



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 996 339**

⑮ Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61P 11/06 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2018 PCT/AU2018/050937**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2019 WO19051536**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2018 E 18855341 (6)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024 EP 3681519**

④ Título: **Método para el tratamiento de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (AAD)/asma**

⑩ Prioridad:

15.09.2017 AU 2017903758

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.02.2025

⑩ Titular/es:

**CYNATA THERAPEUTICS LIMITED (100.00%)
Level 3 62 Lygon Street
Carlton VIC 3053, AU**

⑩ Inventor/es:

**SAMUEL, CHRISHAN y
ROYCE, SIMON**

⑩ Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 996 339 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (AAD)/asma

5 **Campo**

La descripción se refiere al tratamiento de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (AAD) /asma en un sujeto.

10 **Antecedentes**

15 El asma es una enfermedad respiratoria crónica que afecta a aproximadamente 300 millones de personas en todo el mundo y se le atribuyen 250.000 muertes anuales. Su patogénesis tiene tres componentes principales: inflamación de las vías respiratorias (AI); remodelación de las vías respiratorias (AWR; que representan cambios estructurales en las vías respiratorias o los pulmones que eventualmente conducen a la fibrosis y obstrucción de las vías respiratorias); e hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR; la característica clínica del asma). La AWR puede ser el resultado de una AI persistente o crónica, pero también puede desarrollarse y contribuir a la AHR independientemente de la AI.

20 El tratamiento actual del asma, que incluye corticosteroides y agonistas beta, se centra en el tratamiento de los síntomas, más que en la regresión de la enfermedad y, por tanto, no es totalmente eficaz. Los sujetos tratados con terapias basadas en agonistas beta presentan un alivio de los síntomas del asma, pero la AI subyacente persiste. Por tanto, los sujetos que requieren el uso crónico de agonistas beta corren un mayor riesgo de empeorar gravemente el asma, lo que lleva a la hospitalización y la muerte.

25 La terapia estándar de referencia de los corticosteroides tampoco es efectiva para tratar las subpoblaciones de sujetos asmáticos graves y con alta resistencia al tratamiento. Los sujetos asmáticos graves a menudo necesitan tratamiento con dosis altas de corticosteroides, que pueden estar asociados con efectos secundarios sistémicos y no necesariamente mejoran la función pulmonar o la calidad de vida. Además, el subgrupo de sujetos asmáticos con resistencia grave al tratamiento muestra una restricción fija de las vías respiratorias y, por lo tanto, esta población demuestra el papel fundamental de la AWR como parte de sus síntomas de asma, lo que pone de relieve la necesidad urgente de estrategias de tratamiento que puedan centrarse y reducir la AWR.

30 Las células madre mesenquimatosas (MSC) son células estromales multipotentes que tienen la capacidad de dividirse en varios linajes celulares. Estas células expresan el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), pero carecen del MHC-II y de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 y, por lo tanto, son inmunoprivilegiadas. 35 Por lo tanto, las MSC se pueden administrar sistémicamente mediante infusión intravenosa (IV), lo que permite una amplia distribución. Tras la administración intravenosa, las MSC se acumulan en el pulmón. Las MSC también albergan el tejido lesionado a través de la expresión del receptor de quimiocinas tipo 4, cuya expresión aumenta en un entorno proinflamatorio, como en el asma, lo que mejora su capacidad de localización.

40 Jill M Koch y col.: "Mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stromal cells inhibit cell damage, tissue damage and improve peripheral blood flow following hindlimb ischemic injury in mice" Cytotherapy, vol. 18, 2016, describe las MCA-MSE que mejoran el flujo sanguíneo de las extremidades y tienen un efecto protector contra las lesiones isquémicas.

45 Los modelos murinos de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (AAD), que imitan varias características del asma humano, se han utilizado para demostrar que las MSC muestran propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias tanto a través del contacto directo entre células como de la secreción de factores paracrinos. Se demostró que la administración de MSC exógenas disminuye la proliferación de Th2 y reduce el sesgo de Th2, lo que contribuye a la AAD. Se ha observado la supresión de la activación, migración y presentación de抗ígenos de las células dendríticas. Se observó una disminución de las citocinas proinflamatorias asociadas a los eosinófilos en el líquido de lavado broncoalveolar. En comparación con los corticosteroides que inhiben la AI, en estos modelos se ha demostrado que las MSC reducen activamente la presencia y la actividad de las células responsables de la inflamación.

55 Además, se ha demostrado que el tratamiento con MSC reduce el grosor epitelial, la hiperplasia del músculo liso y la metaplasia de células caliciformes en las vías respiratorias, y disminuye modestamente la deposición de colágeno total y subepitelial (fibrosis) gracias a su capacidad para promover los niveles de gelatinasa que degradan el colágeno, lo que sugiere que las MSC también tienen acciones antirremodeladoras.

60 Por ejemplo, Royce Simon G. y col. : "Intranasal administration of mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stem cells abrogates airway fibrosis and airway hyperresponsiveness associated with chronic allergy airways disease" The FASEB Journal, vol. 31, 2017, describe la administración intranasal de MCA-MSC, pero no de MCA-MSC que expresan miR-145-5p, miR-181b-5p y miR-214-3p.

65 Sin embargo, las MSC no han demostrado de manera consistente un alivio de los síntomas adversos asociados con las enfermedades crónicas, y los resultados del tratamiento con las MSC pueden variar según el origen o la fuente del

tejido, el grado de expansión del cultivo, la viabilidad y eficacia dependientes del donante y el momento de su administración.

5 Además, las MSC solo han demostrado efectos beneficiosos cuando se administran en combinación con un segundo agente terapéutico.

10 Además, dado que solo se puede aislar un número relativamente pequeño de MSC de cada órgano del donante, se necesitaría un suministro continuo de donantes para facilitar un número suficiente para el uso experimental y comercial.

15 Debe entenderse que, si en la presente memoria se hace referencia a alguna publicación anterior, dicha referencia no constituye una admisión de que la publicación forma parte del conocimiento general común en la técnica, en Australia o en cualquier otro país.

15 **Resumen**

Un primer aspecto proporciona un método para tratar la AAD/asma en un sujeto, comprendiendo el método administrar una célula madre mesenquimatosa mesenquimoangiblástica (MCA-MSC) al sujeto, en el que el MCA-MSC expresa miR-145-5p, miR-181b-5p y miR-214-3p, pero no miR-127-3p y miR-299-5p.

20 Una realización alternativa o adicional del primer aspecto proporciona el uso de una célula madre mesenquimatosa mesenquimoangiblástica (MCA-MSC) en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de AAD / asma en un sujeto, en el que el MCA-MSC expresa miR-145-5p, miR-181b-5p, y miR-214-3p, pero no miR-127-3p y miR-299-5p.

25 Otra realización alternativa o adicional del primer aspecto proporciona una célula madre mesenquimatosa mesenquimoangiblástica (MCA-MSC) para su uso en un método de tratamiento de la AAD/asma en un sujeto, en el que el MCA-MSC expresa miR-145-5p, miR-181b-5p y miR-214-3p, pero no miR-127-3p y miR-299-5p.

30 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 En la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, la MCA-MSC tiene un fenotipo CD73⁺CD105⁺CD90⁺CD146⁺CD44⁺CD10⁺CD31⁺CD45⁻.

40 En la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, la MCA-MSC se elabora mediante un método que comprende:

(a) cultivar una célula mesodérmica primitiva en un medio formador de colonias mesenquimatosas (M-CFM) compuesto por LiCl y FGF2, pero excluyendo el PDGF, en condiciones normóxicas durante un tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimatosa; y

45 (b) cultivar la colonia mesenquimatosa de (a) de forma adherente para producir la MCA-MSC.

50 En un ejemplo, la MCA-MSC se administra por vía intravenosa o intranasal. En un ejemplo, la MCA-MSC se administra por vía intranasal.

55 En un ejemplo, el tratamiento comprende administrar aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 MCA-MSC al sujeto.

60 En una realización, el sujeto es un mamífero. En una realización, el sujeto es un ser humano.

65 En una realización, al sujeto se le ha administrado previamente un corticosteroide o un agonista beta para tratar el asma. En otra realización, al sujeto no se le ha administrado previamente un corticosteroide o un agonista beta para tratar el asma.

70 En una realización, al sujeto no se le administra un corticosteroide o un agonista beta.

75 En una realización, el sujeto tiene asma grave o asma refractario grave.

80 En una realización, el tratamiento de la AAD/asma o un rasgo característico de los mismos comprende:

(a) disminución de IA, AWR, fibrosis de las vías respiratorias, fibrosis pulmonar, metaplasia de células caliciformes, engrosamiento epitelial, nivel de factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 de las vías respiratorias, densidad de miofibroblastos subepiteliales, concentración de colágeno subepitelial o concentración total de colágeno pulmonar; o

85 (b) aumento de la actividad de la la metaloproteinas de la matriz pulmonar (MMP); o

(c) cualquier combinación de una o más características de (a) o cualquier combinación de una o más características de (a) y (b).

5 El uso de MCA-MSC para tratar la AAD/asma o un rasgo característico de las mismas puede proporcionar una o más de las siguientes ventajas no limitantes:

- 10
- reversión sustancial, si no completa, de los niveles aberrantes de TGF- β 1 en las vías respiratorias, la fibrosis pulmonar y la AHR
 - aumento de los niveles de MMP que degradan el colágeno
 - ningún efecto sobre la expresión basal de los parámetros medidos, lo que indica un tratamiento seguro y eficaz de la AAD/ asma.
- 15

La solución proporcionada por la invención fue inesperada porque estudios anteriores mostraron que la promoción de la deposición de colágeno subepitelial y total inducida por la ovoalbúmina (OVA) sólo podía revertirse por completo cuando los tratamientos basados en células madre se administraban en combinación con un fármaco antifibrótico. Por tanto, la presente invención proporciona una mejora significativa en el tratamiento de la AAD/asma.

20

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 muestra los efectos de las MCA-MSC en la puntuación de inflamación peribronquial según el ejemplo 4. A) Las microfotografías representativas de secciones pulmonares teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de cada uno de los grupos estudiados muestran el grado de infiltración de células inflamatorias de la pared bronquial presente dentro y alrededor de la capa epitelial de las vías respiratorias. Barra de escala = 50 μ m. B) También se muestra la puntuación media \pm EEM de la inflamación de cinco vías respiratorias por ratón, n = 8 ratones/grupo, donde las secciones se puntuaron según el número y la distribución de los agregados inflamatorios en una escala de 0 (sin inflamación aparente) a 4 (inflamación grave). *P < 0,05, ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); ***P < 0,001 frente a grupo con OVA.

30

35 La figura 2 muestra los efectos de las MCA-MSC sobre la metaplasia de células caliciformes según el ejemplo 4. A) Micrografías representativas de secciones pulmonares teñidas con ácido peryódico azul alciano Schiff (ABPAS) de cada uno de los grupos estudiados muestran la extensión de las células caliciformes (indicadas con flechas únicamente en ratones lesionados con OVA) dentro de la capa epitelial de las vías respiratorias. Barra de escala = 25 μ m. B) También se muestra el recuento medio \pm EEM de células caliciformes en cinco vías respiratorias por ratón, n = 8 ratones/grupo. ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); ##P < 0,01, ***P < 0,001 frente a grupo con OVA.

40 La figura 3 muestra los efectos de las MCA-MSC sobre el grosor epitelial de las vías respiratorias y la deposición de colágeno subepitelial (fibrosis) según el ejemplo 4. A) Las microfotografías representativas de las secciones pulmonares teñidas con tricromo de Masson de cada uno de los grupos estudiados muestran la extensión del grosor del epitelio de las vías respiratorias y del grosor del colágeno subepitelial (tinción azul). Barra de escala = 50 μ m. También se muestra la media \pm EEM (B) del grosor epitelial (μ m²) y C) del grosor del colágeno subepitelial (μ m) en relación con la longitud de la membrana basal (BM) de cinco vías respiratorias por ratón, n = 8 ratones/grupo. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); # P < 0,05, ##P < 0,001 frente a grupo con OVA; ¶P < 0,05 frente a grupo con OVA MCA-MSC IV.

50 La figura 4 muestra los efectos de las MCA-MSC sobre la concentración total de colágeno pulmonar (otra medida de la fibrosis) según el ejemplo 4. Se muestra la concentración media \pm EEM total de colágeno pulmonar (% de contenido de colágeno pulmonar/peso seco de tejido) de cada uno de los grupos estudiados; medido desde el segundo lóbulo pulmonar más grande por ratón, a partir de n = 8 ratones/grupo. **P < 0,01, ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); # P < 0,05, ##P < 0,001 frente a grupo con OVA; ¶P < 0,05 frente a grupo con OVA MCA-MSC IV.

55 La figura 5 muestra los efectos de las MCA-MSC sobre la expresión del TGF- β 1 (citocina profibrótica) en las vías respiratorias según el ejemplo 4. A) Las microfotografías representativas de las secciones pulmonares teñidas con inmunohistoquímica (IHC) de cada grupo estudiado muestran el grado de tinción o expresión del TGF- β 1 dentro y alrededor de la capa epitelial de las vías respiratorias. Barra de escala = 50 μ m. B) También se muestra la media relativa \pm EEM de la tinción con TGF- β 1 (expresada como %/campo) en cinco vías respiratorias por ratón, n = 7-8 ratones/grupo. ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); ***P < 0,001 frente a grupo con OVA.

60 La figura 6 muestra los efectos de las MCA-MSC sobre la densidad de los miofibroblastos subepiteliales (células productoras de fibrosis clave) según el ejemplo 4. A) Las microfotografías representativas de las secciones pulmonares teñidas con IHC de cada grupo estudiado muestran el grado de densidad de miofibroblastos teñidos con α -SMA (como lo indican las flechas) dentro de la capa subepitelial de las vías respiratorias. Barra de escala = 25 μ m. B) También se muestra la media \pm EEM del número de miofibroblastos (por 100 μ m de longitud de BM) de cinco vías respiratorias

por ratón, n = 7-8 ratones/grupo. ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); # P < 0,05, ###P < 0,001 frente a grupo con OVA; ¶P < 0,05 frente a grupo con OVA MCA-MSC IV.

