inducida por tBMMSC de las células SP activadas (G). (K, M) Se co-cultivaron células activadas de CD4⁺ CD4⁺ (1×10^6 / pocillo) y tBMMSC o BMMSC regulares (cada una de 0.1×10^6 / pocillo) en presencia de TGF β 1 (2 ng / ml) e IL-2 (2 ng / ml) con o sin inhibidor de NOS durante 3 días. Las células flotantes se tiñeron para células reguladoras CD4⁺ CD8-CD25⁺ FoxP3⁺ T (Treg). Las tBMMSC mostraron un efecto significativo en la regulación al alza de las células T reguladoras de Foxp3⁺ (Treg) (K). Sin embargo, los tratamientos con L-NMMA y 1400W dieron como resultado la abolición de la regulación al alza inducida por tBMMSC de Treg (L, M). Los resultados fueron representativos de, al menos, tres experimentos independientes. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001. La barra gráfica representa la media \pm SD.

La Figura 6 muestra que las tBMMSC mostraron un efecto terapéutico superior en ratones MRL / lpr similares a SLE. (A) Un modelo hipotético que muestra que se infundieron tBMMSC o BMMSC regulares de ratones C3H / HeJ en la vena de la cola de ratones MRL/lpr de 10 semanas de edad (0.1×10^6 células / 10 g de peso corporal de ratón). (B) El tratamiento con tBMMSC y BMMSC recupera el trastorno de la membrana basal inducida por LES y el crecimiento excesivo de las células de mesangio en glomerular (G) (tinción con H&E). (C) Los niveles de proteína en la orina se evaluaron 2 semanas después de la infusión de BMMSC. Tanto las tBMMSC como las BMMSC fueron capaces de reducir los niveles de proteína en la orina en comparación con el grupo de MRL / lpr. Sin embargo, las tBMMSC ofrecieron una reducción más significativa de los niveles de proteína en la orina en comparación con las BMMSC regulares. (D, E) ELISA cuantificó que los niveles de anticuerpos anti dsDNA IgG e IgM aumentaron significativamente en la sangre periférica de ratones MRL/lpr cuando se compararon con el nivel no detectable (N.D.) en los controles (C3H). Los tratamientos con tBMMSC y BMMSC pudieron reducir los niveles de anti dsDNA IgG e IgM, pero los tBMMSC muestran un efecto de tratamiento superior al de BMMSC en la reducción del nivel de IgG de dsDNA (D). (F) Los tratamientos con tBMMSC y BMMSC pudieron reducir significativamente el anticuerpo antinuclear (ANA) en ratones MRL / lpr, que aumentó significativamente en comparación con el control (n = 6). Pero las tBMMSC mostraron un mejor efecto en la reducción de los niveles de ANA en comparación con el tratamiento con BMMSC. (G) Los tratamientos con tBMMSC y BMMSC pudieron aumentar el nivel de albúmina en comparación con el nivel en ratones MRL / lpr, que disminuyeron significativamente en comparación con el control (n = 6). Los tratamientos con tBMMSC se muestran más efectivos para elevar el nivel de albúmina en suero en comparación con el grupo tratado con BMMSC. (H) El análisis citométrico de flujo mostró que la cantidad de Tregs CD25⁺ Foxp3⁺ en los linfocitos CD4⁺ T de la sangre periférica MRL / lpr se redujo en comparación con el control. Los tratamientos con BMMSC y tBMMSC elevaron el número de Treg. Parece que las tBMMSC indujeron una elevación más significativa de los niveles de Treg que las BMMSC. (I) La citometría de flujo reveló que los ratones MRL / lpr tenían un nivel significativamente mayor de linfocitos -T IFNg CD4⁺ IL17⁺ (células Th17) en el bazo en comparación con el grupo de control. Las células Th17 disminuyeron notablemente en los grupos tratados con BMMSC y tBMMSC. El tratamiento con tBMMSC indujo una reducción más significativa de las células Th17 que con las BMMSC. Los

resultados fueron representativos de seis experimentos independientes. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001. La barra gráfica representa la media \pm SD.

5 La Figura 7 muestra que la producción de óxido nítrico por BMMSC está regida por la señalización de telomerasa y la Wnt / beta-catenina. (A, B) Se cultivó tBMMSC con inhibidor de telomerasa III (1 μ M) durante una semana. La actividad de la telomerasa (A) y la producción de NO (B) se redujeron significativamente en el grupo de tratamiento con inhibidores de la telomerasa. Se utilizaron células 293 T y muestras inactivadas por calor como control positivo y negativo, respectivamente. (C-E) Las BMMSC regulares se cultivaron con aspirina o inhibidor de telomerasa III (Telo I, 1 μ M) durante una semana. La aspirina puede elevar la actividad de la telomerasa (C), la expresión de la transcriptasa inversa (TERT) de la telomerasa (D) y la producción de NO (E) en las BMMSC. En contraste, el inhibidor de la telomerasa III reduce la actividad de la telomerasa (C) y la producción de NO (E). (F) En el grupo de tratamiento con aspirina, se añadió un inhibidor de Wnt, DKK1 (DKK, 10 ng / ml) a los cultivos de BMMSC durante tres días (DKK-TAT), lo que llevó a una reducción significativa de los niveles de NO en comparación con el grupo de aspirina (TAT). (G) El análisis de transferencia Western mostró que DKK1 puede reducir los niveles de β -catenina activa. El tratamiento con aspirina (TAT) puede bloquear parcialmente la regulación a la baja inducida por DKK1 de la expresión de beta-catenina activada. (H) El tratamiento con DKK1 pudo abolir la actividad de la telomerasa inducida por aspirina (TAT) en las BMMSC (DKK-TAT). (I) Cuando las BMMSC se cultivaron con el activador de la señalización de beta catenina Chiron, a 1 y 10 μ M durante 1 semana, la producción de NO en BMMSC aumentó significativamente de una manera dependiente de la dosis según lo medido por el kit NO / Nitrito / Nitrato Total. (J) El análisis de transferencia Western confirmó que el tratamiento con Chiron induce una expresión regulada al alza de beta-catenina en las BMMSC. (K) El tratamiento con Chiron es capaz de inducir una alta actividad de la telomerasa, que es bloqueada por el inhibidor de la telomerasa III (Telo i-Chiron) cuando se usa antes de la inducción de Chiron. Las células 293T y la muestra inactivada por calor se utilizaron como control positivo y negativo respectivamente. (L) La alta producción de NO inducida por Chiron puede ser bloqueada por el tratamiento con inhibidor de telomerasa III. Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001. La barra gráfica representa la media \pm SD.

La Figura 8 muestra que las BMMSC tratadas con aspirina mostraron un efecto terapéutico mejorado en ratones MSL / lpr similares a SLE. (A) Los niveles de proteína en la orina se evaluaron 2 semanas después de la infusión de BMMSC. Tanto las BMMSC como las BMMSC tratadas con aspirina (TAT) (TAT-BMMSC) fueron capaces de reducir los niveles de proteínas en la orina en comparación con el grupo MRL / lpr. Sin embargo, TAT-BMMSC ofreció una reducción más significativa de los niveles de proteína en la orina en comparación con las BMMSC regulares cuando se infundieron las 0.1 x 10⁶ o 0.01 x 10⁶ células sistémicamente. Parece que las 0.01 x 10⁶ BMMSC no lograron reducir el nivel de proteína en la orina en comparación con los ratones MRL / lpr. (B, C) ELISA cuantificó que los niveles de anticuerpos anti dsDNA IgG e IgM aumentaron significativamente en la sangre periférica de ratones MRL / lpr en comparación con los controles (C3H). Los tratamientos con TAT-BMMSC y BMMSC pudieron reducir los niveles de anti dsDNA IgG e IgM, pero las TAT-BMMSC muestran un efecto de tratamiento superior al de BMMSC para reducir los niveles de dsDNA IgG e IgM. Las TAT-BMMSC del grupo de infusión de 0.01 x 10⁶ células fue capaz de reducir significativamente los niveles de anti dsDNA IgG e IgM. (D) Los tratamientos con TAT-BMMSC y BMMSC pudieron reducir significativamente el anticuerpo antinuclear (ANA) en ratones MRL / lpr, que aumentó significativamente en comparación con el control (C3H). Pero el grupo de infusión de 0.01 x 10⁶ células TAT-BMMSC mostró un mejor efecto en la reducción de los niveles de ANA en comparación con el tratamiento con BMMSC. (E) El análisis ELISA mostró que los tratamientos con TAT-BMMSC y BMMSC pudieron reducir los niveles séricos de IL17 en comparación con el nivel alto en ratones MRL/lpr. Sin embargo, las TAT-BMMSC del grupo de infusión de 0.01 x 10⁶ células mostró un efecto más eficaz en la reducción del nivel de IL17 en suero cuando se comparó con el grupo tratado con BMMSC. (F) La citometría de flujo reveló que los ratones MRL / lpr tenían un nivel significativamente mayor de linfocitos IFN γ -T CD4⁺ IL17⁺ (células Th17) en el bazo en comparación con el grupo de control (C3H). Las células Th17 disminuyeron notablemente en los grupos tratados con TAT-BMMSC y BMMSC.

El tratamiento con TAT-BMMSC indujo una reducción más significativa de las células Th17 que los grupos tratados con BMMSC. (G) El análisis de citometría de flujo mostró que el número de CD25⁺ Foxp3⁺ en los linfocitos T CD4⁺ de la sangre periférica MRL / lpr se redujo en comparación con el control (C3H). Los tratamientos con TAT-BMMSC y BMMSC elevaron el número de Treg. Parece que las TAT-BMMSC indujeron una elevación más significativa de los niveles de Treg que las BMMSC cuando las 0.01 x 10⁶ células fueron infundidas sistémicamente. Los resultados fueron representativos de seis experimentos independientes. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001. La barra gráfica representa la media \pm SD.

55 La Figura 9 muestra que la médula ósea humana contiene tBMMSC. (A) las tBMMSC humanas (htBMMSC) mostraron una actividad de telomerasa de nivel significativamente alto que las BMMSC (hBMMSC) tal como se midió por medio del kit ELISA Telo TAGGG Telomerase PCE. Las células T293 y el calor inactivo (H.I.) se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente. (B) Las htBMMSC producen un nivel de NO mayor que el de

hBMMSC según lo evaluado por el kit NO / Nitrito / Nitrito Total. (C) La producción de kynurenina aumentó significativamente en htBMMSC en comparación con hBMMSC ($p < 0.005$). (D) Cuando hBMMSC o htBMMSC se co-cultivaron con células T activas, el nivel de kynurenina en el sistema de co-cultivo aumentó drásticamente con un aumento más significativo en el grupo de htBMMSC en comparación con el grupo de hBMMSC. (E) Los números de células apoptóticas doble positivas de Anexina V y 7AAD en células T activas aumentaron cuando se cultivaron conjuntamente con hBMMSC o htBMMSC. Sin embargo, la tasa de células apoptóticas aumentó significativamente en el grupo de htBMMSC en comparación con el grupo de hBMMSC. Los resultados fueron representativos de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $p < 0.005$. La barra gráfica representa la media \pm SD.

La Figura 10 muestra el número de CFU-F en cultivos de BMMSC. Las ANC primarias se sembraron a 1×10^6 en placas de cultivo de plástico normales de 6 cm (plástico) o las placas de cultivo recubiertas con ECM producida por BMMSC (ECM) durante 14 días. El número de las CFU-F aumentó significativamente en las BMMSC cultivadas en placas recubiertas con ECM. Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes. *** $P < 0.001$. La barra gráfica representa la media \pm SD.

La Figura 11 muestra la diferenciación multipotente de tBMMSC. (a) La tinción con Rojo Alizarina S y la fosfatasa alcalina (ALP) mostró que las tBMMSC fueron similares a las BMMSC regulares en la diferenciación osteogénica in vitro. (b) Las tBMMSC o las BMMSC regulares (4×10^6 células / trasplante) se transplantaron en ratones inmunocomprometidos utilizando HA / TCP (HA) como vehículo durante 8 semanas. La formación ósea se detectó en los trasplantes de tBMMSC y BMMSC, evidenciado por la tinción con H&E. DECIR AH; fosfato tricálcico de hidroxiapatita, B; hueso, M; médula ósea, C; tejido conectivo; Ampliación original; X 200. Barra = 50 μ m. (c) Las tBMMSC son capaces de formar células positivas para Rojo de aceite O y la expresión del ARNm de PPAB γ 2 y LPL tal como se aprecia en las BMMSC regulares mediante tinción con Rojo de aceite O y análisis de RT-PCR, respectivamente. Se utilizó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno. Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes. Barras de escala = 100 pm. 1: control negativo, 2: BMMSC, 3: tBMMSC. (d) La diferenciación condrogénica se evaluó mediante tinción con azul de Alcian para mucosustancias sulfatadas ácidas, tinción de Trichrome de Pollak para colágeno y tinción inmunohistoquímica para colágeno tipo II. Las tBMMSC fueron capaces de diferenciarse en condrocitos tal como se observó en las BMMSC regulares. Barra = 50 μ m. Los resultados fueron representativos de tres experimentos independientes. La barra gráfica representa la media \pm SD.

La Figura 12 muestra el nivel de NO en tBMMSC. Se cultivaron BMMSC y tBMMSC (2×10^5 / pocillo) durante 3 días y se trataron con L-NMMA (1 mM) o 1400W (0.2 mM) durante 3 días. (a) El sobrenadante de cultivo recogido se utilizó para medir el nivel de NO. Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes, (b) El análisis de transferencia Western mostró que la expresión de iNOS se inhibía por LNMMMA y 1400W. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. La barra gráfica representa la media \pm SD.

La Figura 13 muestra la actividad de los osteoclastos en ratones MRL / lpr tratados con tBMMSC, (a) la tinción con TRAP indicó el aumento del número de células TRAP positivas en la epífisis de los fémures distales de ratones MRL / lpr en comparación con el control (C3H). La infusión de tBMMSC y BMMSC dio como resultado una reducción significativa en el número de células TRAP positivas. Parece que el grupo tBMMSC muestra una reducción más significativa del número de células TRAP positivas que el grupo BMMSC, (b, c) ELISA reveló que los ratones MRL / lpr tienen niveles aumentados de RANKL soluble (sRANKL) (b) y telopéptidos C-terminales de colágeno de tipo I (CTX) (c) en suero en comparación con los controles. La infusión de tBMMSC y BMMSC puede reducir significativamente los niveles de sRANKL (B) y CTX (C), pero el grupo tBMMSC mostró una mayor efectividad en la reducción de los niveles de sRANKL (b) y CTX (c). Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. La barra gráfica representa la media \pm SD.

La Figura 14 muestra que las propiedades inmunomoduladoras de las BMMSC están reguladas por la telomerasa. Las células SP (1×10^6 / cámara), activadas con anticuerpos anti CD3 (5 μ g / mL) y CD28 (2 μ g / mL), fueron co-cultivadas con o sin BMMSC (0.2×10^6 / cámara) utilizando un sistema Trans-well (Corning) por 3 días. Las BMMSC se trataron con un análogo de TAT (TAT, 3 pM) durante 3 días antes del co-cultivo. La viabilidad celular de las células SP se midió utilizando un kit-8 de recuento de células (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD). Las células apoptóticas se tiñeron con el kit de detección de apoptosis Anexina V-PE I (BD Bioscience) y se analizaron con FACSCalibur (BD Bioscience). Las BMMSC tratadas con análogos de TAT (TAT-BMMSC) podrían reducir significativamente la viabilidad de las células SP activadas (a) y mejorar la apoptosis temprana (b) y tardía (c) de las células SP activadas en comparación con las BMMSC regulares. Los resultados fueron representativos de cinco experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. La barra gráfica representa la media \pm SD.

Descripción detallada de la invención

55 Abreviaturas

BMMSC: células madre mesenquimales de la médula ósea;

CFU-F: unidades formadoras de colonias fibroblásticas;

ECM: matriz de célula extracelular;

5 Oct-4: Octámero-4;

SSEA-4: antígeno-4 embrionario específico de la etapa;

SLE: lupus eritematoso sistémico;

HA / TCP: fosfato tricálcico de hidroxapatita;

Treg: células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺;

10 ANC: todas las células nucleares.

Definiciones

15 A menos que se indique lo contrario en el presente documento, todos los términos utilizados en este documento tienen el significado que los términos tendrían para los expertos en la técnica de la presente invención. Se dirige especialmente a los profesionales a los libros de texto actuales para las definiciones y términos de la técnica. Debe entenderse, sin embargo, que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar. Las células individuales y las poblaciones celulares se referirán en el presente documento mediante la utilización de un símbolo "+" o "-" para indicar si una determinada célula o población celular expresa o carece de un marcador específico, por ejemplo, una molécula de CD. Cuando se utiliza en relación con una sola célula, la utilización de un símbolo '+' o '-' indica si esa célula expresa o carece del marcador específico. Por ejemplo, una célula "CD34+", "CD31-" es una que expresa CD34, pero no CD31. Cuando se utiliza en relación con las poblaciones celulares, la utilización de un símbolo + para indicar si una determinada población celular, o una parte de la misma, expresa la presencia o carencia del marcador específico.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, las denominadas "BMMSC regulares" son BMMSC que aparecen como agrupaciones de colonias únicas adherentes (fibroblastos formadores de colonias [CFU-F]) en cultivos plásticos regulares, y posteriormente proliferan en placas de cultivos (Friedenstein et al., 1980).

