

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
3 de noviembre de 2011 (03.11.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2011/135148 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C12N 5/073 (2010.01) C12N 5/077 (2010.01)  
C12N 5/074 (2010.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2011/070303

(22) Fecha de presentación internacional:  
28 de abril de 2011 (28.04.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201030645 30 de abril de 2010 (30.04.2010) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD (JUNTA DE ANDALUCÍA)** [ES/ES]; Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2ª Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Avda. María Luisa s/n; Pabellón de Perú, E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **MENÉNDEZ BUJÁN, Pablo** [ES/ES]. **LIGERO MARTÍN, Gertrudis** [ES/ES]. **SÁNCHEZ CONTRERAS, Laura** [ES/ES]. **GUTIÉRREZ ARANDA, Iván** [ES/ES]. **RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, René** [ES/ES]. **RUBIO AMADOR, Ruth** [ES/ES]. **BUENO UROZ, Clara** [ES/ES]. **RAMOS MEJÍA, Verónica** [ES/ES]. **DELGADO MORA, Mario** [ES/ES].

(74) Mandatario: **ILLESCAS TABOADA, Manuel**; C/ Recoletos, 13 5ª Izda, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING MESENCHYMAL STEM CELLS FOR BIOMEDICAL USE

(54) Título : PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PARA USO BIOMÉDICO

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining MSCs from PSC cultures by inhibiting the SMAD2/3 signaling pathway, preferably using the chemical inhibitor 4-[4-(1,3- Benzodioxole-5-il)-5-(2-pyridinyl)-1 H-imidazole-2-il] benzamide. The PSC-MSCs according to the present invention are able to differentiate into cells of osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages, in addition to showing strong immunosuppressive and anti-inflammatory effects both *in vitro* and *in vivo* in colitis models. The present invention likewise relates to the mesenchymal stem cells (PSC-MSCs) directly obtainable by means of the method described. Furthermore, the invention relates to the use of inhibitors of the SMAD2/3 signaling pathway, preferably the inhibitor 4-[4- (1,3-Benzodioxole-5-il)-5-(2-pyridinyl)-1 H-imidazole-2-il] benzamide, in methods for obtaining MSCs, as well as to the use of the PCS-MSC cells themselves in regenerative medicine for the treatment of various diseases.

(57) Resumen: Procedimiento de obtención de células madre mesenquimales para uso biomédico. La presente invención describe un procedimiento de obtención de CMMs a partir de cultivos de PSC, mediante la inhibición de la vía de señalización SMAD2/3, preferentemente con el inhibidor químico 4-[4-(1,3- Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1 H-imidazol-2-il] benzamida. Las PSC-CMMs descritas en la presente invención, son capaces de diferenciarse a células de la línea osteogénica, condrogénica y adipogénica, además de mostrar potentes efectos inmunosupresores y anti-inflamatorios, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de colitis. Además, en la presente invención se describen las células madre mesenquimales (PSC-CMMs) directamente obtenibles mediante el procedimiento descrito. Por otro lado, también se describe el uso de inhibidores de la vía de señalización SMAD2/3, preferentemente del inhibidor 4-[4- (1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1 H-imidazol-2-il] benzamida, en procesos de obtención de CMM, así como el uso de las propias células PCS-CMMs en medicina regenerativa para el tratamiento de diferentes patologías.

WO 2011/135148 A1

## PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PARA USO BIOMÉDICO.

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuadra en el ámbito de la biomedicina y el sector farmacéutico, más específicamente, se refiere a la obtención, mediante cultivo *in vitro*, de células madre mesenquimales (CMM) con capacidad multipotente y que presentan propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias.

### 10 ANTECEDENTES

Las células madre mesenquimales (CMMs) están presentes en multitud de tejidos adultos y representan uno de los tipos de células madre con mayores expectativas en presentes y futuros ensayos clínicos para diversas patologías mediante terapia celular y génica. Esto es debido a tres propiedades esenciales, en primer lugar a su capacidad de diferenciarse hacia diversos tejidos de  
15 origen mesodérmico tales como hueso, cartilago, grasa o incluso músculo y, en segundo lugar, a su capacidad inmunosupresora que las hace poco vulnerables al sistema inmune del receptor (García-Castro J et al J Cell Mol Med. 2008; 12:2552-2565) y en tercer lugar a su capacidad de migrar a tejidos dañados. La obtención de CMMs requiere generalmente tejido humano obtenido por métodos invasivos (grasa blanca, punción de médula ósea, etc). Además, distintos estudios han indicado que las CMMs  
20 humanas entran en senescencia tras varios pases y, aquellas que logran superar la senescencia, se transforman convirtiéndose en CMMs tumorales (Li H et al Cancer Res 2007; 67:10889-10898; Rosland GV et al Cancer Res 2009; 69:5331-5339; Rubio D et al Cancer Res 2005; 69: 3035-3039). Estos inconvenientes, animan a buscar nuevas fuentes de CMMs humanas, que no requieran de métodos invasivos para su obtención y que además crezcan en cultivo indefinidamente, sin mostrar senescencia,  
25 ni transformación en células tumorales, convirtiéndose así en una fuente potencialmente ilimitada para usos experimentales y clínicos.

Las células madre pluripotentes (PSCs) ofrecen una gran promesa para las estrategias de reemplazo celular basadas en CMMs. El origen de las PSCs puede ser embrionario (ESC) aunque, recientemente se han obtenido también células madre pluripotentes a partir de la reprogramación de  
30 células somáticas procedentes de una amplia variedad de tipos celulares y tejidos, a través de la inserción de genes críticos consiguiendo su dediferenciación hacia células madre pluripotentes (Yu, J., et al. 2007 Science. 318:1917-1920. Takahashi k., et al 2007, Cell.131:861-872. Park, I.H., et al 2008, Nature. 451:141-146). Estas células, conocidas como células madre pluripotentes inducidas (iPS), han abierto nuevas vías para la generación de células específicas extraídas de los propios donantes, y su

utilización en medicina regenerativa, evitando los rechazos inmunológicos. Las células iPS se comportan de la misma manera que las células madre pluripotentes (PSCs), es decir, comparten las capacidades de autorrenovación, proliferación ilimitada y pluripotentes, es decir son capaces de originar tejido de las tres capas germinales, representando, ambas, una fuente de enorme interés para producir  
5 distintos tipos celulares para su posible uso terapéutico.

El grupo de Barbieri y cols, ha demostrado la posibilidad de obtener CMMs a partir de hPSC de origen embrionario (hESCs). Un inconveniente de dicho estudio es que en el mismo los autores no descifran los mecanismos moleculares y celulares que inducen la diferenciación de las PSCs a CMM (Barbieri T., et al 2005). Otro inconveniente mostrado en dicho trabajo es que, la obtención de CMMs a  
10 partir de hPSC, ha sido muy pequeña (< 5%) y que, la población de CMMs obtenida a partir de hPSC, posteriormente tenía que ser cultivada durante al menos 40 días en presencia de células estromales de médula ósea murinas, lo que introduce componentes xenogénicos en el cultivo, que requerían posteriormente, la separación de ambos tipos celulares mediante citometría de flujo. Los estudios de Barbieri, tampoco mostraron la capacidad inmunosupresora de las CMMs resultantes, característica  
15 clave para el uso terapéutico de las CMMs.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

### Breve descripción de la invención

Para solventar los inconvenientes para la obtención de CMMs a partir de PSCs, puestos de manifiesto en el estado de la técnica, la presente invención describe un procedimiento de obtención de CMMs totalmente funcionales *in vitro* e *in vivo* a partir de cultivos de PSC, mediante la inhibición de la vía de señalización SMAD2/3, una vía de transcripción que juega un papel fundamental en el mantenimiento homeostático de las células. Así, las CMMs, obtenidas a partir de PSC mediante la  
20 inhibición de su vía de señalización SMAD2/3 según se describe en la invención, son capaces de diferenciarse en células de la línea osteogénica, condrogénica y adipogénica. La caracterización morfológica, fenotípica y la diferenciación funcional realizadas, en la presente invención, de las células descritas, pone de manifiesto que son CMMs con todo su potencial de autorrenovación, proliferación ilimitada y capacidad de originar cualquiera de los tejidos de las tres capas germinales. Por otro lado, las  
25 CMMs obtenidas en la presente invención muestran potentes efectos inmunosupresores y anti-inflamatorios, tanto *in vitro* como *in vivo*, en un modelo de colitis. Una de las principales características que diferencian a las CMM de la presente invención del resto de CMMs conocidas en el estado de la técnica, con origen adipogénico, de médula ósea o de cordón umbilical, es que éstas tienen crecimiento limitado en cultivo, aproximadamente de 30 a 50 días al cabo de los cuáles, las células comienzan a  
30

mostrar signos de senescencia. Sin embargo, las CMMs de la invención presentan un crecimiento ilimitado, los cultivos se mantienen en crecimiento al menos 200 días pudiendo llegar incluso, hasta más de 300 días, sin que las células presenten signos de senescencia. A los efectos de la presente invención, el término "cultivo ilimitado" se define como cultivo de células PSC-CMMs capaz de proliferar indefinidamente en el tiempo sin perder sus características morfológicas y fenotípicas y permaneciendo indiferenciadas como CMMs, sin mostrar senescencia. También a los efectos de la presente invención, el término "indefinidamente" aplicado al crecimiento de las células PSC-CMMs de la invención, debe entenderse como un tiempo prolongado, de al menos 200 días, sin que aparezcan rasgos de senescencia en las células. Otra de las ventajas mostradas por las células de la presente invención es que al poder mantener los cultivos indiferenciados durante tiempo ilimitado, estos se convierten en reservorios de CMM listos y preparados para cuando sea necesaria su utilización, sin necesidad de extraer, cultivar y diferenciar CMMs, o de descongelar muestras de cordón umbilical, grasa o médula ósea para la obtención de las CMMs, y posterior diferenciación de las mismas, lo que implicaría tiempos excesivamente largos para abordar tratamientos urgentes de determinadas patologías. Además, no podemos olvidar que las CMM de la presente invención son genéticamente idénticas mientras que las CMM procedentes de tejido humano primario presentarán una gran variabilidad entre donantes lo que provoca mayores riesgos de rechazos al utilizarse en medicina regenerativa (implantes, injertos, trasplantes, etc) en individuos distintos al donante de quien se ha obtenido. El tratamiento de las PSC con el inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3, según se describe en la presente invención, hace posible la obtención de cultivos de CMMs, que a su vez pueden diferenciarse a osteocitos, adipocitos y/o condrocitos cultivados en los medios de diferenciación apropiados. Dicha diferenciación se produce en muy poco tiempo, aproximadamente una semana, tiempo muy corto que facilita el tratamiento de reemplazo ante determinadas patologías.

A los efectos de la presente invención se denominan las CMM humanas obtenidas por cultivo de células madre pluripotentes, en presencia de un inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3, preferentemente el 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida, también conocido como SB-431542, PSC-CMMs.

El 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (SB-431542) es un potente y selectivo inhibidor de los receptores de la familia del TGF- $\beta$ : ALK4, ALK5 y ALK7, lo que induce el bloqueo de la señalización celular vía SMAD 2/3-TGF- $\beta$ . Las PSC-CMMs descritas en la presente invención, son capaces de diferenciarse a células de la línea osteogénica, condrogénica y adipogénica, además de mostrar potentes efectos inmunosupresores y anti-inflamatorios, tanto *in vitro* como *in vivo*, en un modelo murino de inflamación intestinal (colitis). A los efectos de la presente invención se define como diferenciación funcional de las PSC-CMMs como aquellas que una vez

cultivadas en medios de cultivo que induzcan su diferenciación en líneas celulares específicas, se caracterizan como condrocitos, osteocitos o adipocitos, por tinción específicas.

Además, en la presente invención se describen las PSC-CMMs directamente obtenidas mediante el procedimiento descrito. Por otro lado, también se describe el uso del inhibidor 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (SB-431542) para la obtención de las PSC-CMMs descritas, así como el uso de las propias células PCS-CMMs en terapia de medicina regenerativa para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como: diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Chron, artritis reumatoide, además de regeneraciones óseas y de cartílago, fístulas y enfermedad-injerto-contr-huésped (EICH) por transplante de médula ósea.

También en la presente invención se describen los condrocitos, osteocitos o adipocitos obtenidos mediante el procedimiento descrito en la invención, así como su uso en terapia de medicina regenerativa para el tratamiento de las enfermedades citadas anteriormente, entre otras.

### Descripción de las figuras

**Figura 1: Cinética de la diferenciación de hPSCs a CMMs mediante el tratamiento con el inhibidor de la ruta SMAD 2/3, 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (SB-431542).** (A) Diferenciación de líneas celulares hPSCs a CMMs mediante el tratamiento con 10  $\mu$ M de 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida, o 10 ng de TGF- $\beta$ 1 o vehículo, durante 28 días. En el eje X se representan los días que se mantuvieron en cultivo las hPSC en presencia de cada uno de los tratamientos mencionados. En el eje Y se representa el porcentaje de células CMMs, representadas por aquellas que presentan fenotipo CD73+ CD90+ CD34- analizado mediante citometría de flujo. Las figuras 1B y 1C muestran la pérdida de la expresión de marcadores asociados a la pluripotencialidad celular, Oct-4 (B) y Tra-1-60 (C), en los mismos cultivos celulares de hPSCs en presencia de los diferentes tratamientos mencionados anteriormente. En los ejes X se representan los días que se mantuvieron en cultivo las hPSC en presencia de los tratamientos mencionados. En los ejes Y se representan el porcentaje de células con fenotipo Oct-4+ y Tra-1-60+ respectivamente, analizado mediante citometría de flujo. La línea continua representa los cultivos tratados con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida. La línea punteada representa los cultivos tratados con TGF- $\beta$ 1. La línea discontinua representa los cultivos no tratados (DMSO). Los datos se muestran como media $\pm$ desviación estándar de los distintos experimentos para cada cultivo celular.