5 La figura 7 muestra los efectos de las MCA-MSC sobre los niveles de MMP-9 (una enzima que degrada el colágeno) según el ejemplo 4. A) Un zimógrafo de gelatina representativo (imagen invertida) muestra los niveles de expresión relativos de la MMP-9 pulmonar (gelatinasa B; 92 kDa) y MMP-13 (colagenasa-3; ~55 kDa) en cada uno de los grupos estudiados. En cada caso, se cargaron 10 µg de proteína total por muestra en zimógrafos para su análisis; y los zimógrafos separados que analizaban cinco o seis muestras adicionales por grupo arrojaron resultados similares. B) También se muestra la media relativa ± EEM de densidad óptica (DO) MMP-9 (que es la gelatinasa expresada más abundantemente en el pulmón de ratones Balb/c hembras) de n = 7-8 ratones/grupo. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); ###P < 0,001 frente a grupo con OVA; ¶P < 0,05 frente a grupo con OVA MCA-MSC IV.

10 15 La figura 8 muestra los efectos de las MCA-MSC sobre la AHR según el ejemplo 4. La resistencia de las vías respiratorias (que refleja los cambios en la AHR) se evaluó mediante una plethysmografía invasiva en respuesta al aumento de las dosis de metacolina nebulizada (un broncoconstrictor; y expresado como cambio de resistencia con respecto al valor de referencia). Se muestra la resistencia media ± EEM de las vías respiratorias a cada dosis de metacolina analizada, de n = 7-8 ratones/grupo. *P < 0,05, ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); #P < 0,01, ###P < 0,001 frente a grupo con OVA; ¶P < 0,01 frente a grupo con OVA MCA-MSC IV.

20 25 La figura 9 es una cronología esquemática del modelo de enfermedad alérgica crónica de las vías respiratorias de los ejemplos 5 y 6. El tratamiento se administra del día 64-78 (cuando la patología pulmonar está establecida y en curso).

30 35 La figura 10 muestra los efectos sobre la AHR de las MCA-MSC suplementadas con dexametasona (DEX) según el ejemplo 5. La resistencia de las vías respiratorias (que refleja los cambios en la AHR) se evaluó mediante una plethysmografía invasiva en respuesta al aumento de las dosis de metacolina nebulizada (un broncoconstrictor; y expresado como cambio de resistencia con respecto al valor inicial) según el ejemplo 4. Se muestra la resistencia media ± EEM de las vías respiratorias a cada dosis de metacolina analizada; de n = 6-8 ratones/grupo. *P < 0,05, ***P < 0,001 frente a grupo con solución salina (SAL); # P < 0,05, ###P < 0,001 frente a grupo con OVA; ¶P < 0,01 frente a grupo con OVA + DEX.

40 45 La figura 11 muestra los efectos sobre la AHR de las MCA-MSC administradas por vía intranasal (IN) frente a por vía intravenosa (IV) frente a endotraqueal (ET) según el ejemplo 6. La resistencia de las vías respiratorias (que refleja los cambios en la AHR) se evaluó mediante una plethysmografía invasiva en respuesta al aumento de las dosis de metacolina nebulizada (un broncoconstrictor; y expresado como cambio de resistencia con respecto al valor inicial) según el ejemplo 4. Se muestra la resistencia media ± EEM de las vías respiratorias a cada dosis de metacolina analizada; de n = 6-8 ratones/grupo. **p < 0,01, ***p < 0,001 frente a grupo tratado con solución salina; ## p < 0,01 frente a grupo con OVA.

40 **Descripción detallada**

45 Los cambios estructurales conocidos como remodelación de las vías respiratorias (AWR) caracterizan el asma crónico/grave y contribuyen a la disfunción pulmonar. En general, el asma se trata con corticosteroides y/o betagonistas.

50 55 La presente descripción se refiere al tratamiento del asma en un sujeto que usa MCA-MSC, lo que representa una mejora con respecto al tratamiento del asma con corticosteroides y/o agonistas beta y es una mejora con respecto al tratamiento sugerido con MSC en combinación con otros agentes.

60 65 Los ejemplos 1 y 2 demuestran la diferenciación de células madre pluripotentes inducidas por humanos (iPSC) en células precursoras conocidas como mesenquimoangioblastos (MCA), una clase de células precursoras mesoendodérmicas clonales tempranas y, posteriormente, en células madre mesenquimatosas (MCA-MSC). Como las iPSC pueden proliferar indefinidamente y los propios MCA pueden expandirse hasta convertirse en cantidades extremadamente grandes de MSC, se pueden adquirir suficientes MCA-MSC en un solo banco de células maestras de iPSC, derivadas de un solo donante de sangre sano, lo que limita la variabilidad dependiente del donante y la expansión y la contaminación por células no objetivo, sin necesidad de una expansión excesiva del cultivo una vez que se forman las MSC.

70 Las MCA-MSC de la descripción proporcionan las ventajas de un suministro esencialmente ilimitado y la ventaja adicional de mejorar los efectos inmunomoduladores en comparación con las MSC de la técnica anterior.

75 80 En esta descripción, en particular en los ejemplos 4 y 5, se investigó el potencial terapéutico de estas MCA-MSC cuando se administran a un modelo murino bien establecido de AAD crónica. Este modelo murino de la AAD presenta las tres características centrales del asma humano, la AI, la AWR y la AHR, y se acepta en la técnica como modelo preclínico de asma. En particular, se compararon los efectos antirremodeladores de las MCA-MSC administradas por vía intravenosa (IV) frente a las administradas por vía intranasal (IN).

Es importante destacar que, aunque algunas MSC pueden haber demostrado cierta eficacia en el tratamiento del asma o sus síntomas, dichos efectos sólo se han obtenido cuando esas MSC se han utilizado en combinación con otros agentes terapéuticos. Ventajosamente, la presente descripción evita la necesidad de una terapia combinada.

- 5 Asma
- 10 El asma y/o la AAD pueden caracterizarse por una o más de las siguientes características en cualquier combinación: AI, AWR, AHR, fibrosis de las vías respiratorias y pulmonares, metaplasia de células caliciformes, engrosamiento epitelial, aumento de los niveles del factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 de las vías respiratorias, niveles bajos o ausentes de MMP-9 pulmonar, aumento de la densidad de miofibroblastos subepiteliales, acumulación de colágeno subepitelial y acumulación total de colágeno pulmonar.
- 15 En consecuencia, el tratamiento del asma y/o la AAD con las MCA-MSC de la presente descripción se puede caracterizar por tratar cualquiera o más de las siguientes características en cualquier combinación: disminución de la AI, disminución de la AWR, disminución de la fibrosis de las vías respiratorias o pulmonares, disminución de la metaplasia de células caliciformes, disminución del engrosamiento epitelial, disminución de los niveles del factor de crecimiento transformante de las vías respiratorias (TGF)- β 1, reducción de miofibroblastos subepiteliales y colágeno pulmonar y disminución de la concentración total de colágeno pulmonar.
- 20 20 El tratamiento de la AAD/asma con las MCA-MSC de la presente descripción puede aumentar la expresión/actividad de una MMP, por ejemplo, una gelatinasa y/o una colagenasa. En una realización, la MMP es MMP-9. En otra realización, la MMP es la MMP13. En otra realización, la MMP es MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8 o MMP12.
- 25 Células madre mesenquimatosas-mesenquimoangioblastos (MCA-MSC)
- 30 En consecuencia, la descripción proporciona una terapia mejorada para la AAD/asma, o uno o más de sus rasgos característicos, mediante la administración de MCA-MSC. Las MCA-MSC ejercen sus efectos a través de sus propiedades inmunomoduladoras y pueden actuar directamente en el sitio, lo que produce un rasgo característico del AAD/ asma.
- 35 Las MCA-MSC secretan moléculas bioactivas como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento y tienen la capacidad de modular el sistema inmunitario. Se ha demostrado que las MCA-MSC facilitan la regeneración y los efectos en el sistema inmunitario sin depender del injerto. En otras palabras, las MCA-MSC en sí mismas no se incorporan necesariamente al sujeto huésped, sino que ejercen sus efectos y luego se eliminan en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, las MCA-MSC pueden injertarse.
- 40 40 Como se usa en el presente documento, “célula madre mesenquimatosa” o “MSC” se refiere a un tipo particular de célula madre que puede aislarse de una amplia gama de tejidos, que incluyen médula ósea, tejido adiposo (grasa), placenta y sangre del cordón umbilical. Alternativamente, las MSC pueden producirse a partir de células madre pluripotentes (PSC). Las MSC también se conocen como “células estromales mesenquimales”.
- 45 45 Tal como se usa en el presente documento, “MCA-MCS” se refiere a un tipo particular de MSC producidas a partir de iPSC mediante un fenotipo de mesenquimoangioblastos. La producción de MCA-MSC a partir de PSC se describe en la solicitud de patente internacional n.º PCT/AU2017/050228, presentada el 14 de marzo de 2017, se describe en los ejemplos 1 y 2. Las MCA-MSC son distintas de las MSC de la técnica anterior, por ejemplo, como se demuestra en el ejemplo 3.
- 50 50 Se ha demostrado que las MSC ejercen actividades inmunomoduladoras contra las células T, las células B, las células dendríticas, los macrófagos y las células asesinas naturales. Sin pretender imponer ninguna teoría, los mecanismos subyacentes pueden comprender mediadores inmunomoduladores, por ejemplo, óxido nítrico, indolamina 2,3, dioxigenasa, prostaglandina E2, proteína del gen 6 inducible por el factor de necrosis tumoral, CCL-2 y ligando de muerte programada 1. Estos mediadores se expresan a un nivel bajo hasta que son estimulados, por ejemplo, por citocinas inflamatorias, como el IFNgamma, el TNF α y la IL-17.
- 55 55 Como se usa en el presente documento, “célula madre pluripotente” o “PSC” se refiere a una célula que tiene la capacidad de reproducirse indefinidamente y de diferenciarse en cualquier otro tipo de célula. Hay dos tipos principales de PSC: células madre embrionarias (ESC); y células madre pluripotentes inducidas (iPSC).
- 60 60 Tal como se usa en el presente documento, “célula madre pluripotente inducida” o “iPSC” se refiere a una célula similar a la ESC derivada de células adultas. Las iPSC tienen características muy similares a las de las ESC, pero evitan las preocupaciones éticas asociadas a las ESC, ya que las iPSC no se derivan de embriones. En cambio, las iPSC generalmente se derivan de células adultas completamente diferenciadas que han sido “reprogramadas” para volver a un estado pluripotente.

Las MCA-MSC utilizadas según la descripción se forman a partir de células mesodérmicas primitivas. Las células primitivas del mesodermo pueden tener potencial de mesenquimangioblastos (MCA). Las células primitivas del mesodermo tienen un fenotipo $EMH^{lin^-}KDR^+APLNR^+PDGFR\alpha\beta^+$. En otras palabras, las MCA-MSC utilizadas según la invención, tal como se definen en las reivindicaciones, se forman a partir de células del mesodermo primitivo $EMH^{lin^-}KDR^+APLNR^+PDGFR\alpha\beta^+$ con potencial de MCA.

Tal como se usa en el presente documento, “célula del mesodermo primitivo $EMH^{lin^-}KDR^+APLNR^+PDGFR\alpha\beta^+$ con potencial de MCA” se refiere a una célula que expresa los genes típicos del mesodermo extraembionario de la línea primitiva y de la placa lateral/placa lateral/extraembionario. Estas células tienen el potencial de formar colonias de MCA y hemangioblastos en un medio sin suero en respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2). Cuando se cultivan según el ejemplo 2, estas células se convierten en MCA-MSC.

El término EMH^{lin^-} denota la falta de expresión de los marcadores endoteliales CD31, cadherina VE, los marcadores mesenquimales/endoteliales CD73 y CD105 y los marcadores hematopoyéticos CD43 y CD45.

Las MCA-MSC usadas según la invención tal como se definen en las reivindicaciones muestran un fenotipo $CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+CD31^-CD45^-$ y expresan cada uno de los microARN miR-145-5p, miR-181b-5p y miR-214-3p, pero no miR-127-3p y miR-299-5p.

Además de sus efectos en el tratamiento de la AAD/asma demostrados en el presente documento, las MCA-MSC poseen “actividades inmunomoduladoras” que pueden evaluarse *in vitro* como la capacidad de una MCA-MSC para suprimir la proliferación de los linfocitos T cooperadores (CD4 $^+$). Las actividades inmunomoduladoras se pueden cuantificar *in vitro* con respecto a una referencia, por ejemplo, tal como se determina usando un ensayo de inmunopotencia.

Un ensayo de inmunopotencia adecuado usa una MCA-MSC de ensayo irradiado producido de acuerdo con el método descrito en el presente documento y una muestra de referencia irradiada MSC, que se colocan en placas por separado a diversas concentraciones con leucocitos marcados con éster succinimidílico de carboxifluoresceína purificados de sangre periférica de un donante sano. Los linfocitos T auxiliares (CD4 $^+$) que representan un subconjunto de la muestra de referencia se estimulan añadiendo anticuerpos CD3 y CD28. Las células T marcadas con CD4 se enumeran usando citometría de flujo para evaluar la proliferación de las células T. Los valores de CI50 se indican en función de la muestra de referencia. Un valor de CI50 más alto indica una mayor magnitud de supresión de la proliferación de los linfocitos T cooperadores (CD4 $^+$) y, por tanto, es indicativo de propiedades inmunomoduladoras superiores de las células T. Las muestras de MSC se irradian antes de su uso en este ensayo para eliminar el factor de confusión de su potencial proliferativo.

Tratamiento de la AAD/asma con MCA-MSC

El experto en la técnica apreciará que la manera exacta de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de MCA-MSC para tratar la AAD/asma en un sujeto quedará a discreción del médico. El modo de administración, incluida la dosis, la combinación con otros agentes, el momento y la frecuencia de administración, y similares, puede verse afectado por el estado y la historia del sujeto.

Aunque una ventaja de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, es que las MCA-MSC se pueden usar solas para tratar la AAD/asma o un rasgo característico de las mismas, se apreciará que las MCA-MSC se pueden combinar con otra terapia para el asma. Por ejemplo, un médico aún puede tratar a un sujeto asmático con otro tratamiento para el asma cuando el sujeto asmático tiene un régimen de tratamiento del asma existente, por ejemplo, que comprende una terapia con corticosteroides o agonistas beta, y el tratamiento con MCA-MSC se produce posteriormente.