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o disminuir (reducir) la afección o trastorno patológico objetivo. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en quienes se debe prevenir el trastorno.

30 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de tBMMC es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad efectiva" puede determinarse empíricamente y de manera rutinaria en relación con el propósito indicado.

35 Un "vehículo" o "vehículos", tal como se utiliza en el presente documento, incluye vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone al mismo en las dosis y concentraciones empleadas. El vehículo fisiológicamente aceptable puede ser una solución tamponada de pH acuoso estéril. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como por ejemplo polivinilpirrolidona; aminoácidos como por ejemplo glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como por ejemplo EDTA; alcoholes de azúcar como por ejemplo manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal como el sodio; y / o tensioactivos no iónicos.

40 Un aspecto de la presente invención está dirigido a subconjuntos únicos de células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas que tienen una alta actividad de telomerasa. La actividad alta de la telomerasa se

define más ampliamente como una población de BMMSC que tienen mayor actividad de la telomerasa que las BMMSC regulares, pero preferentemente el subconjunto aislado de las BMMSC humanas tiene una actividad de la telomerasa al menos dos veces más alta que las BMMSC regulares. Las BMMSC humanas aisladas que tienen una alta actividad de telomerasa de acuerdo con la presente invención se caracterizan generalmente por tener una expresión de CD34 y no formar CFU-F (fibroblastos de unidades formadoras de colonias) en cultivos en plástico, pero que se adhieren a matrices extracelulares producidas por células madre mesenquimales. En su sentido más amplio, el término "aislado" cuando se utiliza en relación con una población de células de interés, significa que la población de células está al menos parcialmente aislada de otros tipos de células u otro material celular con el que se produce naturalmente en el tejido de origen (por ejemplo, médula ósea). En otra forma de realización, las células madre aisladas también están sustancialmente libres de moléculas solubles, que se producen naturalmente.

Las células madre mesenquimales de la médula ósea humana aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen: (1) BMMSC humanas aisladas derivadas de células no adherentes en el cultivo de plástico (en lo sucesivo, denominadas "tBMMSC"); (2) BMMSC CD34⁺ aisladas, preferentemente, BMMSC CD34⁺ / CD73⁺; y (3) BMMSC CD34 - humanas que se han tratado con un agente de inducción de telomerasa (por ejemplo, TAT-BMMSC). Todas las BMMSC en la presente invención son BMMSC humanas.

La médula ósea humana utilizable en relación con la presente invención puede obtenerse generalmente desde el interior del hueso humano. Preferentemente, la médula ósea es médula ósea posnatal. Habitualmente se utilizan todas las células nucleadas de la médula ósea. Lo más preferiblemente, se utiliza la médula ósea derivada de todas las células nucleares (ANCs) de fémures y tibias tal como se describe en el presente documento.

Los tipos de células específicos descritos e identificados en este documento pueden aislarse a partir de las células recolectadas empleando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, pero sin limitarse a, la centrifugación en gradiente de densidad, la separación magnética de células, la citometría de flujo, la separación de células de afinidad o las técnicas de adhesión diferencial. En una forma de realización preferente, las células madre de la presente invención se pueden purificar, por ejemplo, mediante citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), tal como se describe a continuación. Las BMMSC con alto contenido de telomerasa descritas en el presente documento experimentarán una expansión ex vivo de acuerdo con métodos conocidos para que las BMMSC enriquezcan los números de células para la regeneración de tejidos o las terapias sistémicas.

TBMMSC aisladas

Las tBMMSC generalmente se aíslan a partir de una población heterogénea de células precursoras postnatales. Las tBMMSC aisladas se caracterizan generalmente como BMMSC humanas que no pueden formar agrupaciones de colonias únicas (CFU-F) en cultivos de plástico, pero son capaces de adherirse a la ECM producida por células madre mesenquimáticas y muestran una mayor expresión de la telomerasa en relación con las BMMSC humanas normales. Las tBMMSC muestran características de células madre mesenquimales con distinción a las células hematopoyéticas tal como lo demuestra la coexpresión de CD73 o CD105 con CD34. Las tBMMSC no consiguen diferenciarse en el linaje de células hematopoyéticas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para aislar tBMMSC que comprende: cultivar una muestra de médula ósea derivada de todas las células nucleares en un sustrato de plástico; eliminar las células que no se adhieren al sustrato de plástico; cultivar las células eliminadas en un medio recubierto con BMMSC-ECM; y recolectar colonias formando células unidas en el medio BMMSC-ECM.

Más específicamente, las tBMMSC pueden producirse y aislarse de la siguiente manera: las ANC primarias se siembran en un sustrato plástico, por ejemplo, placas de cultivo de plástico. Las tBMMSC en las ANC primarias no se adhieren a las placas de cultivo y permanecen en la suspensión celular. Las suspensiones celulares que contienen tBMMSC putativas no unidas se recolectan y transfieren a placas cultivadas recubiertas con matriz extracelular (ECM) producida por BMMSC, lo que da como resultado la generación de agrupaciones de colonias individuales (CFU-F). Estas BMMSC unidas a ECM (tBMMSC) se subcultivan de acuerdo con métodos conocidos en cultivos plásticos regulares. El análisis citométrico de flujo típico indica que las tBMMSC expresan altos niveles de marcadores de células madre mesenquimales CD73 (por ejemplo, aproximadamente el 80%), Sca-1 (por ejemplo, aproximadamente el 90%) y Oct4 (por ejemplo, aproximadamente el 40%) en comparación con las BMMSC regulares (CD73: por ejemplo, aproximadamente 70%, Sca-1: aproximadamente 50%, Oct4: aproximadamente 14%). Sin embargo, parece que las tBMMSC y las BMMSC expresan un nivel similar de SSEA-4.

Las tBMMSC expresan CD34 y poseen una alta actividad de telomerasa en relación con las BMMSC regulares. Tal como se describe en el presente documento, las BMMSC regulares no expresan CD34, pero son positivas para CD45 (alrededor del 20%). Sin embargo, las tBMMSC expresan tanto CD34 (alrededor del 25%) como CD45 (alrededor del 30%). El análisis de transferencia Western indica que las tBMMSC expresan CD34 y las moléculas de

superficie mesenquimal CD73 y CD105. En contraste, las BMMSC regulares solo expresan CD73 y CD105. Las tBMMSC también tienen niveles significativamente más altos de actividad de la telomerasa que las BMMSC regulares.

5 Para garantizar la pureza de las tBMMSC, se prefiere aislar y purificar sustancialmente las tBMMSC que expresan un marcador conocido por expresarse en BMMSC regulares seleccionadas del grupo que consiste en STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD146, Octámero-4 (Oct4), y antígeno-4 embrionario específico de etapa (SSEA4). En una forma de realización preferente, la tBMMSC SSEA4⁺ puede aislarse y purificarse mediante técnicas generalmente conocidas por los expertos en la materia, como por ejemplo FACS inmune. Una muestra de células madre de tBMMSC es "sustancialmente pura" cuando está al menos al 80%, o al menos al 90%, o al menos al 95%, y, en ciertos casos, al menos el 99% está libre de células distintas de las células de interés. Así, por ejemplo, una muestra de células madre tBMMSC SSEA4⁺ es "sustancialmente pura" cuando es de al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, y, en ciertos casos, al menos el 99% libre de células distintas de tBMMSC SSEA4⁺. La pureza se puede medir mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) u otros ensayos que distinguen los tipos de células.

15 BMMSC CD34⁺ humanas aisladas

Las BMMSC CD34⁺ son distintas de las BMMSC regulares en términos de tener una actividad de telomerasa elevada y unos niveles altos del marcador de células madre mesenquimales anterior, Oct4, junto con un aumento de la función inmunomoduladora. El mecanismo que puede contribuir a la función inmunomoduladora regulada al alza se asocia con una alta producción de NO en tBMMSC (Ren et al., 2008) y un alto nivel de Treg impulsado por NO (Niedbala et al., 2007), que parece estar regido por la actividad de la telomerasa junto con la señalización Wnt / beta-catenina. Sin limitarse a la teoría, se cree que esta es la razón por la que las tBMMSC tienen un efecto terapéutico superior en el tratamiento de ratones con SLE.

25 Las BMMSC CD34⁺ aisladas no consiguen formar CFU-F en cultivos plásticos, pero son capaces de adherirse a la ECM producida por células madre mesenquimales y de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos de ratones C3H / HeJ y C57BL / 6J. Las BMMSC CD34⁺ coexpresan marcadores de células madre mesenquimales CD73 y CD105. Además, las BMMSC CD34⁺ son distintas de las HSC debido a que no pueden diferenciarse en el linaje de células hematopoyéticas in vitro y no pueden rescatar a los ratones irradiados con dosis letales.

30 Preferentemente, las BMMSC humanas aisladas son doble positivas para CD34 y al menos otro marcador conocido por expresarse en BMMSC regulares seleccionadas del grupo que consiste en STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD146, Octámero-4 (Oct4) y antígeno-4 embrionario específico de la etapa (SSEA4). Preferentemente, las BMMSC son tanto CD34⁺ como CD73⁺. Preferentemente, las BMMSC CD34⁺ aisladas son sustancialmente puras. Una muestra de BMMSC CD34⁺ es "sustancialmente pura" cuando está al menos al 80%, o al menos al 90%, o al menos al 95%, y, en ciertos casos, al menos el 99% está libre de células distintas de las células de interés. Así, por ejemplo, una muestra (población) de BMMSC CD34⁺ es "sustancialmente pura" cuando es al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, y, en ciertos casos, al menos 99 % libre de células distintas de BMMSC CD34⁺. La pureza se puede medir por cualquier método apropiado, por ejemplo, por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), u otros ensayos que distinguen los tipos de células.

40 Tal como se describe en el presente documento, aproximadamente el 4% de las células BMMSC humanas son doble positivas para CD34 y CD73 en ANC de médula ósea completa. Estas células CD34⁺ / CD73⁺ se pueden clasificar y aislar de la médula ósea utilizando técnicas convencionales, como un clasificador de citometría de flujo. La utilización de la citometría de flujo para aislar BMMSC CD34⁺ / CD73⁺ de la médula ósea completa ofrece un enfoque práctico para aislar y recoger tBMMSC para uso terapéutico clínico. Las células CD34⁺ / CD73⁺ se pueden clasificar y aislar a partir de tBMMSC y de BMMSC regulares que han sido tratadas con un agente de inducción de telomerasa tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, las BMMSC CD34⁺ / CD73⁺ son "sustancialmente puras." Un grupo de BMMSC CD34⁺ / CD73⁺ son "sustancialmente puras" cuando es al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, y, en ciertos casos, al menos 99% libres de células distintas de BMMSC CD34⁺ / CD73⁺.

50 Las células CD34⁺ / CD73⁺ forman CFU-F en cultivos de BMMSC-ECM a una frecuencia similar a la de las tBMMSC. Los BMMSC CD34⁺ / CD73⁺ también muestran una mayor actividad de la telomerasa que los BMMSC regulares. Los BMMSC CD34⁺ / CD73⁺ también muestran un aumento significativo en la producción de NO en comparación con los BMMSC regulares.

CD34- BMMSC tratadas con un agente de inducción de telomerasa.

5 En el presente documento también se describe un método para aumentar la actividad de la telomerasa en células madre mesenquimales de médula ósea humana CD34- que comprende: poner en contacto células madre mesenquimales de médula ósea humana con una cantidad eficaz de un agente inductor de telomerasa. Las BMMSC CD 34 - pueden ser, por ejemplo, BMMSC regulares. Tal como se define en el presente documento, un grupo de BMMSC es CD34 - si menos de aproximadamente el 1% del grupo es CD34⁺

10 La actividad de la telomerasa de las BMMSC CD 34 - puede aumentarse agregando una cantidad efectiva de agente de inducción de telomerasa al medio de cultivo. Un agente de inducción de telomerasa preferido es la aspirina, pero los análogos estructurales y funcionales de la aspirina pueden ser sustituidos. Las condiciones de cultivo pueden ser determinadas apropiadamente por los expertos en la materia mediante la medición de los niveles de actividad de la telomerasa tal como se describe en el presente documento. Cuando se utiliza aspirina, se agrega preferiblemente al medio de cultivo a aproximadamente 2 ug / ml a aproximadamente 50 pg / ml durante aproximadamente 1 semana. El cultivo en estas condiciones da como resultado un aumento significativo del nivel de actividad de la telomerasa en BMMSC.

15 Las BMMSC humanas regulares pueden ser tratadas con un agente de inducción de telomerasa para convertirse en BMMSC que tienen una alta actividad de telomerasa con una función inmunomoduladora mejorada. Específicamente, cuando la aspirina se agrega al medio de cultivo a 2.5 µg / ml o 50 µg / ml durante 1 semana, se logró un nivel significativamente mayor de actividad de la telomerasa en BMMSC. Las BMMSC resultantes se denominan en el presente documento como TAT-BMMSC. Las TAT-BMMSC muestran una expresión positiva de CD34 cuando se compara con la expresión negativa de CD34 en BMMSC regulares. Los niveles de expresión de CD45 en TAT-BMMSC fueron más bajos que en BMMSC y tBMMSC. Las TAT-BMMSC expresan niveles altos significativos de Scall, Oct4 y CD34 en comparación con las BMMSC, pero a un nivel mucho más bajo que las tBMMSC. Sin embargo, las TAT-BMMSC expresan un nivel mucho menor de CD45 en comparación con las tBMMSC y BMMSC regulares. El análisis de transferencia Western mostró que las tBMMSC y las BMMSC tratadas con aspirina expresan CD34, pero las BMMSC no se pueden expresar en CD34.

25 Aplicaciones terapéuticas de las BMMSC de alta actividad de la telomerasa

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de las BMMSC de la presente invención en el tratamiento de uno o más trastornos.

30 En el presente documento se describe también un método para aumentar la concentración de NO in vivo, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas de la presente invención. El NO es un mediador biológico gaseoso con funciones importantes en la función de los macrófagos y las células T (Sato et al., 2007; Bogdan et al., 2001). iNOS es inducido por IFN γ , TNF α , IL-1 α o IL-1 β en BMMSC, y los ratones iNOS^{-/-} muestran una capacidad reducida para suprimir las funciones de las células T (Ren et al., 2008). Se ha informado de que la NOS endotelial activa junto con el receptor de estrógeno regula de forma cooperativa la expresión de la transcriptasa de la telomerasa humana (hTERT) en el endotelio (Grasselli et al., 2008). En el presente documento describimos el papel funcional de la alta actividad de la telomerasa en la mejora de la actividad inmunomoduladora de las BMMSC a través de la elevación de aproximadamente 10µM de producción de NO y aproximadamente el 5% de regulación al alza de Treg. La producción de NO mejorada con telomerasa también está asociada con la señalización de Wnt / β -catenina, en la que el inhibidor de Wnt DKK1 puede bloquear la actividad de la telomerasa inducida por el activador de telomerasa y la producción de NO asociada en BMMSC. Además, el activador de Wnt Chiron puede promover la actividad de la telomerasa y la producción de NO en las BMMSC. El tratamiento previo con inhibidor de la telomerasa puede anular parcialmente la actividad de la telomerasa inducida por el activador Wnt. Estos datos sugieren que la telomerasa junto con la señalización Wnt / beta-catenina inducía la producción de NO. Por lo tanto, además del papel funcional en la participación en la vía de señalización Wnt / beta-catenina (Park et al., 2009), la telomerasa también colabora con la señalización Wnt / beta-catenina para modular la producción de NO. Tanto la telomerasa como los activadores Wnt / beta-catenina pueden inducir una alta producción de NO en las BMMSC regulares, lo que lleva a una mejor reducción de la viabilidad de las células SP activadas. Pero solo el tratamiento con activador de telomerasa es capaz de mejorar la apoptosis de las células SP activadas. Es posible que otros factores inmunomoduladores también contribuyan a la inmuno-modulación elevada de las tBMMSC.