**Figura 2. Análisis representativo mediante citometría de flujo de cultivos de hPSC-CMMs tratados con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (SB-431542) o TGF- $\beta$ 1.**

(A) Análisis citométrico de la presencia de los marcadores de membrana CD73 y CD90 (panel superior), asociados a fenotipo típico de CMM, así como los marcadores asociados a la pluripotencialidad celular Oct-3/4 (panel central) y Tra-1-60 (panel inferior) en cultivos de hPSC tratados con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida o TGF- $\beta$ 1 o DMSO (Control) durante 28 días. En los paneles de más a la derecha se muestran los controles negativos de las células que se incubaron en presencia de inmunoglobulinas del mismo isotipo unidas a los mismos fluorocromos que los anticuerpos utilizados. Los anticuerpos utilizados están marcados con fluoresceína (FITC) (CD90 y Oct3/4) o con Ficoeritrina, (PE) (CD73 y Tra-1-60). 7AAD: 7-amino-actinomicina D, fluorocromo que tiñe células muertas. SSC: dispersión de la luz ortogonal en el citómetro de flujo. (B) Fotografías tomadas mediante microscopio de contraste de fase, de cultivos celulares de hPSCs cultivados durante 28 días en presencia de (DMSO) (panel izquierdo), de 10  $\mu$ M de 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (panel central) o de 10 ng de TGF- $\beta$ 1 (panel derecho). Las fotografías muestran un aumento de 10x.

**Figura 3. Ensayos de Western Blot de extractos celulares de hPSC-CMMs cultivadas en presencia de 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (SB-431542) o TGF- $\beta$ 1. (A)** La figura muestra la defosforilación de SMAD2/3 (p-SMAD2/3) en células hPSC tratadas con 10  $\mu$ M de 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (+) durante 60 minutos. En cambio, dicho tratamiento no modificó la fosforilación de SMAD1/5/8 (p-SMAD1/5/8). Como control de carga se utilizaron los anticuerpos totales de SMAD2/3 y de SMAD1/5/8 respectivamente. El símbolo - se refiere a las células control tratadas con DMSO. (B) La figura muestra que el tratamiento de cultivos de hPSC con 10 ng de TGF- $\beta$ 1 (+) durante 60 minutos, no modificó el estado de fosforilación de SMAD2/3 (p-SMAD2/3) ni de SMAD1/5/8 (p-SMAD1/5/8). Como control de carga se utilizaron los anticuerpos totales de SMAD2/3 y de SMAD1/5/8 respectivamente. El símbolo - se refiere a las células control tratadas con DMSO.

**Figura 4: Caracterización fenotípica de las hPSC-CMMs. (A)** Aislamiento mediante citometría de flujo de las poblaciones celulares de hPSC-CMMs que presentan los fenotipos CD73+CD90+ y CD73-CD90+, después de 28 días de tratamiento con 10  $\mu$ M de 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (SB-431542). La pureza de la población CD73+CD90+ fue consistentemente del 85% y la de la población CD73-CD90+ del 90%. Para el marcaje y posterior caracterización de los extractos celulares mediante citometría de flujo, se utilizaron: un anticuerpo anti-CD73 marcado con PE y un anticuerpo anti-CD90 marcados con FITC. (B) Gráficas obtenidas mediante citometría de flujo mostrando el perfil fenotípico de cultivos de hPSC-CMMs. Se analizó la expresión de diferentes marcadores específicos de las CMMs. Las hPSC-CMMs tras 28 días de tratamiento con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida mostraron la presencia de marcadores

específicos de CMMs: CD73, CD90, CD105, CD44, CD166 y la ausencia de marcadores de hematopoyesis o endotelio que no están presentes en CMM: CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR y SSEA-4.

**Figura 5. Diferenciación funcional de las hPSC-CMMs. (A)** La gráfica muestra el crecimiento de diferentes cultivos celulares de hPSC-CMMs (línea continua), de CMM derivadas a partir de cordón umbilical (línea de puntos) o de CMM derivadas a partir de médula ósea (línea discontinua) a lo largo del tiempo. En el eje Y se muestra el crecimiento expresado como duplicaciones acumulativas de la población (eje Y) y en el eje X se representa el tiempo expresado en días. **(B)** Fotografías obtenidas mediante microscopio óptico que muestran la diferenciación de las hPSC-CMMs cultivadas en presencia de medios de cultivos específicos que favorecen la diferenciación de dichas células hacia la línea osteogénica (panel inferior de la izquierda), adipogénica (paneles inferior central) y condrogénica (panel inferior de la derecha). Los cultivos celulares se tiñeron con colorantes específicos para cada tipo de diferenciación celular: Alizarin Red que tiñe osteocitos (fotografías de la izquierda), Oil Red que tiñe adipocitos (fotografías centrales) y Alcian Blue que tiñe condrocitos (fotografías de la derecha). Las fotografías de la parte superior se corresponden con los controles negativos cultivados en presencia de medio de cultivo que no induce diferenciación. Las fotografías muestran un aumento de 20x.

**Figura 6: Las hPSCs-CMMs muestran potentes efectos inmunosupresores in vitro. (A)** En el panel superior se muestra el número total de células (Eje Y), determinado mediante citometría de flujo, presentes en cultivos mixtos de linfocitos (MLC) después de 4 días en presencia de hPSC-CMMs o CB-CMM o CMM derivadas de tejido adiposo (Ad-CMM). En el panel inferior se muestra el número de linfocitos CD4+ en proliferación (medido como el % de células CFSE<sup>mid/low</sup>). Como control basal se utilizaron cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de uno de los donantes sanos (C). Los datos se muestran como media±desviación estándar de los distintos experimentos para cada cultivo celular. \*p<0.001 vs MLC sin CMMs (-). **(B)** Efecto dosis-dependiente de la participación de los cultivos de hPSC-CMMs en la proliferación de linfocitos. hPSC-CMMs, CB-CMMs y Ad-CMMs se añadieron a MLC a diferentes ratios (desde 1:2 a 1:100). La proliferación se determinó midiendo la incorporación de timidina tritiada tras 96 horas de cultivo. Los cuadrados negros representan la proliferación basal para cada tipo de CMMs. PBMCs de un donante sano se utilizaron control de la proliferación basal (columna gris). \*p<0.001 vs MLC sin CMMs. En el Eje X se muestran los diferentes ratios de concentraciones utilizados y en el Eje Y se muestra la proliferación linfocítica expresada como cuentas por millón por 10<sup>3</sup> (cpmx10<sup>3</sup>). Los datos se muestran como media±desviación estándar de los distintos experimentos para cada cultivo celular. **(C)** La figura muestra que los cultivos de hPSC-CMMs no expresan las moléculas coestimuladoras CD40 ni CD80, implicadas en la adhesión de las células T con las células presentadoras de antígeno, analizado mediante citometría de flujo.

**Figura 7: Las hPSC-CMMs muestran potentes efectos anti-inflamatorios in vitro. (A)** Los cultivos de hPSC-CMM disminuyen la producción de citoquinas por parte de los linfocitos activados presentes en los MLC. hPSC-CMMs o CB-CMMs o Ad-CMMs fueron añadidos a MLC. La producción de citoquinas inflamatorias: interleuquina 2 (IL-2), interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) así como la citoquina no inflamatoria interleuquina 4 (IL-4) fue analizada mediante ELISA en el sobrenadante celular tras 72 horas de cultivo. En el eje Y se muestra la concentración de las citoquinas mencionadas expresada como pg/ml. Los datos se muestran como media $\pm$ desviación estándar de los distintos experimentos para cada cultivo celular. \* $p < 0.001$  vs MLC sin CMMs. **(B)** Las hPSC-CMMs inhiben la respuesta inflamatoria de cultivos de sinoviocitos (FLS) extraídos de pacientes con artritis reumatoide activa (AR). FLS se incubaron en condiciones basales sin estimulación (barras negras) o estimulados (barras blancas) con lipopolisacárido (LPS 1ug/mL) para la determinación de citoquinas (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) o con TNF- $\alpha$  (20ng/mL) para analizar la actividad colagenasa en ausencia (-) o presencia de hPSC-CMMs, CB-CMMs o Ad-CMMs. La actividad colagenasa se determinó en el sobrenadante de los cultivos mediante el Kit EnzChek gelatinasa/colagenasa (Molecular Probes) y la concentración de las citoquinas inflamatorias se en el sobrenadante celular mediante ELISA. En el eje Y se representa la concentración de las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  expresada como ng/ml y la actividad colagenasa expresada como unidades/ml/ $10^6$  células. \* $p < 0.001$  vs LPS (-). Los datos se muestran como media $\pm$ desviación estándar de los distintos experimentos para cada cultivo celular.

**Figura 8. El tratamiento con hPSC-CMMs protege frente a un modelo experimental inducido de colitis en ratones.** La colitis se indujo en los animales mediante una administración intrarectal de ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS). Transcurridas 12 horas, a los animales (n=10/grupo) se les administró intraperitonealmente una concentración de  $10^6$  hPSC-CMMs o CB-CMMs o Ad-CMM. Se utilizaron dos grupos control, uno de ellos al que no se le administró nada y al otro se le administró como vehículo etanol al 50%. **(A)** La gráfica muestra la evolución del peso de los animales a lo largo del tiempo. En el eje X se representa el tiempo de análisis expresado en días y en el eje Y el peso de los animales respecto a día 0, expresados como porcentaje, del peso de los animales a lo largo del estudio. La línea continua representa el grupo de ratones control que no han sido tratados. Los cuadrados blancos representan el grupo de ratones que ha sido tratado con etanol al 50% (vehículo). Los círculos negros representan el grupo de animales que ha sido tratado únicamente con TNBS. Los triángulos negros representan el grupo de animales tratado con TNBS+Ad-CMMs. Los triángulos blancos representan el grupo de animales tratado con TNBS+CB-CMMs. Los círculos blancos representan el grupo de animales tratado con TNBS+hPSC-CMMs. **(B)** En el panel superior se muestra el grado de colitis (eje Y) que presentaron los animales. En el panel inferior se muestra el análisis macroscópico (en una escala graduada de 0-10) (eje Y) realizado en muestras de colon de los animales. Los datos se

muestran como  $\text{media} \pm \text{desviación estándar}$  de los distintos experimentos para cada cultivo celular. **(C)** La gráfica muestra el porcentaje de animales vivos, expresado como porcentaje de supervivencia (eje Y) a lo largo del tiempo de ensayo (10 días) (eje X). Los cuadrados blancos representan el grupo de ratones que ha sido tratado con etanol al 50%. Los círculos negros representan el grupo de animales que ha sido tratado únicamente con TNBS. Los triángulos negros representan el grupo de animales tratado con TNBS+Ad-CMMs. Los triángulos blancos representan el grupo de animales tratado con TNBS+CB-CMMs. Los círculos blancos representan el grupo de animales tratado con TNBS+hPSC-CMMs. \* $p < 0.001$  vs ratones tratados con TNBS.

## 10 Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describe un procedimiento de obtención de células madre mesenquimales (PSC-CMMs) que comprende:

Un primer paso que consiste en cultivar células PSC en presencia de un inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3 para generar las PSC-CMMs, de la presente invención.

15 En un segundo paso, se procede al aislamiento de las PSC-CMMs obtenidas en el paso anterior.

Una vez obtenidas las PSC-CMMs de la presente invención se muestra su eficacia *in vivo*, en un modelo murino de colitis.

20 En una realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque el inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3 es el 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida, también conocido como SB-431542.

25 En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque el 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida se utiliza a una concentración de entre  $5\mu\text{M}$  a  $50\mu\text{M}$ , preferentemente  $10\mu\text{M}$  y durante un tiempo que varía de entre 7 a 40 días, preferentemente 28 días.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque las PSC son de origen humano y, por ende, las PSC-CMMs obtenidas también tienen dicho origen.

30 En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la caracterización de las PSC-CMMs se realiza preferentemente mediante caracterización fenotípica y morfológica. En el contexto de la presente invención, se entiende por caracterización morfológica, la identificación positiva de células con fenotipo fibroblastoide, alargadas, estrechas y de gran tamaño. Por caracterización fenotípica se entiende, la identificación de células con un particular perfil de expresión de marcadores de superficie celular que para la presente invención comprende: ser células negativas para

los antígenos CD34, CD19, CD14, CD106, CD45, SSEA-4, HLA-DR, Oct-3/4 y Tra-1-60 y positivas para CD73, CD90, CD105, CD44 y CD166.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la caracterización morfológica se realiza preferentemente mediante microscopía de contraste de fase.

