

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 961 691**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2015** **PCT/US2015/052029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016** **WO16053758**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2015** **E 15847382 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023** **EP 3201318**

54 Título: **Medio de inducción y procedimientos para el cultivo y la terapia de células madre**

30 Prioridad:

01.10.2014 US 201414504399

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

13.03.2024

73 Titular/es:

SANBIO, INC. (100.0%)
231 S. Whisman Road
Mountain View, CA 94041, US

72 Inventor/es:

BETANCOURT, ALINE

74 Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 961 691 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

Medio de inducción y procedimientos para el cultivo y la terapia de células madre

5 RESUMEN DE LA INVENCION

Una de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 10 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
(b) eritropoyetina, y
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto;
- 15 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 20 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
(b) eritropoyetina, y
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina;
- 25 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 30 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
(b) eritropoyetina,
35 (c) cloruro de cobalto, y
(d) desferrioxamina;
- 40 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 45 (a) poli(I:C),
(b) eritropoyetina, y
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto;
- 50 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 55 (a) poli(I:C),
(b) eritropoyetina, y
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina;
- 60 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 65

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto, y
- (d) desferrioxamina;

5 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

10 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina, y
- 15 (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

20 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- 25 (b) eritropoyetina, y
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

30 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 35 (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto, y
- (d) desferrioxamina;

40 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto;

50 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
- 60 (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

65 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no

estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 5 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
(c) cloruro de cobalto, y
(d) desferrioxamina;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

10 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 15 (a) poli(I:C),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto;

20 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 25 (a) poli (I:C),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina;

30 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 35 (a) poli (I:C),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
(c) cloruro de cobalto, y
40 (d) desferrioxamina;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

45 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 50 (a) poli(A:U),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

55 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 60 (a) poli (A:U),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina;

65 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 5 (a) poli (A:U),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
(c) cloruro de cobalto, y
(d) desferrioxamina;

10 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 15 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
(b) eritropoyetina, y
(c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M;

20 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 25 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
(b) eritropoyetina,
30 (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
(d) desferrioxamina;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

35 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 40 (a) poli(I:C),
(b) eritropoyetina, y
(c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M;

45 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 50 (a) poli (I:C),
(b) eritropoyetina,
(c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
(d) desferrioxamina;

55 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 60 (a) poli(A:U),
(b) eritropoyetina, y
65 (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

5 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- 10 (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) desferrioxamina;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

15 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 20 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M;

25 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 30 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) desferrioxamina;

35 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 40 (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
- 45 (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

50 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 55 (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) desferrioxamina;

60 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 65 (a) poli(A:U),

- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M;

5 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

10

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) desferrioxamina;

15

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

20

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

25

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

30

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

35

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

40

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

45

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

50

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

55

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

60

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

65

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y

(e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

5 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 10 (a) poli(A:U),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
(d) interleucina 4 (IL-4);

15 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 20 (a) poli (A:U),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
(c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
25 (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

30 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 35 (a) poli (A:U),
(b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
(c) cloruro de cobalto,
(d) desferrioxamina, y
(e) interleucina 4 (IL-4);

40 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 45 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
(b) eritropoyetina,
(c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
50 (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

55 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 60 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
(b) eritropoyetina,
(c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
(d) desferrioxamina, y
(e) interleucina 4 (IL-4);

65 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 4 (IL-4);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,

- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características

antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina, y

(d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características

antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no

estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M, y
- (d) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina, y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina,

- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

5 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

10

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- 15 (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

20 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

25

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

30 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

35

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- 40 (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

45 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

50

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- 55 (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

60 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

65

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina,

- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,

- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

5 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) un mimético de hipoxia seleccionado de desferrioxamina,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,

- (c) cloruro de cobalto,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

5 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

10 Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- 15 (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

20 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 25 (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina,
- 30 (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

35 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- 40 (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

45 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina,
- 55 (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

60 donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

65

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (I:C),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) interleucina 4 (IL-4), y
- (e) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli (A:U),
- (b) eritropoyetina presente a una concentración inferior a 10 ng/ml,
- (c) cloruro de cobalto presente a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M,
- (d) desferrioxamina,
- (e) interleucina 4 (IL-4), y
- (f) interleucina 13 (IL-13);

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Otra de las invenciones reivindicadas en esta invención es un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, donde el medio de inducción comprende:

- (a) poli(I:C) a una concentración de entre 0,1 μ g/ml y 100 μ g/ml,
- (b) eritropoyetina a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
- (c) cloruro de cobalto a una concentración de entre 5 μ M y 500 μ M;

donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias y está marcada por una mayor expresión de ARNm de CXCL9, OAS1 e ISG15 en comparación con una población de células madre mesenquimales no estimuladas.

Las invenciones adicionales reivindicadas en esta invención son cualquiera de los medios de inducción establecidos anteriormente que no comprenden suero de origen humano o animal.

Sin embargo, las invenciones adicionales reivindicadas en esta invención son soluciones concentradas de cualquiera de los medios de inducción expuestos anteriormente.

Las invenciones adicionales reivindicadas en esta invención son procedimientos para elaborar una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la población de células madre mesenquimales no estimuladas con cualquiera de los medios de inducción expuestos anteriormente, donde, en la población de células madre mesenquimales tratada mediante el procedimiento, las células están marcadas por una mayor expresión de ARNm de CXCL9 en comparación con la población de células madre mesenquimales no estimuladas.

Las invenciones adicionales reivindicadas en esta invención son procedimientos para preparar una población de células madre mesenquimales polarizadas inmunológicamente, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un

trastorno inflamatorio o autoinmunitario, a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas; comprendiendo el procedimiento poner en contacto la población de células madre mesenquimales no estimuladas con cualquiera de los medios de inducción expuestos anteriormente, donde, en la población de células madre mesenquimales tratada por el procedimiento, las células están marcadas por una mayor expresión de ARNm de *CXCL9* en comparación con la población de células madre mesenquimales no estimuladas. En estos procedimientos, el trastorno inflamatorio o inmunitario puede ser artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, neuritis óptica aguda, enfermedad de Krabbe, retinopatía diabética o lesión pulmonar aguda.

Las invenciones adicionales reivindicadas en esta invención son procedimientos para elaborar una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la población de células madre mesenquimales no estimuladas con cualquiera de los medios de inducción establecidos anteriormente, donde, en la población de células madre mesenquimales tratada mediante el procedimiento, las células están marcadas por una mayor expresión de ARNm de *CXCL9* en comparación con la población de células madre mesenquimales no estimuladas; y además donde las células madre mesenquimales son células madre mesenquimales humanas.

Las invenciones adicionales reivindicadas en esta invención son composiciones que comprenden cualquiera de los medios de inducción expuestos anteriormente y una población de células madre mesenquimales.

UTILIDAD DE LA INVENCIÓN

Existe la necesidad de procedimientos terapéuticos mejorados y procedimientos y medios de cultivo celular mejorados para inducir, activar o cebar poblaciones uniformes de MSC (células madre, células madre mesenquimales, células estromales de médula, células estromales multipotentes, células madre multipotentes) derivadas de diversos tejidos adultos. Las aplicaciones clínicas de las MSC requieren procedimientos de cultivo celular reproducibles y procedimientos de expansión celular que proporcionen un número adecuado de células de calidad adecuada y beneficios terapéuticos consistentes. Los diferentes medios y procedimientos de cultivo han tenido diversos grados de éxito. Sigue existiendo la necesidad de mejoras adicionales en el medio de cultivo de MSC y procedimientos que garanticen rendimientos expandidos de células cebadas, activadas o inducidas utilizadas en terapia basada en células que tengan efectos terapéuticos seguros y consistentemente reproducibles.

Se ha demostrado la potencia o el beneficio terapéutico de las MSC inducidas, activadas o cebadas sobre las MSC convencionales no inducidas en modelos preclínicos de enfermedad. La terapia antiinflamatoria inducida por CMM alivió el dolor y la inflamación en modelos de neuropatía periférica diabética dolorosa, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria y lesión pulmonar aguda de una manera significativamente mejor que la terapia convencional con CMM. Además, la terapia antiinflamatoria inducida por CMM mejoró las puntuaciones clínicas, la marcha y la función motora en un modelo preclínico de esclerosis múltiple (EAE) y enfermedad de Krabbe. En un modelo de cáncer de ovario competente inmunitario murino, la inmunoterapia basada en células MSC inducida por antitumor proinmunitario condujo a la atenuación del crecimiento y la propagación del tumor, mientras que la terapia convencional con MSC promovió el crecimiento y la propagación del tumor.

BASE CIENTÍFICA DE LA INVENCIÓN

La estimulación de receptores de tipo Toll (TLR) específicos afecta a las respuestas inmunomoduladoras de las MSC. Los receptores de tipo Toll reconocen las señales de "peligro" y su activación conduce a respuestas celulares y sistémicas profundas que movilizan las células inmunitarias innatas y adaptativas del huésped. Las señales de peligro que desencadenan los TLR se liberan después de la mayoría de las patologías tisulares. Dado que las señales de peligro reclutan células inmunes a los sitios de lesión, el inventor razonó que las MSC podrían reclutarse de una manera similar. El inventor observó que las MSC expresan varios TLR (por ejemplo, TLR3 y TLR4, conocidos en la técnica), y que su migración, invasión y secreción de factores inmunomoduladores se ve drásticamente afectada por la participación específica de agonistas de TLR. En particular, el inventor observó diversas consecuencias para las MSC después de la estimulación de TLR3 en comparación con TLR4 mediante un protocolo de cebado de TLR a corto plazo de bajo nivel. En base a estos hallazgos, el inventor propuso un nuevo paradigma para las MSC que siguió el ejemplo de la bibliografía sobre monocitos. Específicamente, que las MSC pueden polarizarse (inducirse, activarse o cebarse) mediante la señalización de TLR aguas abajo en dos fenotipos de acción homogénea clasificados como MSC1 y MSC2. Las MSC cebadas con TLR4, o MSC1, expresan principalmente mediadores inflamatorios proinmunitarios, mientras que las MSC cebadas con TLR3, o MSC2, expresan principalmente mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores. Además, el inventor demostró que los cocultivos alogénicos (no propios) de MSC cebadas con TLR con células mononucleares de sangre periférica (PB-MC) conducen de manera predecible a la activación suprimida de linfocitos T después del cocultivo de MSC2 y la activación permisiva de linfocitos T en cocultivo con MSC1. La inducción de MSC en el fenotipo MSC1 proinmune mediante la activación de TLR4 o en el fenotipo MSC2 antiinflamatorio mediante la activación de TLR3 garantiza células uniformes y definidas que resuelven un obstáculo de la industria al proporcionar células definidas y predecibles para su uso en aplicaciones de terapia basada en células.