50 Otra forma de realización de la presente invención se refiere a las BMMSC de la invención para su utilización en métodos para modular el lupus eritematoso sistémico que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de las células madre mesenquimáticas de médula ósea humana aisladas de la presente invención.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad efectiva" de las BMMSC de la presente invención, cuando se usa en relación con una utilización médica, es una cantidad de las BMMSC suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. En general, una "cantidad efectiva" en referencia al tratamiento de una

- enfermedad o trastorno puede determinarse empíricamente por referencia a los datos y estándares divulgados en el presente documento y de manera rutinaria en relación con el propósito indicado. Una cantidad efectiva se administra preferiblemente en una sola dosis al paciente; sin embargo, la cantidad efectiva se puede administrar al paciente como una cantidad de dosis durante un período de tiempo. Tal como se describe en el presente documento, la dosis
- 5 de 0.1×10^6 células / 10 g de peso corporal es suficiente para tratar ratones SLE en el caso de BMMSC regular. Mediante la utilización de BMMSC de alta actividad de la telomerasa, la dosis se puede reducir a 0.01×10^6 células / 10 g de peso corporal con efecto terapéutico. Los expertos en la materia pueden aplicar esto al tratamiento de seres humanos utilizando modelos conocidos que relacionan las dosis de ratón con el ser humano y utilizando técnicas conocidas para la optimización de dosis.
- 10 También se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimáticas aisladas de médula ósea que tienen una alta actividad de telomerasa en un medio vehículo. Las composiciones farmacéuticas se utilizan para la administración de células madre mesenquimales de médula ósea aisladas que tienen una alta actividad de telomerasa para el tratamiento de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.
- 15 En los métodos descritos en el presente documento, las BMMSC de la presente invención deberían ser compatibles con el paciente y administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz de las BMMSC. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar desde el número máximo de células que el paciente recibe de forma segura hasta el número mínimo de células necesarias para lograr el efecto deseado. Un experto en la técnica puede
- 20 determinar y optimizar cantidades eficaces de acuerdo con técnicas conocidas para llevar a cabo el propósito previsto del tratamiento.
- La cantidad terapéuticamente efectiva de las BMMSC puede suspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo puede incluir, entre otros, un medio de cultivo adecuado más albúmina sérica al 1%, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua y combinaciones de los mismos. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración.
- 25 En una forma de realización preferente, la preparación o composición de BMMSC se formula para la administración sistémica a seres humanos de acuerdo con los procedimientos para formulaciones farmacéuticas conocidos por los expertos en la materia. Habitualmente, las composiciones para administración sistémica son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Los ingredientes pueden suministrarse por separado o mezclados en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un concentrado crioconservado en un recipiente herméticamente sellado, como por
- 30 ejemplo una ampolla que indica la cantidad de agente activo.
- A la vista de esta memoria descriptiva, una variedad de medios para administrar células a sujetos resultará evidente para los expertos en la técnica. Dichos métodos pueden incluir la administración sistémica o la inyección de las células en un sitio objetivo en un sujeto. Las células pueden insertarse en un dispositivo de administración que
- 35 facilita la introducción mediante inyección o implantación en los sujetos. Dichos dispositivos de administración pueden incluir tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y fluidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En una forma de realización preferente, los tubos tienen además una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la cual se pueden introducir las células de la invención en el sujeto en una ubicación deseada. Las células pueden prepararse para su administración en una variedad de formas diferentes. Por ejemplo, las células pueden estar suspendidas en una solución o gel. Las células pueden mezclarse con un vehículo o diluyente farmacéuticamente
- 40 aceptable en el que las células de la invención permanecen viables. Los vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampón acuosas, disolventes y / o medios de dispersión. La utilización de dichos vehículos y diluyentes es bien conocida en la técnica. La solución es preferentemente estéril y fluida, y con frecuencia será isotónica. Preferentemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos
- 45 mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares.
- Los modos de administración de las BMMSC humanas aisladas incluyen, pero no se limitan a, inyección intravenosa o intraarterial sistémica directamente en el tejido en el sitio de actividad deseado. La preparación se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección de bolos y se puede administrar
- 50 junto con otros agentes biológicamente activos. La administración es preferentemente sistémica. Puede resultar ventajoso, bajo ciertas condiciones, utilizar un sitio de administración cercano o más cercano al sitio de actividad deseado. Cuando la composición se administra por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.
- 55 La administración de las BMMSC de esta invención se puede realizar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales que incluyen administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

EJEMPLOS

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas formas de realización y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos de su alcance. Aunque dichos ejemplos son típicos de los que podrían utilizarse, alternativamente pueden utilizarse otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. De hecho, los expertos en la técnica pueden visualizar y producir fácilmente formas de realización adicionales, basadas en las enseñanzas de este documento, sin experimentación excesiva.

Métodos experimentales

10 Animales. Se adquirieron ratones hembra C3H / HeJ, C57BL / 6J y CSMRL-Fas^{lpr} / J en Jackson Lab. Ratones inmunocomprometidos hembra (Beige desnudo / XIDIII desnudo) fueron adquiridos en Harlan. Todos los experimentos con animales se realizaron bajo los protocolos aprobados por la institución para la utilización de la investigación con animales (USC # 10874 y 10941).

15 Anticuerpos. Anti Oct4, SSEA4, β catenina activa y β catenina se adquirieron en Millipore. Se adquirieron anticuerpos anti Sca-1-PE, CD34-PE, CD34-FITC, CD45-PE, CD73-PE, CD4-PerCP, CD8-FITC, CD25-APC, CD3 y CD28 en BD Bioscience. Los anticuerpos anti CD105-PE, Foxp3-PE, IL17-PE e IFN γ -APC se adquirieron en eBioscience. Los anti CD34, CD73 y CD 105 no conjugados y anti TERT se compraron en Santa Cruz Biosciences. El anticuerpo anti β -actina se adquirió en Sigma.

20 Aislamiento de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón (BMMSC). La suspensión única de médula ósea derivada de todas las células nucleares (ANC) de fémures y tibias se sembró a 15×10^6 en placas de cultivo de 100 mm (Corning) a una temperatura de 37 °C a 5% de CO₂. Las células no adherentes se eliminaron después de 48 horas y las células unidas se mantuvieron durante 16 días en medio esencial mínimo alfa (α -MEM, Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 20% (FBS, Equitech-bio), L-glutamina 2 mM 55 μ M 2 mercaptoetanol, 100 U / ml de penicilina y 100 pg / ml de estreptomina (Invitrogen). Las células unidas formadoras de colonias se pasaron una vez para un uso experimental adicional.

25 Preparación de placas recubiertas con matriz extracelular (ECM). Las placas recubiertas con ECM se prepararon como se describe en Chen et al. (2007). Brevemente, el 100% de confluencia de BMMSC se cultivó en medio de cultivo con 100 nM L de fosfato de ácido ascórbico (Wako Pure Chemical). Después de 2 semanas, los cultivos se lavaron con PBS y se incubaron con 0.005% de Triton X-100 (Sigma) durante 5-10 minutos a temperatura ambiente para eliminar las células. La ECM se trató con ADNasa I (100 unidades / ml; Sigma) durante 1 hora a 37 °C. La ECM se lavó con PBS tres veces y se almacenó en 2 ml de PBS que contenía 100 U / ml de penicilina, 100 g / ml. De estreptomina, y 0.25 ug / ml de fungizona (Invitrogen) a 4 °C.

30 Aislamiento de tBMMSC. Las ANTC derivadas de médula ósea se sembraron a 15×10^6 en placas de cultivo de 100 mm y se cultivaron durante 48 horas. El sobrenadante de cultivo se recogió y se centrifugó para obtener BMMSC no adjuntas putativas. Las células se sembraron nuevamente en las cifras indicadas en placas recubiertas con ECM. Después de 48 horas, las células flotantes en los cultivos se eliminaron con PBS y las células unidas en ECM se mantuvieron durante 14 días adicionales. Las células unidas formadoras de colonias se pasaron una vez y se subcultivaron en placas de cultivo de plástico regulares para experimentos adicionales. Para algunos análisis de caracterización de células madre, se recolectaron tBMMSC positivas para SSEA4 utilizando el citómetro de flujo FACS^{Calibur} (BD Bioscience) y se expandieron en los cultivos.

40 Ensayo fibroblástico de unidad de formación de colonias (CFU-F). Se sembró un millón de células de ANC de médula ósea en un matraz de cultivo de células T25 (Nunc). Después de 16 días, los cultivos se lavaron con PBS y se tiñeron con solución de azul de toluidina al 1% en paraformaldehído al 2% (PFA). El grupo de células que tiene más de 50 células se contó como una colonia bajo microscopía. El número de colonias se contó en cinco muestras independientes por cada grupo experimental.

45 Ensayo de proliferación celular. La proliferación de BMMSC y tBMMSC se realizó mediante el ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU). Cada población celular (1×10^4 células / pocillo) se sembró en portaobjetos de cámara de 2 pocillos (Nunc) y se cultivó durante 3 días. Los cultivos se incubaron con solución de BrdU (1:100) (Invitrogen) durante 20 horas y se tiñeron con un kit de tinción de BrdU (Invitrogen). Los números de células positivos y BrdU se contaron en diez imágenes por sujeto. El ensayo BxdU se repitió en 5 muestras independientes para cada grupo experimental.

50

- 5 Ensayo de duplicación de la población. En la primera pasada se sembraron 0.5×10^6 células de BMMSC y pBMMSC en placas de cultivo de 60 mm. Al alcanzar la confluencia, las células se pasaron a la misma densidad celular. La duplicación de la población se calculó en cada pasada según la ecuación: \log_2 (número de células recolectadas / número de células sembradas). Las duplicaciones de la población finita se determinaron mediante la suma acumulativa de los números totales generados a partir de cada pasada hasta que las células dejaron de dividirse.
- 10 Análisis citométrico de flujo de moléculas de superficie de células madre mesenquimales. Se incubaron BMMSC o pBMMSC (0.2×10^6) con $1 \mu\text{g}$ de anticuerpos conjugados con PE o IgG de control de isotipo coincidente (Southern Biotech) a 4°C durante 45 min. Las muestras se analizaron mediante un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Bioscience). Para el análisis de color dual, las células se trataron con anticuerpos conjugados con PE y conjugados con FITC o con IgG de control de isotipo coincidente (cada $1 \mu\text{g}$). Las células se analizaron en FACS Calibur (BD Bioscience).
- 15 Microscopía inmunofluorescente. Las células subcultivadas en portaobjetos de cámara de 8 pocillos (Nunc) (2×10^3 / pocillo) se fijaron con PFA al 4%. Las muestras se incubaron con los anticuerpos de ratón específicos o de isotipo coincidente (1: 200) durante la noche a 4°C , y se trataron con anticuerpos secundarios conjugados con rodamina (1: 300, Jackson ImmunoResearch; Southern Biotechnology). Finalmente, se montaron en un medio de montaje Vectashield que contiene 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories).
- 20 Aislamiento de células doble positivas CD34⁺ CD73⁺. Las ANC derivadas de la médula ósea se tiñeron con anticuerpos anti CD34-FITC y anti CD73-PE durante 30 min en hielo en condiciones de oscuridad. Después del lavado con PBS, las células se resuspendieron en el suplemento OPTI-MEM (Invitrogen) con FBS al 2% y antibióticos (100 U / ml de penicilina y 100 μg / ml de estreptomycin) y fueron clasificadas por el clasificador de células MOFLO XDP (BECKMAN Coulter). Las células dobles positivas clasificadas se sembraron en una placa de 60 mm recubierta con ECM a una densidad de 1×10^6 / placa y se cultivaron para experimentos adicionales.
- 25 Ensayo in vivo de formación ósea. Se mezclaron 4.0×10^6 células con polvos cerámicos de hidroxiapatita / fosfato tricálcico (HA / TCP) (40 mg, Zimmer Inc.) y se transplantaron por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos de 8 semanas de edad. Después de 8 semanas, los trasplantes se recolectaron, se fijaron en PFA al 4% y a continuación se descalcificaron con EDTA al 5% (pH 7.4), seguido de la inclusión de parafina. Las secciones de parafina se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se analizaron con una N1H Image-J. El área de tejido mineralizado recién formado de cinco campos se calculó y se mostró como un porcentaje del área de tejido total.
- 30 Ensayo de diferenciación osteogénica in vitro. Las BMMSC y las tBMMSC se cultivaron en condiciones de cultivo osteogénico que contenía 2 mM de β -glicerofosfato (Sigma), 100 μM de ácido 2-fosfato L-ascórbico y 10 nM de dexametasona (Sigma). Después de la inducción, los cultivos se tiñeron con alizarina roja o fosfatasa alcalina.
- 35 Ensayo de diferenciación adipogénica in vitro. Para la inducción adipogénica, se añadieron 500 nM de isobutilmetilxantina, 60 μM de indometacina, 500 nM de hidrocortisona, 10 μg / ml de insulina (Sigma), 100 nM de fosfato de ácido L-ascórbico al medio de cultivo. Después de 10 días, las células cultivadas se tiñeron con Oil Red-O y las células positivas se cuantificaron utilizando una N1H Image-J. El ARN total también se aisló de cultivos después de 10 días de inducción para experimentos adicionales.
- 40 Análisis de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). La extracción del ARN total y la RT-PCR se realizaron de acuerdo con los procedimientos estándar.
- 45 Análisis de Transferencia Western. Se utilizaron 20 mg de proteína y se realizaron SDS-PAGE y transferencia Western de acuerdo con los procedimientos estándar. La actina β en la misma membrana sirvió como control de carga.
- Tratamiento inhibidor. Las tBMMSC y las BMMSC fueron tratadas con L-NMMA 1 mM (Cayman Chemical) o 1400 W 0.2 mM (Cayman Chemical) para inhibir el NOS o iNOS total, respectivamente. Se utilizaron 50 μg / ml de aspirina (TAT) e inhibidor de la telomerasa III (1 μM ; EMD Chemicals) para activar y suprimir la actividad de la telomerasa en BMMSC cultivadas, respectivamente. Se utilizaron CHIRON 99021 (1 o 10 μM ; Chiron Corporation) y Dickkopf 1 (DKK1, 10 ng / ml, R&D Systems) como activador e inhibidor para regular los niveles de β catenina en las BMMSC.
- Medición de la actividad de la telomerasa. La actividad de la telomerasa se midió utilizando el kit ELISA de PCR para telomerasa TeloTAGGG (Roche).

5 Medición de la producción de óxido nítrico. Las BMMSC (0.2×10^6 / pocillo) se cultivaron en placas de 24 pocillos con o sin citoquinas (IPN γ , 25 ng / ml; IL-1 β , 5 ng / ml, R&D Systems) y productos químicos (L-NMMA, 1 ml; 1400W, 0.2 mM; aspirina, 50 μ g / ml; inhibidor de la telomerasa III, 1 μ M; CHIRON 99021, 1 o 10 μ M; DKK1, 10 ng / ml) a la concentración y los días indicados. La misma concentración química también se utilizó en el tratamiento combinado como DKK y aspirina o inhibidor de la telomerasa y CHIRON99021. El sobrenadante de cada cultivo se recogió y se midió la concentración de óxido nítrico utilizando el kit de ensayo de parámetros de óxido nítrico total y nitrato / nitrito (R & D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Ensayo de apoptosis celular y supervivencia celular. Se utilizó el sistema Transwell (Corning) para experimentos de co-cultivo. Se sembraron 0.2×10^6 de tBMMSC o BMMSC en cada cámara inferior. En las cámaras superiores, se cargaron esplenocitos activados (1×10^6 / cámara) que habían sido preestimulados con anticuerpo anti CD3 ϵ unido a la placa (5 μ g / ml) y anticuerpo anti CD28 soluble (2 μ g / ml) durante 3 días. Ambas cámaras se llenaron con un medio completo que contenía medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza) con FBS al 10% inactivado por calor, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), 1% de amino ácido no esencial (Cambrex), L-glutamina 2 mM, 100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomina. Para medir la viabilidad de los esplenocitos, se usó el kit de recuento de células 8 (Dojindo Molecular Technologies). Para la apoptosis del análisis de esplenocitos, se utilizó el kit de detección de apoptosis Anexina V-PE I (BD Bioscience) y se analizó en FACS^{Calibur} (BD Bioscience).