5 En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque opcionalmente, comprende además un paso c) de diferenciación funcional, que consiste en primer lugar, en cultivar las PSC-CMMs obtenidas, en medios de cultivo específicos para inducir su diferenciación en una u otra línea celular y en segundo lugar, en teñir dichas PSC-CMMs con colorantes específicos que evidencien dicha diferenciación en una línea celular determinada.

10 En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque los medios de cultivo utilizados, inducen la diferenciación de las CMMs en células de las líneas osteogénica, condrogénica y adipogénica.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque las células PCS-CMMs obtenidas pueden mantenerse ilimitadamente en cultivo. En la presente invención se define  
15 el término cultivo de crecimiento ilimitado de PSC-CMMs como aquellos cultivos de PSC-CMMs que se mantienen indiferenciados por un largo tiempo, al menos 200 días. Una vez que las PSC han sido diferenciadas a PSC-CMMs mediante el procedimiento descrito anteriormente, pueden mantenerse en cultivo listas para ser utilizadas, entre otros, en los tratamientos que se mencionan en la presente memoria, en un estado de crecimiento ilimitado, en medio de cultivo DMEM con 10% de suero bovino fetal, 1% de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina, en condiciones de 37°C y 5% de humedad, o  
20 también pueden congelarse mediante procedimientos bioquímicos de rutina, como por ejemplo, utilizando el disolvente dimetil sulfóxido (DMSO) en nitrógeno líquido a una temperatura de al menos -200°C, para así mantener un reservorio continuo de PSC-CMMs. Una vez descongeladas dichas Células PSC-CMMs, conservan sus características morfológicas, fenotípicas y funcionales inalteradas.  
25 Al ser descongeladas, pueden utilizarse en tratamientos de medicina regenerativa como los que se mencionan de forma no exhaustiva en la presente memoria.

Otro objeto de la presente invención se refiere a las CMM, PSC-CMMs, obtenibles mediante el procedimiento descrito anteriormente. Dichas células se caracterizan por cultivarse indefinidamente sin  
30 mostrar signos de senescencia, además de, como se ha mencionada antes, poder congelarlas en nitrógeno líquido, sin que pierdan ninguna de sus características y propiedades, y tenerlas como reservorio de PSC-CMMs. En la presente invención se define el término senescencia como los cambios graduales e intrínsecos de las células u organismos vivos que conducen a un riesgo creciente de vulnerabilidad, pérdida de vigor, enfermedad y muerte.

En una realización preferida, las células PSC-CMMs se caracterizan porque, preferentemente, expresan los marcadores: CD73, CD90, CD105, CD44 y CD166 y no expresan los marcadores: CD106, CD45, CD34, CD14, CD19, HLADR, SSEA-4, Oct3/4 y Tra-1-60, y porque además, muestran propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias *in vitro* e *in vivo*.

- 5 En otra realización preferida, las células PSC-CMMs se caracterizan porque *in vitro* comprenden al menos una propiedad inmunosupresora o anti-inflamatoria a elegir de entre: disminución del número de linfocitos, disminución de la proliferación de linfocitos, disminución de la concentración de las citoquinas inflamatorias, IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  o disminución de la actividad colagenasa.

- 10 En otra realización preferida, las células PSC-CMMs se caracterizan por no mostrar senescencia al cabo de, al menos, 200 días de cultivo.

En otra realización preferida, las células PSC-CMMs se caracterizan porque son de origen humano.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3 en procedimientos de obtención de CMM.

- 15 En una realización preferida, el inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3 utilizado para la obtención de CMM, preferentemente es el 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida.

- 20 Otro objeto de la presente invención se refiere a los condrocitos, osteocitos o adipocitos obtenibles mediante el procedimiento descrito en la presente invención, así como su uso en el tratamiento de enfermedades del grupo: enfermedades autoinmunes, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Chron, artritis, enfermedades óseas, enfermedades de cartílago, fístulas, rechazo inmune a injerto y enfermedad-injerto-contra-huésped por trasplante de médula ósea.

- 25 Otro objeto de la presente invención se refiere al uso de las PSC-CMMs descritas en la presente invención para el tratamiento de enfermedades del grupo: enfermedades autoinmunes, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Chron, artritis, enfermedades óseas, enfermedades de cartílago, fístulas, rechazo inmune a injerto y enfermedad-injerto-contra-huésped por trasplante de médula ósea.

- 30 El procedimiento de la invención parte de PSCs de origen animal, incluyendo PSCs de origen humano (hPSCs). Lo mismo ocurre con las células madre mesenquimales obtenibles, son células de origen animal, incluyendo células de origen humano, hPSC-CMMs. De forma análoga, los usos de las células obtenibles con el procedimiento de la invención, se basan en PSC-CMMs de origen animal, incluyendo las células de origen humano, hPSC-CMMs. Por último, siguiendo con el mismo razonamiento, el uso de inhibidores de la vía de señalización SMAD2/3, como el 4-[4-(1,3-Benzodioxol-

5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (SB-431542), en la obtención de CMMs se aplica a PSC-CMMs de origen animal, incluyendo las de origen humano, hPSC-CMMs

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar la invención y no pretenden limitar el alcance de la misma.

### **Ejemplo 1. Generación de hPSC-CMMs mediante la inhibición de la vía de señalización SMAD2/3**

Líneas celulares de hPSCs se mantuvieron en cultivo, en estado pluripotente, en un medio libre de soporte celular como se ha descrito previamente (Montes R et al Cell Res 2009; 19: 698-709). Para la realización de los ensayos se obtuvo la aprobación de los Comités Regionales y Nacionales de Investigación con hPSCs. Brevemente, las hPSCs se cultivaron en frascos de cultivo T25 cubiertos con Matrigel® (Becton Dickinson, San Jose, CA) en medio condicionado por fibroblastos de prepucio (HFF-CM) o células estromales (CMM-CM) suplementado con 8 ng/mL de factor de crecimiento fibroblástico básico, bFGF (Miltenyi, Alemania). El medio de cultivo se cambió a diario y las células se pasan semanalmente mediante disociación con 200 U/mL de colagenasa IV (Invitrogen, Edimburgo, Escocia). Para la obtención de cultivos diferenciados de CMMs a partir de los cultivos de hPSCs, éstos se trataron a diario con: i) 10ng de TGF-β1 (R&D Systems, UK) para analizar el efecto de la activación de la vía de señalización SMAD 2/3 mediada por TGF-β o, ii) 10μM de 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (Sigma-Aldrich, St Louise, MO), un inhibidor químico potente y selectivo de los receptores ALK4, ALK5 y ALK7 que induce el bloqueo de la señalización celular vía SMAD 2/3-TGF-β o, iii) DMSO como vehículo (control negativo) durante 28 días.

Ante la ausencia de un marcador específico de las CMMs, estas poblaciones celulares se definen combinando diversas propiedades que les caracterizan, como son: una morfología definida, un fenotipo determinado por múltiples marcadores de membrana y una marcada capacidad de diferenciación hacia línea mesenquimal utilizando medios de cultivo específicos (Dominici M, et al The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8: 315-317). Por lo tanto, la caracterización de las hPSC-CMMs obtenidas mediante el procedimiento descrito en la presente invención se realizó basándose en los siguientes criterios:

- Caracterización morfológica: células con forma fibroblastode, alargadas y estrechas, de gran tamaño.

- Caracterización fenotípica: mediante citometría de flujo con lo que se obtuvo una población celular homogénea con el siguiente perfil: células negativas para los antígenos CD34, CD19, CD14, CD106, CD45, SSEA-4 y HLA-DR y positivas para CD73, CD90, CD105, CD44 y CD166.

- Caracterización funcional: las CMM se caracterizan por poseer la capacidad de diferenciarse, mediante cultivos en medios específicos, hacia tipos celulares como adipocitos, osteocitos y condrocitos. Posteriormente, los cultivos diferenciados se analizan por técnicas histológicas, tiñéndose con colorantes específicos, como son el "Alizarin Red" para los Osteocitos, el "Oil Red O" para los adipocitos y el "Alcian blue" para los condrocitos. Los medios de cultivo específicos para cada tipo de diferenciación son:

\* Diferenciación osteogénica: Medio de cultivo Osteogenic MSCs Differentiation Bullet Kit (Lonza, Suiza), durante dos semanas.

\* Diferenciación adipogénica: Medio de cultivo Adipogenic MSCs Differentiation Bullet Kit (Lonza, Suiza), durante dos semanas.

\* Diferenciación condrogénica: Medio de cultivo Chondrogenic MSCs Differentiation Bullet Kit (Lonza, Suiza), durante dos semanas

La caracterización fenotípica mediante citometría de flujo de los cultivos de hPSC-CMMs se realizó, mediante la tripsinización durante 5 min (0,5% tripsina y 0,2% EDTA) de las células presentes en los cultivos. Posteriormente se lavaron con buffer salino (centrifugando a 600 g, 5 minutos, temperatura ambiente) y se resuspendieron en 100 uL de buffer salino. En tubos distintos, la misma concentración celular se incubó con 10 uL de anticuerpos monoclonales: CD34, CD19, CD14, HLA-DR, CD73, CD90, CD105, CD166 (BD Biosciences, Estados Unidos) marcados con los fluorocromos FITC o PE. Como control de isotipo las células se incubaron con inmunoglobulinas del mismo isotipo unidas a los mismos fluorocromos. Tras 45 minutos de incubación a 4°C en oscuridad las células se lavaron y se resuspendieron en 200 uL de buffer salino. El análisis de las poblaciones celulares se realizó en un citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos después de todo el procedimiento muestran que tras 28 días de cultivo en condiciones basales, sin tratamiento, los cultivos indiferenciados de hPSCs presentan de forma basal alrededor de un 10% de células con un fenotipo candidato de CMM humana (CD73+CD90+CD34-). La morfología de los cultivos celulares de hPSCs se visualiza mediante microscopía óptica de contraste de fase.

La caracterización fenotípica de los cultivos indiferenciados de hPSCs, tras el tratamiento con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida o TGF-β1, se realizó mediante citometría de flujo, como se ha mencionado anteriormente. Dicha caracterización se llevó a cabo semanalmente (días 4, 14, 21 y 28) para así analizar cuando se producía la aparición en los cultivos de las hPSC-CMMs, caracterizados por presentar un fenotipo CD73+CD90+CD34-. Tras el marcaje de los cultivos celulares con los anticuerpos correspondientes (CD73, CD90, CD34, Oct-3/4 y Tra-1-60) unidos a FITC o PE, las células se lavaron en PBS y se marcaron con 7-amino-actinomicina D (7AAD) durante

15 minutos a temperatura ambiente. Las células vivas se identifican como negativas para 7AAD. Dentro de la fracción viable se analizó la co-expresión de CD90 y CD73 usando el citómetro de flujo FACSCanto II equipado con el programa de análisis FACS Diva (Becton Dickinson). En paralelo, se determinó la expresión de los marcadores asociados a pluripotencia Tra-1-60-FITC (Chemicon) y Oct3/4-PE (Pharmingen) y el marcador hemato-endotelial CD34 (Becton Dickinson).

Como se observa en la **Figura 1A**, el tratamiento de los cultivos de hPSCs indiferenciados con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida, desencadena en tan sólo 28 días una rápida y robusta diferenciación a linaje mesenquimal (~42% de células CD73+CD90+CD34-). Por el contrario, el tratamiento con TGFβ1 o DMSO (usado como control), no modificó significativamente los niveles basales de células CD73+CD90+CD34- tras los 28 días de tratamiento. La adición de TGFβ1 a los cultivos no afectó la homeostasis de los cultivos ni a la aparición de células con fenotipo de CMMs, dado que el medio de cultivo ya es rico en TGFβ1 (Montes *et al* 2009 Cell Res; 19: 698-709). Por otro lado, cabe destacar que la diferenciación de las células hPSCs a CMM, mediante la inhibición de la vía de señalización SMAD2/3, ocurre en paralelo con la pérdida de marcadores asociados a pluripotencia, como son el Oct3/4 (**Figura 1B**) y el Tra-1-60 (**Figura 1C**). En cambio, los cultivos de hPSC tratados con TGFβ1 o DMSO, presentan un incremento en el número de células que presentan los marcadores asociados a pluripotencialidad mencionados.

La **Figura 2A** muestra un análisis citométrico representativo de la co-expresión de los marcadores CD73 y CD90, en ausencia del marcador CD34, en cultivos de células hPSCs tratadas durante 28 días con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida (10 ng/mL) o con TGF-β1 (10μM) o con DMSO (control). Como se observa en dicha figura el tratamiento con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida incrementa el número de células que presentan fenotipo de CMMs, al expresar los marcadores CD73+ y CD90+. En cambio, el tratamiento con TGF-β1 no incrementó la expresión de dichos marcadores en los cultivos celulares, permaneciendo así las células en estado indiferenciado. En los dos paneles inferiores de la Figura 2A se muestra que el tratamiento de los cultivos hPSC con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida dejan de expresar los marcadores de pluripotencialidad Oct-3/4 y Tra-1-60, mientras que los cultivos de hPSC tratados con TGF-β1 muestran aproximadamente el mismo porcentaje de expresión de dichos marcadores de pluripotencia que los cultivos control tratados con DMSO. El control isotópico está representado en los paneles de la columna de la derecha.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los problemas que presentaban las CMMs para su uso en terapia, era que con el tiempo se transformaban en células tumorales, debido a la presencia en los cultivos de CMMs indiferenciadas. En la presente invención se demuestra, que mediante el tratamiento con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida, las hPSC-CMMs

obtenidas, no presentan marcadores de pluripotencialidad, sugiriendo que todas las células hPCS-CMMs presentes en los cultivos están diferenciadas a linaje mesenquimal, evitándose así su posible transformación en células tumorales.