El MCA-MSC se puede administrar como una composición terapéutica. Tal como se usa en el presente documento, el término “composición terapéutica” se refiere a una composición que comprende una MCA-MSC o una población de MCA-MSC tal como se describe en el presente documento que se ha formulado para su administración a un sujeto. Preferiblemente, la composición terapéutica es estéril. En una realización, la composición terapéutica está libre de pirógenos.

En un ejemplo, la MCA-MSC o la composición terapéutica se proporcionan en un recipiente, preferiblemente un recipiente estéril, preferiblemente un recipiente libre de pirógenos. En una realización, el recipiente es una jeringa, por ejemplo adecuada para la administración en bolo. En otra realización, el recipiente es una bolsa de infusión adecuada para la infusión. En otra realización, el recipiente está adaptado para la administración IN.

La MCA-MSC se formulará, dosificará y administrará de manera consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el tipo particular de trastorno que se está tratando y los efectos secundarios o síntomas anticipados, el sujeto particular que se está tratando, el estado clínico del sujeto, el sitio de administración, el método de administración, el calendario de administración y otros factores conocidos por los

profesionales médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz de las MCA-MSC a administrar se regirá por tales consideraciones.

5 Las dosis de MCA-MSC pueden variar de aproximadamente 10^3 células/m² a aproximadamente 10^{11} células/m², por ejemplo de aproximadamente 10^6 células/m² a aproximadamente 2×10^8 células/m², o de aproximadamente 10^3 células/m², aproximadamente 5×10^3 células/m², aproximadamente 10^4 células/m², aproximadamente 5×10^4 células/m², aproximadamente 10^5 células/m², aproximadamente 5×10^5 células/m², aproximadamente 10^6 células/m², aproximadamente 5×10^6 células/m², aproximadamente 10^7 células/m², aproximadamente 5×10^7 células/m², aproximadamente 10^8 células/m², aproximadamente 5×10^8 células/m², aproximadamente 10^9 células/m², aproximadamente 5×10^9 células/m², aproximadamente 10^{10} células/m², aproximadamente 5×10^{10} células/m², o aproximadamente 10^{11} células/m².

10 Las dosis de MCA-MSC pueden variar de aproximadamente 10^3 células/kg a aproximadamente 10^{11} células/kg, por ejemplo de aproximadamente 10^6 células/kg a aproximadamente 2×10^8 células/kg, o aproximadamente 10^3 células/kg, aproximadamente 5×10^3 células/kg, aproximadamente 10^4 células/kg, aproximadamente 5×10^4 células/kg, aproximadamente 10^6 células/kg, aproximadamente 5×10^6 células/kg, aproximadamente 10^7 células/kg, aproximadamente 5×10^7 células/kg, aproximadamente 10^8 células/kg, aproximadamente 5×10^8 células/kg, aproximadamente 10^9 células/kg, aproximadamente 5×10^9 células/kg, aproximadamente 10^{10} células/kg, o aproximadamente 10^{11} células/kg.

15 20 Las dosis de MCA-MSC pueden variar de aproximadamente 10^3 células a aproximadamente 10^{11} células, por ejemplo de aproximadamente 10^6 células a aproximadamente 2×10^8 células, o aproximadamente 10^3 células, aproximadamente 5×10^3 células, aproximadamente 10^4 células, aproximadamente 5×10^4 células, aproximadamente 10^6 células, aproximadamente 5×10^6 células, aproximadamente 10^7 células, aproximadamente 5×10^7 células, aproximadamente 10^8 células, aproximadamente 5×10^8 células, aproximadamente 10^9 células, aproximadamente 5×10^9 células, aproximadamente 10^{10} células, o aproximadamente 10^{11} células.

25 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de MCA-MSC eficaz para tratar en un sujeto.

30 35 Las MCA-MSC se pueden administrar en una dosis única, una dosis dividida o en dosis múltiples. Por ejemplo, se puede administrar una dosis dividida entre las fosas nasales de un sujeto, por ejemplo, aproximadamente la mitad de una dosis por fosa nasal.

40 A un sujeto se le pueden administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dosis de MCA-MSC.

45 50 A un sujeto se le pueden administrar dos o más dosis de MCA-MSC con 1 semana, 2 semanas, 1 mes o 2 meses de diferencia. A un sujeto se le pueden administrar dos o más dosis trimestralmente, semestralmente, anualmente, bienalmente o en un intervalo mayor, por ejemplo, si la AAD/asma o un rasgo característico de la misma reaparece en un sujeto ya tratado con una MCA-MSC, en o después del momento de la recurrencia.

55 60 Las MCA-MSC se pueden administrar de forma sistémica o periférica por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vías que incluyen la intravenosa (IV), la intranasal (IN), la intratraqueal, la intrapulmonar y la intraarterial. En una realización, las MCA-MSC se administran por vía intravenosa, intravenosa, intratraqueal o intrapulmonar. En una realización, las MCA-MSC se administran IN.

65 65 En una realización, las MCA-MSC se tratan previamente antes de la administración. El tratamiento previo puede ser con un factor de crecimiento o mediante edición genética, por ejemplo, donde un factor de crecimiento puede cavar la MCA-MSC y la edición génica puede conferir una nueva propiedad terapéutica a la MCA-MSC.

70 Las MCA-MSC pueden administrarse al sujeto antes, durante o después del desarrollo de AAD/asma o un rasgo característico de la misma por parte del sujeto.

75 Como tales, los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir, reducir o mejorar la AAD/asma o un rasgo característico de la misma en un sujeto o ralentizar (disminuir) la progresión de la AAD/asma o un rasgo característico de la misma en un sujeto. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen AAD/asma o un rasgo característico de la misma, así como aquellos en los que se debe prevenir o mejorar la AAD/asma o un rasgo característico de la misma.

80 85 Los términos "prevenir", "que previene", "preventivo" o "profiláctico" se refieren a impedir que se produzca la AAD/asma o un rasgo característico de la misma, o a impedir, defenderse o proteger de la aparición de la AAD/asma o un rasgo característico de la misma. Un sujeto que necesita prevenir la AAD/asma o un rasgo característico de la misma puede ser propenso a desarrollar AAD/asma o un rasgo característico de la misma, por ejemplo, debido a los antecedentes familiares.

El término “mejorar” o “mejora” se refiere a una disminución, reducción o eliminación de la AAD/asma o a un rasgo característico de la misma.

5 El tratamiento de la AAD/asma o un rasgo característico de la misma administrando una MCA-MSC puede resultar en una disminución de aproximadamente el 1 %, aproximadamente una disminución del 2 %, aproximadamente una disminución del 3 %, aproximadamente una disminución del 4 %, aproximadamente una disminución del 5 %, aproximadamente una disminución del 6 %, aproximadamente una disminución del 8 %, aproximadamente una disminución del 9 %, aproximadamente una disminución del 10 %, aproximadamente una disminución del 15 %, aproximadamente una disminución del 20 %, aproximadamente una disminución del 25 %, aproximadamente una disminución del 30 %, aproximadamente una disminución del 35 %, aproximadamente una disminución del 40 %, aproximadamente una disminución del 45 %, aproximadamente una disminución del 50 %, aproximadamente una disminución del 55 %, aproximadamente una disminución del 60 %, aproximadamente una disminución del 65 %, aproximadamente un 70 % disminución, aproximadamente una disminución del 75 %, aproximadamente una disminución del 80 %, aproximadamente una disminución del 85 %, aproximadamente una disminución del 90 %, aproximadamente una disminución del 95 %, aproximadamente una disminución del 99 % o una disminución de aproximadamente el 100 % en la AAD/asma o un rasgo característico de la misma.

20 En un ejemplo, el tratamiento de la AAD/asma o un rasgo característico de la misma mediante la administración de una MCA-MSC puede disminuir la AAD/asma o un rasgo característico de la misma a una magnitud equivalente a la de un sujeto que no tiene AAD/asma o un rasgo característico de la misma.

25 El experto en la técnica comprenderá fácilmente cómo evaluar y cuantificar la AAD/asma o un rasgo característico de los mismos, y podrá hacerlo sin dificultad ni carga indebida, por ejemplo, utilizando los métodos establecidos en los presentes ejemplos. Por ejemplo, se puede cuantificar lo siguiente: i) la puntuación de inflamación como medida de la AI; ii) la metaplasia de células caliciformes como medida de la AWR inducida por la AI; iii) el grosor epitelial como medida de la AWR; iv) el grosor del colágeno subepitelial como medida de la AWR/fibrosis; v) la concentración total de colágeno pulmonar como medida de la AWR/fibrosis; vi) tinción epitelial con TGF- β 1 como medida del AWR; vii) la densidad de miofibroblastos subepiteliales como medida de la AWR; viii) expresión/actividad de gelatinasa (por ejemplo, MMP-2 y/o MMP-9) y/o colagenasa (por ejemplo, MMP-1 y/o MMP-13) como medida de la AWR; y/o ix) hiperrespuesta/reactividad de las vías respiratorias como medida de la función pulmonar y la AHR.

30 35 Cualquier cuantificación de la AAD/asma o un rasgo característico de la misma puede compararse con un control, por ejemplo, un sujeto de control sano o una población sana de sujetos de control que no tienen AAD/asma o un rasgo característico de la misma. Alternativamente, el control puede ser un sujeto de control o una población de sujetos de control que tenían AAD/asma o un rasgo característico de la misma y que han sido tratados con MCA-MSC y que han respondido a ellas.

40 45 Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” puede referirse a un mamífero. El mamífero puede ser un primate, particularmente un ser humano, o puede ser un animal doméstico, de zoológico o de compañía. Aunque se contempla particularmente que el método descrito en el presente documento sea adecuado para el tratamiento médico de seres humanos, también es aplicable al tratamiento veterinario, incluido el tratamiento de animales domésticos tales como caballos, vacas y ovejas, animales de compañía tales como perros y gatos, o animales de zoológico tales como felinos, cánidos, bóvidos y ungulados.

50 55 60 A menos que se defina lo contrario en esta memoria descriptiva, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta descripción y por referencia a los textos publicados.

Cabe señalar que el término “un” o “una” se refiere a uno o más, por ejemplo, “una MCA-MSC”, y se entiende que representa uno o más MCA-MSC. Como tal, los términos “un” o “una”, “uno o más” y “al menos uno” pueden usarse indistintamente en el presente documento.

En las reivindicaciones que siguen y en la descripción, a menos que el contexto requiera de cualquier otra manera en razón de un lenguaje expreso o una implicación necesaria, la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” se usa en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas pero no para excluir la presencia o adición de características adicionales en diversas realizaciones.

65 El término “aproximadamente”, tal como se usa en el presente documento, contempla un intervalo de valores para un número dado de \pm 25 % de la magnitud de ese número. En otras realizaciones, el término “aproximadamente” contempla un intervalo de valores para un número dado de \pm 20 %, \pm 15 %, \pm 10 % o \pm 5 % de la magnitud de ese número. Por ejemplo, en un ejemplo, “aproximadamente 3 gramos” indica un valor de 2,7 gramos a 3,3 gramos (es decir, 3 gramos \pm 10 %), y similares.

65 Del mismo modo, el tiempo o la duración de los eventos pueden variar en al menos un 25 %. Por ejemplo, aunque en un ejemplo se puede describir que un evento particular dura un día, el evento puede durar más o menos de un día.

Por ejemplo, “un día” puede incluir un período de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 30 horas. En otros casos, los períodos de tiempo pueden variar en un $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$ o $\pm 5\%$ de ese período de tiempo.

Los siguientes ejemplos ayudan a describir la divulgación, que no se limita a dichos ejemplos.

5

Ejemplos

Ejemplo 1. Reactivos para la producción de MCA-MSC

10 Tabla 1. Reactivos

Descripción	Vendedor, número de catálogo o número de referencia
medio básico DMEM/F12	Invitrogen / A1516901
suplemento E8	Invitrogen / A1517101
vitronectina	Life Technologies / A14700
colágeno IV	Sigma / C5533
Inhibidor ROCK H-1152	EMD Millipore / 555550
Inhibidor ROCK del dihidrocloruro Y27632	Tocris / 1254
FGF2	Waisman Biomanufacturing / WC-FGF2-FP
SFM endotelial humano	Life Technologies / 11111-044
medio de expansión de células madre hematopoyéticas de línea germinal II	Sigma / S0192
GLUTAMAX	Invitrogen / 35050-061
insulina	Sigma / 19278
cloruro de litio (LiCl)	Sigma / L4408
solución de colágeno I	Sigma / C2249
fibronectina	Life Technologies / 33016-015
DMEM/F12	Invitrogen / 11330032
BMP4 humano recombinante	Peprotech / 120-05ET
activina A	Peprotech / 120-14E
medio modificado de Dulbecco de Iscove (IMDM)	Invitrogen / 12200036
mezcla de nutrientes de Ham F12	Invitrogen / 21700075
bicarbonato de sodio	Sigma / S5761
Ácido L-ascórbico 2-fosfato Mg ²⁺	Sigma / A8960
1-tioglicerol	Sigma / M6145
selenito de sodio	Sigma / S5261
aminoácidos no esenciales	HyClone / SH30853.01
concentrado lipídico definido químicamente	Invitrogen / 11905031
agua apta para transferencia de embriones	Sigma / W1503
poli(alcohol vinílico) (PVA)	MP Bio / 151-941-83
holo-transferrina	Sigma / T0665
ES-CULT M3120	Stem Cell Technologies / 03120
Medio de expansión sin suero STEMSPAN (SFEM)	Stem Cell Technologies / 09650
Ácido L-ascórbico	Sigma / A4544
homodímero de la subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB)	Peprotech / 110-14B

65 Los reactivos enumerados en la tabla 1 son conocidos por los expertos en la materia y tienen composiciones aceptadas, por ejemplo, IMDM y de Ham F12. GLUTAMAX comprende el dipéptido L-alanil-L-glutamina, normalmente

suministrado a 200 mM en NaCl al 0,85 %. GLUTAMAX libera L-glutamina tras la escisión del enlace dipeptídico por parte de las células que se están cultivando. El concentrado lipídico definido químicamente comprende ácido araquidónico 2 mg/l, colesterol 220 mg/l, acetato de DL-alfa-tocoferol 70 mg/l, ácido linoleico 10 mg/l, ácido linolénico 10 mg/l, ácido mirístico 10 mg/l, ácido oleico 10 mg/l, ácido palmítico 10 mg/l, ácido palmitoleico 10 mg/l, ácido palmitoleico 10 mg/l, Pluronic F-68 90 g/l, ácido esteárico 10 mg/l, ácido esteárico 10 mg/l, ácido palmitoleico 10 mg/l, Pluronic F-68 90 g/l, ácido esteárico 10 mg/l, ácido esteárico 10 mg/l, Tween 80® 2,2 g/l y alcohol etílico. El H-1152 y el Y27632 son inhibidores selectivos de la ROCK (proteína serina/treonina quinasa formadora de espiral asociada a RHO) altamente potentes, permeables a las células.