La eritropoyetina, también conocida como EPO, es una hormona glucoproteica que controla la eritropoyesis o

producción de glóbulos rojos. Es una citoquina o molécula de señalización celular para precursores de eritrocitos (glóbulos rojos) en la médula ósea. La EPO humana tiene un peso molecular de 34 kDa y también se llama hematopoyetina o hemopoyetina. La EPO es producida por fibroblastos intersticiales en el riñón en estrecha asociación con el túbulo epitelial tubular y capilar peritubular y en las células peri sinusoidales en el hígado. Si bien la producción hepática predomina al principio del desarrollo (período fetal y perinatal), el riñón es el sitio de producción de EPO predominante en los adultos. Además de la eritropoyesis, la eritropoyetina también tiene otras funciones biológicas conocidas. Por ejemplo, desempeña un papel importante en la respuesta del cerebro a la lesión neuronal al proporcionar una señal de anti-apoptosis (muerte celular programada) a favor de la supervivencia. La EPO también está involucrada en el procedimiento de cicatrización de heridas. La eritropoyetina sintética también se produce mediante tecnología de ADN recombinante en cultivo celular. Además, varios agentes farmacéuticos similares a la EPO están disponibles con una variedad de patrones de glicosilación, y se denominan colectivamente agentes estimulantes de la eritropoyesis (esa). La EPO se utiliza en esta invención como un medio para prevenir la muerte celular prematura y prolongar la supervivencia de las células cebadas, activadas o inducidas producidas utilizadas en la terapia basada en células.

El suministro constante de oxígeno es un factor importante que influye en todos los aspectos principales de la biología celular, incluida la supervivencia, la proliferación, la diferenciación y la migración. Por lo general, las células de mamífero (no las células madre) requieren un suministro constante de oxígeno para mantener una producción de energía robusta y para preservar la función celular normal y la supervivencia celular. Por el contrario, las células madre de mamíferos parecen prosperar y persistir en el entorno hipóxico (con una tensión de oxígeno que oscila entre el 0,5 % y el 7 %) de la médula ósea. Varios estudios han demostrado que el entorno hipóxico es necesario para mantener la capacidad de proliferación y autorrenovación de las células madre en la médula ósea. En particular, los efectos de la reducción de la tensión de oxígeno incluso después del cultivo a corto plazo de MSC se han descrito como un procedimiento general para mejorar su capacidad de injerto en terapias basadas en células. Se utiliza un entorno hipóxico en esta invención como un medio para mantener la autorrenovación y el potencial proliferativo de las células cebadas, activadas o inducidas producidas utilizadas en la terapia basada en células.

DEFINICIONES Y VALORES PREFERIDOS

Para una comprensión clara, los términos se definen y los valores preferidos se indican aquí, y también en todo el texto cuando sea necesario.

El término "cáncer" significa cualquier enfermedad causada por una división incontrolada de células en una parte del cuerpo. Los cánceres incluyen, pero no se limitan a, leucemia, linfoma, melanoma, carcinoma, sarcoma, adenoma o cualquier otro tumor maligno o neoplasia causada por un mecanismo genético, ambiental o estocástico.

El término "célula madre" significa una célula que es capaz de dar lugar a múltiples tipos diferentes de células. El término "célula madre mesenquimatosa" o "MSC" significa una célula madre derivada originalmente del mesénquima. El término se refiere a una célula que es capaz de diferenciarse en al menos dos o más de un osteoblasto, un condrocito, un adipocito o un miocito. Las MSC pueden aislarse de cualquier tipo de tejido adulto. Típicamente, las MSC se aíslan de la médula ósea, el tejido adiposo, el cordón umbilical o la sangre periférica. En un aspecto preferido de la invención, las MSC se obtienen a partir de médula ósea o lipoaspirados, obtenidos ellos mismos a partir de tejido adiposo.

El término "multipotente" y el término alternativo "pluripotente" significan una célula que es capaz de dar lugar a múltiples tipos de células de diferentes linajes tisulares. El término "multipotente" o "pluripotente" también abarca células madre multipotentes inducidas o células madre pluripotentes inducidas, o células que se han inducido a una etapa pluripotente usando cualquier medio químico o genético. En ciertas realizaciones, las células madre multipotentes o pluripotentes de la descripción son células madre mesenquimales.

Las células de esta descripción se derivan de cualquier célula de cualquier especie de mamífero, incluidos humanos, primates, perros, gatos, caballos, vacas, cabras, ovejas y cerdos. La célula puede ser una célula primaria o una línea celular inmortalizada.

El término "terapia celular" o "terapia basada en células" significa el trasplante de células humanas o animales para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno, tal como, pero sin limitación, el reemplazo o reparación de tejidos u órganos dañados, la modulación de reacciones inmunitarias y la reducción de síntomas inflamatorios y cánceres.

El término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, incluidos los no primates (*por ejemplo*, una vaca, un cerdo, un caballo, un gato, un perro, una rata o un ratón) o un primate (*por ejemplo*, un mono o un ser humano). En una realización preferida de la invención, el sujeto es un ser humano.

Los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata", cuando se usan directamente en referencia a un paciente o sujeto, significan la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno que incluye, pero no se limita a, cualquier cáncer, cualquier tumor o neoplasia, un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad

mediada inmunológicamente que incluye el rechazo de órganos y tejidos trasplantados, donde la mejora resulta de la administración de las células inmunomoduladoras producidas por la invención, o una composición farmacéutica que comprende células inmunomoduladoras producidas por la invención, a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

5 El término "no estimulado" se refiere a una población de células que ha sido no tratada, no polarizada o no inducida por los procedimientos de esta descripción. Las células madre mesenquimales aisladas primarias que están frescas o congeladas se consideran no estimuladas. Las células que se han tratado previamente con un compuesto o composición que carece de al menos uno de un ligando de receptor de tipo toll, eritropoyetina, hipoxia o un mimético de hipoxia se consideran no estimuladas.

10 Los términos "reparar" y "reparando" cuando se usan directamente en referencia a tejidos dañados significan la mejora de dicho daño tanto por mecanismos directos tales como la regeneración de tejidos dañados, así como a través de mecanismos indirectos, por ejemplo, reduciendo la inflamación permitiendo así la formación de tejido.

15 "Alogénico" significa de diferentes individuos de la misma especie. Cuando los individuos poseen genes que difieren en uno o más loci, se dice que son alogénicos. Por el contrario, "autólogo" significa del mismo individuo.

El término "enfermedad inmunitaria" se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por lesión celular, tisular y/u orgánica causada por una reacción inmunológica del sujeto.

20 El término "trastorno autoinmunitario" se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/u orgánica causada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. Los ejemplos ilustrativos y no taxativos de enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar con las células inmunomoduladoras producidas por la invención incluyen alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celíaca, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CF1DS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de aglutinina fría, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 o inmunomediada, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjogren, síndrome de Good pasture, síndrome de hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de takayasu, arteris temporal/célula gigante arteritis, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis como dermatitis herpetiforme vasculitis, vitiligo, granulomatosis de Wegener, enfermedad de membrana basal antiglomerular, síndrome antifosfolípido, enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, fiebre mediterránea familiar, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, oftalmia simpática, polendocrinopatías, psoriasis, etc.

40 Los "trastornos inmunitarios" incluyen enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias mediadas inmunológicamente.

45 "Enfermedad inflamatoria inmunomediada" significa cualquier enfermedad caracterizada por inflamación crónica o aguda, resultante de, asociada con, o desencadenada por, una desregulación de la respuesta inmune normal; *por ejemplo*, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de Sjogren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, colitis ulcerosa, anemia hemolítica autoinmune, esterilidad, miastenia gravis, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, púrpura trombopénica, síndrome de Guillain-Barre, alergia, asma, enfermedad atópica, arteriosclerosis, miocarditis, cardiomiopatía, nefritis glomerular, anemia hipoplásica y rechazo después del trasplante de órganos.

55 El término "inmunomodulador" se refiere a la modificación, amplificación, inhibición o reducción de una o más actividades biológicas del sistema inmunitario que incluye, entre otras, la regulación negativa de la respuesta inmunitaria, el aumento de las respuestas inmunitarias y los cambios de los estados inflamatorios mediados por cambios en el perfil de citocinas, la actividad citotóxica y la producción de anticuerpos y sus efectos sobre las células inmunitarias y relacionadas con el sistema inmunitario.

60 El término "trastornos inflamatorios" se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, *por ejemplo*, inflamación crónica. Los ejemplos ilustrativos y no limitantes de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, neuritis óptica aguda, neuropatía diabética, enfermedad de Krabbe, lesión pulmonar aguda, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), asma, encefalitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), osteólisis inflamatoria, trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), vacúltidas inflamatorias (*por ejemplo*, poliarteritis nodosa, granulomatosis

de Wegner, arteritis de Takayasu, arteritis temporal y granulomatosis linfoma atóide), angioplastia vascular postraumática (*por ejemplo*, restenosis después de la angioplastia), espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, hepatitis crónica e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas.

El término "afección viral" se refiere a cualquier enfermedad causada por un virus. Las enfermedades adecuadas incluyen, pero no se limitan a: Influenza, infecciones por adenovirus, enfermedad sincitial respiratoria, infecciones por rinovirus, herpes simple, varicela (varicela), sarampión (rubéola), sarampión alemán (rubéola), paperas (parotitis epidémica), viruela pequeña (variola), enfermedad de Kawasaki, fiebre amarilla, dengue, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis NANB, gastroenteritis viral, fiebres virales, enfermedad por citomegalovirus, SIDA (VIH), rabia, polio, virus del Ébola, fiebre hemorrágica, Epstein-Barr y enfermedades que incluyen cánceres causados por el virus que causa cualquiera de las enfermedades anteriores.

El término "infección bacteriana" se refiere a cualquier infección causada por una bacteria médicamente relevante que incluye, pero no se limita a, tos ferina, lepra, tuberculosis, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, salmonela, intoxicación por E. coli, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, sepsis, enfermedad de Lyme, cólera, disentería y otros.

"Población celular aislada" significa una población celular, aislada del cuerpo humano o animal, que está sustancialmente libre de una o más poblaciones celulares que normalmente están asociadas con la población celular *in vivo* o *in vitro*.