20 Inducción de Tregs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ In vitro. Se estimuló previamente linfocitos CD4⁺ CD25⁻ T (1×10^6 / pocillo), recogidos por el kit de aislamiento de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ (Miltenyi Biotec) con un anticuerpo anti CD3 unido a la placa (5 μ g / ml) y un anticuerpo anti CD28 soluble (2 μ g / ml) durante 3 días. Estos T linfocitos activados se cargaron en 0.2×10^6 de cultivos de BMMSC o tBMMSC con TFGpI humano recombinante (2 μ g / ml) (R&D Systems) e IL2 recombinante de ratón (2 μ g / ml) (R&D Systems). Después de 3 días, se recogieron las células en suspensión y se tiñeron con anticuerpos anti CD4-PerCP, anti CD8a-FITC, anti CD25-APC (cada 1 μ g) durante 45 minutos en hielo en condiciones de oscuridad. Y a continuación las células se tiñeron con el anticuerpo anti Foxp3-PE (1 μ g) utilizando el kit de tampón de tinción Foxp3 (eBioscience) para la fijación y la permeabilización celular. Las células se analizaron en FACS^{Calibur} (BD Bioscience).

30 Trasplante alogénico de tBMMSC de ratón en ratones MRL / lpr. Bajo anestesia general, se inyectaron BMMSC derivadas de C3H / HeJ o tBMMSC (0.1×10^6 células / 10 g de peso corporal) en ratones MRL / lpr a través de la vena de la cola a las 10 semanas de edad (n = 6). En el grupo de control, los ratones MRL / lpr recibieron PBS (n = 5). Todos los ratones se sacrificaron a las 12 semanas de edad para un análisis adicional. La concentración de proteína en la orina se midió utilizando el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad,). Coulter LH-750 (BECKMAN Coulter) midió la cantidad de glóbulos blancos de la sangre periférica.

35 Medición de autoanticuerpos, albúmina, sRANKL y CTX. Se recogieron muestras de suero de sangre periférica de ratones. Los autoanticuerpos, albúmina, sRANKL y CTX se analizaron mediante el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando kits comerciales disponibles (anticuerpos anti-dsDNA, ANA y albúmina, diagnóstico alfa; sRANKL, R&D Systems; CTX, Nordic Bioscience Diagnostics A / S) de acuerdo con las instrucciones de sus fabricantes. Los resultados fueron promediados en cada grupo. Las diferencias intragrupo se calcularon entre los valores medios.

40 Tinción de TRAP. Las secciones desparafinadas se volvieron a fijar con una mezcla de 50% de etanol y 50% de acetona durante 10 min. Las soluciones de tinción TRAP se elaboraron recientemente (1.6% de naftol AS-BI fosfato en N, N-dimetilformamida y 0.14% de sal de diazonio LB rojo violeta rápido, 0.097% de ácido tartárico y 0.04% de MgCl₂ en 0.2 M de tampón de acetato de sodio, pH 5.0) y mezclado en 1:10. Las secciones se incubaron en la solución durante 10 minutos a 37 °C bajo protección y se tiñeron con azul de toluidina. Todos los reactivos para la tinción TRAP se adquirieron en Sigma.

45 Histometría. El área del hueso trabecular se midió en secciones óseas con tinción con H&E. Para cuantificar la actividad de los osteoclastos en los huesos, se determinó el número de osteoclastos maduros mediante células TRAP positivas adheridas a la superficie del hueso. Cada número de células y área se midió a partir de cinco imágenes representativas por cada muestra utilizando una Imagen-J NIH, seguido de un cálculo de las medias. Los datos fueron promedios de las medias en cada grupo experimental. Los resultados fueron mostrados como cada porcentaje indicado.

50 Rescate de ratones irradiados con dosis letales. En cada grupo, se inyectaron 10×10^6 células en 50 ml de PBS o PBS solo como control en la vena de la cola de los ratones receptores 1 día después de la irradiación letal (8,5 Gy por ratón). La fecha de supervivencia de cada ratón fue registrada y analizada.

Estadística. Se utilizó la prueba t de Student para analizar la diferencia estadística. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron significativos.

Ejemplo 1

5 Un subconjunto de BMMSC no se adhiere a las placas de cultivo de plástico, pero se adhiere a las placas de cultivo recubiertas con ECM.

Para determinar si un subconjunto de BMMSC permanece en suspensión de cultivo, sembramos 15×10^6 células nucleares de médula ósea (ANC) en condiciones de cultivo plástico regulares durante 2 días y posteriormente transplantamos todas las células no unidas a ratones inmunocomprometidos por vía subcutánea utilizando fosfato de hidroxapatita tricálcico (HA / TCP) como vehículo. A las 8 semanas posteriores al trasplante, el hueso recién formado se identificó en los trasplantes mediante tinción con H&E (Figura 1A), lo que sugiere que la suspensión de cultivo de BMMSC puede contener células con una capacidad de diferenciación en células formadoras de hueso in vivo. La evidencia adicional indicó que la matriz extracelular (ECM) producida por las BMMSC (BMMSC-ECM) pueden adherir un mayor número de CFU-F en comparación con los cultivos de plástico (Figura 10; Chen et al., 2007). Por lo tanto, recogimos el medio de cultivo 2 días después del cultivo de CFU-F primario y cargamos el medio en placas recubiertas con BMMSC-ECM (Figura 1B). Un subconjunto de BMMSC (llamado tBMMSC) en la suspensión fue capaz de adherirse al BMMSC-ECM y formar CFU-F (Figura 1B), a una menor incidencia en comparación con el número de CFU-F generadas a partir de BMMSC regulares (Figura 1C). Se encontró que las tBMMSC expresaban marcadores asociados a células madre mesenquimales (CD73, antígeno de células madre 1 [Sca-1], Octámero 4 [Oct4] y antígeno específico de etapa 4 [SSEA4]) como lo demuestra el análisis de citometría de flujo (Figura 1D). Cuando se compararon con las BMMSC regulares, las tBMMSC expresaron niveles significativamente más altos de Sca-1 (87.74% vs. 52.16% en las BMMSC) y Oct4 (40.7% vs. 14.08% en BMMSC), ambas moléculas de superficie progenitora anteriores para células madre mesenquimales. A fin de caracterizar las propiedades de las células madre de las tBMMSC, se recopilaron las tBMMSC positivas para SSEA4 y se evaluó su tasa de proliferación mediante el etiquetado de bromodeoxi uridina (BrdU). Encontramos que las tBMMSC tenían una tasa de captación de BrdU significativamente elevada en comparación con las BMMSC regulares (Figura 1E). Además, utilizamos un ensayo de cultivo celular continuo para indicar que SSEA4⁺ tBMMSC adquirió un número significativamente mayor de duplicación de la población (Figura 1F). Estos datos implican que las tBMMSC son distintas de las BMMSC regulares en términos de fijación, proliferación y auto renovación.

Para examinar el potencial de diferenciación multipotente, revelamos que las tBMMSC son análogas a las BMMSC en la expresión de fosfatasa alcalina (ALP), la acumulación de nódulos mineralizados en los cultivos inductivos osteogénicos y la regeneración ósea cuando se trasplantan en ratones inmunocomprometidos utilizando HA / TCP como vehículo (Figuras 11 A, 11B). Además, demostramos que las tBMMSC eran similares a las BMMSC regulares en la formación de células positivas al Rojo de aceite O en condiciones inductivas adipogénicas, expresión de gamma receptor activado por proliferador de peroxisoma de genes adipogénicos 2 (PPAR γ 2) y lipoproteína lipasa (LPL) y diferenciación en condrocitos bajo condiciones inductivas condrogénicas con expresión de proteoglicano, colágeno tricrómico positivo y colágeno tipo II (Figuras 11C, 11D). Estos datos confirman que las tBMMSC son un nuevo subconjunto de BMMSC no adherentes.

Ejemplo 2

Las tBMMSC Expresan Telomerasa y CD34, pero se distinguen de las Células madre hematopoyéticas

40 Con el fin de caracterizar tBMMSC, se utilizó el análisis de citometría de flujo para examinar si tBMMSC expresaba marcadores de células hematopoyéticas. Encontramos que el 17.4% de las tBMMSC, pero no las BMMSC regulares, expresaban CD34, un HSC y un marcador de células endoteliales (Figura 2A). Las BMMSC (21.25%) y las tBMMSC (31.22%) expresaron CD45, otro marcador hematopoyético, en la pasada 2 (Figura 2A). Tanto las BMMSC como las tBMMSC fueron negativas a la tinción del anticuerpo CD11b (no se muestran los datos), excluyendo que las tBMMSC se deriven de las células del linaje monocito / macrófago. Es importante destacar que tBMMSC CD 34⁺ coexpresó marcadores asociados con BMMSC (CD73 o Oct4), como lo demuestra el análisis de citometría de flujo (Figura 2B). El análisis de transferencia Western confirmó que las tBMMSC expresaban CD34, CD73 y CD105 (Figura 2C), y las BMMSC regulares expresaban CD73 y CD 105, pero carecían de la expresión de CD34 (Figura 2C). Las tBMMSC muestran una expresión continua de CD34 desde el paso 1 al 5, sin embargo, los niveles de expresión aparecen reducidos después del paso 3 (Figura 2D). Para verificar aún más la expresión de CD34 en tBMMSC, usamos doble inmunocitotinción para mostrar que las tBMMSC coexpresan CD34 con los marcadores mesenquimales CD73 y CD105 (Figuras 2E, 2F) y las BMMSC regulares son negativas para la tinción de anticuerpos anti-CD34 (Figuras 2E, 2F). De manera más interesante, encontramos que las tBMMSC poseían niveles significativamente más altos de actividad de telomerasa en comparación con las BMMSC regulares mediante el ensayo de PCR-ELISA y el análisis de transferencia Western (Figuras 2G, 2H), lo que implica que las tBMMSC pueden ser una subpoblación primitiva de las BMMSC.

A continuación, utilizamos la citometría de flujo para clasificar las células doble positivas CD34 y CD73 de ANCs de médula ósea y recuperamos un 3.77% de células positivas doble (Figura 2I). Estas células doble positivas CD34 y CD73 muestran características de células madre mesenquimales, incluida la formación de agrupaciones de colonias individuales (Figura 2J) y la diferenciación en células osteogénicas y adipogénicas (no se muestran los datos), lo que indica un enfoque factible para aislar directamente células de tipo tBMMSC de médula espinal. Las BMMSC CD34⁺ / CD73⁺ son análogas a las tBMMSC en términos de tener un mayor nivel de actividad de telomerasa y una alta producción de NO en comparación con las BMMSC regulares (Figuras 2K, 2L).

Para excluir la posible contaminación por HSC en tBMMSC, utilizamos aspirina (TAT) para elevar el nivel de telomerasa en BMMSC CD34- regulares (Figura 7C). Después del tratamiento con aspirina, las BMMSC muestran unos niveles más altos de expresión de Sca-1 y Oct4 en comparación con las BMMSC, pero a un nivel más bajo que las tBMMSC (Figura 3A, 3B). Es importante destacar que las BMMSC CD 34 - tratadas con aspirina (TAT) adquieren una expresión de CD34 positiva (Figura 3A). El análisis de transferencia Western confirmó que las BMMSC tratadas con aspirina (TAT) expresan CD34, pero a un nivel más bajo que las tBMMSC (Figura 3C). Estos datos sugieren que la expresión de CD34 en BMMSC no se debe a la contaminación por HSC.

En general, se cree que la expresión de CD34 está asociada con HSC y poblaciones endoteliales. Las HSC pueden diferenciarse en el linaje de células hematopoyéticas y rescatar a los sujetos irradiados con dosis letales. Por lo tanto, utilizamos un medio de diferenciación hematopoyética para tratar tBMMSC, BMMSC tratadas con aspirina (TAT) y BMMSC regulares y encontramos que todas estas células no logran diferenciarse en el linaje de células hematopoyéticas tal como se aprecia en células de médula ósea y células de linaje que sirven como controles positivos capaces de formar grupos de colonias (Figura 4A). A continuación, infundimos tBMMSC sistémicamente para rescatar a ratones irradiados con dosis letales y encontramos que las tBMMSC, pero no las BMMSC regulares, pueden extender la vida útil de los ratones irradiados con dosis letales (Figura 4B). Sin embargo, las tBMMSC no pudieron rescatar ratones irradiados con dosis letales, tal como se muestra en el grupo de médula ósea (Figura 4B). Estas evidencias experimentales también indican que la expresión de CD34 en tBMMSC no se debe a la contaminación por HSC.

Ejemplo 3

Las tBMMSC poseen funciones inmunomoduladoras superiores a través de una alta producción de óxido nítrico (NO).

Recientemente, las propiedades inmunomoduladoras se identificaron como una importante característica de las células madre de las BMMSC, lo que llevó a utilizar BMMSC infundidas sistémicas para tratar una variedad de enfermedades inmunitarias (Nauta et al., 2007; Uccelli et al., 2007, 2008). Aquí encontramos que las tBMMSC mostraron una capacidad significativamente mayor para la producción de NO en comparación con las BMMSC regulares cuando se trataron con interferón gamma (IFN γ) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (Figura 5A). Se sabe que el NO desempeña un papel crítico en la inmunosupresión mediada por BMMSC (Ren et al., 2008), por lo tanto, evaluamos el papel funcional de la alta producción de NO en las propiedades inmunomoduladoras asociadas a tBMMSC. Las células del bazo (SP) se activaron con la estimulación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días y a continuación se cultivaron conjuntamente con tBMMSC o BMMSC regulares en presencia del inhibidor general de óxido nítrico sintasa (NOS), NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), o el inhibidor de NOS inducible (iNOS), 1400W, utilizando un sistema de cultivo Transwell. Se verificó la eficacia de L-NMMA y 1400W para inhibir la producción de NO en BMMSC (Figura 12). Aunque tanto las tBMMSC como las BMMSC regulares fueron capaces de inhibir la viabilidad celular de las células SP activadas, las tBMMSC mostraron una inhibición marcada de la viabilidad de las células SP sobre la de las BMMSC regulares (Figura 5B). Curiosamente, tanto L-NMMA como 1400W fueron capaces de bloquear significativamente la viabilidad celular inducida por las tBMMSC, pero no por las BMMSC regulares, de las células SP activadas (Figuras 5C, 5D).

Además, el análisis de citometría de flujo indicó que tanto las tBMMSC como las BMMSC regulares inducen la apoptosis de las células SP activadas en el sistema de cultivo Transwell, incluidas las células apoptóticas tempranas (Figura 5E) y las células apoptóticas tardías y muertas (Figura 5H). Sin embargo, las tBMMSC muestran una capacidad elevada para inducir la apoptosis de células SP activadas en comparación con las BMMSC regulares (Figuras 5E, 5H). Cuando se agregaron L-NMMA y 1400W a los cultivos, el número de células SP apoptóticas tempranas y tardías se redujo significativamente tanto en tBMMSC como en los grupos de BMMSC regulares (Figuras 5F, 5G, 5I, 5J). El tratamiento con 1400W dio como resultado una inhibición significativamente mayor de las células SP apoptóticas tempranas en el grupo tBMMSC en comparación con el grupo BMMSC regular (Figura 5G). Estos datos sugieren que se requiere producción de NO para la inmunomodulación mediada por BMMSC.

A continuación, co-cultivamos células T nativas con tBMMSC o BMMSC regulares en presencia de IL-2 y factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1). Encontramos que las tBMMSC mostraron una regulación al alza significativa de los niveles de células T reguladoras (Tregs) de CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ en comparación con las

BMMSC regulares (Figura 5K). Tanto L-NMMA como 1400W fueron capaces de inhibir la regulación positiva inducida por BMMSC y tBMMSC de las Treg, tal como se muestra en el análisis de citometría de flujo (Figuras 5L, 5M). El efecto regulador sobre las Treg fue más significativo en el grupo tBMMSC en comparación con el grupo BMMSC (Figuras 5L, 5M). Estos datos verificaron además el papel del NO en el efecto inmunomodulador inducido por tBMMSC.

Ejemplo 4

El trasplante de tBMMSC mejora la función de múltiples órganos en ratones MRL / lpr.

Para examinar las propiedades inmunomoduladoras in vivo de las tBMMSC, se infundieron tBMMSC y BMMSC alogénicas en ratones MRL / lpr a las 10 semanas de edad y se analizó la respuesta al tratamiento a las 12 semanas de edad (Figura 6A). Descubrimos que tanto las tBMMSC como las BMMSC eran capaces de mejorar el trastorno de la membrana basal glomerular inducida por SLE (Figura 6B) y reducir el nivel de proteína en la orina (Figura 6C).