Para terminar de confirmar la caracterización de los cultivos de hPSC tratados con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida, se realizó un análisis morfológico, mediante microscopia de contraste de fase, de dichos cultivos tras 28 días de tratamiento con el inhibidor 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida. El análisis morfológico puso de manifiesto el aspecto fibroblastoide diferenciado, típico de CMMs, que presentaban los cultivos de hPSCs (**Figura 2B**, panel del centro), mientras que los cultivos tratados con TGF $\beta$ 1 no modificaron su morfología respecto a los cultivos control, tratados con DMSO, predominando la presencia de colonias indiferenciadas de hPSCs en el cultivo (**Figura 2B**, paneles de la derecha e izquierda, respectivamente).

Para confirmar la robustez y especificidad del inhibidor 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida sobre la vía de señalización SMAD 2/3, pero no sobre la vía de señalización SMAD 1/5/7, se realizaron ensayos de western blot, utilizando anticuerpos que reconocen las formas fosforiladas de SMAD2/3 y de SMAD1/5/8, así como los anticuerpos que reconocen SMAD2/3 y SMAD1/5/8 totales. Para la obtención de las muestras para la realización de los ensayos de western blot, previamente, las hPSC se trataron durante 60 minutos con o sin 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida o TGF- $\beta$ . Después del tratamiento y mediante la utilización del Kit de extracción nuclear con inhibidores de fosfatasa Active Motif (Sigma), se obtuvieron los extractos nucleares de los cultivos. Dichos extractos se separaron en geles de 10% de poliácridamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de Polivinilidenofluoruro (PVDF) mediante una transferencia semi-sólida durante 1 hora a 15 Voltios. Las membranas se bloquearon con 5% de suero de albúmina bovino (BSA) en tampón fosfato y posteriormente se incubaron con los siguientes anticuerpos: conejo anti-fosfo-SMAD2/3, conejo anti- fosfo -SMAD1/5/8 o conejo anti-SMAD2/3 total y conejo anti-SMAD1/5/8 total (Cell Signalling Technologies, 1:10.000). Todos los anticuerpos secundarios estaban conjugados con peroxidada de rábano (HRP) y la expresión de la proteína se detectó usando quimioluminiscencia (ECL; Pierce). La señal quimioluminiscente se detectó usando una estación de detección de imagen (Alpha-Innotech Corp).

Como se observa en la **Figura 3A**, el tratamiento de cultivos celulares hPSCs durante 60 minutos con 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida, produce una completa defosforilación (inhibición) de SMAD 2/3, pero no de SMAD 1/5/8, confirmando el potente y específico efecto del inhibidor 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida en el bloqueo de la señalización de a través de SMAD2/3. Por otro lado, el tratamiento de los cultivos celulares de hPSC con TGF- $\beta$ 1 no modificó el estado de fosforilación ni de SMAD2/3 ni de SMAD1/5/8 (**Figura 3B**).

Por lo tanto, estos datos ponen de manifiesto la alta eficiencia en la diferenciación de hPSC-CMMs a través de la inhibición de la ruta de señalización SMAD2/3.

### **Ejemplo 2. Caracterización morfológica, fenotípica y funcional de las hPSC-CMMs.**

5 Para confirmar que las hPSC-CMMs, con fenotipo CD73+CD90+CD34-, obtenidas mediante la inhibición de la vía de señalización SMAD2/3 según se describe en la presente invención, son CMMs con todo su potencial, se procedió, en primer lugar, al aislamiento mediante citometría de flujo de la fracción celular CD73+ y CD73-. Para ello, los cultivos celulares de hPSCs en diferenciación (cultivados en presencia de 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida), se incubaron con anticuerpos anti-CD90 y anti-CD73 conjugados a FITC o PE respectivamente. La población celular que  
10 presentó doble positividad (CD90+CD73+) se separó con el separador FACSaria (Becton Dickinson) usando la Unidad de Deposición Celular Automática (ACDU). Entre 2-3x10<sup>5</sup> de células aisladas se cultivaron en placas de cultivo cubiertas de fibronectina para facilitar la adherencia. Tras 24 horas, las células no adherentes se eliminaron y se añadió nuevo medio de cultivo DMEM con 10% de suero, 1% Glutamax y 1% Penicilina/Estreptomicina y se dejaron crecer hasta alcanzar prácticamente un 100% de  
15 confluencia. Como se puede observar en la **Figura 4A**, la pureza de los cultivos obtenidos (células CD73+CD90+) fue superior al 85% y se adhirió perfectamente a la placa de cultivo pudiendo ser expandida con éxito, en cambio, la fracción CD73 negativa apenas logró adherirse a la placa de cultivo y tras varios días de cultivo dicha población desaparecía, posiblemente por apoptosis.

20 Tras múltiples (>10) pases de cultivo, las células hPSC-CMMs con fenotipo CD73+CD90+, presentaban morfológicamente, un aspecto fibroblastoide y un fenotipo típico de CMMs analizado mediante citometría de flujo. Brevemente, las hPSC-CMMs se tripsinizaron, lavaron en PBS y se suspendieron en PBS+1%BSA. Un total de 2x10<sup>5</sup> células se incubaron 30 minutos en la oscuridad con los siguientes anticuerpos directamente conjugados con FITC o PE: CD73, CD90, CD105, CD44, CD166, CD106, CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR (Becton Dickinson) y SSEA-4 (Chemicon). Las  
25 células se lavaron en PBS+1%BSA y se analizaron en un FACSCanto II con el programa de análisis FACSDiva (Becton Dickinson). En la **figura 4B** se pueden observar los histogramas obtenidos mediante el análisis de citometría de flujo, mostrando los marcadores fenotípicos típicos de las CMMs: CD73+ CD90+ CD105+ CD44+ CD166+ CD106- CD45- CD34- CD14- CD19- HLADR- SSEA-4- (**Figura 4B**).

30 Posteriormente, con las células hPSC-CMMs descritas en la presente invención, se realizó un estudio comparativo analizando la capacidad de crecimiento de dichas CMMs frente a la capacidad de crecimiento de otras CMMs de origen diferente, en este caso, CMMs somáticas derivadas de cordón umbilical (CB-CMM) y CMMs derivadas de médula ósea humana (BM-CMM). En la **Figura 5A** se

observa que las hPSC-CMMs mostraron un patrón de crecimiento similar a las CMM de cordón umbilical.

Finalmente, analizamos la capacidad de las hPSC-CMMs de diferenciarse a línea osteogénica, adipogénica y condrogénica (**Figura 5B**). Para ello, las hPSC-CMMs se cultivaron a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en Advance-DMEM con 10% de suero, 1% Glutamax y 1% Penicilina/Estreptomicina y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. El medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo inductor de la diferenciación específica a adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis. Para la diferenciación adipogénica, los cultivos de hPSC-CMMs se cultivaron en presencia del medio Adipogenic MSCs Differentiation Bullet Kit (Lonza, Basel, Suiza) durante 2 semanas. Para la diferenciación osteogénica, se cultivaron en presencia del medio comercial Osteogenic MSCs Differentiation Bullet Kit (Lonza, Basel, Suiza) durante 2 semanas también. Para la diferenciación condrocítica, se cultivaron en presencia del medio comercial Chondrogenic MSCs Differentiation Bullet Kit (Lonza, Basel, Suiza) durante 2 semanas también. Como se ha comentado previamente, para demostrar que los cultivos de hPSC-CMMs en presencia de los medios de cultivos mencionados, son capaces de diferenciarse a adipocitos, osteocitos y condrocitos, se procedió al tratamiento de dichos cultivos con los colorantes: Oil Red (Sigma) que tiñe adipocitos o Alizarin Red (Sigma) que tiñe las células procedentes de linaje óseo (Sigma) y Azul Alcian (Sigma) que marca capacidad condrogénica. Como se muestra en la **Figura 5B**, los cultivos de hPSC-CMMs cultivados en presencia de los medios de cultivo específicos, fueron capaces de diferenciarse hacia hueso, grasa y cartílago, incluso un mes después del establecimiento de los cultivos de hPSC-CMMs. En conjunto, estos datos muestran que las hPSC-CMMs, presentan un fenotipo, crecimiento celular y diferenciación, típica de las CMMs.

### **Ejemplo 3. Capacidad inmunotolerante y anti-inflamatoria, *in vitro* e *in vivo*, de las hPSC-CMMs.**

El potencial terapéutico de las CMMs en medicina regenerativa es, en parte debido a sus propiedades inmunomoduladores lo que convierte a las CMM en candidatos atractivos para el tratamiento de enfermedades inmunes. Por ello, en la presente invención se muestra la capacidad de las hPSC-CMMs de inactivar las respuestas de las células T e inhibir la respuesta inflamatoria. El posible potencial inmunomodulador de las hPSC-CMM fue comparado con el potencial inmunomodulador de las CMMs derivadas de cordón umbilical (CB-CMM) y con las CMMs derivadas de tejido adiposo (Ad-CMM), el cual ha sido previamente reportado como potente inmunosupresor celular (García-Castro J et al. J. Cell Mol Med. 2008; 12:2552-2565; Yañez R et al Stem Cells 2006; 24: 2582-2591). Las Ad-CMM y las CB-CMM se han comprado a InbioBank (Inbiomed, San Sebastián, España). Las Ad-CMM y las CB-CMM se cultivaron en DMEM con 1% de FBS, 2mM de L-Glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina en condiciones de 95% de humedad, 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Para el análisis de la capacidad inmunotolerante y anti-inflamatoria se realizaron co-cultivos de las hPSC-CMMs, AD-CMMs y CB-CMMs junto con cultivos mixtos de linfocitos primarios (MLCs). Los MLCs se llevaron a cabo en placas de cultivo de 96 pocillos en presencia de  $10^5$  células respondedoras mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante A con otras  $10^5$  células PBMC de un donante B, tratadas con mitomicina C (para inducir parada de su ciclo celular en fase S), en un volumen de 200  $\mu$ L de medio completo en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de las CMMs antes mencionadas (hPSC-CMMs, AD-CMMs o CB-CMMs). Las PBMCs se aislaron de muestras de sangre total procedentes de diferentes donantes sanos mediante centrifugación de gradiente con Ficoll-Hipaque (20 mins, 600g). Las células fueron recogidas tras el Ficoll y lavadas con RPMI 160 y plantadas en cultivo inmediatamente.

Los cultivos se marcaron con 5  $\mu$ Ci de timidina tritiada por pocillo durante las últimas 12 horas del cultivo. A continuación, las células se recogieron en membranas y la proliferación se determinó midiendo la incorporación de timidina tritiada en un contador de centelleo. Tras 48 horas, se determinó por ELISA la concentración en los sobrenadantes de las citoquinas IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . En experimentos similares, las PBMCs respondedoras se marcaron con 2.5  $\mu$ M de carboxy-fluoresceína-diacetato-succinimidil-éster" (CFSE, Molecular Probes) antes de establecer los co-cultivos. Tras el establecimiento de los co-cultivos, las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD4-PerCP, se fijaron con 1% de paraformaldehído y las células en proliferación se determinaron mediante la dilución de CFSE en la población CD4+ en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson). El número de células en ciclo fue calculado como el % de células CFSE<sup>-low</sup> que se habían dividido por el número total de células.

Los resultados obtenidos demuestran que la adición de hPSC-CMMs a cultivos mixtos de linfocitos (MLC) redujo significativamente el número total de células en el cultivo y, en especial, el número de linfocitos T CD4+ en proliferación (**Figura 6A**). Por otro lado, las hPSC-CMM inhibieron fuertemente la respuesta proliferativa de linfocitos T activados, mostrando un efecto dosis-dependiente con respuestas inmunosupresoras significativas a ratios tan bajos como 1:10 (hPSC-CMM:PBMCs) (**Figura 6B**). Es probable que la ausencia de expresión de moléculas MHC clase II (datos no mostrados) y de moléculas co-estimuladoras como por ejemplo CD80 y CD40 (**Figura 6C**), en las hPSC-CMM sea la responsable de la no estimulación de la proliferación de las PBMCs alogénicas. Además, las hPSC-CMM inhibieron de forma significativa la producción de citoquinas Th1 tales como IL-2,  $\gamma$ -IFN y TNF- $\alpha$  en MLCs analizados mediante ELISA en el sobrenadante de los cultivos (**Figura 7A**). Sin embargo, los niveles de IL-4, una citoquina Th2, no se vieron afectados por la presencia de hPSC-CMM (**Figura 7A**). Los efectos inducidos por las hPSC-CMM no son consecuencia de muerte celular dado que las hPSC-CMM no afectaron a la muerte celular/supervivencia celular de las PBMCs en los MLCs. En general, los

efectos inmunosupresores de las hPSC-CMM sobre las células T son muy similares a los observados en las CB-CMM, pero un poco menos pronunciados que los observados en las Ad-CMM.