El término "inductor de ligando" significa un agente o agentes que dan como resultado una mayor producción de dicho ligando. Un inductor de ligando para un ligando de receptor tipo Toll (TLR) producirá un mayor ligando de TLR y, por lo tanto, es esencialmente equivalente al propio ligando de TLR.

El término "MHC" (complejo mayor de histocompatibilidad) se refiere a un subconjunto de genes que codifican proteínas presentadoras de antígenos en la superficie celular. En los seres humanos, estos genes se denominan genes de antígeno leucocitario humano (HLA). Las abreviaturas MHC o HLA se usan indistintamente.

El término "población de células" significa cualquier número de células mayor que 1, pero es al menos 1×10^3 células, al menos 1×10^4 células, al menos 1×10^5 células, al menos 1×10^6 células, al menos 1×10^7 células, al menos 1×10^8 células, o al menos 1×10^9 o más células. Una población de células también se refiere a células en formación de lotes cultivadas en biorreactores u otros procedimientos industriales destinados a cultivar una gran cantidad de células

En realizaciones preferidas de la presente invención, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 % o al menos el 95 %, de las células madre (% por número de células) en una población celular inicial serán MSC indiferenciadas.

El término "expresión significativa" o sus términos equivalentes "positivo" y "+" cuando se usa con respecto a un marcador de superficie celular significa que, en una población celular, más del 20 %, preferentemente más del 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 % de las células expresan el marcador de superficie celular.

La expresión de marcadores de superficie celular se puede determinar, por ejemplo, por medio de citometría de flujo para un marcador de superficie celular específico utilizando procedimientos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema BECKMAN COULTER EPICS XL FACS utilizado con anticuerpos disponibles comercialmente y protocolos estándar conocidos en la técnica) que muestran una señal para un marcador de superficie celular específico en citometría de flujo por encima de la señal de fondo utilizando procedimientos y aparatos convencionales. La señal de fondo se define como la intensidad de señal dada por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico utilizado para detectar cada marcador de superficie en el análisis FACS convencional. Para que un marcador se considere positivo, la señal específica observada es más fuerte que el 20 %, preferentemente más fuerte que el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 500 %, 1000 %, 5000 %, 10000 % o superior, que la intensidad de la señal de fondo utilizando procedimientos y aparatos convencionales. Además, se pueden usar anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles y conocidos contra dichos marcadores de superficie celular (*por ejemplo*, receptores celulares y proteínas transmembrana) para identificar células relevantes.

La expresión de ARNm se determina mediante cualquier tecnología adecuada que incluye, pero no se limita a, matrices de expresión génica (chips génicos), ARNm-SEQ, transferencia Northern o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que incluye procedimientos de PCR cuantitativa (qPCR) que incluyen el uso de transcriptasa inversa. Los procedimientos de QPCR incluyen, pero no se limitan a: cuantificación basada en sonda, por ejemplo, TaqMan®; cuantificación basada en colorante, por ejemplo, verde SYBR; PCR digital. El procedimiento de qPCR puede ser uno que use un procedimiento de cuantificación absoluta, o un procedimiento de cuantificación relativa que requiera normalización a genes de mantenimiento tales como actina, GAPDH o subunidades ribosómicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra los datos de expresión génica generados usando una matriz de PCR de MSC polarizadas para poseer características antiinflamatorias usando el ligando de TLR3 poli(I:C). El gris indica al menos una inducción de dos veces de la expresión génica; el negro indica una reducción de dos veces en la expresión génica; y los recuadros gruesos indican genes que se sobreexpresaron más de dos veces y se seleccionaron para una validación adicional (con la excepción de PIAS2 que se redujo en al menos dos veces) en la Fig. 2.

La Fig. 2 muestra la validación de genes seleccionados del experimento en la figura 1 usando qPCR (A y B). Las barras de error indican SEM.

La Fig. 3 muestra la inducción de la secreción de IL-6 e IL-8 en células MSC después del tratamiento con ligando TLR4 (MSC1), o ligando TLR4 más EPO y cloruro de cobalto (MSC1*).

La Fig. 4 muestra la inducción de la secreción de CCL5 y CXCL10 en células MSC después del tratamiento con ligando TLR3 (MSC2), o ligando TLR3 más EPO y cloruro de cobalto (MSC2*).

La Fig. 5 muestra la inducción de un fenotipo MSC1, mediante la expresión de *TNFSF10 (TRAIL)* en células MSC de diferentes donantes humanos, después del tratamiento con ligando TLR4 (sin*), o ligando TLR4 más EPO y cloruro de cobalto (con*).

La Fig. 6 muestra la inducción de un fenotipo MSC2, mediante la expresión de *CXCL9* en células MSC de diferentes donantes humanos, después del tratamiento con ligando TLR3 (sin*), o ligando TLR3 más EPO y cloruro de cobalto (con*).

La Fig. 7 muestra un curso temporal de inducción de la expresión de *TNFSF10 (TRAIL)* en células MSC de MSC después del tratamiento con ligando TLR4 (MSC1), o ligando TLR4 más EPO y cloruro de cobalto (MSC1*).

La Fig. 8 muestra un curso temporal de inducción de la expresión de *CXCL9* en células MSC de MSC después del tratamiento con ligando TLR3 (MSC2), o ligando TLR3 más EPO y cloruro de cobalto (MSC2*).

La Fig. 9 muestra un ensayo de migración transwell de MSC que no están estimuladas (control neg) en comparación con MSC que se han estimulado con ligando TLR4 (MSC1), ligando TLR4 más EPO y cloruro de cobalto (MSC1*), ligando TLR3 (MSC2) y ligando TLR3 más EPO y cloruro de cobalto MSC2*). Las barras de error indican SEM.

La Fig. 10 muestra un ensayo de proliferación/viabilidad celular de MSC que no están estimuladas (control neg) en comparación con MSC que se han estimulado con ligando TLR4 (MSC1), ligando TLR4 más EPO y cloruro de cobalto (MSC1*), ligando TLR3 (MSC2) y ligando TLR3 más EPO y cloruro de cobalto (MSC2*). Las barras de error indican SEM.

La Fig. 11 muestra la validación de un ensayo de qPCR para medir la expresión de *TNFSF10 (TRAIL)*: muestra un gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR del cebador *TNFSF10 (TRAIL)*.

La Fig. 12 (A) muestra un curso temporal de la expresión de *CXCL9* en MSC polarizadas a MSC2; (B) muestra un gel de agarosa de productos de amplificación por PCR del cebador *CXCL9*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La práctica de la invención emplea, a excepción de la propia invención, técnicas convencionales de cultivo celular, biología molecular y microbiología, que están dentro de la habilidad de los que trabajan en la materia.

La invención proporciona un medio de inducción de cultivo inductor, activador, polarizador o cebador para una población de células madre mesenquimales, que comprende un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina (EPO) y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia, más componentes estándar adicionales del medio de cultivo celular conocido en la técnica y descrito aquí.

La invención también proporciona un suplemento de inducción de medio de cultivo que comprende un ligando de receptor de tipo Toll (TLR) o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina (EPO) y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia, que se puede agregar a otro medio de cultivo existente. Dicho suplemento podría ser apropiado cuando los componentes inusuales o las concentraciones de otros componentes sean apropiadas para ciertas circunstancias.

La invención también proporciona un recipiente de cultivo sellado herméticamente que contiene el medio de inducción de cultivo o el suplemento de inducción de medio de cultivo de la invención.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar un medio de inducción de cultivo como se describe en esta invención, que comprende las etapas de: (a) obtener un medio de cultivo; y (b) añadir un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina (EPO) y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia al medio de cultivo.

La invención también proporciona una composición que comprende: (a) un medio de cultivo según la invención; y (b) células madre.

La invención proporciona también una composición que contiene: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) una superficie sólida. En determinadas realizaciones, una superficie sólida es cualquier superficie compatible con el cultivo de tejidos, incluidas placas de cultivo de tejidos, matraces y botellas de cualquier tamaño para su uso en el

cultivo celular 2D. En determinadas realizaciones, una superficie sólida es un microportador o cualquier otra matriz de soporte para células utilizadas en cultivo 3D.

La invención también proporciona el uso de un medio de cultivo de la invención para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales.

La invención también proporciona un procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre mesenquimales; (b) proporcionar un medio de cultivo de la invención; (c) poner en contacto las células madre con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células en condiciones apropiadas.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia en la fabricación de un medicamento de terapia celular. Por consiguiente, en una realización, la invención también proporciona un procedimiento de fabricación de un medicamento de terapia celular, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre mesenquimales; (b) proporcionar un medio de cultivo de la invención; (c) poner en contacto las células madre con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células en condiciones apropiadas. La invención también proporciona el uso de una composición que comprende: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) células madre, para fabricar un medicamento de terapia celular. La invención también proporciona el uso de una composición que comprende: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) una superficie sólida, para fabricar un medicamento de terapia celular.

Dichos medicamentos son útiles en el tratamiento, la reparación, la profilaxis y/o la mejora de tejidos dañados, o uno o más síntomas asociados con trastornos inflamatorios y/o inmunitarios tales como, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente que incluyen el rechazo de órganos y tejidos trasplantados y cáncer. Un medicamento de terapia celular de la invención comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células madre y un portador farmacéutico. Particularmente preferidas son las células madre de origen mesenquimal. En la técnica se conocen ejemplos de dosificaciones y regímenes de dosificación para cada uno de estos tipos de células. En la técnica se conocen portadores farmacéuticos adecuados y son preferentemente aquellos aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de EE. UU. o enumerados en la Farmacopea de EE. UU., o Farmacopea Europea, u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes amortiguadores de pH. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E W Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico o terapéutico preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración adecuada al sujeto. La formulación debe adaptarse al modo de administración. En una realización preferida de la invención, los medicamentos son estériles y están en una forma adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente un sujeto animal, más preferentemente un sujeto mamífero, y lo más preferentemente un sujeto humano.