10 Tabla 2. Medio IF6S (concentración 10X)

10X IF6S	Cantidad	Concentración final
IMDM	1 paquete, polvo para 1 l	5X
Mezcla de nutrientes de Ham F12	1 paquete, polvo para 1 l	5X
bicarbonato de sodio	4,2 g	21 mg/ml
Ácido L-ascórbico 2-fosfato Mg ²⁺	128 mg	640 ug/ml
1-tioglicerol	80 µl	4,6 mM
selenito de sodio (solución de 0,7 mg/ml)	24 µl	84 ng/ml
GLUTAMAX	20 ml	10X
aminoácidos no esenciales	20 ml	10X
concentrado lipídico definido químicamente	4 ml	10X
agua apta para transferencia de embriones	Hasta 200 ml	NA

30 Tabla 3. Medio IF9S (concentración 1X; basado en IF6S)

IF9S	Cantidad	Concentración final
IF6S	5 ml	1X
poli(alcohol vinílico) (PVA) Solución de 20 mg/ml)	25 ml	10 mg/ml
holo-transferrina (solución de 10,6 mg/ml)	50 µl	10,6 µg
insulina	100 µl	20 µg/ml
agua apta para transferencia de embriones	Hasta 50 ml	NA

40 Tabla 4. Medio de diferenciación (concentración 1X; basado en IF9S)

Medio de diferenciación	Cantidad	Concentración final
IF9S	36 ml	1X
FGF2	1,8 µg	50 ng/ml
LiCl (solución 2 M)	36 µl	2 mM
BMP4 (solución de 100 µg/ml)	18 µl	50 ng/ml
Activina A (solución de 10 mg/ml)	5,4 µl	1,5 ng/ml

55 Tabla 5. Medio formador de colonias mesenquimatosas (concentración 1X)

Medio formador de colonias mesenquimatosas (M-CFM)	Cantidad	Concentración final
ES-CULT M3120	40 ml	40 %
STEMSPAN SFEM	30 ml	30 %
SFM endotelial humano	30 ml	30 %
GLUTAMAX	1 ml	1X
Ácido L-ascórbico (solución 250 mM)	100 µl	250 µM
LiCl (solución 2 M)	50 µl	1 mM

Medio formador de colonias mesenquimatosas (M-CFM)	Cantidad	Concentración final
1-tioglicerol (solución 100 mM)	100 μ l	100 μ M
FGF2	600 ng	20 ng/ml

5

Tabla 6. Medio de expansión mesenquimatoso sin suero (concentración 1X)

Medio de expansión sin suero mesenquimatoso (M-SFEM)	Cantidad	Concentración final
SFM endotelial humano	5 l	50 %
STEMLINE II HSFM	5 l	50 %
GLUTAMAX	100 ml	1X
1-tioglicerol	87 μ l	100 μ M
FGF2	100 μ g	10 ng/ml

10

Ejemplo 2. Diferenciar las iPSC humanas en MCA-MSC

15

1. iPSC descongeladas en medio completo E8 (medio base DMEM/F12 + suplemento E8) + H1152 de 1 μ M en recipientes de plástico recubiertos de vitronectina (0,5 μ g/cm²). iPSC en placas incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂, 20 % de O₂ (normóxicas).

20

2. Las iPSC expandieron tres pasos en medio completo E8 (sin inhibidor ROCK) sobre recipientes de plástico recubiertos con vitronectina (0,5 μ g/cm²) y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y 20 % de O₂ (normóxico) antes de iniciar el proceso de diferenciación.

25

3. Se cosecharon y sembraron iPSCs como células individuales/colonias pequeñas a 5×10^3 células/cm² en material plástico recubierto de colágeno IV (0,5 μ g/cm²) en medio completo E8 + 10 μ M Y27632 y se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂, 20 % O₂ (normoxia) durante 24 h.

30

4. Se reemplazó el medio completo E8 + 10 μ M Y27632 por un medio de diferenciación y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂, 5 % de O₂ (hipóxico) durante 48 h para producir células primitivas del mesodermo.

35

5. Células mesodérmicas primitivas formadoras de colonias recolectadas del cultivo adherente en medio de diferenciación como suspensión unicelular, transferidas al cultivo en suspensión M-CFM e incubadas a 37 °C, 5 % CO₂, 20 % O₂ (normóxico) durante 12 días, hasta que se formaran colonias mesenquimatosas.

40

6. Se cosecharon y sembraron colonias mesenquimatosas en placas de plástico recubiertas de fibronectina/collágeno I (0,67 μ g/cm² de fibronectina, 1,2 μ g /cm² de collágeno I) en M-SFEM y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y 20 % de O₂ (normoxia) durante 3 días para producir CMM (pase 0).

45

7. Se cosecharon las colonias y se sembraron como células individuales (pase 1) a $1,3 \times 10^4$ células/cm² en placas de plástico recubiertas de fibronectina/collágeno 1 en M-SFEM y se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂, 20 % O₂ (normoxia) durante 3 días.

50

8. Se cosecharon y sembraron como células individuales (pase 2) a $1,3 \times 10^4$ células/cm² en un recipiente de plástico recubierto de fibronectina/collágeno 1 en M-SFEM y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂, 20 % O₂ (normóxico) durante 3 días.

55

9. Se cosecharon y sembraron como células individuales (pase 3) a $1,3 \times 10^4$ células/cm² en un recipiente de plástico recubierto de fibronectina/collágeno 1 en M-SFEM y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂, 20 % O₂ (normóxico) durante 3 días.

60

10. Se cosecharon y sembraron como células individuales (pase 4) a $1,3 \times 10^4$ células/cm² en un recipiente de plástico recubierto de fibronectina/collágeno 1 en M-SFEM y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂, 20 % O₂ (normóxico) durante 3 días.

65

11. Se cosecharon y sembraron como células individuales (pase 5) a $1,3 \times 10^4$ células/cm² en un recipiente de plástico recubierto de fibronectina/collágeno 1 en M-SFEM y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂, 20 % O₂ (normóxico) durante 3 días.

12. Se cosecharon como células individuales y se congelaron el producto final.

65

Se realizaron dos experimentos (TC-A-96 y DAD-V-90) para investigar el impacto de la suplementación del M-CFM con PDGF-BB (10 ng/ml) y/o LiCl (1 mM) en la supresión de las células T de las MCA-MSC derivadas de iPSC. La supresión de las células T se evaluó mediante el ensayo de inmunopotencia (IPA) de Waisman Biomanufacturing.

5 Como se describe en la tabla 7, se evaluaron las siguientes combinaciones de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y LiCl: PDGF+/LiCl+, PDGF-/LiCl-, PDGF+/LiCl- y PDGF-/LiCl+. Obsérvese que en el experimento TC-A-96 se compararon dos densidades de siembra de Dneg1 diferentes (5×10^3 células/cm² y 1×110^4 células/cm²) y dos concentraciones diferentes de activina A (AA) en el medio de diferenciación (1X AA = 15 ng/ml y 0,1X AA = 1,5 ng/ml). En el experimento DAD-V-90 se usaron una sola densidad de semillas de Dneg1 (5×10^3 células/cm²) y una concentración de activina A (1,5 ng/ml). Tenga en cuenta también que se usó un solo leukopak (LPK7) en la primera IPA (IPA 1) y dos leukopaks (LPK7 y LPK8) en la segunda IPA (IPA 2).

10 Este ensayo está diseñado para evaluar el grado en que cada línea de MSC puede suprimir la proliferación de linfocitos T auxiliares (CD4⁺). Las MSC crioconservadas se probaron utilizando leucocitos crioconservados purificados de la sangre periférica de individuos sanos (células mononucleóticas de sangre periférica (PBMC) derivadas de leukopaks (LPK)). Como tal, se espera una variación en la población de células LPK de un donante a otro. Cada muestra de prueba del MCA-MSC se analizó contra la PMBC de dos personas diferentes para obtener material de grado clínico, con la opción de limitar las pruebas a una sola muestra de PMBC para material de grado de investigación. El ensayo para cada muestra de prueba de MCA-MSC se realizó junto con una línea MSC estándar de referencia para garantizar la integridad/reproducibilidad del ensayo y para normalizar las muestras de prueba. El ensayo se describe en Bloom y col. *Cytotherapy*, 2015, 17(2):140-51.

15 En resumen, las MCA-MSC de prueba se expusieron a 21 Gy de radiación gamma. En una placa de cultivo tisular de 48 pocillos, se colocaron en placas de 4×10^5 , 2×10^5 , 4×10^4 y 2×10^4 MCA-MSC irradiadas en pocillos individuales. Las PMBC se marcaron por separado con éster succinimidílico de carboxifluoresceína. Las células PMBC etiquetadas se siembran en placas a 4×10^5 células por pocillo que contiene las MCA-MSC anteriores. Esto da como resultado razones valoradas de PBMC:MCA-MSC de 1:1, 1:0,5, 1:0,1 y 1:0,05. Se sembró un pocillo adicional con PMBC estimuladas solas, otro con MCA-MSC solas y otro en una razón de 1:0,05 sin estimulación, todos los cuales sirven como controles. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo anticuerpos monoclonales estimuladores de las células T, contra el CD3-épsilon humano y contra el CD28 humano (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN).

20 El cuarto día de cultivo, las células se recolectaron de pocillos individuales. Las células de cada pocillo se incubaron con CD4 antihumano marcado con aloficiocianina. A continuación, se analizó la proliferación de las células CD4⁺ mediante la intensidad de la carboxifluoresceína utilizando un citómetro de flujo. El control con MCA-MSC solo sirvió para eliminar las MCA-MSC de los pozos de cocultivo. El control con PMBC solo sirvió como control positivo para la máxima proliferación de células T contra la que se mide el grado de supresión mediada por MCA-MSC. El pocillo de razón 1:0,05 no estimulado se usó para generar una puerta de control negativa contra la cual se midió la proliferación.

25 A partir de las razones de las muestras de prueba, se usó una curva de mejor ajuste para generar los valores de CI50. Los valores de CI50 se normalizaron con respecto al estándar de referencia (CI50 de estándar de referencia/CI50 de muestra de prueba). Esta CI50 normalizada produce valores más grandes para muestras más potentes (más supresoras) y valores más pequeños para muestras menos potentes.

30 Resultados

35 Los datos de CI50 presentados en la tabla 7 muestran que la M-CFM suplementada con LiCl, pero excluyendo el PDGF (es decir, PDGF-/LiCl+), era óptima para diferenciar las iPSC y producir iPSC-MSC que son inmunomoduladoras. Además, una concentración más baja de activina A también mejoró la inmunosupresión de las MCA-MSC derivadas de iPSC.

40 Tabla 7. Ensayo de inmunopotencia

	CI50 (LPK7)	CI50 (LPK8)	Muestra	PDGF	LiCl	Activina A	Densidad de semillas (D2)
55	No aplicable	no supresor	TC-A-96-B3	+	+	0,1 X (1,5 ng/ml)	5×10^3 células/cm ²
	No aplicable	0,17	TC-A-96-B1	+	+	1 X (15 ng/ml)	5×10^3 células/cm ²
	No aplicable	0,17	DAD-V-90-4	+	+	0,1 X (1,5 ng/ml)	5×10^3 células/cm ²
60	No aplicable	0,19	TC-A-96-D3	+	+	0,1 X (1,5 ng/ml)	1×10^4 células/cm ²
	No aplicable	0,36	DAD-V-90-2	+	-	0,1 X (1,5 ng/ml)	5×10^3 células/cm ²
65	No aplicable	0,57	DAD-V-90-1	-	-	0,1 X (1,5 ng/ml)	5×10^3 células/cm ²
	0,39	0,54	TC-A-96-B1	-	+	1 X (15 ng/ml)	5×10^3 células/cm ²

CI50 (LPK7)	CI50 (LPK8)	Muestra	PDGF	LiCl	Activina A	Densidad de semillas (D2)
0,37	0,58	TC-A-96-D2	-	+	1 x (15 ng/ml)	1×10 ⁴ células/cm ²
0,69	0,93	DAD-V-90-3	-	+	0,1 X (1,5 ng/ml)	5×10 ³ células/cm ²

5 Las MCA-MSC producidas según este ejemplo muestran un fenotipo CD73⁺CD105⁺CD90⁺CD146⁺CD44⁺CD10⁺CD31⁻CD45⁻.

10 Ejemplo 3. Análisis de microARN de MCA-MSC

La MCA-MSC producida según el ejemplo 2 se analizó frente a una micromatriz de microARN (miARN) que comprendía 1194 miARN y un panel de miARN patentado que consistía en miR-127-3p, miR-145-5p, miR-181b-5p, miR-214-3p, miR-299-5p, validado contra 71 muestras de MSC y 94 muestras que no son de MSC.

15 La MCA-MSC producida según el ejemplo 2 expresó cada uno de los miR-145-5p, miR-181b-5p y miR-214-3p, pero no miR-127-3p y miR-299-5p.

20 Un análisis de los componentes principales de los 233 miARN de la micromatriz detectados de forma fiable en los datos normalizados (presentes en al menos una muestra analizada) generados para todas las muestras analizadas demostró que la MCA-MSC producida según el ejemplo 2 era distinto de cada una de las otras 71 muestras de MSC.

Ejemplo 4. Tratamiento in vivo de la AAD/asma

25 Métodos y materiales

Animales

30 Se obtuvieron ratones Balb/c hembras de seis a ocho semanas de edad de Monash Animal Services (Universidad de Monash, Clayton, Victoria, Australia) y se alojaron en un entorno controlado, en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de iluminación oscura con acceso gratuito a agua y pienso de laboratorio (Barastock Stockfeeds, Pakenham, Victoria, Australia). A todos los ratones se les proporcionó un periodo de aclimatación de 4-5 días antes de cualquier experimentación y todos los procedimientos realizados fueron aprobados por un Comité de Ética Animal de la Universidad de Monash (número de ética: MARP/2016/078), que cumple con las Directrices australianas para el cuidado y el uso de animales de laboratorio con fines científicos.