A continuación, investigamos la capacidad de las hPSC-CMM de regular la respuesta anti-inflamatoria de células residentes en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide activa (AR). 2x10<sup>5</sup> sinoviocitos de aspecto fibroblastoide (FLS) fueron aislados de las rodillas de pacientes independientes con AR activa. Los FLS fueron estimulados con lipopolisacárido (LPS; 1µg/mL) o con TNF-α (20ng/mL) en presencia o ausencia de 10<sup>5</sup> Ad-MSCs, CB-MSCs o hPSC-MSCs. Tras 24-48 horas, se determinó mediante ELISA la concentración de citoquinas (IL-6 y TNF-α) y mediante el Kit EnzChek gelatinasa/colagenasa (Molecular Probes) la actividad colagenasa (degradación de la matriz extracelular) en los sobrenadantes de los cultivos.

El tratamiento de cultivos de FLS de pacientes con AR activa con hPSC-CMM disminuyó la secreción de TNF-α pero no de IL-6 tras la estimulación con LPS y también redujo la actividad colagenasa tras la estimulación con TNF-α (**Figura 7B**). Estos datos demuestran que las hPSC-CMMs presentan potentes propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias, características de CMMs somáticas funcionales.

Sobre la base de las propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias demostradas por los cultivos *in vitro* de las hPSC-CMMs obtenidas mediante el procedimiento descrito en la presente invención, se procedió al análisis de la potencial acción terapéutica de las hPSC-CMMs *in vivo*, en un modelo experimental de enfermedad inflamatoria intestinal (colitis) en ratones, inducido por la infusión intrarrectal de ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS), que muestra características clínicas, histopatológicas e inmunológicas propias de la enfermedad de Crohn humana (Bouma y Strober, 2003). En ambas enfermedades, enfermedad de Crohn y en la colitis inducida por TNBS, las células Th1 y Th17 activadas, promueven una infiltración y activación exagerada de macrófagos y neutrófilos, dando lugar a una grave y prolongada inflamación de la mucosa intestinal, que se caracteriza por la producción incontrolada de citoquinas y quimioquinas inflamatorias (Bouma y Strober, 2003). Los mediadores inflamatorios como las citoquinas y los radicales libres, producidos por las células infiltrantes y los macrófagos residentes, desempeñan un papel crítico en la destrucción de los tejidos del colon en dichas patologías.

Para la inducción del modelo experimental de inflamación intestinal (colitis) en ratones BALB/c machos de 7 semanas de edad, se les administró de manera intrarrectal 3 mg de TNBS (Sigma) resuspendidos en 50% de etanol (100 µl). Los ratones control recibieron etanol al 50% solamente. Los animales fueron posteriormente divididos en cuatro grupos y 12 horas después del tratamiento con TNBS, cada grupo fue tratado con una inyección intraperitoneal que contenía medio de cultivo solo o medio de cultivo que incluía una concentración de 10<sup>6</sup> células hPSC-CMM o de CB-CMM o de Ad-CMM,

respectivamente. Posteriormente, se realizó un seguimiento de los animales para observar la aparición de diarrea, pérdida de peso corporal, así como la supervivencia de los mismos. El colon de los animales se utilizó para analizar el daño macroscópico (en una escala graduada de 0-10), basándonos en criterios de inflamación (por ejemplo, hiperemia, engrosamiento intestinal y ulceración). También se analizó la consistencia de las heces así como el sangrado rectal.

Como se muestra en la **Figura 8**, los ratones tratados con TNBS desarrollaron una enfermedad grave caracterizada por diarrea con sangre, prolapso rectal, pancolitis acompañada de síndrome de desgaste extensivo (**Figura 8B**) y pérdida de peso sostenida y profunda (**Figura 8A**), que resultó en un índice de mortalidad del 60% (**Figura 8C**). El examen macroscópico mostró hiperemia de colonos en huelga, la inflamación y necrosis. Sin embargo, los ratones tratados con hPSC-CMMs o los tratados con CB-CMMs o Ad-CMMs, muestran un incremento en la tasa de supervivencia (**Figura 8C**), en la recuperación rápida del peso perdido (**Figura 8A**), en la mejora de la caquexia, y en la recuperación de una apariencia saludable, y sólo mostraron leves signos de inflamación en el colon, similares a los encontrados en los ratones control tratados con etanol al 50% (**Figura 8B**). En conjunto, estos datos confirman el efecto terapéutico *in vivo* de las hPSC-CMMs en un modelo experimental de colitis, demostrando, por primera vez, que los cultivos de hPSC-CMMs exhiben potentes propiedades anti-inflamatorias e inmunosupresoras, tanto *in vivo* como *in vitro*.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento de obtención de células madre mesenquimales (PSC-CMMs) que comprende:
- 5       a) Cultivar células PSC en presencia de un inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3.
- b) Aislar las PSC-CMMs obtenidas en el paso anterior
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque el inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3 es el 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida.
- 10   3.- Procedimiento según la reivindicación 2 caracterizado porque el 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida se utiliza a una concentración de entre 5µM a 50µM y durante un tiempo que varía de entre 7 a 40 días, preferentemente a una concentración de 10 µM durante 28 días.
- 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque comprende además un paso c) de diferenciación funcional que consiste en:
- 15       c1) Cultivar las PSC-CMMs obtenidas en medios de cultivo específicos para inducir su diferenciación en líneas osteogénica, condrogénica y adipogénica
- c2) Teñir las PSC-CMMs cultivadas en el paso anterior con colorantes específicos que evidencian su diferenciación.
- 20   5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque las PSC son de origen humano.
- 6.- Células madre mesenquimales (PSC-CMMs) obtenibles mediante el procedimiento de las reivindicaciones 1-3 y 5.
- 25   7.- Células madre mesenquimales (PSC-CMMs) según la reivindicación 6 caracterizadas por no mostrar senescencia al cabo de, al menos, 200 días de cultivo.
- 30   8.- Condrocitos, osteocitos o adipocitos obtenibles mediante el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5.
- 9.- Uso de un inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3 en procedimientos de obtención de células madre mesenquimales.

10.- Uso según la reivindicación 10, donde el inhibidor de la vía de señalización SMAD2/3, es el 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida.

- 5    11.- Uso de las células madre mesenquimales (PSC-CMMs) de las reivindicaciones 6 y 7 en el tratamiento de enfermedades del grupo: enfermedades autoinmunes, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Chron, artritis, enfermedades óseas, enfermedades de cartílago, fistulas y rechazo inmune a injerto.
- 10   12.- Uso de los condrocitos, osteocitos o adipositos de la reivindicación 8 en el tratamiento de enfermedades del grupo: enfermedades autoinmunes, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Chron, artritis, enfermedades óseas, enfermedades de cartílago, fistulas y rechazo inmune a injerto.

FIGURA 1

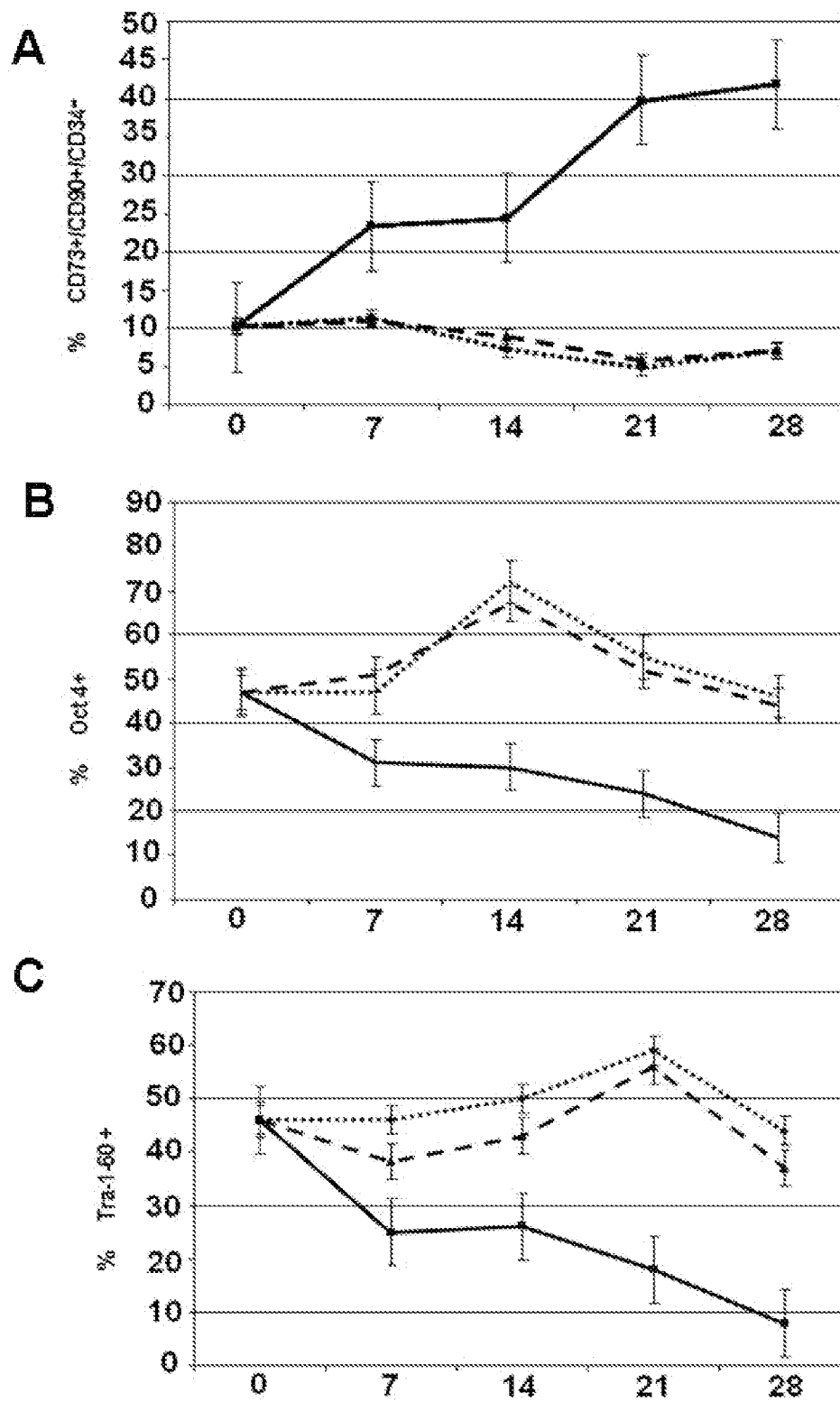
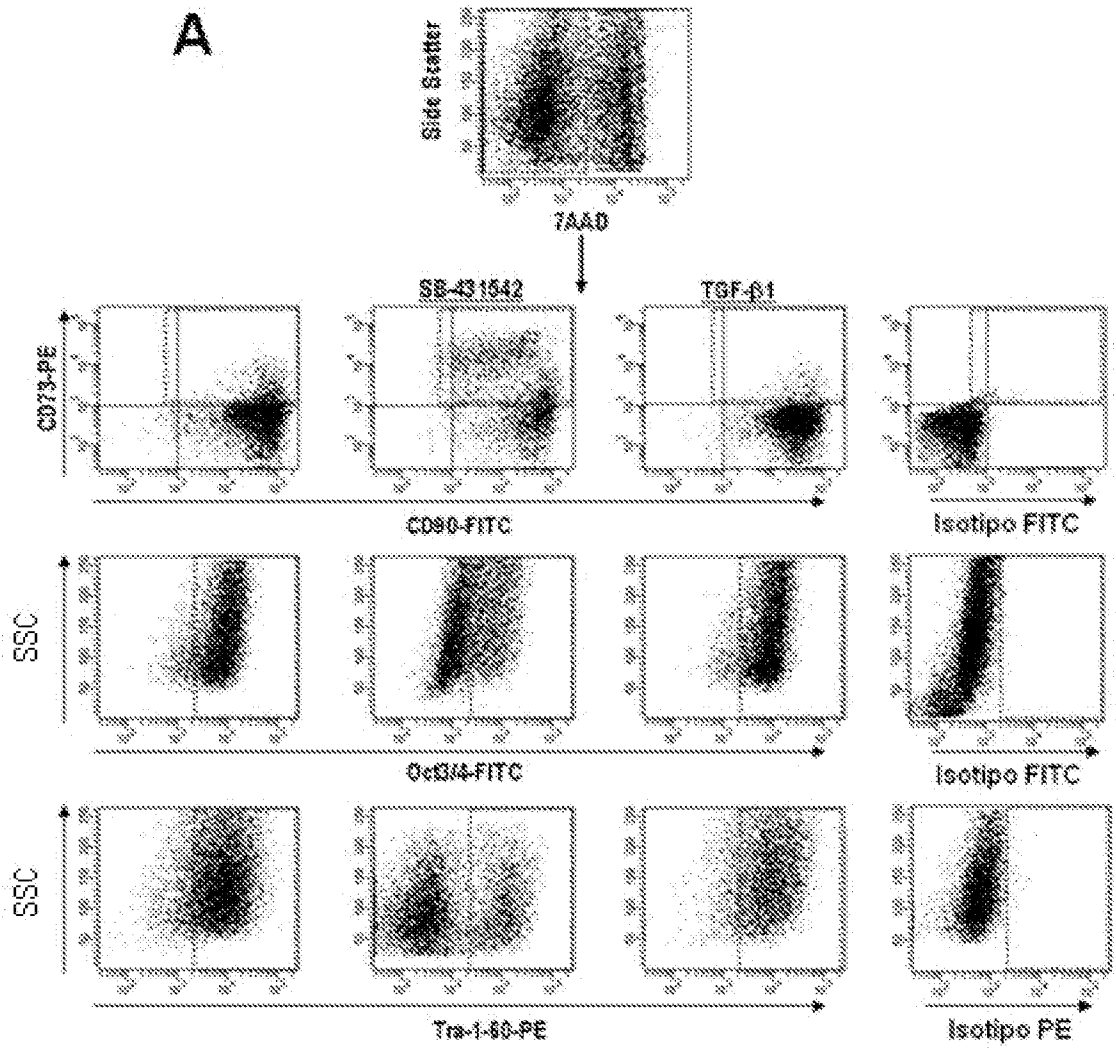