Si bien no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, en determinadas realizaciones, los procedimientos, las células y el medio de inducción de la presente descripción son para el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, los procedimientos, células y medio de inducción de esta descripción son para el tratamiento de tumores. En ciertas realizaciones, los procedimientos, las células y el medio de inducción de esta descripción son para aumentar el tratamiento del cáncer. En determinadas realizaciones, el cáncer es leucemia linfoblástica aguda, en el adulto; leucemia linfoblástica aguda, en la infancia; leucemia mieloide aguda, en el adulto; leucemia mieloide aguda, en la infancia; carcinoma cortical adreno; cánceres relacionados con el SIDA; linfoma relacionado con el SIDA; cáncer anal; cáncer de apéndice; astrocitomas; tumor teratoide/rabdoide atípico; carcinoma de células basales; cáncer de conducto biliar, extrahepático; cáncer de vejiga; cáncer de hueso, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno; glioma del tronco cerebral; tumor cerebral; tumores embrionarios del sistema nervioso central; astrocitomas; craneofaringioma; ependimoblastoma; tumor cerebral, ependimoma; meduloblastoma; meduloeptelioma; tumores parenquimales pineales de diferenciación intermedia; tumor supratatorial primario ectodérmico y pinoblastoma; Tumores cerebrales y de la médula espinal; Cáncer de mama; Cáncer de mama, masculino; Tumores bronquiales; Linfoma de Burkitt; Tumor carcinoide; Tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central; Tumores embrionarios del sistema nervioso central; Linfoma del sistema nervioso central (SNC), cáncer cervical; Primario; Cáncer cervical; Cánceres infantiles; Cordoma; Leucemia linfocítica crónica; Leucemia mielógena crónica; Trastornos mieloproliferativos crónicos; Cáncer de colon; Cáncer colorrectal; Craneofaringioma; Linfoma cutáneo de células T; Tumores embrionarios, sistema nervioso central; Cáncer endometrial; Ependimoblastoma; Ependimoma; Cáncer esofágico; Esthesioneuroblastoma; Sarcoma de Ewing Familia de tumores; Tumor de células germinales extracraneales; Tumor de células germinales extragonadal; Tumor de células germinales extragonadal; Ducto biliar extrahepático Cáncer; Cáncer ocular, melanoma intraocular; Cáncer ocular, retinoblastoma; Cáncer de vesícula biliar; Cáncer gástrico (estómago); Tumor carcinoide gastrointestinal; Tumor del estroma gastrointestinal (GIST); Tumor de células germinales, extracraneal; Tumor de células germinales, extragonadal; Tumor de células germinales, ovárico; Tumor trofoblástico gestacional; Glioma; Leucemia de células pilosas; Cáncer de cabeza y cuello; Cáncer cardíaco; Cáncer hepatocelular (hígado), adulto (primario); Cáncer hepatocelular (hígado); Histiocitosis, célula de Langerhans;

Linfoma de Hodgkin, adulto; Linfoma de Hodgkin, infantil; Cáncer de hipofaringe; Melanoma intraocular; Tumores de células islotas (páncreas endocrino); Sarcoma de Kaposi; Cáncer de riñón (células renales); Cáncer de riñón; Histiocitosis de células de Langerhans; Cáncer laríngeal; Cáncer laríngeo, infantil; Leucemia, Linfoblástico agudo, adulto; Leucemia, linfoblástico agudo, infantil; Leucemia, mieloide agudo, adulto; Leucemia, mieloide agudo, infantil; 5 Leucemia, linfocítica crónica; Leucemia, mielógena crónica; Leucemia, de células pilosas; Cáncer de labios y cavidad oral; Cáncer de hígado, adulto (primario); Cáncer de hígado; Cáncer de pulmón, de células no pequeñas; Cáncer de pulmón, de células pequeñas; Linfoma, relacionado con el SIDA; Linfoma, Burkitt; Linfoma, células T cutáneas; Linfoma, Hodgkin, adulto; Linfoma, Hodgkin, infantil; Linfoma, no Hodgkin, adulto; Linfoma, no Hodgkin, infantil; Linfoma, sistema nervioso central primario (SNC); Macroglobulinemia, síndrome de Waldenström; Histiocitoma óseo 10 fibroso maligno y osteosarcoma; Meduloblastoma; Meduloepitelioma; Melanoma; Melanoma, intraocular (ojo)); Carcinoma de células de Merkel; Mesotelioma, maligno en adultos; Mesotelioma; Cáncer de cuello escamoso metastásico con cáncer primario oculto; Cáncer de boca; Síndrome de neoplasia endocrina múltiple; Mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; Micosis fungoide; Síndromes mielodisplásicos; Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas; Leucemia mielógena, crónica; Leucemia mieloide, aguda en adultos; Leucemia mieloide, aguda en la infancia; Mieloma, múltiple; Trastornos mieloproliferativos, crónicos; Cáncer de cavidad nasal y de seno paranasal; Cáncer nasofaríngeo; Neuroblastoma; Linfoma no hodgkiniano, adulto; Linfoma no hodgkiniano, infancia; Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer oral; Cáncer de cavidad oral, labio y orofaríngeo; Cáncer orofaríngeo; Osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno Hueso; Cáncer de ovario; Cáncer epitelial de ovario; Tumor de células germinales de ovario; Tumor ovárico de bajo potencial maligno; Cáncer de páncreas; Cáncer de páncreas, 20 tumores de células de islotas; Papilomatosis; Cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; Cáncer de paratiroides; Cáncer de pene; Cáncer de faringe; Tumores parenquimatosos pineales de diferenciación intermedia; Tumor hipofisario; Neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; Blastoma pleuropulmonar; Embarazo y cáncer de mama; Linfoma primario del sistema nervioso central (SNC); Cáncer de próstata; Cáncer de recto; Cáncer de células renales (riñón); Cáncer de pelvis renal y uréter, cáncer de células transicionales; Cáncer del tracto respiratorio con cambios en el cromosoma 15; Retinoblastoma; Rhabdomyosarcoma; Cáncer de glándulas salivales; Cáncer de glándula; 25 Sarcoma, familia de tumores de sarcoma de Ewing; Sarcoma, Kaposi; Sarcoma, tejido blando, adulto; Sarcoma, tejido blando, infancia; Sarcoma, útero; Síndrome de Sézary; Cáncer de piel (no melanoma); Cáncer de piel; Cáncer de piel (melanoma); Carcinoma de piel, células de Merkel; Cáncer de pulmón de células pequeñas; Cáncer de intestino delgado; Sarcoma de tejido blando, adulto; Sarcoma de tejido blando, infancia; Carcinoma de células escamosas; 30 Cáncer de cuello escamoso con oculto primario, metastásico; Cáncer de estómago (gástrico); Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; Linfoma de células T, cutáneo; Cáncer testicular; Cáncer de garganta; Timoma y Carcinoma tímico; Cáncer de tiroides; Cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter; Tumor trofoblástico, gestacional; Sitio primario desconocido, carcinoma de; Uretero y pelvis renal, cáncer de células transicionales; Cáncer de útero; Cáncer de útero, endometrial; Sarcoma; Melanoma uveal; Cáncer vulvarinal; Cáncer 35 de macromolecular o vírculo de rana.

Si bien no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, en determinadas realizaciones, los procedimientos, células y medio de inducción de la presente descripción son para la administración a un sujeto que necesita tratamiento para un cáncer, trastorno autoinmunitario o trastorno inflamatorio. En ciertas realizaciones, las 40 células de los procedimientos y el medio de inducción de esta descripción abarcan diferentes vías de administración. En ciertas realizaciones, las vías de administración son subcutánea, intraparietal, intramuscular, intravenosa, intratumoral, intraocular, intrarretinal, intravítrea o intracraneal.

En ciertas realizaciones, los procedimientos, las células y el medio de inducción de esta descripción son para la administración a un sujeto que necesita tratamiento para un trastorno autoinmunitario o una enfermedad inflamatoria inmunomediada. 45

El medicamento de la invención puede estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación semisólidas y líquidas, tales como preparaciones liofilizadas, soluciones o suspensiones líquidas, 50 soluciones inyectables e infusibles, etc., el medicamento es preferentemente inyectable.

En determinadas realizaciones, los medicamentos son para tratar o reparar tejido dañado (preferentemente tejido mesenquimal), y/o para el tratamiento, modulación, profilaxis y/o mejora de uno o más síntomas asociados con trastornos inflamatorios y/o inmunitarios. En la sección de definiciones se proporciona una lista representativa no exhaustiva de dichos trastornos. Particularmente preferido es un medicamento para el tratamiento de enfermedades 55 inflamatorias inmunomediadas. Se prefiere adicionalmente un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), incluyendo enfermedad de Crohn y/o colitis ulcerosa y esclerosis múltiple (EM). La invención también proporciona el uso de un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia para cultivo de 60 células madre mesenquimales.

Los ingredientes específicos y la proporción de ingredientes del medio de cultivo, los suplementos y las composiciones de la invención pueden variar de acuerdo con las necesidades y aplicaciones particulares. Del mismo modo, las etapas precisas de los procedimientos de la invención pueden variar de acuerdo con las necesidades y aplicaciones 65 particulares. El medio de cultivo, los suplementos, los procedimientos, las composiciones y los usos de acuerdo con esta invención se pueden optimizar mediante experimentación de rutina. Por ejemplo, si un resultado deseado es un