35 Inducción de la AAD crónica

40 Para evaluar los efectos de las MSC en la AAD crónica, se estableció un modelo de AAD crónica inducida por ovoalbúmina (OVA) en ratones (n = 24). Los ratones se sensibilizaron con dos inyecciones intraperitoneales (IP) de 10 µg de huevo de gallina OVA de grado V (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.) y 400 µg de adyuvante de sulfato de aluminio y potasio (alumbre); AJAX Chemicals, NSW, Australia) los días 0 y 14. A continuación, se les expuso por inhalación de todo el cuerpo (nebulización) a OVA aerosolizado (2,5 % p/v en solución salina normal al 0,9 %) durante treinta minutos, tres veces por semana, entre los días 21 y 63, utilizando un nebulizador ultrasónico (Omron NE-U07; Omron, Kioto, Japón). Sin embargo, para los ratones de control (n = 24), en lugar de OVA, se les administraron inyecciones IP de 500 ml de solución salina al 0,9 % y se nebulizaron con solución salina al 0,9 %.

45 Tratamiento con MCA-MSC

50 Veinticuatro horas después del establecimiento de la AAD crónica (el día 64), los subgrupos de ratones sensibilizados o expuestos a la OVA o a la solución salina (n = 8 ratones/grupo) se sometieron a la administración intravenosa o intravenosa de MCA-MSC. En todos los casos, se eligió un periodo de tratamiento de catorce días (de 64 a 77 días) para replicar el marco temporal utilizado para evaluar los efectos de otras células madre, como las MSC derivadas de la médula ósea humana (estromal) y las células epiteliales del amnios humano, en el modelo crónico de AAD inducido por los óvulos.

55 Las MCA-MSC se produjeron según los ejemplos 1 y 2. Una característica definitoria de las MSC es la expresión de las células CD73, CD90 y CD105, y las células MCA-MSC fueron más del 99 % positivas para estos tres marcadores, pero negativas para las CD43/45 y CD31, lo que confirma la ausencia de células de linaje hematopoyético y endotelial. Todos los tratamientos se administraron una vez por semana durante el periodo de tratamiento (los días 64 y 71). En la mañana de cada tratamiento programado, las MCA-MSC congeladas se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y luego se resuspendieron de la siguiente manera: para la administración intravenosa de MCA-MSC, se resuspendieron 1 × 10⁷ células en 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se sujetó a los ratones en un dispositivo de sujeción de metacrilato y se injectaron 1 × 10⁶ células/200 µl de PBS en la vena de la cola de ratones tratados con solución salina o con OVA. Para la administración intravenosa de MCA-MSC, se resuspendieron 1 × 10⁷ células en 0,5 ml de PBS. Los ratones se anestesiaron ligeramente con isoflurano (Baxter Health Care, NSW, Australia)

y se mantuvieron en posición semisupina mientras tenía lugar la instilación intranasal. A continuación, se administraron por vía intravenosa a los ratones 1×10^6 células/50 μ l de PBS; 25 μ l en cada orificio nasal con una pipeta automática.

5 Pletismografía invasiva

El día 78 (7 días después del último tratamiento de las MCA-MSC), los ratones se anestesiaron con ketamina (10 mg/kg de peso corporal) y xilazina (2 mg/kg de peso corporal) en solución salina al 0,9 %. La traqueotomía se realizó entonces en todos los ratones con un tubo de traqueotomía de calibre 18. A continuación, los ratones se colocaron en la cámara del pletismógrafo Buxco FinePointe (Buxco, Research Systems, Wilmington, NC, EE. UU.) y se ventilaron. A continuación, se midió la resistencia de las vías respiratorias de cada ratón en respuesta al aumento de las dosis de metacolina (metacolina; Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.) se disolvió en PBS y se administró por vía intratraqueal en dosis de 6,25 a 50 mg/ml en 4 dosis para provocar broncoconstricción y evaluar la AHR. El cambio en la resistencia de las vías respiratorias (la resistencia máxima de las vías respiratorias después de cada dosis menos la resistencia basal al PBS solo) se representó frente a la dosis correspondiente de metacolina.

10 15 Recolección de tejidos

20 Tras una pletismografía invasiva, los tejidos pulmonares de cada animal se aislaron y se enjuagaron con PBS frío antes de dividirlos en cuatro lóbulos separados. El lóbulo más grande se fijó en formaldehído tamponado neutro al 10 % durante la noche y se procesó para cortarlo e incrustarlo en cera de parafina (para el análisis histológico e inmunohistoquímico de varios puntos finales). Los tres lóbulos restantes se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido para varios otros ensayos.

25 Histopatología pulmonar

30 Una vez embebido en parafina el lóbulo más grande de cada ratón, cada bloque de tejido se seccionó en serie (3 μ m de grosor) y se colocó en láminas de Mikro Glass cargadas (Grale Scientific, Ringwood, Victoria, Australia) y se sometió a diversas tinciones histológicas o inmunohistoquímicas. Para evaluar la puntuación de inflamación, el grosor epitelial y la deposición de la matriz extracelular subepitelial (ECM), una sección (por lámina) de cada ratón se sometió a la tinción tricromática de Masson. Para evaluar la metaplasia de células caliciformes, una segunda serie de láminas se sometió a tinción con ácido periódico Schiff (ABPAS) con azul alciano. Las secciones teñidas con tricromo y ABPAS de Masson se analizaron morfométricamente, como se detalla a continuación.

35 Inmunohistoquímica (IHC)

40 La IHC se utilizó para detectar el TGF- β 1 (utilizando un anticuerpo políclonal; sc-146; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE. UU.; dilución 1:1000) o α -actina del músculo liso (a-SMA; un marcador de diferenciación de miofibroblastos; usando un anticuerpo monoclonal; M0851; DAKO, Glostrup, Dinamarca; dilución 1:200). La tinción primaria de anticuerpos se detectó utilizando los kits anticonejos o ratones DAKO EnVision y el cromógeno de 3,3'-diaminobencidina (DAB), mientras que también se incluyeron los controles negativos, que estuvieron expuestos a los kits EnVision en ausencia de cualquier anticuerpo primario. A continuación, todos los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y los Servicios de Histología de Monash los escanearon utilizando ScanScope AT Turbo (Aperio, CA, EE. UU.) para su análisis morfométrico.

45 Análisis morfométrico

50 Los portaobjetos teñidos con tricromo, ABPAS e IHC de Masson se sometieron a un análisis morfométrico de la siguiente manera. Se seleccionaron al azar cinco vías respiratorias (de 150-300 μ m de diámetro) por sección y se analizaron utilizando el software Aperio ImageScope (Aperio, CA, EE. UU.). Los portaobjetos teñidos con tricromo de Masson se sometieron a una puntuación semicuantitativa de inflamación peribronquiolar, en la que el experimentador quedó ciego y puntuó las vías respiratorias individuales de 0 (sin inflamación detectable alrededor de las vías respiratorias) a 4 (agregados de células inflamatorias masivas y generalizadas, tamaño combinado de $\sim 0,6 \text{ mm}^2$). Los portaobjetos teñidos con tricromo de Masson también se analizaron para determinar el grosor epitelial y la deposición de ECM subepitelial midiendo el grosor del epitelio y la capa de ECM subepitelial (teñidos de azul); que se expresaron como $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ de longitud de la membrana basal (BM).

55 Las láminas teñidas con ABPAS y a-SMA se analizaron para determinar la metaplasia de células caliciformes y el número de miofibroblastos subepiteliales, respectivamente, contando el número de células caliciformes o células positivas para a-SMA teñidas positivamente por 100 μ m de longitud de BM. Los portaobjetos teñidos con TGF- β 1 se analizaron para determinar la expresión de la proteína TGF- β 1 mediante la ejecución de un algoritmo para evaluar los píxeles fuertes teñidos positivamente dentro de las vías respiratorias. Los resultados se expresaron como el número de píxeles positivos fuertes por área total (mm^2) de la vía aérea; y luego en relación con el del grupo de control tratado con solución salina, que se expresó como 1.

60 65 Ensayo de hidroxiprolina

El segundo lóbulo pulmonar más grande de cada ratón se procesó como se describió anteriormente para la medición del contenido de hidroxiprolina (Royce, S. G. y col., (2013) Clin. Sci. 124, 41-51), que se determinó a partir de una curva estándar de trans-4-hidroxi-L-prolina purificada (Sigma-Aldrich). Los valores de hidroxiprolina se multiplicaron por un factor de 6,94 (basándose en que la hidroxiprolina representa aproximadamente el 14,4 % de la composición de aminoácidos del colágeno en la mayoría de los tejidos de los mamíferos) para extrapolar el contenido total de colágeno, que a su vez se dividió por el peso seco de cada tejido correspondiente para obtener el porcentaje de concentración de colágeno.

Zimografía con gelatina

El tercer lóbulo pulmonar más grande de cada ratón se procesó como se detalló anteriormente para la extracción de proteínas que contienen metaloproteinasas de matriz (MMP) (Woessner, J. F., (1995) Methods Enzymol. 248, 510-528) antes de evaluar alícuotas iguales de proteína total (10 µg por muestra) en geles de acrilamida al 7,5 % que contienen 1 mg/ml de gelatina. La actividad gelatinolítica se visualizó como bandas transparentes. La densitometría de la MMP-9 (la gelatinasa predominante en el pulmón de ratones Balb/c hembras) se realizó utilizando un densímetro GS710 (Bio-Rad Laboratories, Gladesville, NSW, Australia) y el software Quantity-One (Bio-Rad). A continuación, se representó gráficamente la media relativa ± EEM de la densidad óptica (DO) de la MMP-9.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) y se expresaron como la media ± EEM. Los resultados de la AHR se analizaron mediante un ANOVA bidireccional con una prueba post-hoc de Bonferroni. Los datos restantes se analizaron mediante un ANOVA unidireccional con una prueba post-hoc de Neuman-Keuls para comparaciones múltiples entre grupos. En cada caso, los datos se consideraron significativos a $P < 0,05$.

Resultados

Efectos de las MCA-MSC en la AI

La AI se semicuantificó a partir de secciones pulmonares teñidas con H&E utilizando un sistema de puntuación de inflamación (de 0 a 4). La puntuación de inflamación peribronquial de los ratones lesionados por el OVA ($2,75 \pm 0,09$) fue significativamente mayor que la de los controles sensibilizados o expuestos a la solución salina (SAL) ($0,25 \pm 0,09$; $P < 0,001$ frente a grupo con SAL) (figura 1). El elevado nivel de inflamación en el grupo de OVA confirmó que estos ratones habían sido sensibilizados y expuestos con éxito a los OVA.

La administración de MCA-MSC redujo significativamente la infiltración de células inflamatorias peribronquiales inducida por los OVA ($1,25 \pm 0,23$; $P < 0,001$ frente al grupo con OVA) sin afectar a la puntuación de inflamación basal cuando se administró a ratones control con SAL (figura 1A, figura 1B). Sin embargo, el tratamiento con MCA-MSCs no fue capaz de reducir completamente la IA hasta la medida en ratones SAL-control ($P < 0,05$ frente al grupo con SAL para el tratamiento administrando MCA-MSC a ratones lesionados por OVA).

Efectos de las MCA-MSC en la AWR

45 Metaplasia de células caliciformes

La metaplasia de células caliciformes se evaluó morfométricamente a partir de secciones pulmonares teñidas con ABPAS y se expresó como número de células caliciformes por 100 µm de longitud de BM (figura 2). Los ratones tratados con OVA tuvieron un número de células caliciformes significativamente mayor ($6,08 \pm 0,52$) en comparación con sus homólogos de control con SAL ($0,001 \pm 0,00$); $P < 0,001$ frente a grupo con SAL; figura 2A, figura 2B). La administración de MCA-MSC fue capaz de reducir significativamente, aunque no totalmente, la promoción del número de células caliciformes inducida por OVA ($3,97 \pm 0,64$ a $2,89 \pm 0,48$, $P < 0,01$ frente a grupo con OVA; figura 2A, figura 2B). Sin embargo, la administración de MCA-MSC no restauró la metaplasia de células caliciformes inducida por OVA a la medida en los controles SAL (ambos $P < 0,001$ frente al grupo con SAL), pero no afectó al número de células caliciformes en los ratones tratados con SAL.

Grosor epitelial de las vías respiratorias

El grosor del epitelio de las vías respiratorias se evaluó morfométricamente a partir de las secciones pulmonares teñidas con tricromo de Masson y se expresó como una longitud de BM $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ (figura 3). El grosor epitelial de los ratones tratados con OVA ($19,16 \pm 0,63$) fue significativamente mayor que el medido en los controles de SAL ($14,28 \pm 0,45$; $P < 0,001$ frente a grupo con SAL; figura 3A,

figura 3B). La administración de MCA-MSC disminuyó significativamente, aunque no totalmente, el grosor del epitelio ($18,59 \pm 0,77$ a $16,67 \pm 0,87$) respecto al medido en el grupo con OVA ($P < 0,05$ frente a grupo con OVA; $P < 0,05$

frente a grupo con SAL; figura 3A, figura 3B). Es importante destacar que el tratamiento con MCA-MSC no afectó al grosor epitelial basal en los ratones de control con SAL.

Depósito de colágeno subepitelial

5 La deposición de colágeno subepitelial se evaluó morfométricamente a partir de secciones pulmonares teñidas con tricromos de Masson y se expresó como una longitud de BM $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ (figura 3); y significativamente elevado en los ratones lesionados con OVA ($27,63 \pm 0,66$) en comparación con los de los controles con SAL ($14,31 \pm 1,87$; $P < 0,001$ frente a grupo con SAL; figura 3A, figura 3C). La administración de MCA-MSC redujo la promoción aberrante inducida por los OVA de la deposición de colágeno subepitelial ($22,39 \pm 1,78$ a $16,98 \pm 0,98$; $P < 0,05$ frente a grupo con OVA; figura 3A, figura 3C).