Parece que las tBMMSC fueron superiores en comparación con las BMMSC en términos de reducir los niveles generales de proteínas en la orina (Figuras 6C). Tal como era de esperar, los ratones MRL / lpr mostraron un aumento notable en los niveles de autoanticuerpos, incluidos los anticuerpos IgG e IgM anti-ADN de doble hebra (dsDNA) (Figuras 6D, 6E) y anticuerpos anti-nucleares (ANA; Figuras 6F) en la sangre periférica. Aunque la infusión de tBMMSC y BMMSC mostró niveles reducidos significativos de dsDNA IgG, anticuerpos IgM y ANA en sangre periférica (Figuras 6D-F), las tBMMSC mostraron un efecto terapéutico superior para reducir los niveles de anticuerpos y ANA de dsDNA IgG cuando se comparó con el grupo de BMMSC (Figuras 6D, 6F). Además, la disminución de los niveles de albúmina sérica en ratones MRL / lpr se recuperó mediante la infusión de tBMMSC y BMMSC (Figura 6G), pero el tratamiento con tBMMSC produce una recuperación más significativa que el tratamiento con BMMSC (Figura 6G).

A continuación, utilizamos el análisis de citometría de flujo para revelar que las tBMMSC muestran una mayor efectividad en la recuperación del nivel disminuido de $CD4^+ CD25^+ Foxp3^{++}$ Tregs y mayor número de $CD4^+ IL17^+ IFN\gamma^-$ linfocitos T en sangre periférica en comparación con las BMMSC (Figura 6H, 6I). Además, demostramos que las tBMMSC son superiores a las BMMSC en términos de reducir el número aumentado de osteoclastos positivos a la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) en la epífisis distal del fémur de ratones MRL / lpr (Figura 13A), unos niveles séricos elevados del ligando NF- κ B (sRANKL) soluble, un factor crítico para la osteoclastogénesis (Figura 13B) y los marcadores de resorción ósea de los telopéptidos C-terminales del colágeno tipo I (CTX, Figura 13C). Estos datos sugieren que las tBMMSC muestran un efecto terapéutico superior para los trastornos del SLE en comparación con las BMMSC.

Ejemplo 5

La producción de NO en BMMSC es Modulada por la Actividad de la Telomerasa Junto con la Señalización de Wnt / β -catenina

Dado que se observó una actividad de telomerasa elevada en la producción de NO en las tBMMSC, es importante aclarar si la actividad de la telomerasa rige la producción de NO en las tBMMSC. Encontramos que el inhibidor de la telomerasa III es eficaz para inhibir la actividad de la telomerasa y para reducir la producción de NO en tBMMSC (Figuras 7A, 7B). También se encontraron efectos similares del inhibidor de la telomerasa en las BMMSC regulares (Figura 7C, 7E). En contraste, el tratamiento con aspirina (TAT) conduce a una actividad significativamente elevada de la telomerasa, a la expresión de telomerasa transcriptasa inversa (TERT) y a la producción de NO en BMMSC (Figura 7C-E). Estos datos implican que la actividad de la telomerasa puede estar asociada con la producción de NO en las BMMSC.

Recientemente, se ha informado que la telomerasa modula directamente la señalización de Wnt / beta-catenina sirviendo como un cofactor en un complejo transcripcional de beta-catenina (Park et al, 2009). Por lo tanto, se evaluó si la producción de NO asociada a la actividad de la telomerasa en las BMMSC podría estar regulada a la baja por el inhibidor de Wnt, Dickkopf 1 (DKK1). De manera interesante, encontramos que DKK1 fue capaz de bloquear significativamente la producción de NO inducida por la aspirina en las BMMSC cuando se agregó a los cultivos antes del tratamiento con aspirina (TAT) (Figura 7F). La eficacia de DKK1 en la reducción del nivel de β -catenina activada se confirmó mediante análisis de transferencia Western (Figura 7G). Además, encontramos que la aspirina (TAT) fue capaz de bloquear parcialmente la regulación por disminución inducida por DKK1 de la beta-catenina activada (Figura 7G). Para examinar el mecanismo por el cual DKK1 inhibe la producción de NO inducida por aspirina (TAT), demostramos que DKK1 es capaz de bloquear la actividad de la telomerasa inducida por aspirina (TAT) (Figura 7H). Estos datos indican que la producción de NO impulsada por la telomerasa está acoplada con la señalización Wnt / β -catenina.

A continuación, determinamos si la señalización de Wnt / beta-catenina afectó la producción de NO en las BMMSC. Utilizamos Chiron 99021 (Chiron) para tratar BMMSC durante 7 días y mostramos una elevación de la beta-catenina activa de una manera dependiente de la dosis (Figura 7I), lo que confirma la eficacia de Chiron como activador de Wnt / beta-catenina. A continuación, mostramos que el tratamiento con Chiron regulaba al alza la producción de NO en BMMSC de una manera dependiente de la dosis (Figura 7J), junto con una actividad de telomerasa elevada en BMMSC (Figura 7K). Además, mostramos que la actividad de la telomerasa inducida por Chiron y la producción de NO se podían bloquear durante 3 días de tratamiento previo con inhibidor de la telomerasa III (Figuras 7K, 7L). Estos hallazgos sugieren que la telomerasa y la Wnt / beta-catenina colaboran para mejorar la actividad de la telomerasa e inducen la producción de NO en las BMMSC.

10 Ejemplo 6

El tratamiento con aspirina genera BMMSC activadas por inmunomodulación

Para determinar si la telomerasa afecta las propiedades inmunomoduladoras de las BMMSC regulares, demostramos que la aspirina (TAT) es capaz de promover la reducción inducida por BMMSC de la viabilidad de las células SP activadas y la elevación de la apoptosis temprana y tardía de las células SP activadas (Figuras 14A-14C). Estos datos sugieren un potencial de inducir la actividad de la telomerasa en BMMSC regulares para mejorar sus funciones inmunomoduladoras, tal como se aprecia en las tBMMSC.

Con el fin de confirmar el efecto terapéutico de las BMMSC tratadas con aspirina (TAT) (TAT-BMMSC), infundimos 0.1×10^6 o 0.01×10^6 TAT-BMMSC en ratones MRL / lpr a las 10 semanas de edad y se analizó la respuesta al tratamiento a las 12 semanas de edad. Encontramos que tanto las TAT-BMMSC como las BMMSC tratadas con aspirina fueron capaces de reducir el nivel de proteína en la orina en comparación con los ratones MRL / lpr (Figura 8A). Las TAT-BMMSC fueron más eficaces para reducir los niveles generales de proteína en la orina en los grupos 0.1×10^6 y 0.01×10^6 en comparación con BMMSC. Parece que la infusión de 0.01×10^6 BMMSC no logra reducir significativamente los niveles de proteína en la orina (Figuras 8A). Aunque la infusión de TAT-BMMSC y BMMSC mostró niveles reducidos significativos de anticuerpos dsDNA IgG, IgM y ANA en sangre periférica (Figuras 8B-D), las TAT-BMMSC mostraron un efecto terapéutico superior para reducir los anticuerpos dsDNA IgG e IgM y los niveles de ANA en comparación con el grupo de BMMSC en los grupos de 0.1×10^6 y 0.01×10^6 (Figuras 8B-D). Además, ELISA y el análisis de citometría de flujo revelaron que TAT-BMMSC muestra una mayor eficacia en la reducción de los niveles séricos de IL17 en el grupo de 0.01×10^6 (Figura 8E) y el número de $CD4^+ IL17^+$ linfocitos T IFN γ tanto en 0.1×10^6 como en 0.01×10^6 (Figura 8F) y elevando el nivel de $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Tregs en el grupo 0.01×10^6 en comparación con BMMSC (Figura 8G). Estos datos indican que el número de BMMSC en la inmunoterapia podría reducirse significativamente con el tratamiento con activador de telomerasa ex vivo.

Ejemplo 7

La médula ósea humana contiene tBMMSC y el tratamiento con aspirina puede inducir que las BMMSC humanas normales se conviertan en tBMMSC con una mejor función inmunomoduladora. Cuando se agregó aspirina al medio de cultivo a $2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ o $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ durante 1 semana, existe un nivel significativamente mayor de actividad de la telomerasa en las BMMSC.

REFERENCIAS

- Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.
- 40 Anjos-Afonso, F., Bonnet, D. (2007) Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1⁺ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood* 109, 1298-1306. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Cancedda, R., Pennesi, G. (2007) Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 1175-1186.
- 45 Bernardo, M.E., Locatelli, F., Fibbe, W.E. (2009) Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1176, 101-17.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Robey, P.G. (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19, 180-192.
- Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. (2001) *Nat. Immunol.* 2, 907-916.

- Biihring, H.J., Battula, V.L., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., Vogel, W. (2007) Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 1106, 262-271.
- Chen, X., Armstrong, M.A., Li, G. (2006) Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol. Cell Biol.* 84, 413-421.
- 5 Chen, X.D., Dusevich, V., Feng, J.Q., Manolagas, S.C., Jilka, R.L. (2007) Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 22, 1943-1956.
- Clarke, E., McCann, S.R. (1989) Age dependent in vitro stromal growth. *Bone Marrow Transplant* 4, 596-597.
- 10 Conget, P.A., Minguell, J.J. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol.* 181, 67-73. Copland, I., Sharma, K., Lejeune, L., Eliopoulos, N., Stewart, D., Liu, P., Lachapelle, K., Galipeau, J. (2008) CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Exp. Hematol.* 36, 93-103.
- 15 Covas, D.T., Panepucci, R.A., Fontes, A.M., Silva, W.A. Jr., Orellana, M.D., Freitas, M.C., Neder, L., Santos, A.R., Peres, L.C., Jamur, M.C., Zago, M.A. (2008) Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profiles with CD 146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol.* 36, 642-654.
- Deschaseaux, F., Gindraux, F., Saadi, R., Obert, L., Chalmers, D., Herve, P. (2003) Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45medf low phenotype. *Br. J. Haematol.* 122, 506-517.
- 20 Eghbali-Fatourehchi, G., Lamsam, J., Fraser, D., Nagel, D., Riggs, B.L., Khosla, S. (2005) Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N. Engl. J. Med.* 352, 1959-1966.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393-403.
- 25 Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., Keiliss-Borok, I.V. (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331-340.
- Dillon, R.L., White, D.E., Muller, W.J. (2007) The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 26, 1338-1345.
- 30 Friedenstein, A.J. (1980) Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol. Blood Transfus* 25, 19-29.
- Galmiche, M.C., Koteliensky, V.E., Briere, J., Herve, P., Charbord, P. (1993) Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 82, 66-76.
- 35 Gang, E.J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C.A., Visser, J.W., Perlingeiro, R.C. (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109, 1743-1751.
- Gonzalez, M.A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Buscher, D., Delgado, M. (2009) Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136, 978-989.
- 40 Grasselli, A., Nanni, S., Colussi, C., Aiello, A., Benvenuti, V., Ragone, G., Moretti, F., Sacchi, A., Bacchetti, S., Gaetano, C., Capogrossi, M.C., Pontecorvi, A., Farsetti, A. (2008) Estrogen receptor-alpha and endothelial nitric oxide synthase nuclear complex regulates transcription of human telomerase. *Circ. Res.* 103, 34-42.
- Greco, S.J., Liu, K., Rameshwar, P. (2007) Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 3143-3154.

- Gronthos, S., Simmons, P.J. (1995) The growth factor requirements of STRO-1- positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 85, 924-940
- Gronthos, S., Simmons, P.J., Graves, S.E., Robey, P.G. (2001) Integrin- mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28, 174- 181
- 5 Gronthos, S., Zannettino, A.C., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A., Simmons, P.J. (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 116, 1827-1835.
- Haynesworth, S.E., Baber, M.A., Caplan, A.I. (1992) Cell surface antigens on human marrow- derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13, 69-80.
- 10 Henson, E.S., Gibson, S.B. (2006) Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal.* 18, 2089-2097.
- Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., Jones, R.A., Straszynski, L., Meredith, D.M., Markham, A.F., Jack, A., Emery, P., McGonagle, D. (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 46, 3349-3360.
- 15 Koç, O.N., Gerson, S.L., Cooper, B.W., Dyhouse, S.M., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Lazarus, H.M. (2000) Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high- dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 18, 307-316.
- Kwan, M.D., Slater, B.J., Wan, D.C., Longaker, M.T. (2008) Cell-based therapies for skeletal regenerative medicine. *Hum. Mol. Genet.* 17, R93-98. Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, EL, Lewis, I, Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A., Fibbe, W., Ringden, O. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363,1439-1441.
- 20 Lee, R.H., Seo, M.J., Reger, R.L., Spees, J.L., Pulin, A.A., Olson, S.D., Prockop, D.J. (2006) Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105,17438-17443.
- 25 Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Zhang, C, Bartold, P.M., Gronthos, S., Shi, S., Wang, S. (2008) Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells* 26, 1065-1073.
- Lund, T.C., Tolar, J., Orchard, P.J. (2008) Granulocyte colony- stimulating factor mobilized CFU-F can be found in the peripheral blood but have limited expansion potential. *Haematologica.* 93, 908-912. Martinez, C, Hofmann, T.J., Marino, R., Dominici, M., Horwitz, E.M. (2007) Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSC. *Blood* 109, 4245-4248.
- 30 Miura, M., Chen, X-D., Allen, M.R., Bi, Y., Gronthos, S., Seo, B-M., Lakhani, S., Flavell, R.A., Feng, X-H., Robey, P.G., Young, M., and Shi, S. (2004) A crucial role of Caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *J. Clin. Invest.* 114, 1704-1713.
- 35 Nauta, A.J., Fibbe, W.E. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-3506.
- Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P.G., Leelahavanichkul, K., Roller, B.H., Brown, J.M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R.A., Mezey, E. (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E (2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* 15, 42-49.
- 40 Niedbala, W., Cai, B., Liu, H., Pitman, N., Chang, L., Liew, F.Y. (2007) Nitric oxide induces CD4⁺CD25⁺ Foxp3 regulatory T cells from CD4⁺CD25⁺ T cells via p53, IL-2, and OX40. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 104, 15478-15483.
- Noort, W.A., Kruisselbrink, A.B., in't Anker, P.S., Kruger, M., van Bezooijen, R.L., de Paus, R.A., Heemskerk, M.H., Lowik, C.W., Falkenburg, J.H., Willemze, R., Fibbe, W.E. (2002) Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34 cells in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol* 30, 870-878.
- 45

- Ogawa, M., Larue, A.C., Watson, P.M., Watson, D.K. (2010) Hematopoietic stem cell origin of mesenchymal cells: opportunity for novel therapeutic approaches. *Int. J. Hematol.* 91, 353-359.
- 5 Olmsted-Davis, E.A., Gugala, Z., Camargo, F., Gannon, F.H., Jackson, K., Kienstra, K.A., Shine, H.D., Lindsey, R.W., Hirschi, K.K., Goodell, M.A., Brenner, M.K., Davis, A.R. (2003) Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 15877- 15882.
- Owen, M., Friedenstein, A.J. (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba. Found Symp.* 136, 42-60.
- 10 Panetta, N.J., Gupta, D.M., Quarto, N., Longaker, M.T. (2009) Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med.* 51, 25-41.
- Parekkadan, B., Tilles, A.W., Yarmush, M.L. (2008) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independent of regulatory T cells. *Stem Cells* 26, 1913- 1919.
- 15 Park, J.I., Venteicher, A.S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., McLaughlin, M., Veenstra, T.D., Nusse, R., McCrea, P.D., Artandi, S.E. (2009) Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature.* 460, 66-72.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, MA, Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- 20 Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G.W., Kidd, M., Moadsiri, A, Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B., Bartholomew, A. (2008) IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur. J. Immunol.* 38, 1745-1755.
- Prockop, D.J. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- 25 Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lummi, C, Deliliers, G.L. (2002) Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol.* 30, 783-791. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A,L, Zhao, R.C., Shi, Y. (2008) Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2, 141-150.
- 30 Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, L, Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., Bianco, P. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131, 324-336.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, L, Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K. (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228-234.
- 35 Simmons, P.J., Torok-Storb, B. (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55- 62.
- Simmons, P.J., Torok-Storb, B. (1991) CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78, 2848-2853.
- 40 Shi, S., Gronthos, S. (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* 18, 696-704. Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Counter, CM., Robey, P.G., and Wang, C-Y. (2002) Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat. Biotechnol.* 20, 587-591.
- Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., Simmons, P.J. (2003) Mesenchymal stem cells. *Arch. Med. Res.* 34, 565-571.
- 45 Sordi, V., Malosio, M.L., Marchesi, F., Mercalli, A., Melzi, R., Giordano, T., Belmonte, N., Ferrari, G., Leone, B.E., Bertuzzi, F., Zerbini, G., Allavena, P., Bonifacio, E., Piemonti, L. (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells

express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 106, 419- 427.

5 Sun, L., Akiyama, K., Zhang, H., Yamaza, T., Hou, Y., Zhao, S., Xu, T., Le, A., Shi, S. (2009) Mesenchymal Stem Cell Transplantation Reverses Multi-Organ Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus Mice and Humans. *Stem Cells* 27,1421-1432.