- efecto terapéutico antiinflamatorio, un medio de cultivo, suplemento o composición contendrá específicamente un ligando de TLR3 o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina). La cantidad de cada uno de los ingredientes descritos en esta invención se puede optimizar independientemente de los otros ingredientes mediante optimización de rutina o se pueden añadir o eliminar uno o más ingredientes. Un medio de cultivo puede analizarse para determinar su capacidad para soportar la inducción, activación o sensibilización de células madre mesenquimales analizándolo junto con o en lugar de un medio o procedimiento de cultivo conocido. El medio de cultivo, los suplementos, los procedimientos, las composiciones y los usos de la invención se describen con más detalle a continuación.
- El medio de inducción de la invención comprende un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o un inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia. En un aspecto, el medio de inducción de la invención comprende un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o un inductor de ligando de TLR. En un aspecto alternativo, el medio de inducción de la invención comprende eritropoyetina y exposición a hipoxia o mimético de hipoxia. En un aspecto adicional, el medio de inducción de la invención comprende un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o un inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia. Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, en determinadas realizaciones, el ligando de TLR es un ligando de TLR4. En ciertas realizaciones, el ligando de TLR es un ligando de TLR3.
- El medio de inducción de la invención puede comprender dos o más, tres o más, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10- o más, combinaciones de un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina (EPO) y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia.
- Un medio de inducción de la invención puede comprender entre alrededor de 0,10 picomolar (pM) y alrededor de 100 milimolar (mM) de un ligando de TLR o inductor de ligando de TLR en combinación con entre alrededor de 0,5 mU/mL y alrededor de 100 mU/mL de eritropoyetina (EPO) y con exposición a alrededor de 0,5 a alrededor de 2 % de condiciones de oxígeno (hipoxia) o mimético de hipoxia tal como cloruro de cobalto o desferrioxamina, a una concentración de alrededor de 10 micromolar a alrededor de 1 mM, o cualquier otra combinación del ligando de TLR o inductor de ligando de TLR anterior, eritropoyetina e hipoxia.
- El ligando de TLR3 utilizado en el medio de cultivo de inducción puede ser IL4, IL13, poli(A:U), poli(I:C) y combinaciones de estos, y puede administrarse mediante incubación, transfección, transducción, mediante moléculas portadoras o mediante combinaciones de estos. Preferentemente, el ligando o agonista de TLR3 es poli(I:C).
- Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, el ligando de TLR4 utilizado en el medio de cultivo de inducción puede ser aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos, interferones, TNF-alfa, GM-CSF, lipopolisacárido (LPS) y combinaciones de los mismos, y puede administrarse mediante incubación, transfección, transducción, mediante moléculas portadoras o mediante combinaciones de los mismos. Preferentemente, el ligando o agonista de TLR4 es LPS.
- El ligando o agonista de TLR3 se puede proporcionar en una cantidad de alrededor de 10 pg/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 100 pg/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 1 ng/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 5 ng/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 10 ng/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 100 ng/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 50 µg/mL, de alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 10 µg/mL, de alrededor de 0,25 µg/mL a alrededor de 7,5 µg/mL, de alrededor de 0,5 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, de alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 2,5 µg/mL, y preferentemente de alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 1,5 µg/mL en medio de cultivo o suplemento como se indicó anteriormente.
- En determinadas realizaciones, el ligando de TLR3 es poli(I:C), y se proporciona en una cantidad de alrededor de 10 pg/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 100 pg/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 1 ng/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 5 ng/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 10 ng/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 100 ng/mL a alrededor de 100 µg/mL, de alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 50 µg/mL, de alrededor de 0,1 µg/mL a alrededor de 10 µg/mL, de alrededor de 0,25 µg/mL a alrededor de 7,5 µg/mL, de alrededor de 0,5 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, de alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 5 µg/mL, y de alrededor de 1 µg/mL a alrededor de 2,5 µg/mL en. En determinadas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de alrededor de 1 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 2 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 3 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 4 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 5 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 6 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 7 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 8 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 9 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de aproximadamente 10 µg/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de menos de aproximadamente 100 ng/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de menos de aproximadamente 50 ng/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de menos de aproximadamente 20 ng/mL. En ciertas realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de menos de aproximadamente 10 ng/mL. En ciertas

realizaciones, el poli(I:C) se proporciona en una cantidad de menos de aproximadamente 50 ng/mL.

Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, el ligando o agonista de TLR4 se puede proporcionar en una cantidad de alrededor de 10 pg/mL a alrededor de 10 µg/mL, de alrededor de 100 pg/mL a alrededor de 10 µg/mL, de alrededor de 1 ng/mL a alrededor de 1 µg/mL, de alrededor de 5 ng/mL a alrededor de 1 µg/mL, de alrededor de 10 ng/mL a alrededor de 1 µg/mL, de alrededor de 100 ng/mL a alrededor de 1 µg/mL, preferentemente de alrededor de 5 ng/mL a alrededor de 50 ng/mL, y también preferentemente de alrededor de 5 ng/mL a alrededor de 25 ng/mL en medio de cultivo o suplemento como se indicó anteriormente.

Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, en determinadas realizaciones, el ligando de TLR4 es LPS. En determinadas realizaciones, el LPS está presente en una cantidad de alrededor de 10 pg/mL a alrededor de 10 µg/mL, de alrededor de 100 pg/mL a alrededor de 10 µg/mL, de alrededor de 1 ng/mL a alrededor de 1 µg/mL, de alrededor de 5 ng/mL a alrededor de 1 µg/mL, de alrededor de 10 ng/mL a alrededor de 1 µg/mL, de alrededor de 100 ng/mL a alrededor de 1 µg/mL, preferentemente de alrededor de 5 ng/mL a alrededor de 50 ng/mL, y también preferentemente de alrededor de 5 ng/mL a alrededor de 25 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 5 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 10 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 15 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 20 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 25 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 30 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 35 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 40 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 45 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de aproximadamente 50 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de menos de aproximadamente 100 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de menos de aproximadamente 50 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de menos de aproximadamente 20 ng/mL. En ciertas realizaciones, el LPS está presente a una concentración de menos de aproximadamente 10 ng/mL.

En ciertas realizaciones, el medio de cultivo de inducción de la invención comprende una incubación en un entorno hipóxico o sin oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee menos del 2 % de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee menos de 1,5 % de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee menos de 1,0 % de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee menos de 0,5 % de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee eficazmente 0 % de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee entre 0,5 % y 2,0 % de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee entre 0,5 % y 1,5% de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee entre 0,5 % y 1,0% de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee entre 1,0 % y 2,0% de oxígeno. En determinadas realizaciones, un entorno hipóxico posee entre 1,5 % y 2,0 % de oxígeno.

En ciertas realizaciones, el medio de cultivo de inducción de la invención comprende cloruro de cobalto. En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente en una concentración de aproximadamente 50 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente en una concentración de aproximadamente 100 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 200 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 300 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 400 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 500 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 600 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 700 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 800 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 900 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 1 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 1 mM. En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 800 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 500 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 400 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 300 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 300 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 300 μM . En determinadas realizaciones, el cloruro de cobalto está presente a una concentración de aproximadamente 150 μM a aproximadamente 300 μM .

En determinadas realizaciones, el medio de cultivo de inducción de la invención comprende desferrioxamina. En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 50 μ M. En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 200 μ M. En

determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 300 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 400 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 500 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 600 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 700 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 800 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 900 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 1 mM. En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 1 mM. En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 800 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 500 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 400 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 300 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 300 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 300 μM . En determinadas realizaciones, la desferrioxamina está presente a una concentración de aproximadamente 150 μM a aproximadamente 300 μM .

En ciertas realizaciones, el medio de cultivo de inducción de la invención comprende eritropoyetina. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo de inducción de la invención comprende eritropoyetina recombinante. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo de inducción de la invención comprende eritropoyetina recombinante humana. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina está entre aproximadamente 0.1 ng/mL y aproximadamente 1.0 mg/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina está entre aproximadamente 0,1 ng/mL y aproximadamente 100 ng/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina está entre aproximadamente 0,1 ng/mL y aproximadamente 50 ng/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina está entre aproximadamente 0,1 ng/mL y aproximadamente 10 ng/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina está entre aproximadamente 0,1 ng/mL y aproximadamente 1,0 ng/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina está entre aproximadamente 0.2 ng/mL y aproximadamente 0,8 ng/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina está entre aproximadamente 0.3 ng/mL y aproximadamente 0,6 ng/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 10 mg/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 5 mg/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 1 mg/mL. En determinadas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 100 ng/mL. En determinadas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 30 ng/mL. En determinadas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 10 ng/mL. En determinadas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 5 ng/mL. En determinadas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 4 ng/mL. En determinadas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 1 ng/mL. En determinadas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 0,8 ng/mL. En determinadas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 1 ng/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 5U/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 1U/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 0,5 U/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 0.1U/mL. En ciertas realizaciones, la cantidad de eritropoyetina es inferior a 0,05 U/mL.

El medio de inducción celular típicamente contiene una gran cantidad de ingredientes, que son necesarios para apoyar el mantenimiento de las células cultivadas. Por lo tanto, un medio de inducción de la invención normalmente contendrá muchos otros ingredientes además de un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o un inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina). El experto en la materia puede formular fácilmente combinaciones adecuadas de ingredientes, teniendo en cuenta la siguiente descripción. Un medio de inducción de acuerdo con la invención generalmente será una solución nutritiva que comprende ingredientes de cultivo celular estándar, tales como aminoácidos, vitaminas, metales traza, sales inorgánicas, una fuente de energía de carbono y un amortiguador, como se describe con más detalle a continuación.

Un medio de inducción de la invención puede contener suero. El suero contiene factores y componentes celulares y no celulares que pueden ser necesarios para la viabilidad y la expansión. Se puede utilizar suero obtenido de cualquier fuente apropiada, incluido suero bovino fetal (FBS), suero bovino (BS), suero de ternero (CS), suero de ternero fetal (FCS), suero de ternero recién nacido (NCS), suero de cabra (GS), suero de caballo (HS), suero porcino, suero de oveja, suero de conejo, suero de rata (RS), etc. También queda dentro del alcance de la invención que si dichas MSC son de origen humano, el medio de inducción celular se complementa con un suero humano, preferentemente de origen autólogo. Se entiende que los sueros pueden inactivarse por calor a 55-65 grados C si se considera necesario para inactivar los componentes de la cascada del complemento. Cuando se usa un reemplazo de suero, puede usarse entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 40 % en volumen del medio, de acuerdo con técnicas convencionales.

En otras realizaciones, un medio de inducción de la invención puede contener un reemplazo de suero. Varias

formulaciones de reemplazo de suero diferentes están disponibles comercialmente y son conocidas por el experto, tales como, pero sin limitarse a, albúmina sérica, transferrina sérica, selenio y proteínas recombinantes que incluyen, pero sin limitarse a, insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Cuando se usa un reemplazo de suero, puede usarse entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 40 % en volumen del medio, de acuerdo con técnicas convencionales. En otras realizaciones, un medio de inducción de la invención puede estar libre de suero y/o libre de reemplazo de suero. Un medio libre de suero es aquel que no contiene suero animal de ningún tipo. Se puede preferir el medio libre de suero para evitar la posible xenocontaminación de las células madre. Un medio libre de reemplazo de suero es aquel que no se ha complementado con ninguna formulación comercial de reemplazo de suero.