FIGURA 2



**B**

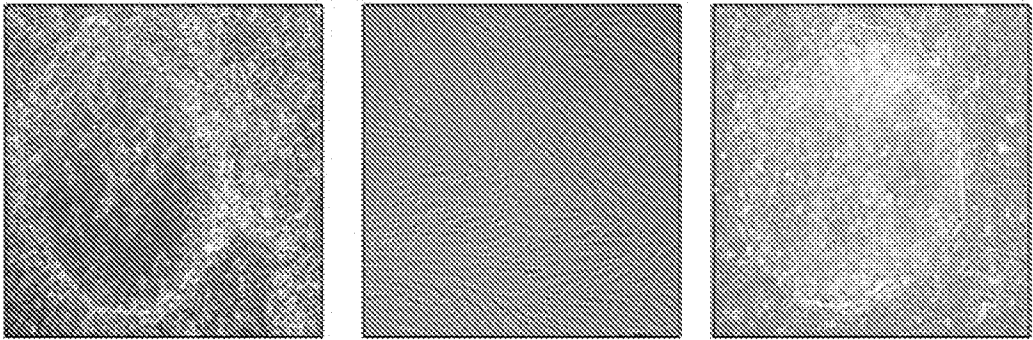


FIGURA 3

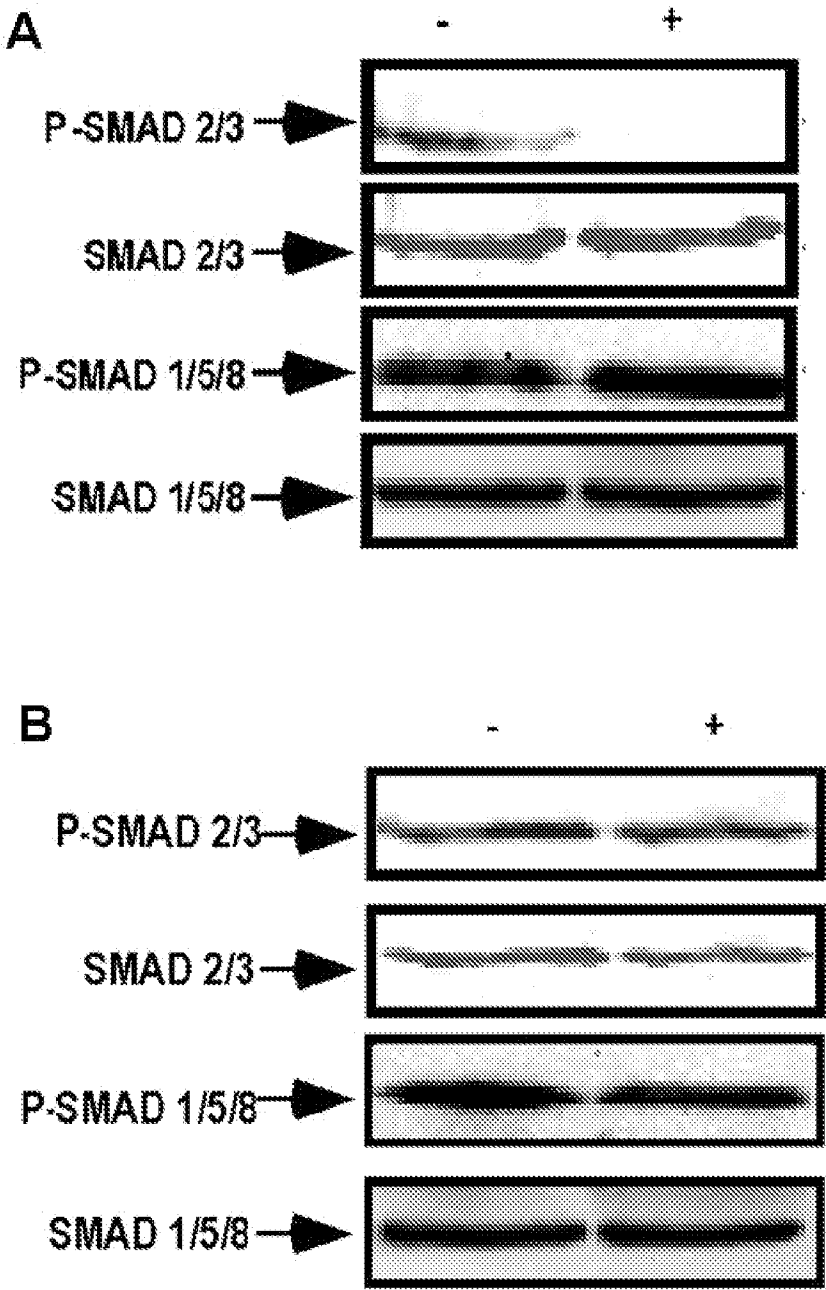


FIGURA 4

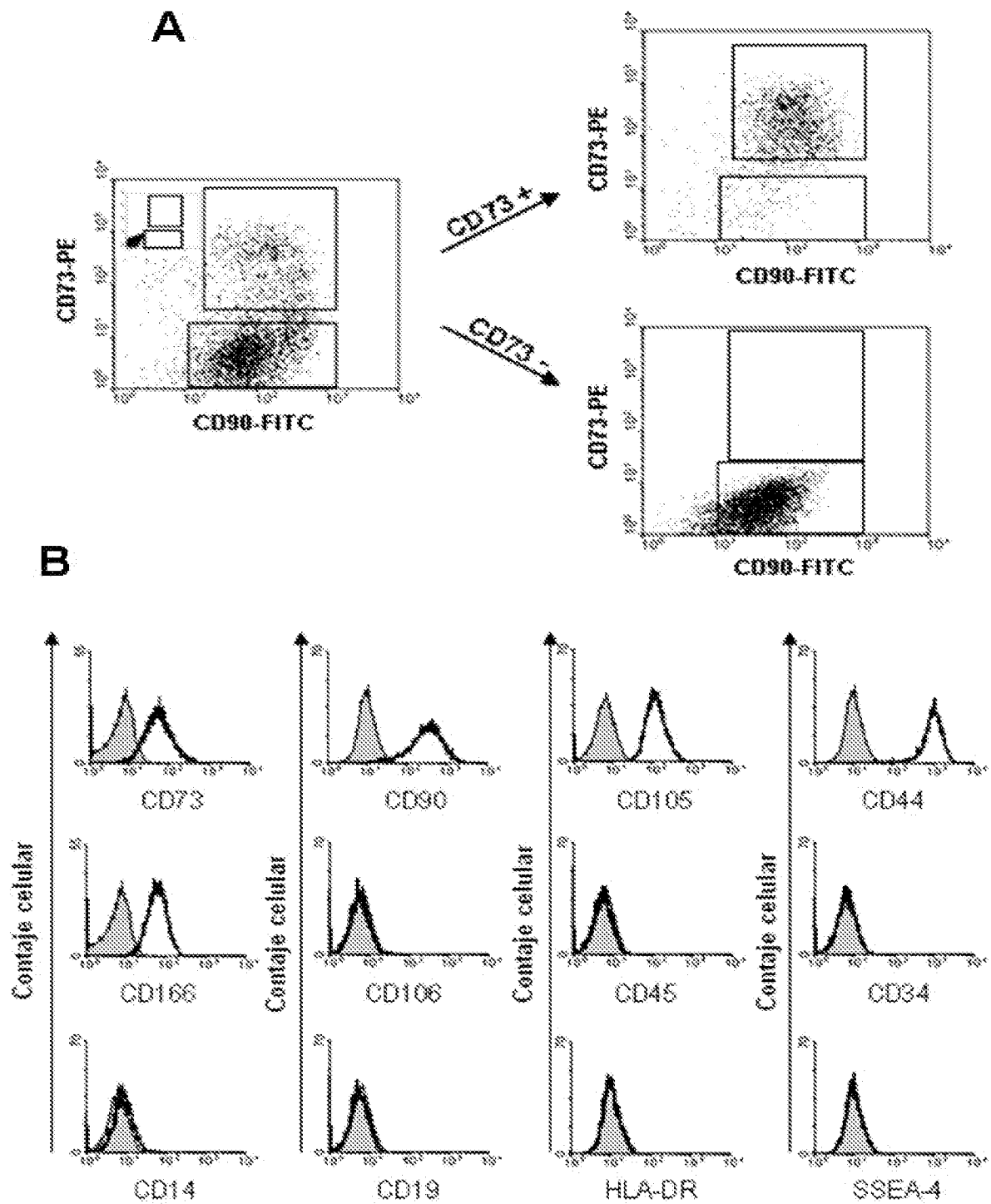
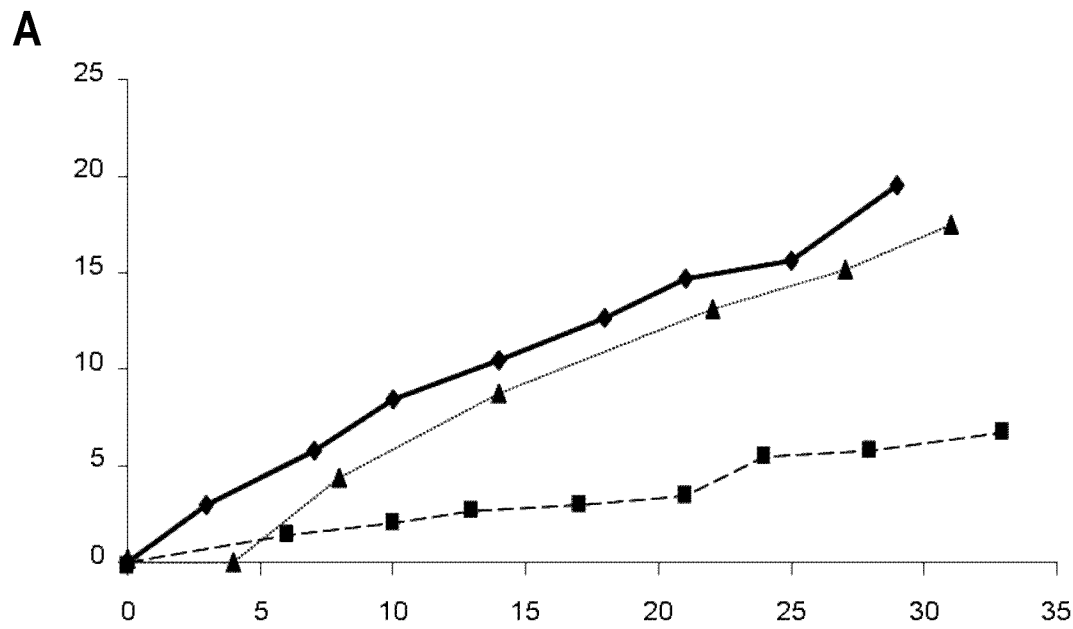