Tessier, M., Woodgett, J.R. (2006) Serum and glucocorticoid-regulated protein kinases: variations on a theme. *J. Cell Biochem.* 98, 1391-1407.

Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726-736.

10 Uccelli, A., Pistoia, V., Moretta, L. (2007) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 28, 219-226.

Wlodarski, K.H., Galus, R., Wlodarski, P. (2004) Non-adherent bone marrow cells are a rich source of cells forming bone in vivo. *Folia Biol (Praha).* 50, 167- 73.

15 Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G., Uccelli, A. (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy. *Blood* 106, 1755-1761.

20 Zhang, Z.L., Tong, J., Lu, R.N., Scutt, A.M., Goltzman, D., Miao, D.S. (2009) Therapeutic potential of non-adherent BM-derived mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Bone Marrow Transplant.* 43, 69-81. Zhang, X., Zanello, L.P. (2008) Vitamin D receptor-dependent 1 alpha,25(OH)₂ vitamin D₃-induced anti-apoptotic PI3K/AKT signaling in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 23, 1238-1248.

Zhou, K., Zhang, H., Jin, O., Feng, X., Yao, G., Hou, Y., Sun, L. (2008) Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice. *Cell Mol. Immunol.* 5, 417-424.

REIVINDICACIONES

1. Células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas en que las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas
 5 son células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas CD34⁺, y en que las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas CD34⁺ no forman CFU-F (fibroblastos de unidades de formación de colonias) en cultivos de plástico, pero se adhieren a la matriz extracelular producida por células madre mesenquimales.
2. Las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas CD34⁺ de acuerdo con la reivindicación 1, en que las células madre son CD73⁺.
 10
3. Las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas CD34⁺ de acuerdo con la reivindicación 1, en que dichas células madre son CD105⁺.
4. Las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas CD34⁺ de acuerdo con la reivindicación 1, en que dichas células madre son capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos.
 15
5. Las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas CD34⁺ de acuerdo con la reivindicación 1, en que dichas células madre mesenquimales de médula ósea tienen una alta actividad de telomerasa y se derivan de células no adherentes en cultivo de plástico.
 20
6. Las células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas CD34⁺ de acuerdo con la reivindicación 5, en que las células madre mesenquimales de médula ósea son SSEA4⁺.
7. Un método para aislar células madre mesenquimales de médula ósea con alto contenido de telomerasa que comprende:
 25 cultivar una muestra de médula ósea derivada de todas las células nucleares en un sustrato de plástico;
 30 eliminar las células que no se adhieren al sustrato; cultivar cualquier célula en el medio en una matriz celular extracelular producida por células madre mesenquimales (ECM);
 35 recolectar colonias que forman células unidas en la matriz celular extracelular producida por células madre mesenquimales (ECM).
8. Células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas que tienen una alta actividad de telomerasa para su utilización en un método para modular el sistema inmunitario de un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de dichas células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas.
 40
9. Células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas para su utilización de acuerdo con la reivindicación 8, en que dichas células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas son CD34⁺ y preparadas por medio del tratamiento de células madre mesenquimales de médula ósea humana con una cantidad efectiva de agente inductor de telomerasa.
 45
10. Células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas para su utilización de acuerdo con la reivindicación 9, en que dicho agente inductor de telomerasa es aspirina o un compuesto con una estructura química similar a la aspirina.
11. Células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas para su utilización de acuerdo con la reivindicación 10, en que dicho agente inductor de telomerasa es aspirina.
 50
12. Células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas para su utilización de acuerdo con la reivindicación 11, en que la cantidad efectiva de aspirina se encuentra en el intervalo de 2 microgramos / mililitro a 50 microgramos / mililitro durante una semana.
13. Células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas para su utilización de acuerdo con la reivindicación 8, en que el paciente tiene un desorden inmunitario.
 55
14. Células madre mesenquimales de médula ósea humana aisladas para su utilización de acuerdo con la reivindicación 8, en que el paciente tiene lupus eritematoso sistémico.

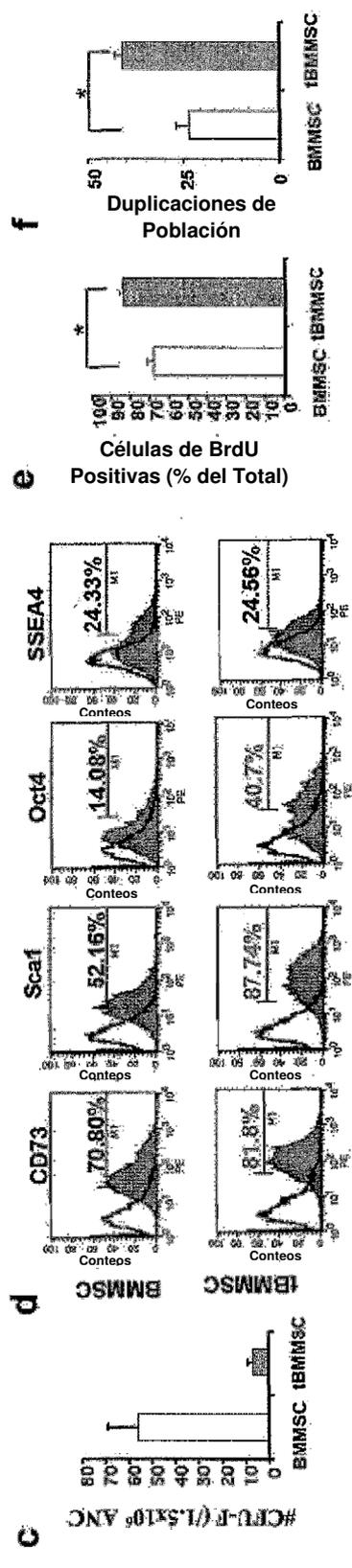
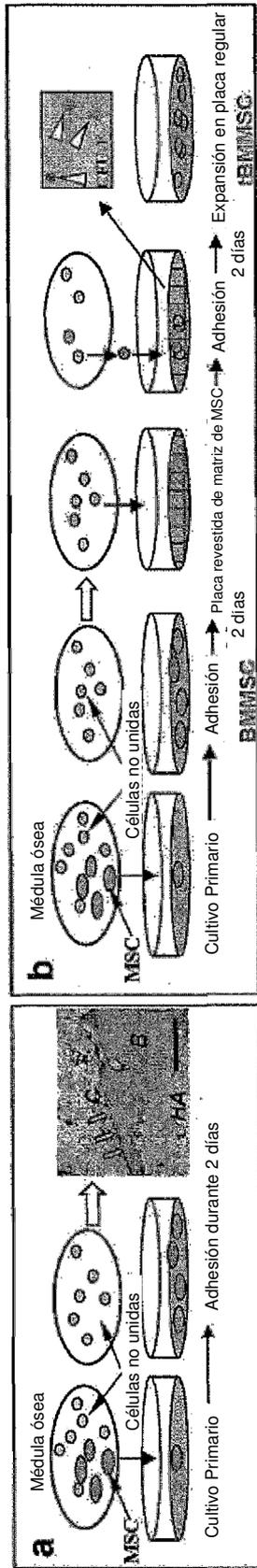


Fig. 1

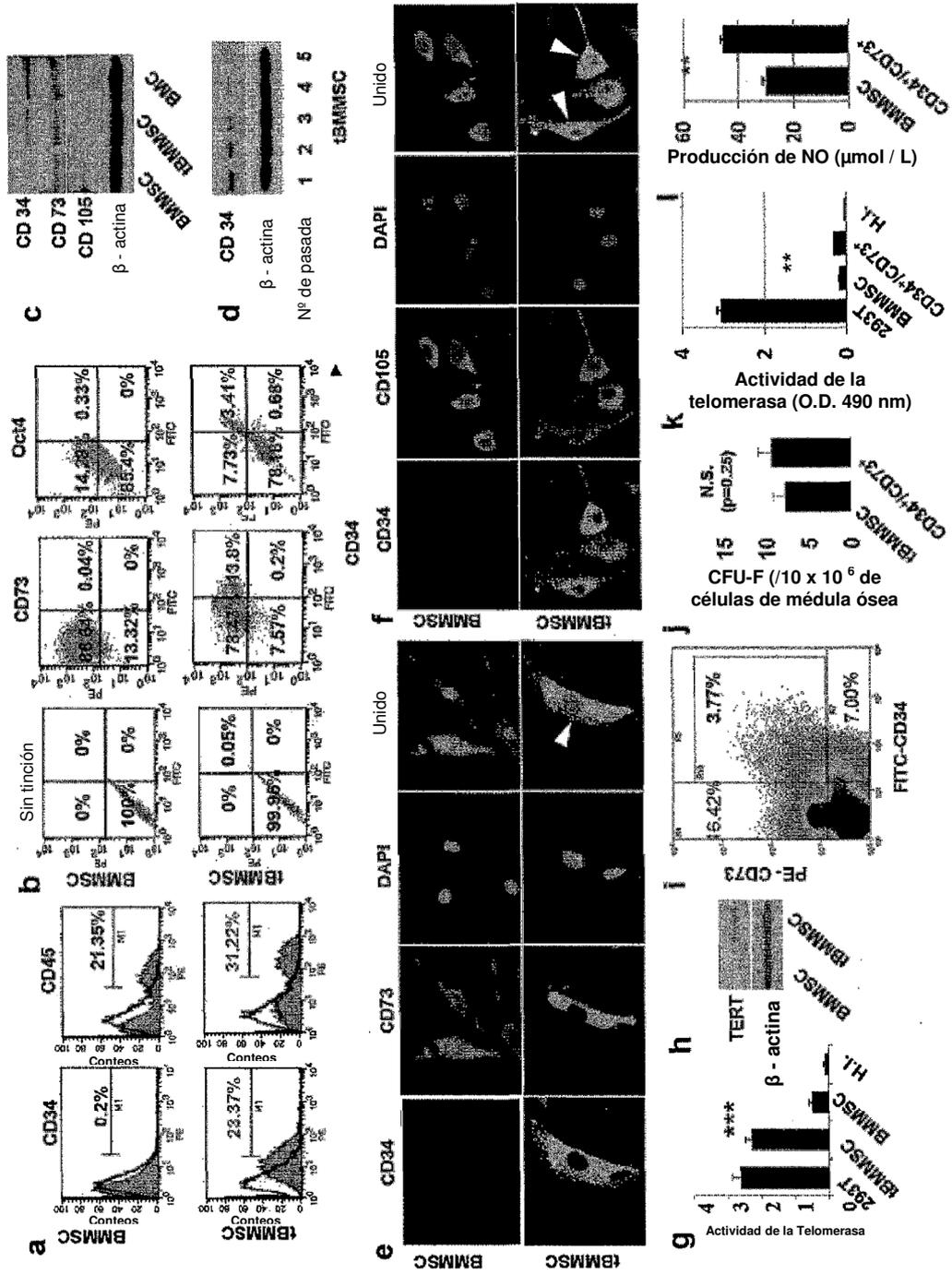


Fig. 2

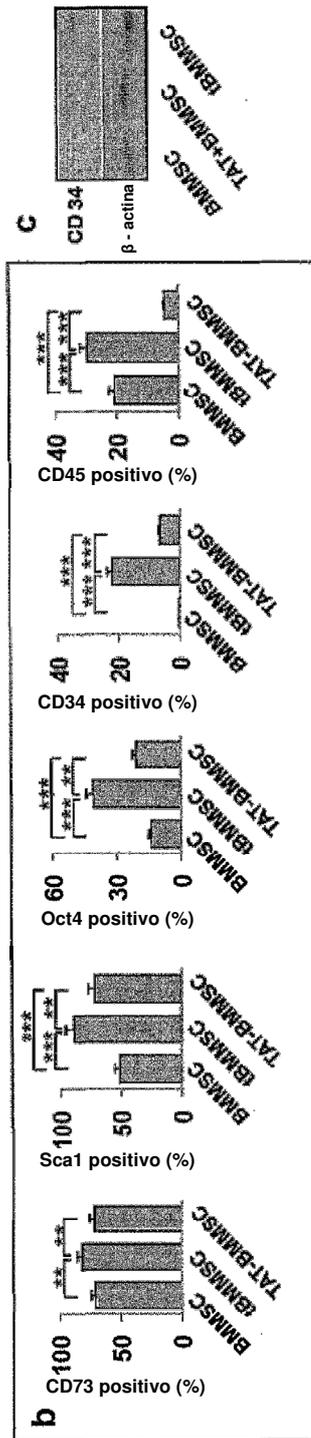
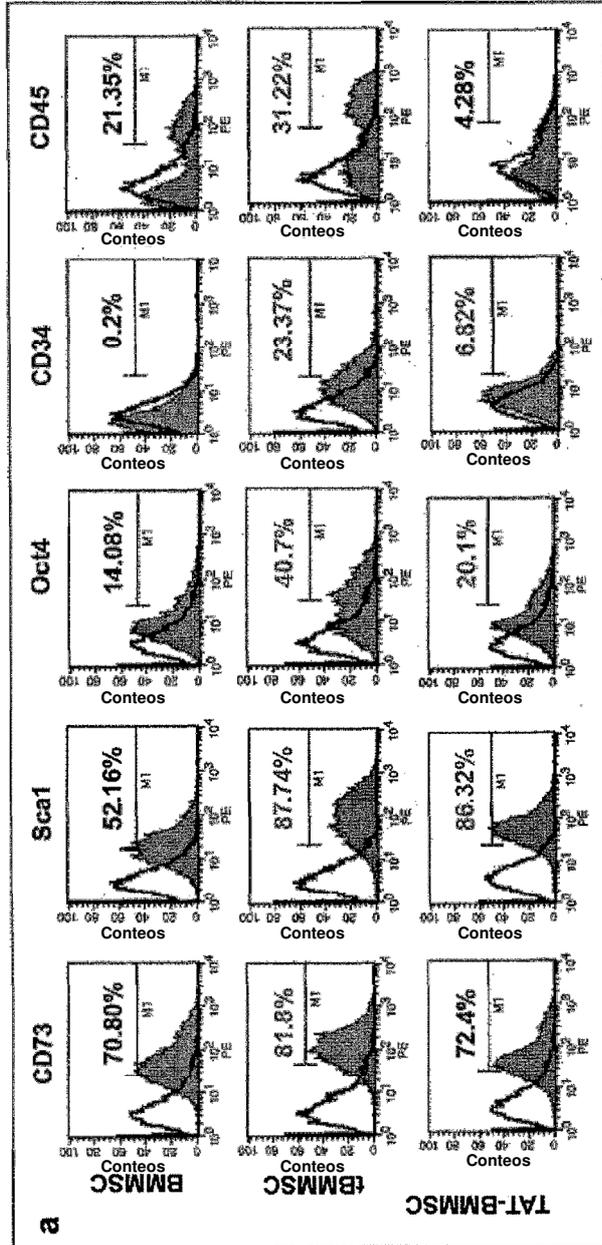