Concentración total de colágeno pulmonar (fibrosis)

15 La concentración total de colágeno pulmonar (% de concentración de colágeno /peso seco del tejido pulmonar) se extrapoló a partir de los niveles de hidroxiprolina presentes en el segundo lóbulo pulmonar más grande de cada ratón y se usó como medida de la fibrosis (figura 4); y aumentó significativamente en los ratones lesionados con OVA ($3,94 \pm 0,09$ %) en comparación con el medido en los controles con SAL ($2,89 \pm 0,18$ %; $P < 0,001$ frente a grupo con SAL). La administración de MCA-MSC a ratones lesionados con OVA redujo la fibrosis en los pulmones (del $3,26 \pm 0,17$ % 20 al $3,62 \pm 0,07$ %; $P < 0,05$ frente a grupo con OVA; figura 4).

Expresión del TGF- β 1 en las vías respiratorias

25 Para determinar los mecanismos por los que las MCA-MSC podían revertir la deposición de colágeno total y subepitelial inducida por el OVA (fibrosis), los cambios relativos en los niveles de expresión del TGF- β 1 (citocina profibrótica) en las vías respiratorias se evaluaron morfométricamente a partir de secciones pulmonares teñidas con IHC y se expresaron como % de tinción por vía respiratoria analizada (figura 5). La expresión del TGF- β 1 en las vías respiratorias aumentó significativamente en los ratones lesionados con OVA ($1,85 \pm 0,13$) en comparación con la medida en los controles de SAL ($1,00 \pm 0,08$; $P < 0,001$ frente a grupo con SAL; figura 5A, figura 5B). La administración 30 de MCA-MSC a ratones lesionados con OVA revirtió los niveles de expresión aberrante del TGF- β 1 en las vías respiratorias hasta los medidos en los controles con SAL ($1,06 \pm 0,05$ a $1,22 \pm 0,05$; $P < 0,001$ frente a grupo con OVA; no es diferente al grupo con SAL) sin afectar los niveles de expresión del TGF- β 1 en las vías respiratorias basales cuando se administra a ratones con control de SAL (figura 5A, figura 5B).

35 Densidad de miofibroblastos subepiteliales

40 Los cambios en la densidad de los miofibroblastos subepiteliales teñidos con α -SMA también se evaluaron morfométricamente a partir de secciones pulmonares teñidas con IHC y se expresaron como el número de miofibroblastos por $100 \mu\text{m}$ de longitud del BM (figura 6). Se detectaron cantidades mínimas de miofibroblastos 45 subepiteliales α -SMA positivos en los ratones SAL de control ($0,14 \pm 0,05$), mientras que los ratones lesionados por OVA presentaban un aumento de la densidad de miofibroblastos de unas 30 veces ($4,37 \pm 0,37$; $P < 0,001$ frente a grupo con SAL; figura 6A, figura 6B). La administración de MCA-MSC redujo el aumento inducido por la OVA en la densidad de miofibroblastos subepiteliales ($2,86 \pm 0,27$ a $3,42 \pm 0,09$; $P < 0,05$ frente a grupo con OVA) en ausencia de efectos sobre el número de miofibroblastos basales cuando se administró a ratones control con SAL (figura 6A, figura 6B). Sin embargo, la administración de MCA-MSC no revirtió completamente la carga de miofibroblastos 50 subepiteliales aberrantes a la medida en ratones control con SAL (ambos $P < 0,001$ frente al grupo con SAL; figura 6A, figura 6B).

55 Expresión de gelatinasa pulmonar

50 También se determinó si la reversión mediada por el MCA-MSC de la fibrosis pulmonar o de las vías respiratorias inducida por los OVA se asoció con su capacidad para influir en los niveles de MMP que degradan el colágeno. La zimografía con gelatina demostró que los pulmones de ratones Balb/c hembras expresaban predominantemente MMP-9 (gelatinasa B) y, en menor medida, MMP-13 (colagenasa-3) (figura 7). Los niveles relativos de expresión de la MMP-9 en ratones lesionados con OVA ($1,62 \pm 0,22$) no fueron significativamente diferentes de los medidos en los animales de control de SAL ($1,00 \pm 0,09$) (figura 7A; figura 7B). En comparación, la administración de MCA-MSC a ratones 55 lesionados con OVA aumentó notablemente los niveles de MMP-9 ($3,77 \pm 0,18$ a $4,56 \pm 0,20$; $P < 0,05$ frente al grupo con OVA MCA-MSC) en $\sim 1,3$ y $\sim 1,8$ veces por encima de lo medido en ratones tratados únicamente con OVA ($P < 0,001$ frente al grupo con OVA; $P < 0,001$ frente a grupo con SAL; figura 7A; figura 7B). Curiosamente, la administración de MCA-MSC a ratones tratados con SAL también aumentó significativamente los niveles de MMP-9 ($1,95 \pm 0,38$ a $2,65 \pm 0,30$; $P < 0,05$ frente a grupo con SAL).

60 Efectos de las MCA-MSC en la AHR

65 La AHR se evaluó mediante plethysmografía invasiva en respuesta al aumento de las concentraciones de metacolina nebulizada, un broncoconstrictor (figura 8). Como era de esperar, los ratones tratados con OVA presentaron un AHR

significativamente elevado en comparación con el medido en los controles con SAL ($P < 0,001$ frente al grupo con SAL; figura 8). La administración de MCA-MSC revirtió el aumento de AHR inducido por OVA ($P < 0,05$ frente al grupo con OVA; figura 8). Como ocurre con la mayoría de los demás criterios de valoración medidos, la administración de MCA-MSC no afectó a las mediciones de AHR basal cuando se administró a ratones con control con SAL (figura 8).

5

Discusión

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial terapéutico de las nuevas MCA-MSC derivadas de las iPSC contra los tres componentes centrales de la patogénesis crónica de la AAD/asma: AI, AWR y AHR, cuando se administran terapéuticamente para enfermedades patológicas establecidas.

La administración de MCA-MSC protegió contra la AI establecida, la AWR (metaplasia de células caliciformes, niveles aberrantes de TGF- β 1 en las vías respiratorias, la acumulación de miofibroblastos y colágeno subepiteliales, concentración total de colágeno pulmonar) y la AHR, que fue inducida por la sensibilización repetida a OVA y la exposición a ratones (tabla 8). Esto dio como resultado la reversión de los niveles aberrantes de TGF- β 1 en las vías respiratorias, la fibrosis pulmonar y la AHR durante un período de tratamiento de dos semanas (una vez a la semana), y un aumento significativo de los niveles de MMP-9 que degradan el colágeno mediante la administración de MCA-MSC (tabla 8). Lo que es igualmente importante, no se encontró que la administración de MCA-MSC afectara a la expresión basal de los parámetros medidos, lo que sugiere que la administración de MCA-MSC ofrece un medio seguro y muy eficaz de tratar los componentes centrales de la AAD/ el asma.

Tabla 8. Resumen: Efectos del MCA-MSC en las patologías de la AAD crónica

Características principales del asma humana	OVA	SAL MCA-MSC IV	OVA MCA-MSC IV	SAL MCA-MSC IN	OVA MCA-MSC IN
AI	↑↑↑	-	↓	-	↓↓
Metaplasia de células caliciformes	↑↑↑	-	↓	-	↓↓
Grosor epitelial	↑↑↑	-	-	-	↓↓*
Colágeno subepitelial	↑↑↑	-	↓	-	↓↓↓*
Colágeno pulmonar total	↑↑↑	-	↓	-	↓↓↓*
Niveles de TGF- β 1 en las vías respiratorias	↑↑↑	-	↓↓↓	-	↓↓↓
Densidad de miofibroblastos subepiteliales	↑↑↑	-	↓	-	↓↓*
Niveles de MMP-9 en los pulmones	-	↑	↑↑↓	↑↑	↑↑↑*
AHR	↑↑↑	-	↓↓	-	↓↓↓**

En la tabla 8, las flechas de las columnas OVA, SAL MCA-MSC IV y SAL MCA-MSC IN reflejan los cambios con respecto a los medidos en ratones tratados con solución salina (SAL), mientras que las flechas de los grupos OVA MCA-MSC IV y OVA MCA-MSC IN reflejan los cambios en el grupo OVA solo. (-) no implica ningún cambio en comparación con los ratones tratados con SAL u OVA, respectivamente. $P < 0,05$, $**P < 0,01$ frente a grupo con OVA MCA-MSC IV.

El componente inflamatorio del asma contribuye a la obstrucción de las vías respiratorias. La inflamación sesgada por el Th2 da como resultado la elevación de un subconjunto particular de citocinas, incluida la interleucina (IL) -13, y la inducción de la metaplasia de células caliciformes.

Según estos hallazgos, estudios anteriores han demostrado que la inyección intravenosa de MSC derivadas de iPSC (no de MCA-MSC como se describe en el presente documento) podría disminuir parcialmente la puntuación inflamatoria de las vías respiratorias en un modelo de OVA aguda al suprimir los niveles de las citocinas Th2, IL-4, IL-5 e IL-13. Los efectos sistémicos de las MCA-MSC pueden incluso estar relacionados con su capacidad para activar las células T reguladoras a través del contacto directo entre células. Sin embargo, los hallazgos actuales de que las MCA-MSC suprimen notablemente la AI en aproximadamente un 75 % y la metaplasia de células caliciformes en aproximadamente un 50 % indican que las MCA-MSC median mayores propiedades inmunomoduladoras en comparación con las MSC derivadas de la médula ósea o el tejido adiposo humanos.

La administración directa de las MCA-MSC en las vías respiratorias o los pulmones permite que los factores protectores que secretan permanezcan en el entorno pulmonar. Además, las MCA-MSC administradas directamente tienen más probabilidades de permanecer en los pulmones inflamados y tienen mayores efectos protectores contra la exposición a alérgenos mediada por la supresión de las células presentadoras de抗ígenos, incluidos los macrófagos alveolares y las células dendríticas.

5 Junto con la metaplasia de células caliciformes, la proliferación epitelial contribuye de manera importante a la remodelación epitelial en el asma. La disminución de la función de barrera epitelial y la descamación culminan con la proliferación epitelial. Esta proliferación es particularmente extensa en el asma grave, donde la expansión del epitelio conduce a la obstrucción de las vías respiratorias. Dado que esta reprogramación se produce en las primeras etapas de la patogénesis del asma, el tratamiento del asma debe dirigirse al epitelio. La administración de MCA-MCS resultó en una disminución del grosor epitelial, a pesar de ofrecer reducciones similares en la AI. Esto contrasta con los hallazgos anteriores relacionados con las MSC derivadas de la médula ósea, en los que la administración de las MSC de la médula ósea por sí sola no tuvo ningún efecto sobre el grosor epitelial. En ese estudio, el grosor epitelial no se vio afectado por una disminución de la AI. Por tanto, la diferencia observada entre las MCA-MSC y las de médula ósea parece deberse a una propiedad activa de las propias MCA-MSC, más que a un efecto pasivo producido por su capacidad para atenuar la AI.

10 15 Además, en otro estudio, la administración de un péptido reparador del factor epitelial (factor trébol 2) redujo el grosor epitelial en la misma medida que el tratamiento combinado con un antifibrótico y un corticosteroide, a pesar de la mayor disminución de la AI que ofrecía el tratamiento combinado. Como tal, la reducción de la proliferación epitelial no estuvo mediada por una reducción de la inflamación.

20 25 Con esta evidencia adicional, los presentes hallazgos indican que la administración de MCA-MSC permite i) una acumulación suficiente de factores paracrinos que reducen el grosor epitelial y/o ii) que estas células entran en contacto directo con el epitelio dañado y medien en la reversión de su proliferación. Esta disminución del grosor epitelial y de la metaplasia de células caliciformes producida por las MCA-MSC es la primera evidencia de una AWR invertida.

30 35 40 La culminación de una serie de factores, como las agresiones mecánicas y los alérgenos, puede contribuir a la destrucción de la arquitectura pulmonar y la función de las vías respiratorias, lo que lleva a la AWR, además de a la AI. Los daños debidos a los alérgenos o a la susceptibilidad hereditaria provocan que los pulmones sufran procesos endógenos de remodelación en un esfuerzo por autorreparar la estructura y la función de las vías respiratorias, y estos procesos reparadores dan como resultado una cicatrización aberrante de las heridas y, finalmente, conducen a la fibrosis. La fibrosis fue evidente en las vías respiratorias sensibilizadas con OVA, que mostraron una elevación en los niveles aberrantes de colágeno subepitelial y total. La administración de MCA-MSC redujo significativamente la deposición aberrante de colágeno subepitelial y total y, en algunos casos, revirtió por completo esta deposición aberrante de colágeno hasta los niveles observados en el grupo tratado con solución salina ilesa. Estos resultados fueron inesperados, ya que estudios anteriores mostraron que la promoción inducida por los OVA de la deposición de colágeno subepitelial y total solo podía revertirse por completo cuando los tratamientos basados en células madre se administraban conjuntamente con un fármaco antifibrótico. En estos estudios de tratamiento combinado, se propuso que el fármaco antifibrótico crearía un entorno más favorable en el que podrían introducirse terapias basadas en células madre, lo que ayudaría a la supervivencia de las células madre y aumentaría su capacidad proliferativa y migratoria para inducir sus efectos protectores y terapéuticos. Por tanto, la administración de MCA-MSC tiene efectos similares a los de un fármaco antifibrótico y puede poseer propiedades antifibróticas similares a las de los fibroblastos fetales, lo que puede facilitar la cicatrización de heridas en ausencia de fibrosis.

45 Estos resultados también se corresponden con la reducción observada del grosor epitelial inducida por MCA-MSC. Los factores de crecimiento fibrogénicos son liberados habitualmente por las células epiteliales en respuesta a las alteraciones epiteliales. En el asma, esta respuesta aumenta, lo que sugiere que la fibrosis subepitelial es el resultado de un conducto de señales desde un epitelio defectuoso hasta la pared más profunda de las vías respiratorias. Por tanto, las MCA-MSC podrían ejercer sus efectos antifibróticos mediante las propiedades inmunomoduladoras y la posible secreción de mediadores antifibróticos, dada la reducción del colágeno subepitelial y total cuando se administran por vía intravenosa.