Un medio de inducción de la invención normalmente se formulará en agua destilada desionizada. Un medio de inducción de la invención se esterilizará típicamente antes de su uso para evitar la contaminación, por ejemplo, por luz ultravioleta, calentamiento, irradiación o filtración. El medio de inducción se puede congelar (por ejemplo, a -20 °C o -80 °C) para su almacenamiento o transporte. Los agentes antimicrobianos también se usan típicamente en el medio para mitigar la contaminación bacteriana, micoplasmática y fúngica. El medio puede contener uno o más agentes antimicrobianos o antibióticos para prevenir la contaminación. Típicamente, los antibióticos o compuestos antimicóticos utilizados son mezclas de penicilina/estreptomicina, pero también pueden incluir, entre otros, anfotericina (Fungizone®), ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, *etc.*

En una realización de la invención, el medio de cultivo es un medio que se ha condicionado mediante la adición de células inducidas por un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o un inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina). El medio acondicionado se produce cultivando una población de dichas células en un medio de inducción durante un tiempo suficiente para acondicionar el medio y a continuación recogiendo el medio acondicionado. Cuando se utiliza un medio acondicionado, el medio puede estar condicionado a células de mamífero, por ejemplo, células de ratón o células humanas. Se pueden usar varios tipos diferentes de células de mamífero para producir medio acondicionado adecuado para la inducción de células madre mesenquimales.

Un medio de inducción puede ser una formulación 1x o una formulación concentrada, por ejemplo, una formulación de medio concentrado 2x a 250x. En una formulación 1x, cada ingrediente en el medio está a la concentración prevista para la inducción celular. En una formulación concentrada, uno o más de los ingredientes están presentes a una concentración más alta que la prevista para la inducción celular. El medio de inducción se puede concentrar usando procedimientos conocidos, por ejemplo, precipitación de sal o filtración selectiva. Un medio concentrado se puede diluir para su uso con agua (preferentemente desionizada y destilada) o cualquier solución apropiada, por ejemplo, una solución salina acuosa, un tampón acuoso o un medio de cultivo.

Un medio de inducción como se describe en esta invención puede ser capaz de inducir, activar o cebar una población de células madre en un estado multipotente, indiferenciado y proliferativo para solo un único pase o población que se duplica en condiciones apropiadas. Se considera que las células madre están en un estado multipotente, indiferenciado y proliferativo si exhiben ciertas características como se describe con más detalle en otra parte en esta invención. El experto en la materia puede seleccionar las condiciones apropiadas a partir de las que se utilizan normalmente para el cultivo de células madre mesenquimales.

Como se indica en otra parte en esta invención, la invención también proporciona un recipiente sellado herméticamente que contiene un medio de inducción de la invención. Los recipientes herméticamente sellados pueden preferirse para el transporte o almacenamiento del medio de inducción, para evitar la contaminación. El recipiente puede ser cualquier recipiente adecuado, tal como un biorreactor, un matraz, una placa, una botella, un frasco, un vial o una bolsa. Como se indica en otra parte en esta invención, la invención proporciona también un procedimiento para preparar un medio de inducción, que comprende las etapas de: (a) obtener un medio de cultivo; y (b) añadir un ligando de receptor tipo Toll (TLR) o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina (EPO) y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina) al medio de cultivo. Se prevén varios procedimientos diferentes para preparar el medio de inducción, dependiendo de los ingredientes específicos que se incluirán en el medio de inducción. Por ejemplo, un procedimiento para preparar un medio de inducción puede comprender las etapas de: (a) obtener un medio de cultivo; y (b) añadir un ligando de TLR o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina (EPO) y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina) al medio de cultivo. En una realización, un procedimiento para preparar un medio de inducción puede comprender las etapas de: (a) obtener un medio de cultivo; y (b) añadir un ligando de TLR, EPO y cloruro de cobalto al medio de cultivo.

El medio de inducción de la invención se puede usar para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales. Por consiguiente, la invención proporciona el uso de cualquier medio de inducción como se describe en esta invención para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales en fenotipos uniformes discretos para la terapia basada en células.

En determinadas realizaciones, el medio de inducción descrito en esta invención induce o reduce la expresión de determinados genes que se pueden medir mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia que incluyen, entre otros: PCR; qPCR; qRT-PCR; RT-PCR semicuantitativa; PCR digital; técnica Northern; ARNm-SEQ;

micromatrices; y otros. En determinadas realizaciones, el medio de inducción descrito en esta invención aumenta o disminuye los niveles de proteína que se pueden medir mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia que incluyen, entre otros: ensayos basados en anticuerpos; ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); inmunotransferencia o transferencia Western; citometría de flujo, espectrometría de masas y otros. En ciertas realizaciones, el medio de inducción descrito en esta invención induce la activación o atenuación de las vías de señalización celular que pueden medirse mediante un procedimiento conocido por los expertos en la materia que incluye, pero no se limita a: ensayo de cinasa; mediciones de fosforilación/desfosforilación de proteínas; mediciones de ubiquitinación/desubiquitinación de proteínas; mediciones de acetilación/desacetilación de proteínas; mediciones de degradación/estabilidad de proteínas; mediciones de segundos mensajeros tales como calcio o diacilglicerol; o monitorización de la escisión de una forma inactiva a activa.

En ciertas realizaciones, el medio de inducción descrito en esta invención conduce a cambios medibles en la expresión génica, los niveles de proteínas o las vías de señalización celular de una población celular. En ciertas realizaciones, el cambio es un aumento en la expresión génica, los niveles de proteínas o la señalización celular. En ciertas realizaciones, el cambio es cualquier cambio estadísticamente significativo medido entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba. En determinadas realizaciones, el cambio entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba, es un aumento de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más. En determinadas realizaciones, el cambio entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba, es un aumento de al menos 100 veces o más. En ciertas realizaciones, el cambio entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba, es una disminución de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más. En ciertas realizaciones, el cambio entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba, es una disminución de al menos 100 veces o más.

En ciertas realizaciones, el medio de inducción que comprende un ligando de TLR3 induce la expresión de ARNm de cualquiera de los siguientes genes al menos 2 veces en comparación con una población de células no estimuladas: CXCL9; EGFR; IRF1; A2M; FAS; IL2RG; MMP3; GBP1; ISG15; FCGR1; NFKB1; NOS2A; USF1; YY1; JAK2; STA2, STAT4; STATS; SOCS1; o IRF1. En ciertas realizaciones, el medio de inducción que comprende un ligando de TLR3 reduce la expresión de ARNm de cualquiera de los siguientes genes en al menos 2 veces en comparación con una población de células no estimuladas: EPOR; F2R; STAM; PDGFRA; PIAS2; MYC; SH2B1; o CSF2RB. En ciertas realizaciones, el medio de inducción que comprende un ligando de TLR3 induce la expresión de ARNm de cualquiera de los siguientes genes en al menos 10 veces en comparación con una población de células no estimuladas: CXCL9; GBP1; ISG15; SOCS1; MMP3; JAK2 o IRF1. En ciertas realizaciones, el medio de inducción que comprende un ligando de TLR3 induce la expresión de ARNm de cualquiera de los siguientes genes al menos 20 veces en comparación con una población de células no estimuladas: CXCL9; GBP1; ISG15; o SOCS1. En ciertas realizaciones, el medio de inducción que comprende un ligando de TLR3 induce la expresión de ARNm de CXCL9 en al menos 100 veces en comparación con una población de células no estimuladas.

Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, en determinadas realizaciones, el medio de inducción que comprende un ligando de TLR4 induce la expresión de ARNm de *TNFSF10 (TRAIL)* al menos 2 veces, 10 veces, 100 veces o 1000 veces en comparación con una población celular no estimulada.

La invención también proporciona un procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre mesenquimales; (b) proporcionar un medio de inducción como se describe en esta invención; (c) poner en contacto las células madre con el medio de inducción; y (d) cultivar las células madre en condiciones apropiadas.

En determinadas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descrito en esta invención induce o reduce la expresión de determinados genes que se pueden medir mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia que incluyen, entre otros: PCR; qPCR; qRT-PCR; RT-PCR semicuantitativa; PCR digital; técnica Northern; ARNm-SEQ; micromatrices; y otros. En determinadas realizaciones, el medio de inducción descrito en esta invención aumenta o disminuye los niveles de proteína que se pueden medir mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia que incluyen, entre otros: ensayos basados en anticuerpos; ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); inmunotransferencia o transferencia Western; citometría de flujo, espectrometría de masas y otros. En ciertas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descrito en esta invención induce la activación o atenuación de las vías de señalización celular que pueden medirse mediante un procedimiento conocido por los expertos en la técnica que incluye, entre otros: ensayo de quinasas; mediciones de fosforilación/desfosforilación de proteínas; mediciones de ubiquitinación/desubiquitinación de proteínas; mediciones de acetilación/desacetilación de proteínas; mediciones de degradación/estabilidad de proteínas; mediciones de segundos mensajeros tales como calcio o diacilglicerol; o monitoreo de la escisión de una forma inactiva a activa.

En ciertas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descrito en esta invención conduce a cambios medibles en la expresión génica, los niveles de proteínas o las vías de señalización celular de una población de células madre. En ciertas realizaciones, el cambio es un aumento en la expresión génica, los niveles de proteínas o la señalización celular. En ciertas realizaciones, el

cambio es cualquier cambio estadísticamente significativo medido entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba. En determinadas realizaciones, el cambio entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba, es un aumento de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más. En determinadas realizaciones, el cambio entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba, es un aumento de al menos 100 veces o más. En ciertas realizaciones, el cambio entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba, es una disminución de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más. En ciertas realizaciones, el cambio entre una muestra no estimulada o de control, y una muestra estimulada o de prueba, es una disminución de al menos 100 veces o más.

En ciertas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descrito en esta invención que comprende un ligando de TLR3 induce la expresión de ARNm de cualquiera de los siguientes genes al menos 2 veces en comparación con una población de células no estimuladas: CXCL9; EGFR; IRF1; A2M; FAS; IL2RG; MMP3; GBP1; ISG15; FCGR1; NFKB1; NOS2A; USF1; YY1; JAK2; STA2; STAT4; STAS; SOCS1; o IRF1. En ciertas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descrito en esta invención que comprende un ligando de TLR3 reduce la expresión de ARNm de cualquiera de los siguientes genes en al menos 2 veces en comparación con una población de células no estimuladas: EPOR; F2R; STAM; PDGFRA; PIAS2; MYC; SH2B1; o CSF2RB. En ciertas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descrito en esta invención que comprende un ligando de TLR3 induce la expresión de ARNm de cualquiera de los siguientes genes en al menos 10 veces en comparación con una población de células no estimuladas: CXCL9; GBP1; ISG15; SOCS1; MMP3; JAK2 o IRF1. En ciertas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descrito en esta invención que comprende un ligando de TLR3 induce la expresión de ARNm de cualquiera de los siguientes genes al menos 20 veces en comparación con una población de células no estimuladas: CXCL9; GBP1; ISG15; o SOCS1. En ciertas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descrito en esta invención que comprende un ligando de TLR3 induce la expresión de ARNm de CXCL9 en al menos 100 veces en comparación con una población de células no estimuladas.

Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, en determinadas realizaciones, el procedimiento ex vivo para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales descritas en esta invención que comprende un ligando de TLR4 induce la expresión de ARNm de *TNFSF10 (TRAIL)* al menos 2 veces, 10 veces, 100 veces o 1000 veces en comparación con una población de células no estimuladas.

La invención también proporciona un procedimiento de preparación de células para su uso en terapia celular, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre mesenquimales; (b) proporcionar un medio de inducción de la invención; (c) poner en contacto la población de células madre con el medio de inducción; y (d) cultivar las células en condiciones apropiadas.

Los procedimientos de la invención pueden comprender cultivar las células en contacto con una superficie sólida como se describe en otra parte en esta invención. Por ejemplo, la invención proporciona un procedimiento que comprende: (a) proporcionar una población de células madre mesenquimales; (b) proporcionar un medio de inducción como se describe en esta invención; (c) poner en contacto las células madre con el medio de inducción; y (d) cultivar las células en condiciones apropiadas y en contacto con una superficie sólida. La invención también proporciona el uso de un medio de inducción como se describe en esta invención y una superficie sólida para expandir una población de células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales pueden adherirse, fijarse o sembrarse en dicho soporte. Típicamente, las células se colocan en placas a una densidad deseada tal como entre aproximadamente 100 células/cm² a aproximadamente 100.000 células/cm² (tal como aproximadamente 500 células/cm² a aproximadamente 50.000 células/cm², o, más particularmente, entre aproximadamente 1.000 células/cm² a aproximadamente 20.000 células/cm²) antes de inducir, activar o cebar las células madre. En una realización particular, la densidad celular está entre 200-10.000 células/cm².

Se apreciará que las etapas de los procedimientos descritos en esta invención se pueden realizar en cualquier orden adecuado o al mismo tiempo, según corresponda, y no es necesario que se realicen en el orden en que se enumeran. Por ejemplo, en el procedimiento anterior, la etapa de proporcionar una población de células madre mesenquimales puede realizarse antes, después o al mismo tiempo que la etapa de proporcionar un medio de inducción.

Los procedimientos y usos de la invención pueden implicar cualquier medio o suplemento de inducción como se describe en esta invención. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los procedimientos de la invención pueden ser procedimientos sin suero y/o sin reemplazo de suero. En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención se pueden utilizar para inducir células en ausencia de contacto con una capa de células alimentadoras.

Los procedimientos y usos preferidos de la invención son para la inducción, activación o sensibilización de la población de células madre mesenquimales que se produce una vez que las células se han expandido y antes de ser criopreservadas.

Se prefiere que dicha población de células madre sea de origen adulto, y se prefiere además que dichas células sean una población de células madre mesenquimales, como en las células derivadas de médula ósea o derivadas de tejido adiposo.

- 5 Las condiciones para el cultivo de células madre son conocidas por el experto en la materia. Se prefiere que el cultivo se lleve a cabo en presencia de un soporte sólido adecuado para la adherencia de células madre mesenquimales.

10 Dicho procedimiento de fabricación puede comprender opcionalmente además las etapas de: (a) pasar las células en un medio de cultivo como se describe en esta invención; (b) cultivar adicionalmente las células en condiciones apropiadas y (c) inducir, activar o cebar las células.

15 Se ha demostrado que la expansión ex vivo de las MSC sin inducir diferenciación se puede lograr durante períodos de tiempo prolongados, por ejemplo, mediante el uso de lotes especialmente seleccionados de suero adecuado (como suero bovino fetal o suero humano). En la técnica se conocen procedimientos para medir la viabilidad y el rendimiento (por ejemplo, exclusión de azul de tripano).

20 Cualquiera de las etapas y procedimientos para aislar las células de la población celular de la invención se puede realizar manualmente, si se desea. Alternativamente, el procedimiento de aislamiento de dichas células se puede facilitar y/o automatizar a través de uno o más dispositivos adecuados, ejemplos de los cuales se conocen en la técnica.

25 La práctica de la invención se puede realizar usando cualquier recipiente de cultivo celular adecuado como soporte. En la técnica se conocen recipientes de cultivo celular de diversas formas y tamaños (por ejemplo, matraces, placas de pocillos individuales o múltiples, placas de pocillos individuales o múltiples, botellas, frascos, viales, bolsas, biorreactores) y construidos a partir de diversos materiales diferentes (por ejemplo, plástico, vidrio). El experto en la materia puede seleccionar fácilmente un recipiente de cultivo celular adecuado.

30 Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, también se proporciona un suplemento de inducción de medio de cultivo que se puede usar para producir un medio de inducción de cultivo como se describe en esta invención. Un "suplemento de inducción de medio de cultivo" es una mezcla de ingredientes que no puede soportar células madre mesenquimales por sí misma, pero que permite o mejora el cultivo de células madre mesenquimales cuando se combina con otros ingredientes de medio de cultivo celular. Por lo tanto, el suplemento se puede usar para producir un medio de cultivo celular funcional de la invención combinándolo con otros ingredientes de cultivo celular para producir una formulación de medio adecuada. En la técnica se conoce bien el uso de suplementos de medio de cultivo. La invención proporciona un suplemento de inducción de medio de cultivo que comprende añadir un ligando de TLR o inductor de ligando de TLR en combinación con eritropoyetina (EPO) y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina). El suplemento puede contener cualquier ligando descrito en esta invención. El suplemento también puede contener uno o más ingredientes de cultivo celular adicionales, por ejemplo, uno o más ingredientes de cultivo celular seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos, fuentes de energía de carbono y amortiguadores.

40 Un suplemento de inducción de medio de cultivo puede ser un suplemento líquido concentrado (*por ejemplo*, un suplemento líquido concentrado de 2x a 250x) o puede ser un suplemento seco. En la técnica se conocen bien tanto tipos de suplementos líquidos como secos. Se puede liofilizar un suplemento.

45 Un suplemento de inducción de medio de cultivo de la invención se esterilizará típicamente antes de su uso para evitar la contaminación, por ejemplo, por luz ultravioleta, calentamiento, irradiación o filtración. Un suplemento de inducción de medio de cultivo se puede congelar (por ejemplo, a -20 ° C o -80 ° C) para su almacenamiento o transporte.

50 Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, también se proporciona un recipiente sellado herméticamente que contiene un suplemento de medio de cultivo de la invención. Los recipientes sellados herméticamente pueden preferirse para el transporte o almacenamiento de los suplementos del medio de cultivo descritos en esta invención, para evitar la contaminación. El recipiente puede ser cualquier recipiente adecuado, tal como un biorreactor, un matraz, una placa, una botella, un frasco, un vial o una bolsa.

55 Se ha utilizado una variedad de sustancias como superficies para el cultivo de células madre adherentes, y el experto en la materia puede seleccionar fácilmente un material apropiado. Preferentemente, la superficie sólida comprende plástico, pero alternativamente puede comprender vidrio, matriz extracelular. La superficie puede ser plana, tubular o en forma de un andamio, perla o fibra.

60 Las composiciones de la invención pueden comprender suero, o pueden estar libres de suero y/o libres de reemplazo de suero, como se describe en otra parte en esta invención.

65 Las células madre mesenquimales para su uso en la invención se pueden obtener utilizando procedimientos bien conocidos (véase más adelante). Se prevé que se puedan usar varios tipos de células madre mesenquimales junto con la invención, ya sea obtenidas de tejido embrionario, fetal o adulto, pero preferentemente se derivan de fuentes

de tejido adulto.

El medio de inducción descrito en esta invención puede usarse para cultivar células madre de mamífero, particularmente células madre adultas humanas. Las células madre adultas humanas que se pueden usar junto con la invención son preferentemente células madre mesenquimales. También se pueden usar células madre de ratón o primate. En realizaciones preferidas de la invención, las células madre son células madre derivadas de médula ósea (MSC) humana.

Las células madre mesenquimales pueden identificarse por su capacidad para diferenciarse en células de las tres capas germinales, por ejemplo, determinando la capacidad de las células para diferenciarse en células que muestran una expresión detectable de marcadores específicos para las tres capas germinales. Las referencias en singular (por ejemplo, a "una célula" y referencias equivalentes) abarcan el plural (por ejemplo, "células") a menos que el contexto requiera lo contrario.

El medio de inducción de la invención se puede usar para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales. Por consiguiente, la invención proporciona el uso de cualquier medio de inducción como se describe en esta invención para inducir, activar o cebar una población de células madre mesenquimales en fenotipos uniformes discretos para la terapia basada en células. Estos fenotipos discretos y uniformes pueden ser un fenotipo de MSC antiinflamatorio (MSC2) y, aunque no forma parte de las invenciones actualmente reivindicadas, un fenotipo de MSC antitumoral proinmune uniforme y discreto (MSC1).

El procedimiento preferido de inducción para un fenotipo de MSC antiinflamatorio uniforme y discreto (MSC2) es la incubación de las MSC con un medio de cultivo que contiene un ligando del receptor tipo Toll-3 (TLR3) tal como ácido poliinosínico: poli-citidílico (o poli(I:C); 1 mg/mL) en combinación con eritropoyetina (1 mU/mL o 5 ng/mL) y con exposición a hipoxia (1 % de oxígeno) o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina, ya sea a 200 mM) durante 1 hora tras un crecimiento confluyente del 70-90 %.

Aunque no forma parte de las invenciones reivindicadas en esta invención, el procedimiento preferido de inducción para un fenotipo de MSC antitumoral proinmune uniforme y discreto (MSC1) es la incubación de las MSC con un medio de cultivo que contiene un ligando del receptor tipo Toll-4 (TLR4) tal como lipopolisacárido (LPS, endotoxina a 10 ng/ml) en combinación con eritropoyetina (1 mU/ml o 5 ng/ml) y con exposición a hipoxia (oxígeno al 1%) o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina, ya sea a 200 mM) durante 1 hora tras un crecimiento confluyente del 70-90 %.