Fig. 3

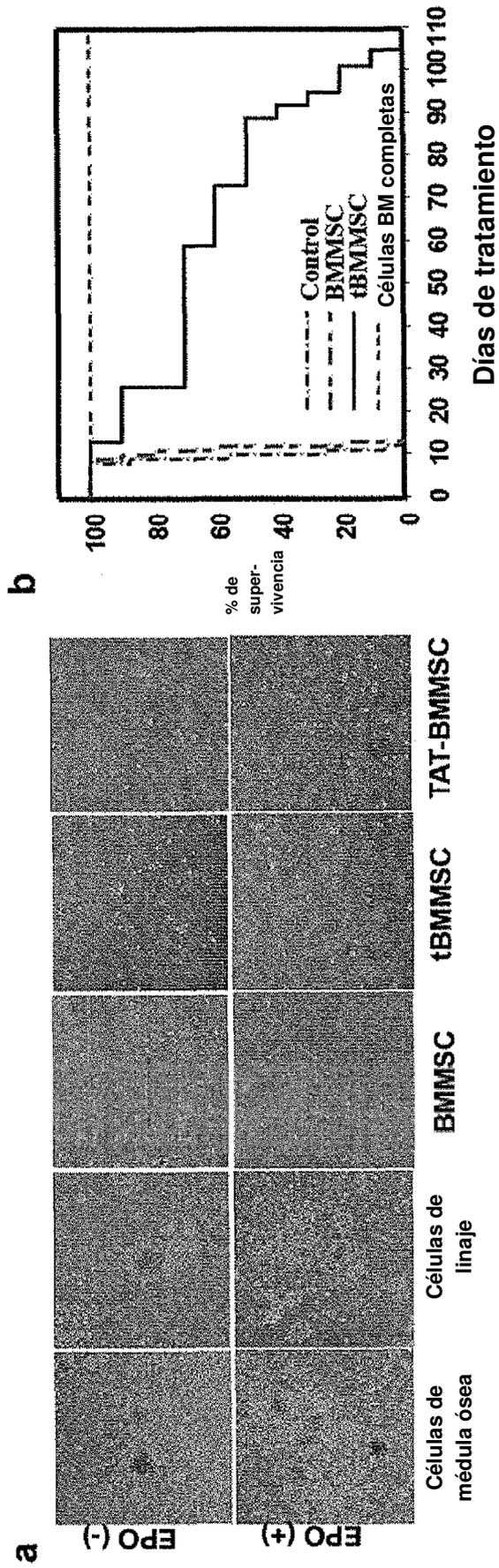


Fig. 4

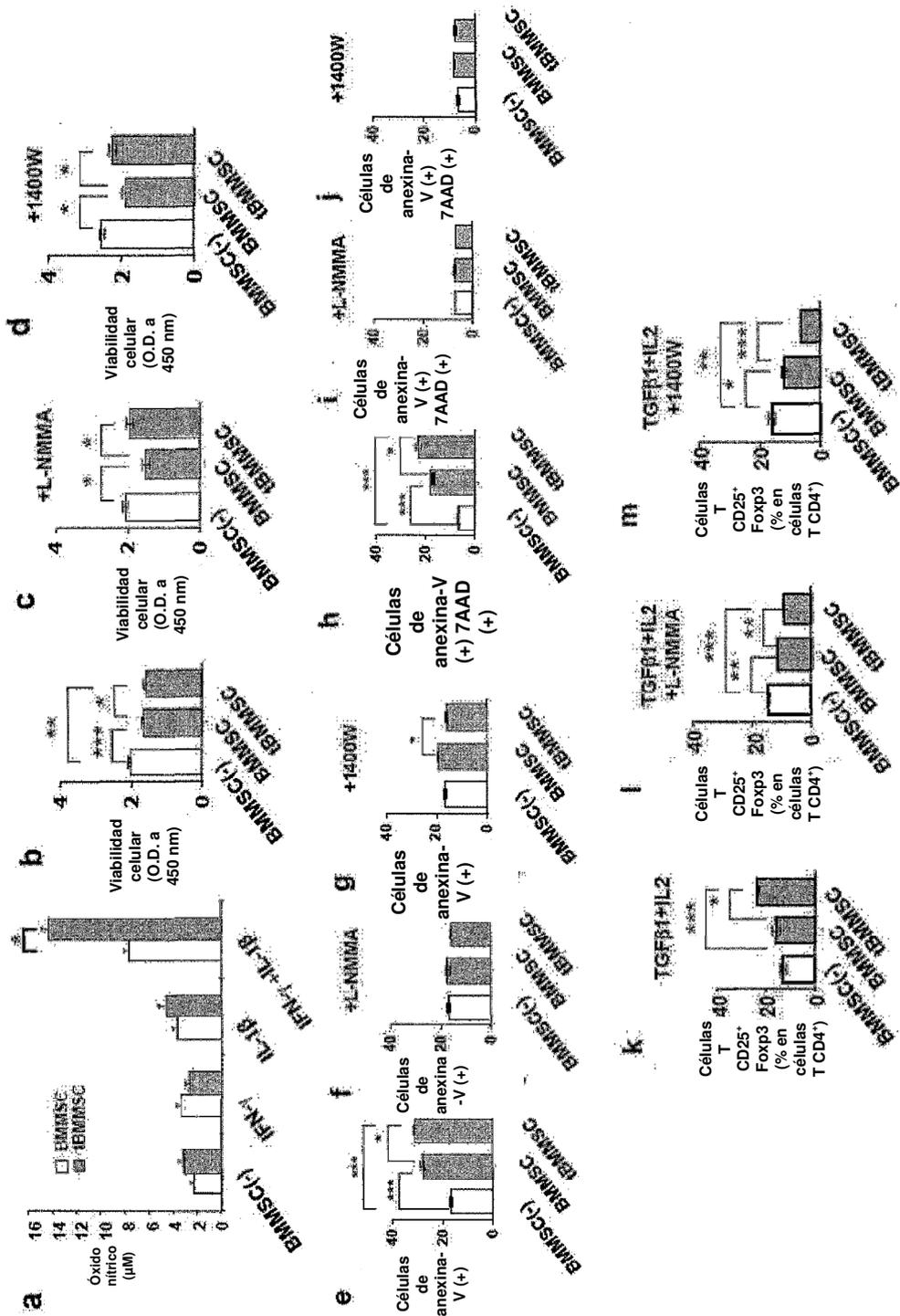


Fig. 5

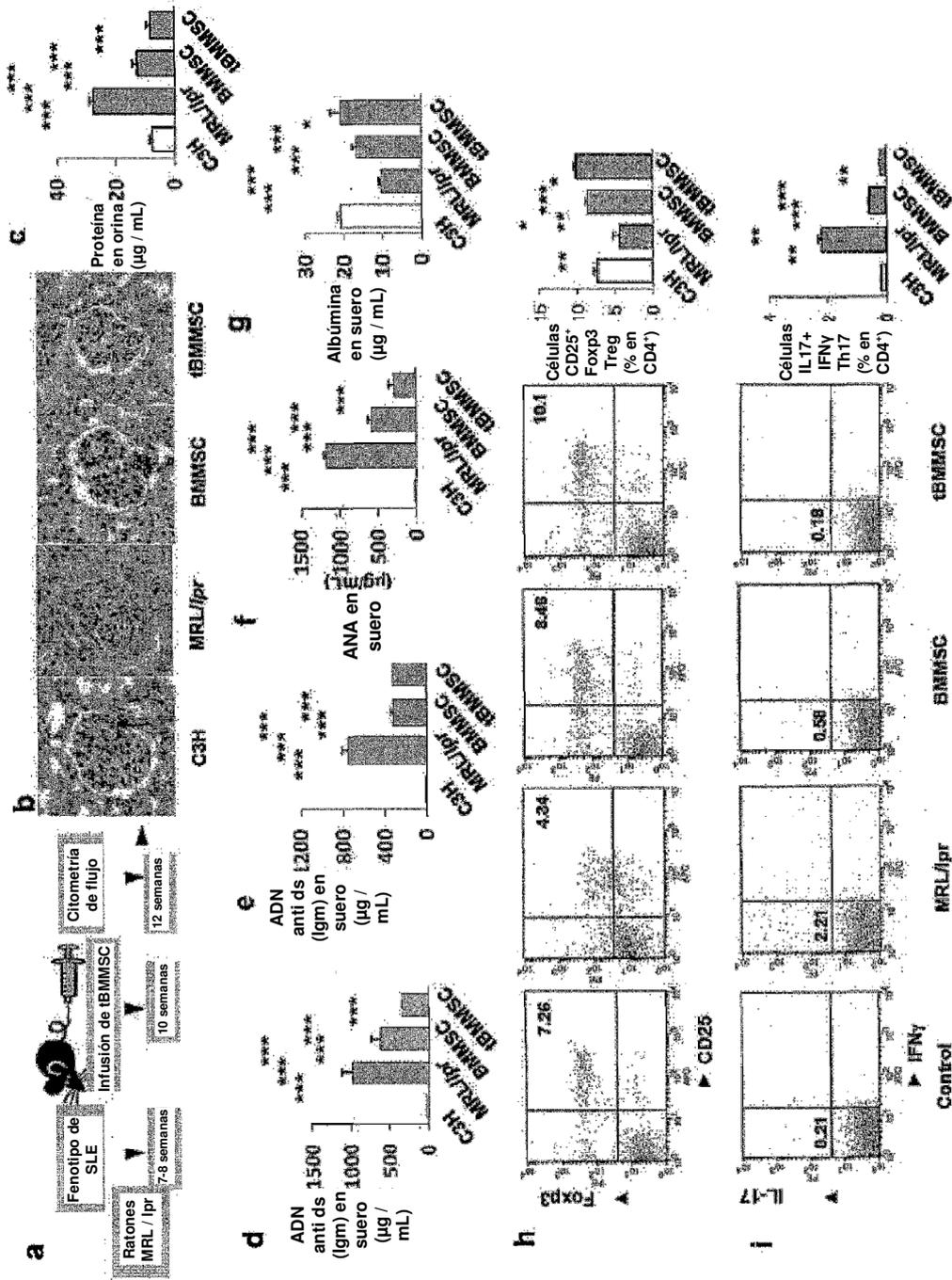


Fig. 6

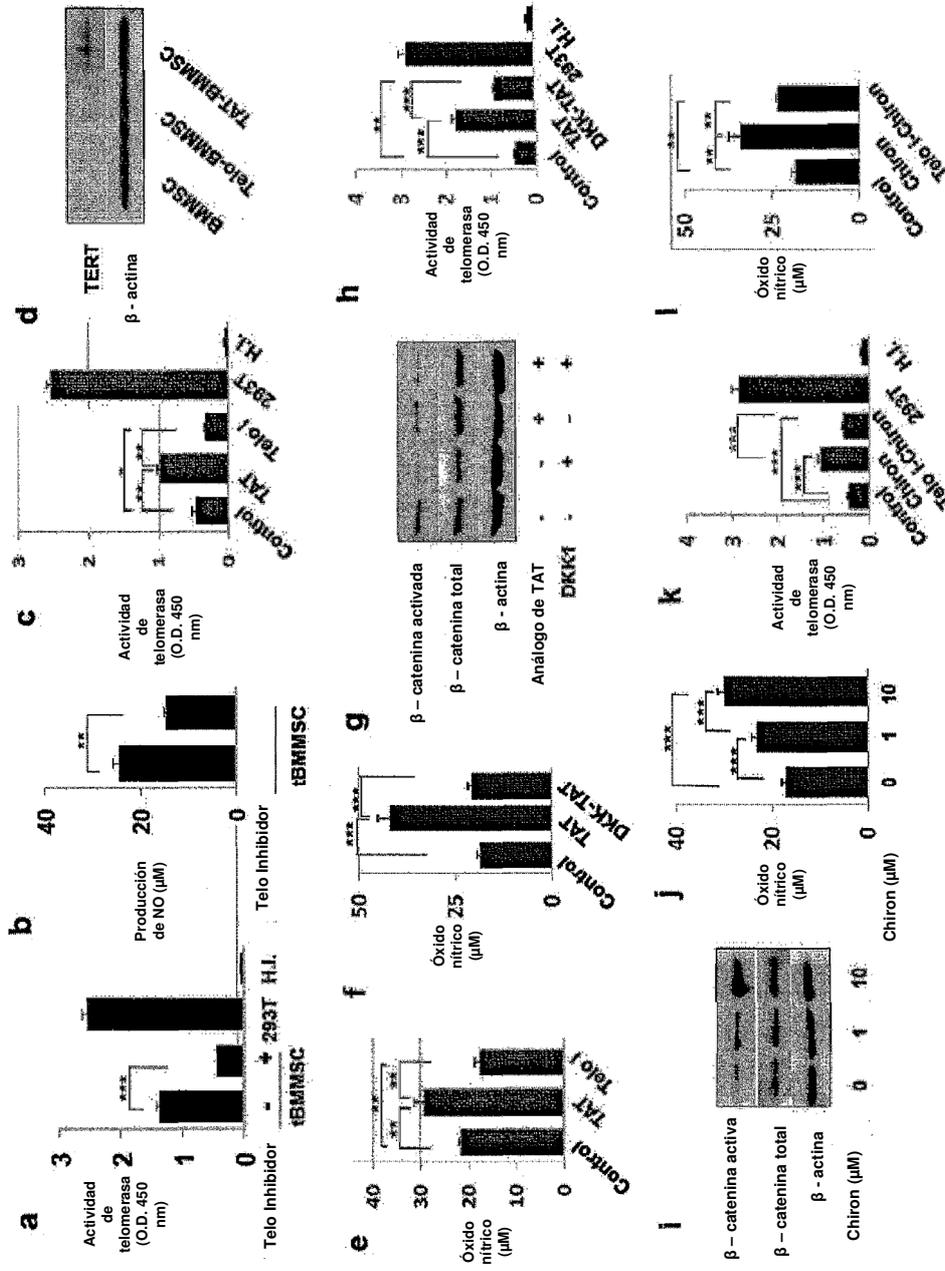


Fig. 7

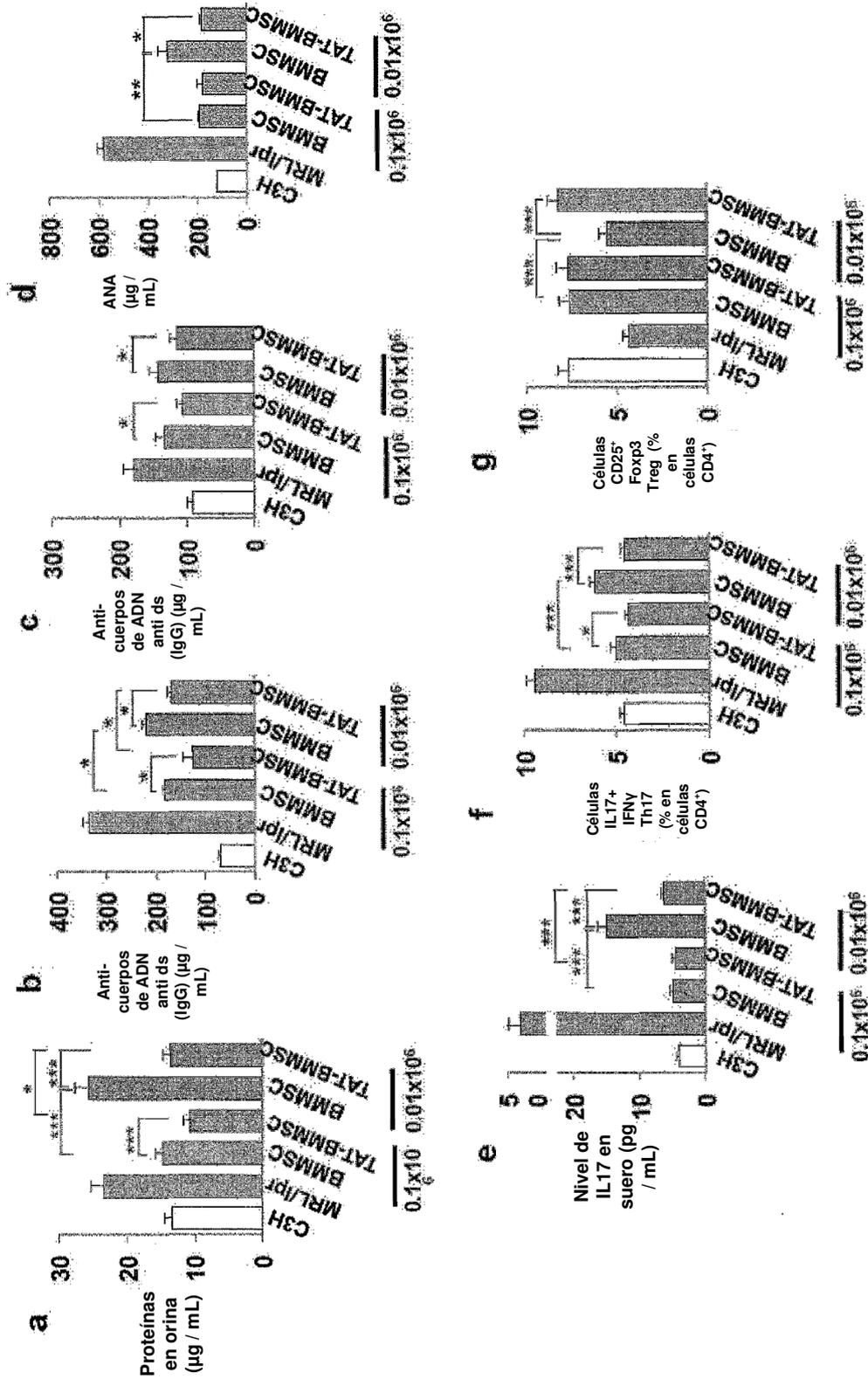


Fig. 8

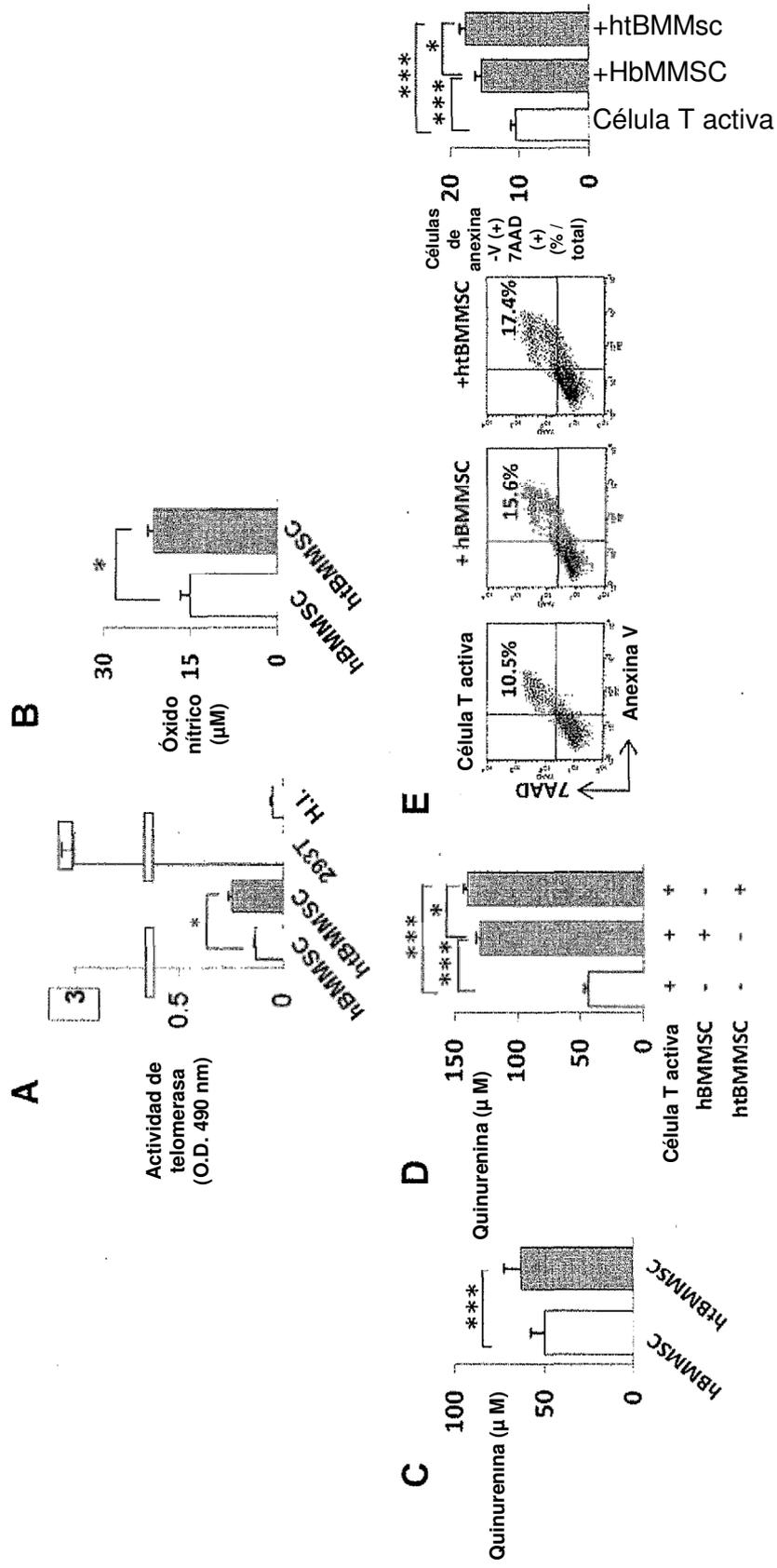