50 55 60 El hallazgo clave de este estudio fue que las MCA-MSC revirtieron la fibrosis y revirtieron la AHR a los niveles medidos en ratones ilesos. La AHR se debe a una obstrucción de las vías respiratorias, que puede deberse a la obstrucción de la mucosidad provocada por la metaplasia de las células caliciformes y el engrosamiento epitelial. Además, la interacción entre la AI y la fibrosis de la pared de las vías respiratorias conduce a un entorno que eleva la AHR. La fibrosis no solo reduce el cumplimiento de las vías respiratorias en los sujetos con asma, sino que esta expansión de la ECM conduce a la retención de mediadores inflamatorios solubles y a la persistencia crónica de la AHR establecida. Como tal, la AHR podría revertirse a niveles normales no lesionados, principalmente mediante la reducción de la fibrosis subepitelial y la atenuación de la AI y/o mediante una disminución de la obstrucción de las vías respiratorias mediada por la reducción del recuento de células caliciformes y los niveles más bajos de engrosamiento epitelial que proporcionan las MCA-MSC. Como se describe en el presente documento, las MCA-MSC corrigieron la AHR dirigiéndose a la AWR en varios niveles, además de sus efectos antiinflamatorios.

65 En conclusión, el presente estudio, el primero en el que se utilizaron MCA-MSC para tratar la AAD/asma crónicos, descubrió que los MCA-MSC reducen eficazmente la AI e invierten los marcadores de la AWR y la AHR. Por tanto, las MCA-MSC proporcionan una terapia independiente para el AAD/asma. Las MCA-MSC también se pueden usar como terapia complementaria para el AAD/asma. Las MCA-MSC pueden proporcionar beneficios terapéuticos particulares

a subpoblaciones de sujetos con AAD/asma que no responden al tratamiento actual, es decir, al tratamiento con corticosteroides o agonistas beta.

5 Un hallazgo sorprendente que separa a las MCA-MSC de otras células madre estudiadas anteriormente es que otras MSC/células madre solo producen efectos terapéuticos cuando se administran en combinación con otros agentes terapéuticos.

Ejemplo 5

10 La AAD/asma se indujo en grupos de 6 a 8 ratones de una manera similar a la del ejemplo 4, excepto que los ratones fueron expuestos a una solución de aerosol nebulizada de ovoalbúmina durante 30 minutos, tres veces por semana durante 8 semanas (de los días 21 a 77, figura 9), en lugar de durante 6 semanas como en el ejemplo 4. Los ratones se asignaron al azar a uno de los cinco grupos: 1 control no tratado (sin asma); 2 animales sensibilizados no tratados (asma); 3 animales sensibilizados (asma) tratados con perfusión intravenosa de MCA-MSC; 4 animales sensibilizados (asma) tratados con perfusión intravenosa de dexametasona (DEX); 5 animales sensibilizados (asma) tratados con infusión intravenosa de MCA-MSC + DEX. Todos los ratones tratados con MCA-MSC recibieron una dosis de 10^6 células IN en dos ocasiones (una vez a la semana en las semanas 9 y 10). DEX (1 mg/kg/día) se administró una vez al día entre las semanas 9 y 11. DEX mejoró la AHR, pero las MCA-MSC tuvieron un efecto significativamente más pronunciado, y el DEX no tuvo ningún efecto adicional más allá del de las MCA-MSC por sí solas (figura 10).

20 Ejemplo 6

25 El modelo usado en este ejemplo fue el mismo que el del ejemplo 5, el modelo de enfermedad crónica de las vías respiratorias inducida por alérgenos de 9 semanas que utiliza ratones BALB/c hembras que responden mejor en este modelo.

30 Se compararon los siguientes grupos de ratones BALB/c hembras de 7 a 8 semanas de edad (ratones n=8 por grupo) en los que las MCA-MSC se administraron una vez a la semana desde las semanas 9 a 11 mediante administración intranasal (IN), intravenosa (IV) o endotraqueal (ET):

- 35 i) controles sensibilizados o cuestionados a la solución salina;
- ii) OVA sensibilizada o desafiada (AAD);
- 35 iii) OVA sensibilizados o expuestos a más de 1×10^6 MCA-MSC/ratón mediante administración IN;
- iv) OVA sensibilizados o expuestos a $+ 1 \times 10^6$ MCA-MSC/ratón por administración IV; y
- 40 vi) OVA sensibilizados o expuestos a $+ 1 \times 10^6$ MCA-MSC/ratón mediante la administración ET.

40 Este diseño con una DE del 20 % proporcionó una potencia del 90 % para detectar un efecto del 25 % con n = 8 ratones/grupo.

45 Se analizó la hiperreactividad de las vías respiratorias (una medida de la función pulmonar) y se presenta en la figura 11.

50 Los ratones con AAD crónica inducida por OVA tuvieron un empeoramiento significativo de la AHR en respuesta al aumento de las dosis de un broncoconstrictor en comparación con sus homólogos tratados con solución salina. Esta AHR inducida por el óvulo se redujo significativamente entre un 79 y un 80 % mediante la administración intravenosa o intranasal de MCA-MSC (administración una vez a la semana entre las semanas 9 y 11 en presencia de una lesión continua inducida por el óvulo). No hubo diferencias significativas en la AHR entre los ratones tratados por vía intravenosa o intranasal con MCA-MSC y los controles tratados con solución salina.

55 La administración ET de MCA-MSC disminuyó la AHR en un 61 %, cifra que siguió siendo significativamente inferior a la medida solo en el grupo de OVA, pero también significativamente más alta que la medida en el grupo de solución salina.

60 No hubo diferencias significativas en la AHR entre los grupos tratados por vía IN, IV y ET, lo que indica que los tres modos de administración del MCA-MSC proporcionan un enfoque factible para tratar el AAD/asma crónicos.

65 Los criterios de valoración adicionales que se analizarán incluyen:

- i) puntuación de inflamación;
- ii) metaplasia de células caliciformes;

- iii) grosor epitelial;
- iv) daño epitelial;
- 5 v) grosor del colágeno subepitelial;
- vi) concentración total de colágeno pulmonar;
- 10 vii) tinción epitelial con TGF-beta1;
- viii) densidad de miofibroblastos subepiteliales; y
- ix) expresión/actividad de gelatinasa (MMP-2 y MMP-9).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una célula madre mesenquimoangioblastos mesenquimatoso (MCA-MSC) para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias (AAD)/asma en un sujeto, en donde la MCA-MSC expresa miR-145-5p, miR-181b-5p, y miR-214-3p, pero no miR-127-3p y miR-299-5p, donde la MCA-MSC tiene un fenotipo CD73⁺CD105⁺CD90⁺CD146⁺CD44⁺CD10⁺CD31⁺CD45⁻, y en donde la MCA-MSC se elabora mediante un método que comprende:
- 5 (a) cultivar una célula mesodérmica primitiva con potencial de mesenquimoangioblastos (MCA) que tenga un fenotipo $EMH^{lin}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFR\alpha^{+}$ en un medio formador de colonias mesenquimatosas (M-CFM) compuesto por LiCl y FGF2, pero excluyendo el PDGF, en condiciones normoxicas durante un tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimatoso; y
- 10 (b) cultivar la colonia mesenquimatoso de (a) de forma adherente para producir la MCA-MSC.
- 15 2. La MCA-MSC para el uso según la reivindicación 1, en donde la MCA-MSC se administra por vía intravenosa o intranasal.
- 20 3. La MCA-MSC para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde la MCA-MSC se administra por vía intranasal.
- 25 4. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al sujeto se le administran de 10^6 MCA-MSC/kg a 2×10^8 MCA-MSC/kg, 10^6 MCA-MSC/kg, 5×10^6 MCA-MSC/kg o 10^7 MCA-MSC/kg.
- 30 5. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde al sujeto se le administran de 1×10^6 MCA-MSC a 1×10^9 MCA-MSC, de 10^6 MCA-MSC a 2×10^8 MCA-MSC, 10^8 MCA-MSC, 5×10^8 MCA-MSC, o 10^9 MCA-MSC.
- 35 6. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el sujeto es un mamífero.
7. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el sujeto es un ser humano.
- 40 8. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde al sujeto se le ha administrado previamente un corticosteroide o un agonista beta para tratar el asma.
9. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde al sujeto no se le ha administrado previamente un corticosteroide o un agonista beta para tratar el asma.
- 45 10. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el sujeto tiene asma grave o asma resistente al tratamiento grave.
11. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el tratamiento de la AAD/asma comprende:
- 50 (a) disminución de IA, AWR, fibrosis de las vías respiratorias, fibrosis pulmonar, metaplasia de células caliciformes, engrosamiento epitelial, nivel de factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta 1$ de las vías respiratorias, densidad de miofibroblastos subepiteliales, concentración de colágeno subepitelial o concentración total de colágeno pulmonar; o
- (b) aumento de la actividad de las MMP pulmonares; o
- (c) cualquier combinación de una o más características de (a) o cualquier combinación de una o más características de (a) y (b).
- 55 12. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde no se administra al sujeto un corticosteroide o un agonista beta.
13. La MCA-MSC para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde al sujeto se le administran las MCA-MSC antes, durante o después del desarrollo de la AAD/asma.