FIGURA 5



**B**

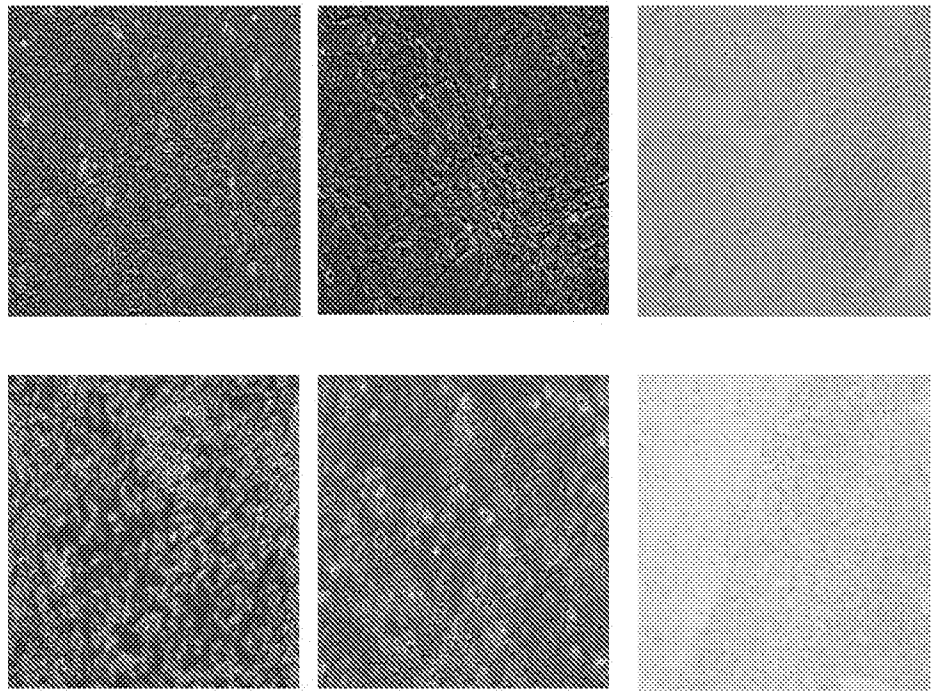


FIGURA 6

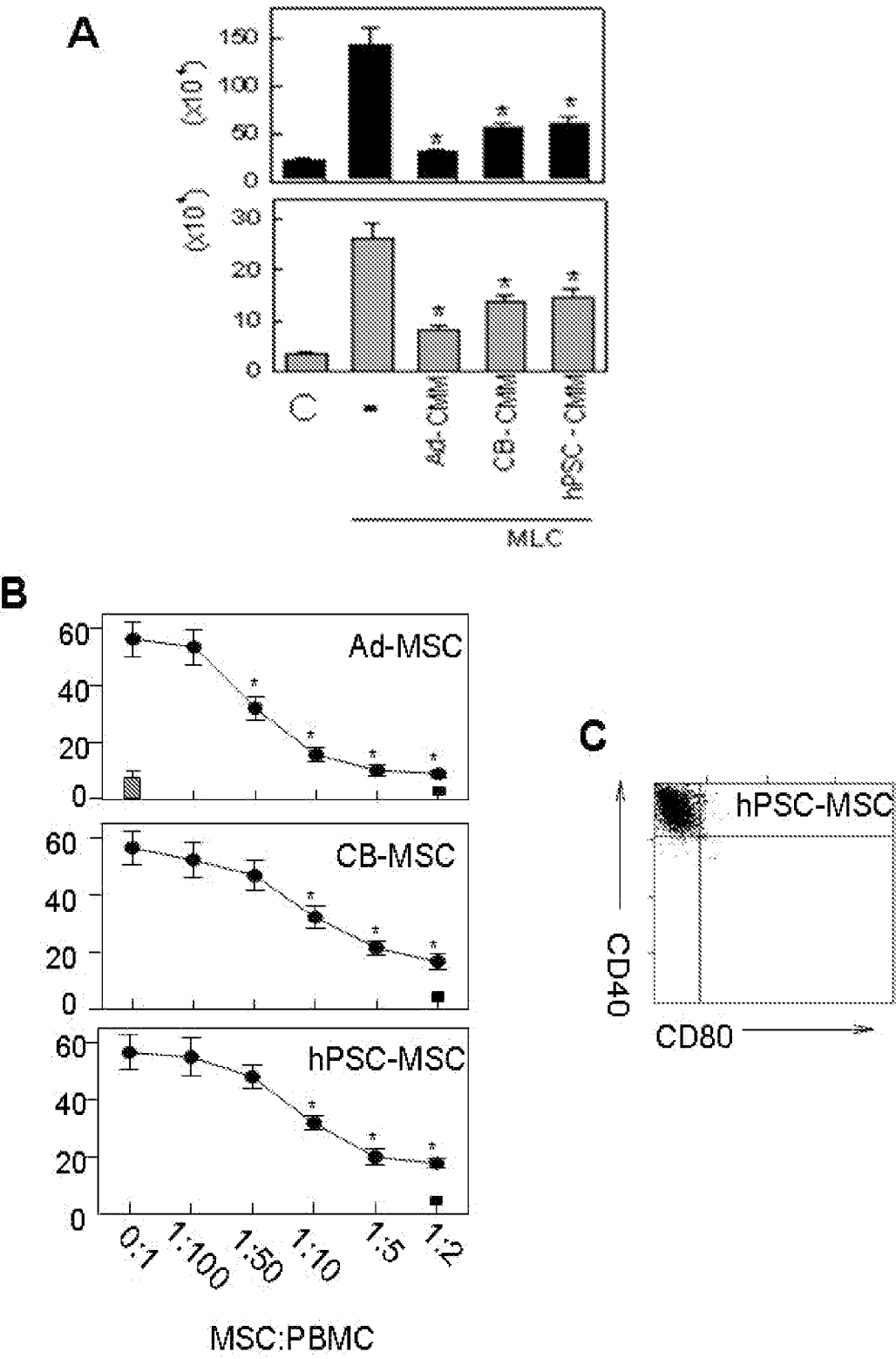


FIGURA 7A

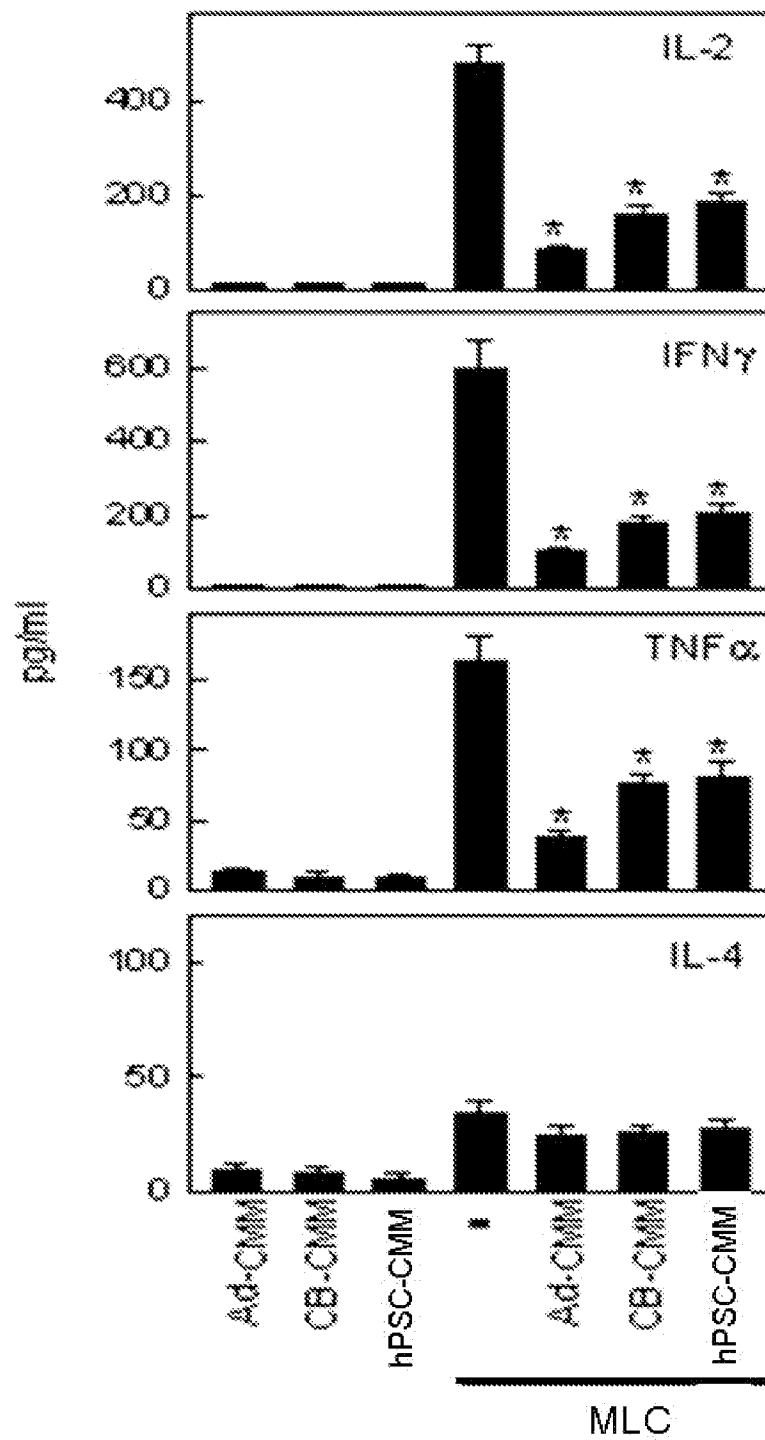


FIGURA 7B

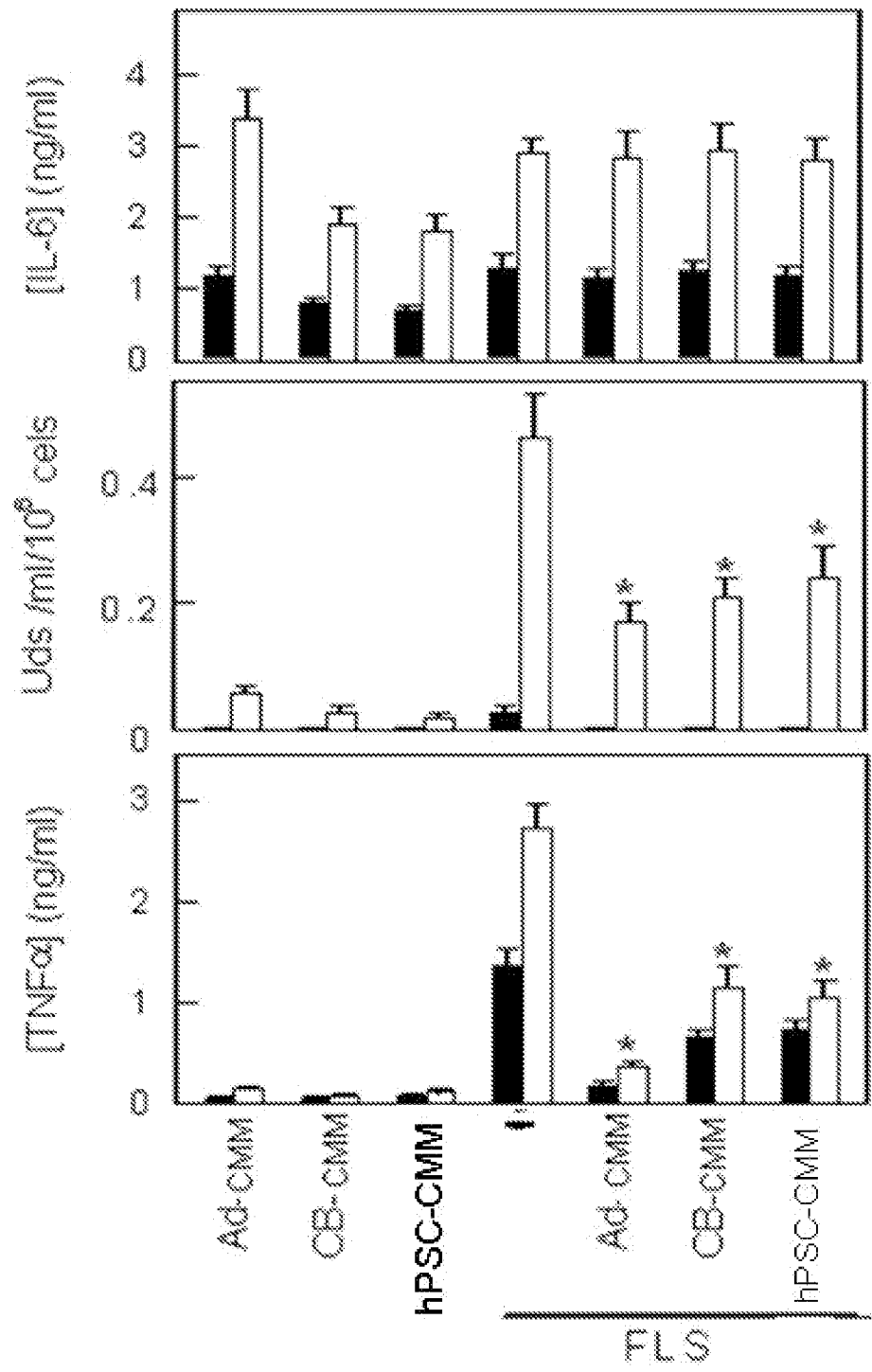
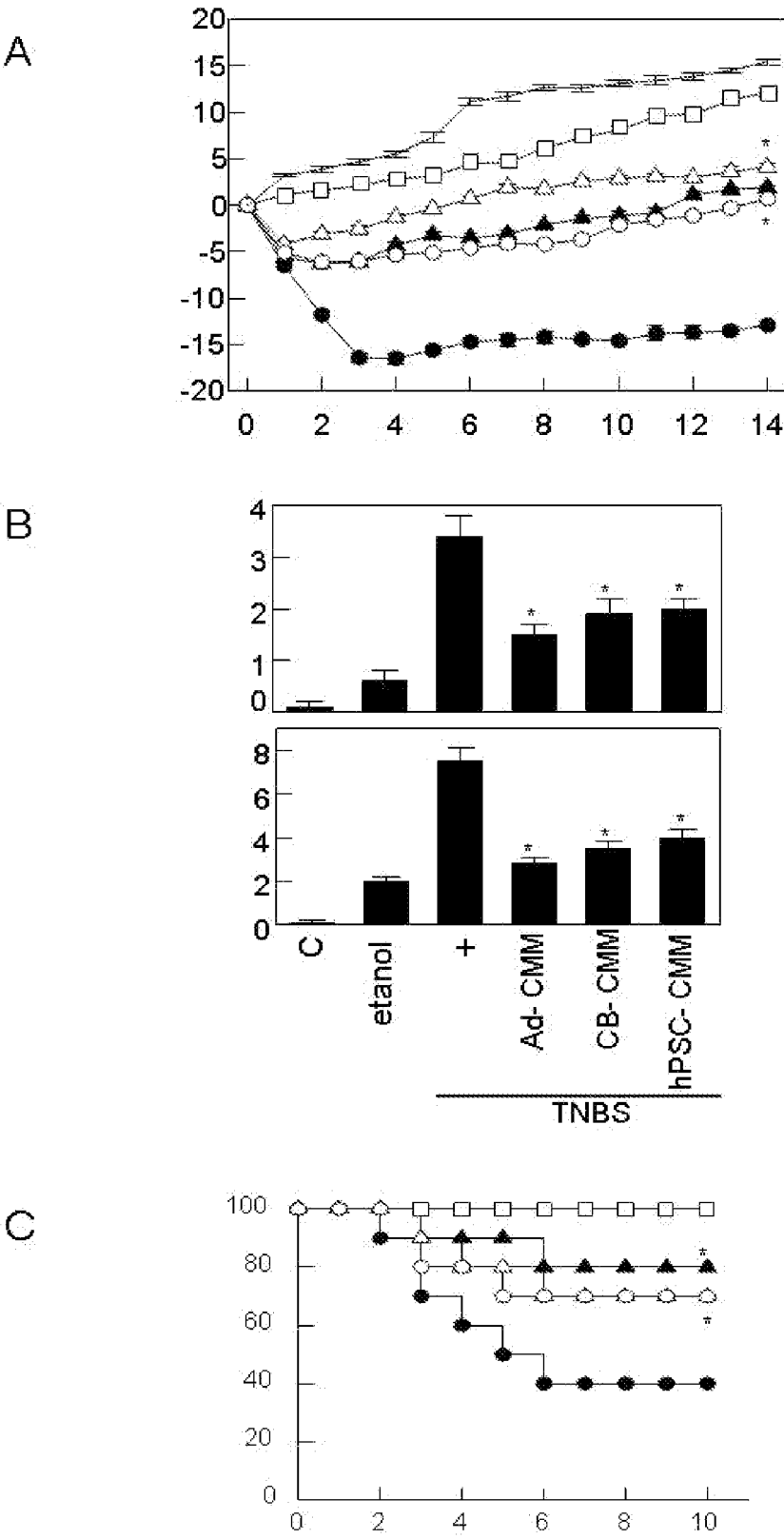