Figura 9

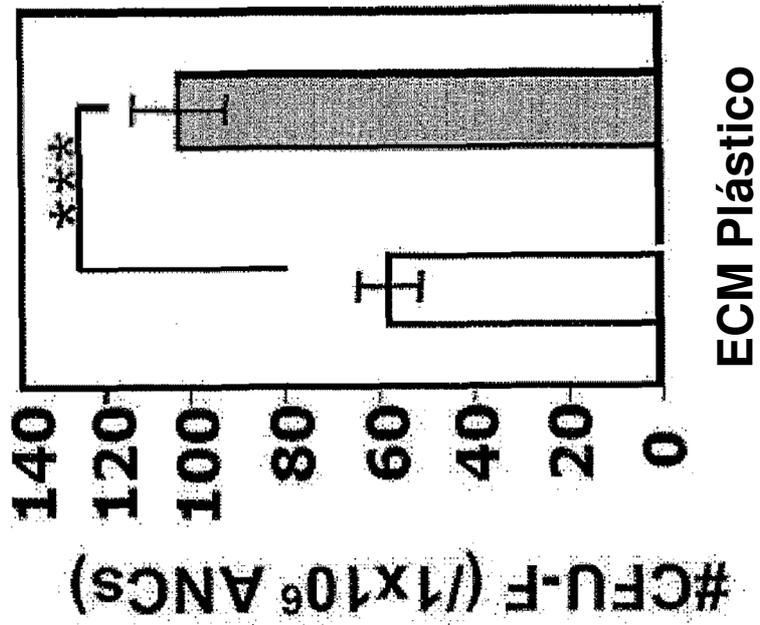


Figura 10

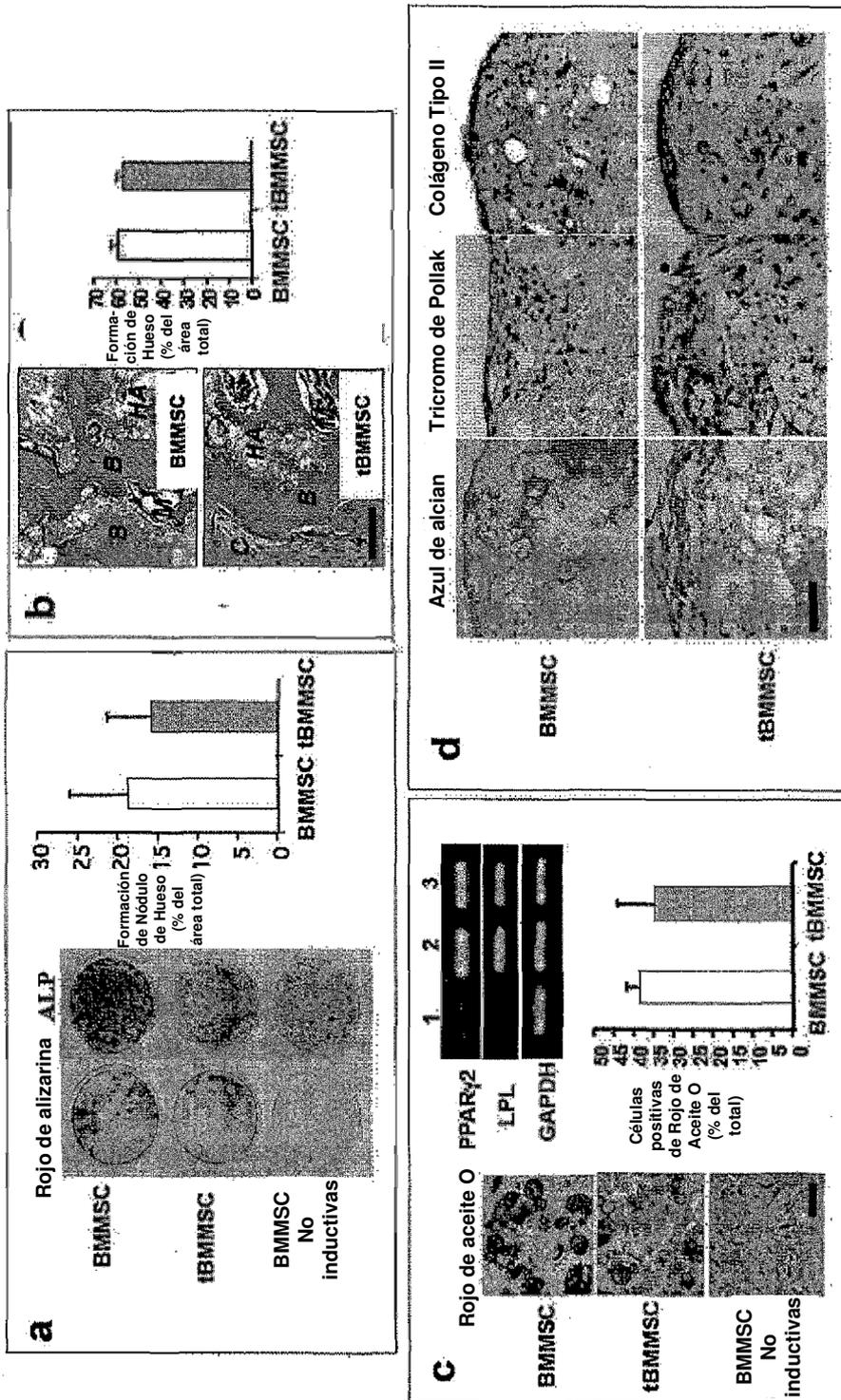


Figura 11

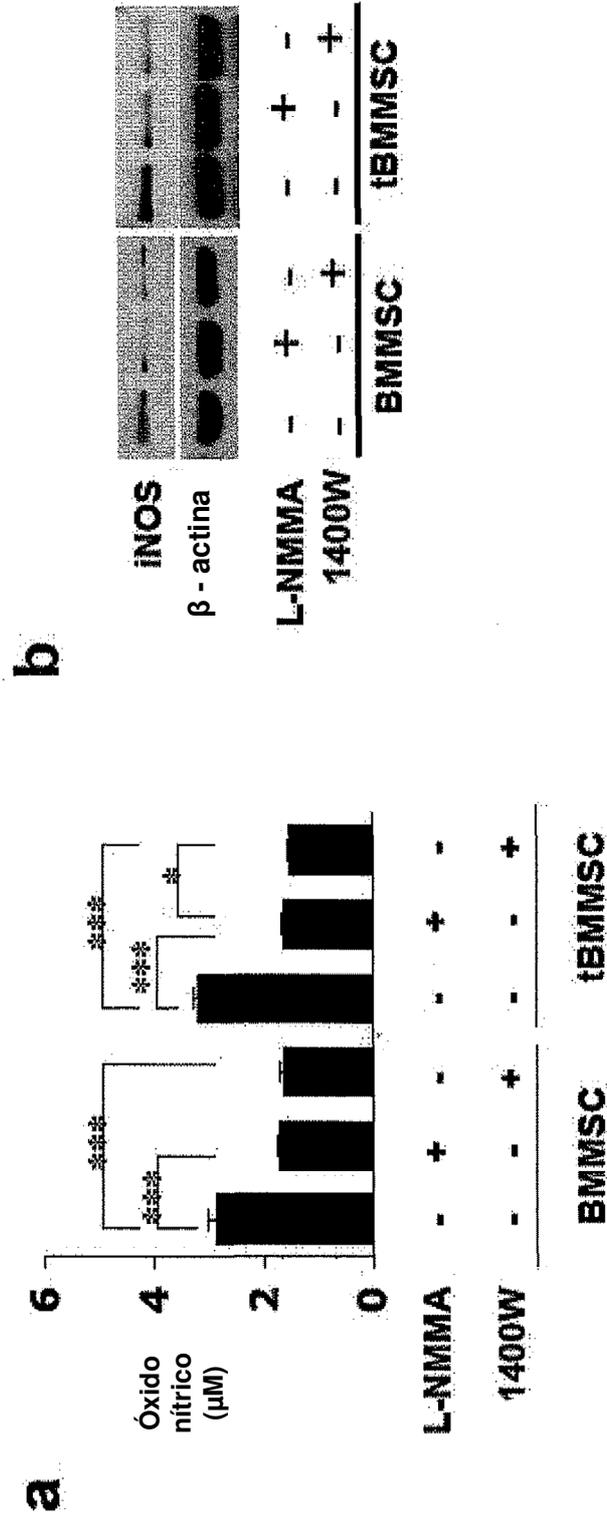


Figura 12

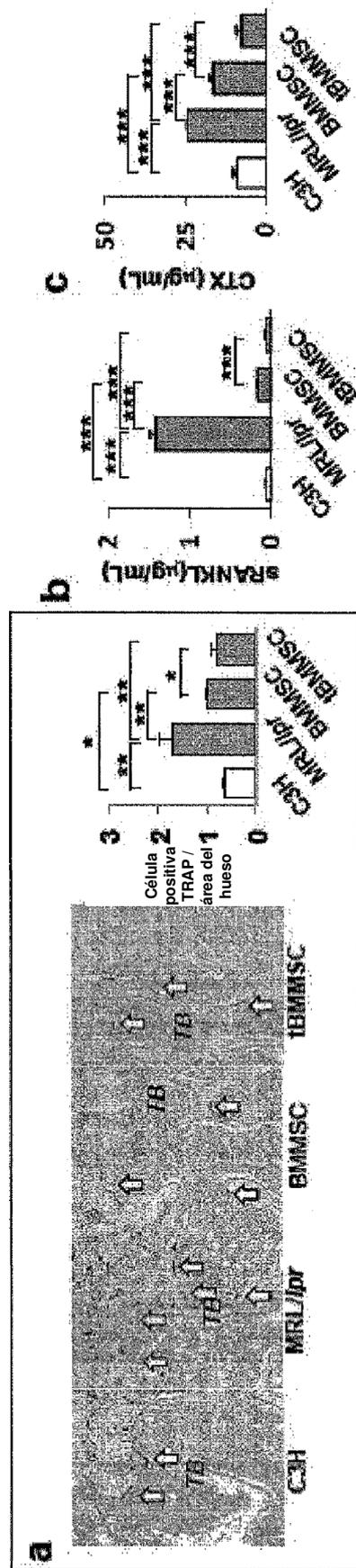


Figura 13

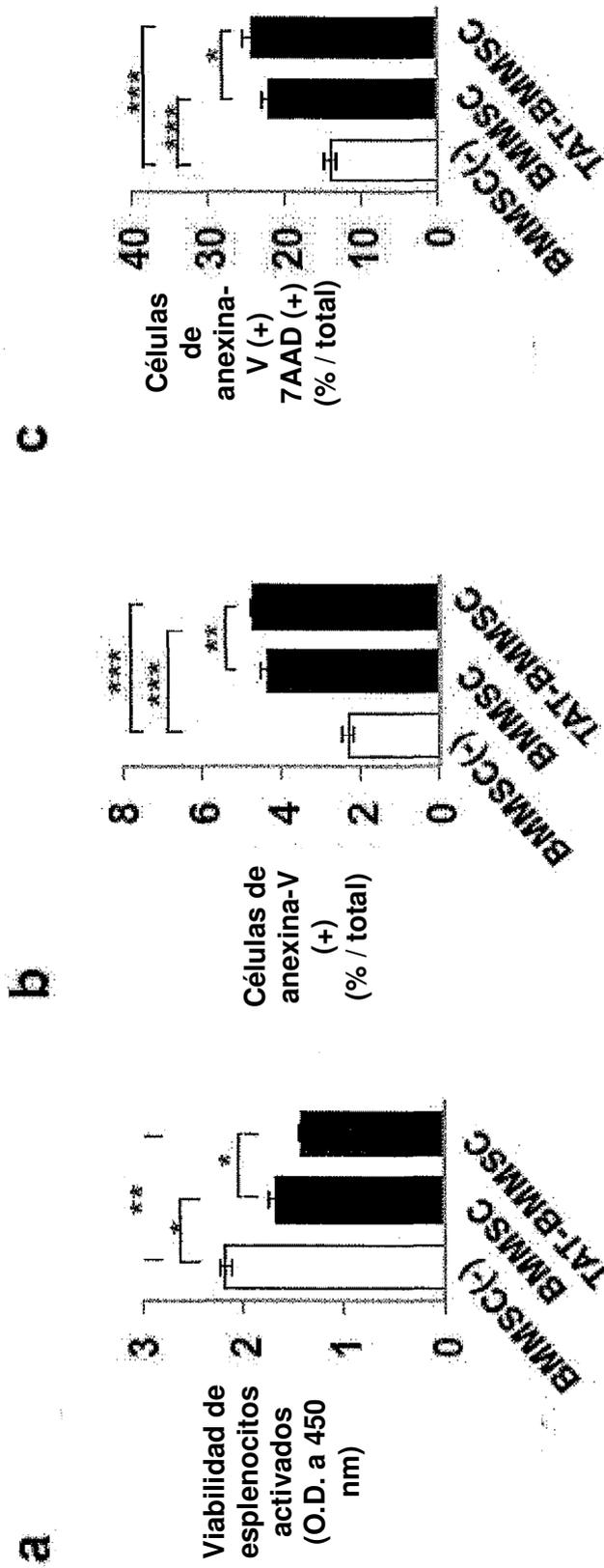


Figura 14