60

65

Figuras

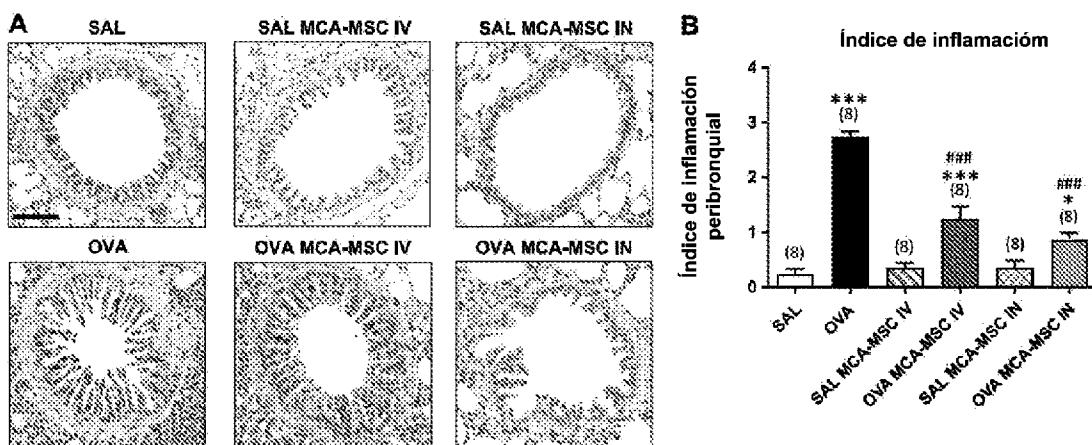


Figura 1

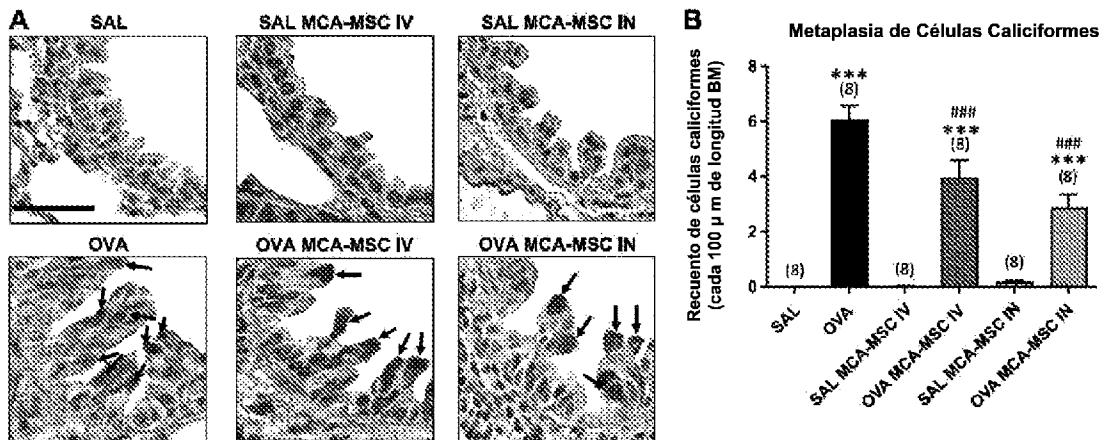


Figura 2

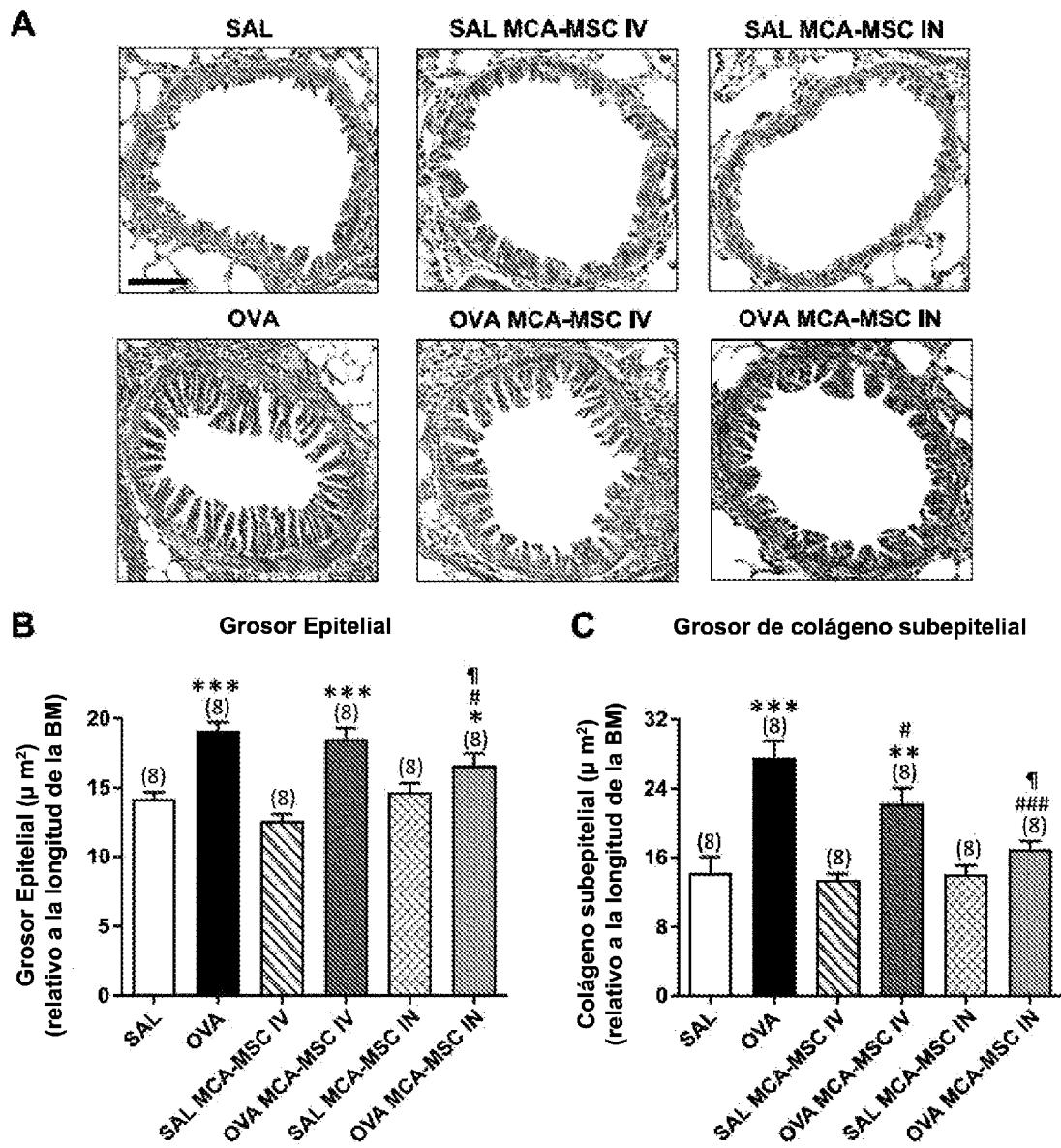


Figura 3

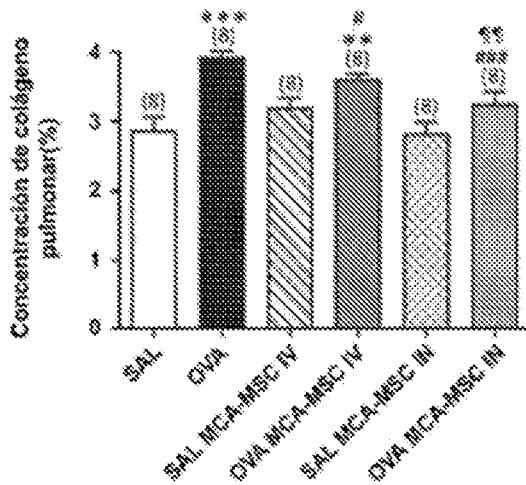


Figura 4

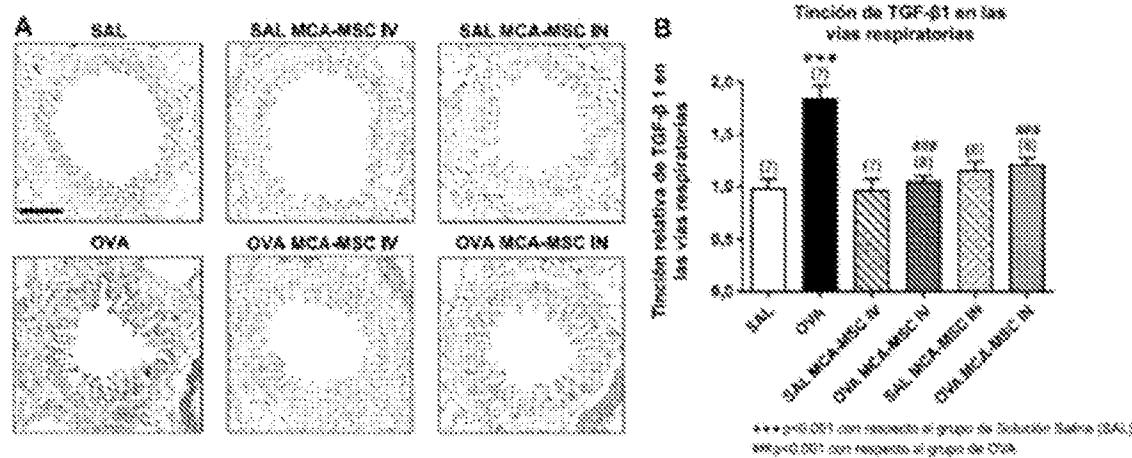


Figura 5

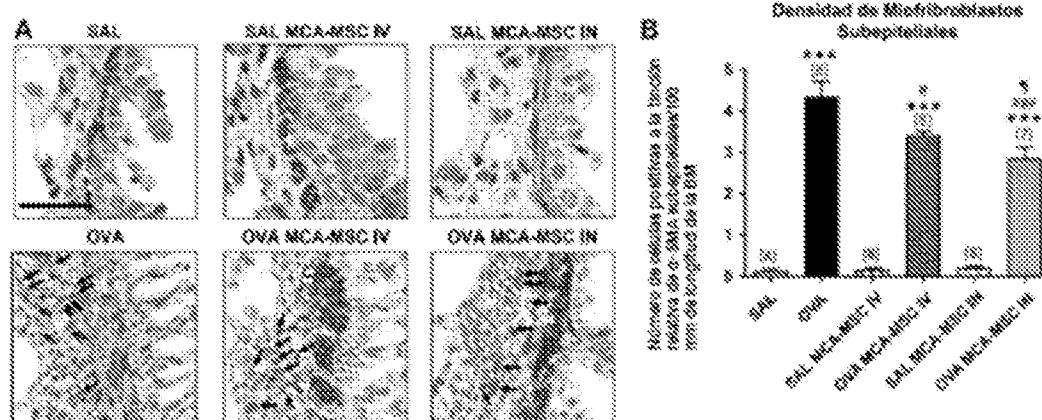


Figura 6

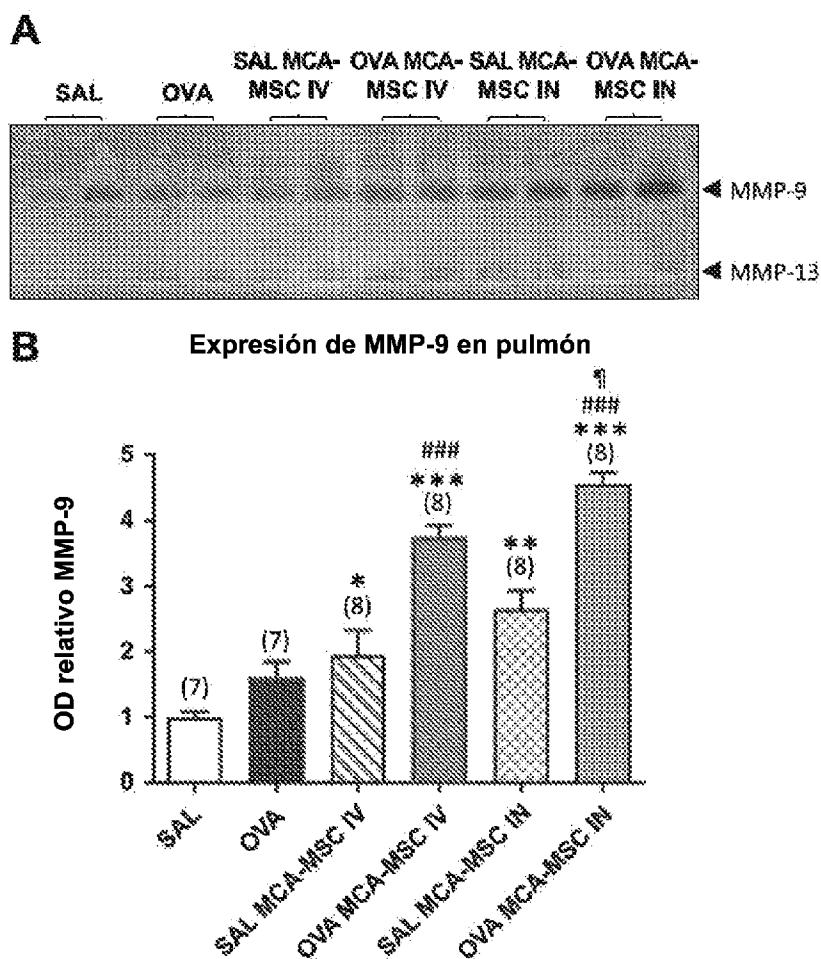


Figura 7

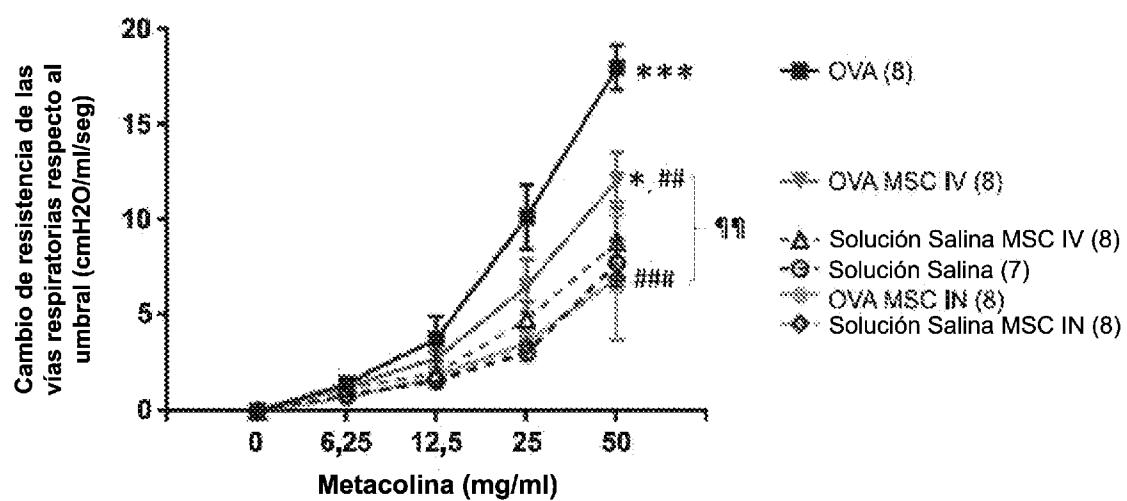
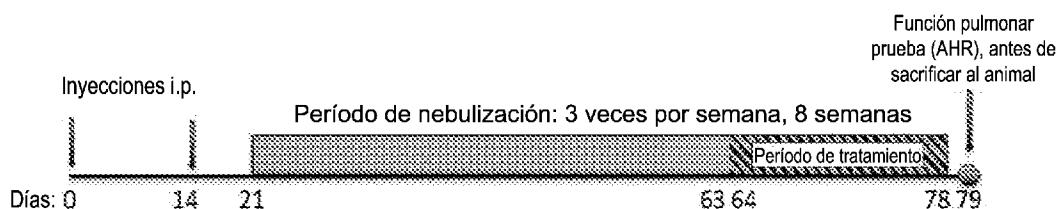
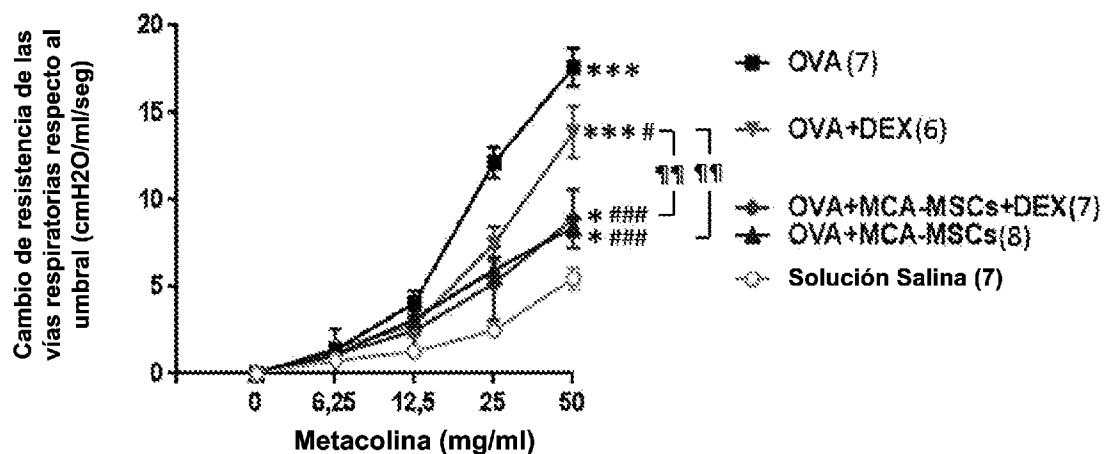
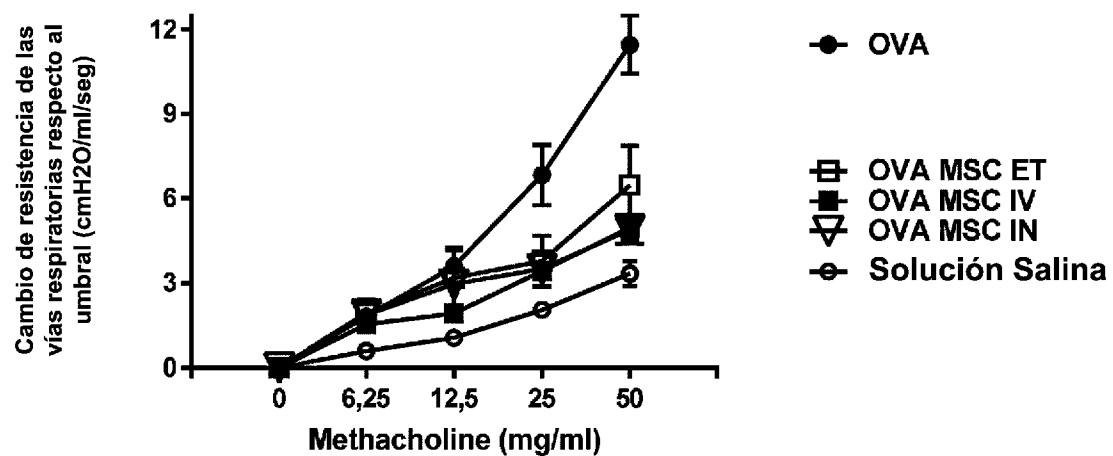


Figura 8

**Figura 9****Figura 10****Figura 11**