FIGURA 8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070303

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP, INSPEC, COMPDX

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P,X       | SÁNCHEZ, L., GUTIÉRREZ-ARANDA, I., LIGERO, G. et al. Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease. Stem Cells. 2011, Vol. 29, N° 2, pages 251 - 262. ISSN 1066-5099. <Doi:10.1002/stem.569> Published on-line the 24.02.2011. | 1-12                  |
| P,X       | MAHMOOD, A., HARKNESS, L., SCHRODER, H. D. et al. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-β/activin/nodal signaling using SB-431542. Journal of Bone and Mineral Research. June 2010, Vol. 25, N° 6, pages 1216 - 1233. ISSN 1523-4681.                                                                         | 1-10                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                         |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.                                                                                           | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                               |

Date of the actual completion of the international search  
19/08/2011

Date of mailing of the international search report  
(16/09/2011)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer  
E. Relaño Reyes

Telephone No. 91 3498504

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070303

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                       |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                            | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
| X                                                     | WO 2010/011352 A2 (THE UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 28.01.2010, pages 1 - 3; page 17; pages 22 - 26; pages 58 - 59.                                                                                                                                                                 | 9, 10                 |
| A                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1-3, 5-7, 11          |
| X                                                     | WO 2008/094597 A2 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 07.08.2008, page 1; pages 7 - 10; pages 15 - 16; example 8, example 9.                                                                                                                                                              | 9, 10                 |
| A                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1-3, 5-7              |
| A                                                     | TRIVEDI, P., HEMATTI, P. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. Experimental Hematology. March 2008, Vol. 36, N° 3, pages 350 - 359. ISSN 0301-472X. <Doi:10.1016/j.exphem.2007.10.007>                                            | 1, 4-8, 11, 12        |
| A                                                     | BARBERI, T., STUDER, L. Mesenchymal Cells. Methods in Enzymology. 2006, Vol. 418, pages 194 - 208. ISSN 0076-6879. <Doi:10.1016/S0076-6879(06)18012-X>                                                                                                                                                  | 1, 4-8                |
| A                                                     | KITAMURA, R., TAKAHASHI, T., NAKAJIMA, N. et al. Stage-specific role of endogenous Smad2 activation in cardiomyogenesis of embryonic stem cells. Circulation Research. July 2007, Vol. 101, N° 1, pages 78 - 87. ISSN 0009-7330 <Doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.147264>                                     | 1-3, 5                |
| A                                                     | JAMES, D., NAM, H.-S., SEANDEL, M., et al. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFβ inhibition is Id1 dependent. Nature Biotechnology. February 2010, Vol. 28, N° 2, pages 161 - 166. ISSN 1546-1696. <Doi:10.1038/nbt1605>                             | 1-3, 5                |
| A                                                     | SMITH, J. R., VALLIER, L., LUPO, G. et al. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. Developmental Biology. January 2008, Vol. 313, N° 1, pages 107 - 117. ISSN 0012-1606. <Doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.003>                       | 1- 3, 5               |
| A                                                     | GARCÍA-CASTRO, J., TRIGUEROS, C., MADRENAS, J. et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. Journal of Cellular and Molecular Medicine. December 2008, Vol. 12, N° 6B, pages 2552 - 2565. ISSN 1582-1838. <Doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00516.x> | 11, 12                |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070303

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11, 12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 11 and 12 relate to subject matter which this Authority considers is affected by the provisions of PCT Rule 67.1(iv) relating to a method for the treatment of the human or animal body by therapy. Nevertheless, the search in respect of these claims has been carried out on the basis of the alleged effects of the product.
2. ☒ Claims Nos.: 1, 9 and 10  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claims 1 and 9 are not clear (PCT Article 6). This is because the term "inhibitor of the SMA2/3 signalling path" is confusing. Consequently, a search has been carried out with respect to the compound  
4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl] benzamide.  
Claims 9 and 10 are not supported by the description (PCT Article 6), since it cannot be deduced from the description that the use of 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl] benzamide makes it possible to obtain mesenchymal stem cells from cells that are not pluripotent stem cells. Consequently, the search was directed to the use of this compound in methods for producing mesenchymal stem cells from pluripotent stem cells.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/070303

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                            | Publication<br>date                                                                       |
|-----------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 2010/011352 A2                             | 28.01.2010          | CA 2731821 A1<br>AU 2009274517 A1<br>KR 20110042093 A<br>EP 2318520 A2                                                | 28.01.2010<br>28.01.2010<br>22.04.2011<br>11.05.2011                                      |
| -----<br>WO 2008/094597 A2                    | -----<br>07.08.2008 | -----<br>CA 2676044 A1<br>AU 2008211103 A1<br>KR 20090115142 A<br>EP 2126045 A2<br>CN 101641436 A<br>US 2010166713 A1 | -----<br>07.08.2008<br>07.08.2008<br>04.11.2009<br>02.12.2009<br>03.02.2010<br>01.07.2010 |
| -----                                         | -----               | -----                                                                                                                 | -----                                                                                     |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070303

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12N5/073** (2010.01)

**C12N5/074** (2010.01)

**C12N5/077** (2010.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2011/070303

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP, INSPEC, COMPTON

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| P,X        | SÁNCHEZ, L., GUTIÉRREZ-ARANDA, I., LIGERO, G. et al. Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease. Stem Cells. 2011, Vol. 29, Nº 2, páginas 251 - 262. ISSN 1066-5099. <Doi:10.1002/stem.569> Publicado en línea el 24.02.2011. | 1-12                                   |
| P,X        | MAHMOOD, A., HARKNESS, L., SCHRODER, H. D. et al. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-β/activin/nodal signaling using SB-431542. Journal of Bone and Mineral Research. Junio 2010, Vol. 25, Nº 6, páginas 1216 - 1233. ISSN 1523-4681.                                                                        | 1-10                                   |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

|                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
19/08/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**16 de septiembre de 2011 (16/09/2011)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
E. Relaño Reyes  
Nº de teléfono 91 3498504

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070303

| C (Continuación). |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES     |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría *       | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                   | Relevante para las reivindicaciones n° |
| X                 | WO 2010/011352 A2 (THE UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 28.01.2010, páginas 1 - 3; página 17; páginas 22 - 26; páginas 58 - 59.                                                                                                                                                            | 9, 10                                  |
| A                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1-3, 5-7, 11                           |
| X                 | WO 2008/094597 A2 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 07.08.2008, página 1; páginas 7 - 10; páginas 15 - 16; ejemplo 8, ejemplo 9.                                                                                                                                                           | 9, 10                                  |
| A                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1-3, 5-7                               |
| A                 | TRIVEDI, P., HEMATTI, P. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. Experimental Hematology. Marzo 2008, Vol. 36, N° 3, páginas 350 - 359. ISSN 0301-472X. <Doi:10.1016/j.exphem.2007.10.007>                                             | 1, 4-8, 11, 12                         |
| A                 | BARBERI, T., STUDER, L. Mesenchymal Cells. Methods in Enzymology. 2006, Vol. 418, páginas 194 - 208. ISSN 0076-6879. <Doi:10.1016/S0076-6879(06)18012-X>                                                                                                                                                   | 1, 4-8                                 |
| A                 | KITAMURA, R., TAKAHASHI, T., NAKAJIMA, N. et al. Stage-specific role of endogenous Smad2 activation in cardiomyogenesis of embryonic stem cells. Circulation Research. Julio 2007, Vol. 101, N° 1, páginas 78 - 87. ISSN 0009-7330. <Doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.147264>                                    | 1-3, 5                                 |
| A                 | JAMES, D., NAM, H.-S., SEANDEL, M., et al. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFβ inhibition is Id1 dependent. Nature Biotechnology. Febrero 2010, Vol. 28, N° 2, páginas 161 - 166. ISSN 1546-1696. <Doi:10.1038/nbt1605>                               | 1-3, 5                                 |
| A                 | SMITH, J. R., VALLIER, L., LUPO, G. et al. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. Developmental Biology. Enero 2008, Vol. 313, N° 1, páginas 107 - 117. ISSN 0012-1606. <Doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.003>                          | 1-3, 5                                 |
| A                 | GARCÍA-CASTRO, J., TRIGUEROS, C., MADRENAS, J. et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. Journal of Cellular and Molecular Medicine. Diciembre 2008, Vol. 12, N° 6B, páginas 2552 - 2565. ISSN 1582-1838. <Doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00516.x> | 11, 12                                 |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070303

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: 11, 12

se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

Las reivindicaciones 11 y 12 se refieren a una materia que esta Administración considera que está afectada por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT, relativas a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. A pesar de ello, se ha efectuado una búsqueda para estas reivindicaciones basada en los efectos atribuidos al producto

2. ☒ Las reivindicaciones n°s: 1, 9 y 10 (todas parcialmente)

se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

La reivindicaciones 1 y 9 no son claras (Art. 6 PCT). Esto es debido a que el término “inhibidor de la vía de señalización SMA2/3” resulta confuso. En consecuencia, se ha buscado el compuesto 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida.

Las reivindicaciones 9 y 10 no están fundadas en la descripción (Art. 6 PCT), ya que de la misma no se deduce que el uso 4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(2-piridinil)-1H-imidazol-2-il] benzamida, permita la obtención de CMM a partir de células que no sean células madre pluripotentes. En consecuencia, se ha buscado el uso de dicho compuesto en procedimientos de obtención de CMM a partir de PSC.

3. ☐ Las reivindicaciones n°s:

son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

### Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070303

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>Publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes                                                                      | Fecha de<br>Publicación                                                          |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| WO 2010/011352 A2                                        | 28.01.2010              | CA 2731821 A1<br>AU 2009274517 A1<br>KR 20110042093 A<br>EP 2318520 A2                                       | 28.01.2010<br>28.01.2010<br>22.04.2011<br>11.05.2011                             |
| -----                                                    | -----                   | -----                                                                                                        | -----                                                                            |
| WO 2008/094597 A2                                        | 07.08.2008              | CA 2676044 A1<br>AU 2008211103 A1<br>KR 20090115142 A<br>EP 2126045 A2<br>CN 101641436 A<br>US 2010166713 A1 | 07.08.2008<br>07.08.2008<br>04.11.2009<br>02.12.2009<br>03.02.2010<br>01.07.2010 |
| -----                                                    | -----                   | -----                                                                                                        | -----                                                                            |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070303

## CLASIFICACIONES DE INVENCION

**C12N5/073** (2010.01)

**C12N5/074** (2010.01)

**C12N5/077** (2010.01)