Los ligandos de TLR en combinación con eritropoyetina y con exposición a hipoxia o miméticos de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina) se agregan al medio de cultivo fresco, o como un suplemento de cultivo y se incuban con las células durante 1 hora. Después de esta etapa de inducción, las MSC se lavan dos veces en medio de cultivo o solución salina tamponada adecuada sin los ligandos de TLR para eliminar las células y los restos de cultivo. Sin querer limitarse a la teoría, los tiempos de incubación cortos (< 1 h) y la exposición mínima al ligando de TLR a las concentraciones indicadas anteriormente (o inferiores) son importantes para lograr los fenotipos deseados y, además, este protocolo imita el gradiente de señales de peligro que las MSC endógenas encuentran y al que responden a una distancia del sitio de la lesión. Una vez lavadas, las MSC inducidas, activadas o cebadas se pueden recoger mediante procedimientos tradicionales, por ejemplo, tripsina y EDTA durante entre 5 segundos y 15 minutos a 37 °C o con un sustituto de tripsina (por ejemplo, TrypLE de Invitrogen), colagenasa, dispasa, accutasa u otros reactivos conocidos por el experto en la materia. Después de recoger las células MSC cebadas, activadas o inducidas, estas pueden crioconservarse mediante procedimientos convencionales.

Los agonistas de TLR3 se pueden administrar mediante incubación, transfección, transducción por moléculas portadoras o mediante otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Las células pueden incubarse con ligando de TLR o ligando agonista en combinación con eritropoyetina (EPO) y con exposición a hipoxia o mimético de hipoxia (cloruro de cobalto o desferrioxamina) durante de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 480 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 475 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 470 minutos, de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 460 minutos, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 455 minutos, de aproximadamente 25 minutos a aproximadamente 450 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 445 minutos, de aproximadamente 35 minutos a aproximadamente 440 minutos, de aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 435 minutos, de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 430 minutos, de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 425 minutos, de aproximadamente 55 minutos a aproximadamente 420 minutos, de aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 415 minutos, y preferentemente de aproximadamente 60 minutos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: inducción de una firma de expresión génica de MSC2 a partir de MSC primarias humanas

Para este experimento, se incubaron MSC humanas primarias a 37 °C con CO₂ al 5 %, en medio sin suero que contenía 2 µg/ml de poli(I:C), durante 6 horas. Posteriormente, las células se lavaron dos veces, el ARN se extrajo

usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) y a continuación se trató usando el kit TURBO libre de ADN (Ambion, Austin, TX). El ARN se transcribió de forma inversa y el ADNc resultante se utilizó en la matriz de PCR Profiler™ de la vía de señalización JAK/STAT (SuperArray Bioscience, Frederick, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un sistema de detección de PCR en tiempo real iCycler iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA). Los datos sin procesar de los grupos no tratados y tratados se analizaron utilizando el software GEArray Analyzer (SuperArray Inc., Bethesda, MD). Esta matriz mide los niveles de expresión de ARN de 84 genes diferentes en la vía de señalización JAK/STAT. Los resultados se muestran en la Fig. 1. Los genes que muestran una inducción de 2 veces o más están en caja en gris, los genes que muestran una reducción de 2 veces o más están en caja en negro, y los genes que fueron inducidos por más de dos veces y seleccionados para una validación adicional se representan en cajas gruesas (excepto para PIAS2 que se redujo en más de 2 veces). La Fig. 2 muestra la validación por qPCR adicional de los genes seleccionados en la Fig. 1; La validación se realizó mediante qPCR utilizando una mezcla maestra SYBR Green con cebadores específicos de genes en las mismas muestras analizadas en la Fig. 1.

Ejemplo 2: polarización de MSC1 y MSC2 de MSC humanas primarias

Los donantes primarios de MSC humanas se polarizaron a MSC1 o MSC2. Las MSC humanas se polarizaron usando un medio que contenía 10 ng/ml de LPS en ausencia (MSC1) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 μ M (MSC1*). Las células MSC2 se polarizaron usando un medio que contenía 2 μ g/ml de poli(I:C) en ausencia (MSC2) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 μ M (MSC2*). Los sobrenadantes cultivados se recogieron y a continuación se analizaron para determinar la expresión de quimiocinas/citocinas mediante bio-plex como se describió anteriormente. En resumen, las MSC se colocaron en placas a una densidad de 50.000 células en placas de 24 pocillos, se dejaron adherir durante la noche, a continuación se cebaron con agonistas de TLR durante 1 h como se indica. El medio acondicionado se recolectó después de 48 h y se analizó con ensayos de citocinas Bio-Plex (Grupo Humano I y II; Bio-Rad, Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces en tres grupos de donantes de MSC individuales. La inducción de MSC1 independientemente de la fórmula da como resultado una secreción significativa de citocina que incluye IL6 e IL8 mientras que (Fig. 3), la inducción de MSC2 independientemente de la fórmula da como resultado una secreción significativa de IP10 (CXCL10) y RANTES (CCL5) (Fig. 4). Las barras de error indican +/- SEM.

Ejemplo 3: la polarización de MSC1 y MSC2 es consistente en múltiples fuentes de MSC

Los donantes de MSC humanas de 3 fuentes comerciales diferentes y hasta seis donantes diferentes se polarizaron a MSC1. Las MSC humanas se polarizaron usando un medio que contenía 10 ng/ml de LPS en ausencia (MSC1) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 μ M (MSC1*). El ARN total se aisló, purificó y transcribió de forma inversa a ADNc. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando SYBR Green Master Mix. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento de TC comparativo cuantitativo, normalizando la expresión del gen diana al gen constitutivo de ARNr 18S, y se mostraron como un aumento de veces sobre el control no tratado. La expresión del gen *Trail* aumentó significativamente después de la inducción de MSC1 en todos los donantes, incluidos los mixtos (FIG. 5). Las barras de error representan +/- el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). Los **cebadores de ADNc humano utilizados: Cxcl9 Forward**-CTT TCCTGG CTA CTC CAT GTT **Reverse**- GTT GGT CACTGG CTG ATC TAT AA; *Trail Forward*-CTT CAC AGT GCT CCT GCA GT **Reverse**-TTA GCC AACTAA AAA GGC CCC; *18SrRNA Forward*- GAGGGAGCCTGAGAAACGG, **Reverse**-GTCGGGAGTGGGTAATTTGC **con el protocolo: 1: 95,0 °C para 0:30, 2: 95,0 °C para 0:10, 3: 68,0 °C para 0:30, lectura de placa, 4: IR A 2, 39 veces más.**

Los donantes de MSC humanas de 3 fuentes comerciales diferentes y hasta seis donantes diferentes se polarizaron a MSC2. Las MSC humanas se polarizaron usando un medio que contenía 2 μ g/ml de poli(I:C) en ausencia (MSC2) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 μ M (MSC2*). El ARN total se aisló, purificó y transcribió de forma inversa a ADNc. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando SYBR Green Master Mix. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento de TC comparativo cuantitativo, normalizando la expresión del gen diana al gen constitutivo de ARNr 18S, y se mostraron como un aumento de veces sobre el control no tratado. La expresión del gen *CXCL9* aumentó significativamente después de la inducción de MSC2 en todos los donantes, incluidos los mixtos (Fig. 6). Las barras de error representan +/- el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés).

Ejemplo 4: curso temporal de la polarización de MSC1 y MSC2.

Los donantes de MSC humanas se polarizaron a MSC1. Las MSC humanas se polarizaron utilizando un medio que contenía 10 ng/ml de LPS en ausencia (MSC1) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 μ M (MSC1*).

Los donantes de MSC humanas se polarizaron a MSC2. Las MSC humanas se polarizaron usando un medio que contenía 2 μ g/ml de poli(I:C) en ausencia (MSC2) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 μ M (MSC2*). Las células se recogieron en diferentes momentos como se indica. El ARN total se aisló, purificó y transcribió de forma inversa a ADNc. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando

SYBR Green Master Mix. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento de TC comparativo cuantitativo, normalizando la expresión del gen diana al gen constitutivo de ARNr 18S, y se mostraron como un aumento de veces sobre el control no tratado. La expresión génica de Cxcl9 aumentó significativamente 4 horas después de la inducción de MSC2 (**Fig. 8**). Las barras de error representan +/- el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés).

Ejemplo 5: bio distribución de células MSC1 y MSC2

Se realizó un experimento para determinar la eficacia in vivo de las MSC polarizadas en comparación con las MSC vírgenes. Para este experimento, se administraron MSC vírgenes humanas, MSC1 y MSC2 (1 millón de células) mediante inyección IP en ratones de tipo salvaje y, después de 4 horas, se extrajeron todos los órganos. Posteriormente, el ARN extraído se analizó para GAPDH humana y se comparó con el ADN de GAPDH de ratón para determinar el direccionamiento del tejido. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

	Porcentaje de células recuperadas, 4 horas después de la administración		
	MSC vírgenes	MSC1	MSC2
Cerebro	0,10	0,3	0,4
Pulmón	<i>54,20</i>	<i>3,1</i>	<i>4,9</i>
Corazón	0,20	0,001	0,5
Bazo	<i>25,50</i>	<i>46,7</i>	<i>82,9</i>
Riñón	20,60	26,9	2,6
Hígado	1,70	22,2	8,9
Intestino	0,60	0,001	0
Ganglios linfáticos	0,00	0,2	0

Ejemplo 6: la incubación con eritropoyetina y cloruro de cobalto durante la polarización de MSC aumenta la migración, la proliferación/viabilidad de las células MSC1 y MSC2

Para determinar la capacidad de migración de MSC cultivadas con o sin eritropoyetina e hipoxia, se añadieron células MSC vírgenes humanas y células polarizadas MSC1 o MSC2 a insertos transwell individuales (poros 8µm, 50.000 células/inserto). Las células MSC1 se polarizaron usando un medio que contenía 10 ng/ml de LPS en ausencia (MSC1) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 µM (MSC1*). Las células MSC2 se polarizaron usando un medio que contenía 2 µg/ml de poli(I:C) en ausencia (MSC2) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 µM (MSC2*). Las membranas se bajaron a placas complementarias de 24 pocillos que contenían medio libre de suero de control negativo (SFM) o el medio de crecimiento que contenía suero (CCM) de control positivo, o el medio inductor correspondiente como se indica. Las fotomicrografías se tomaron después de 16 horas de incubación con un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE300. La **Fig. 9** muestra datos representativos de MSC migradas contadas a partir de 4 cuadrantes de imágenes representativas de más de tres experimentos realizados de forma independiente realizados por triplicado (n=3). Las barras de error indican SEM.

Se utilizó un ensayo de proliferación para determinar la capacidad proliferativa y la viabilidad de las MSC cultivadas con o sin eritropoyetina e hipoxia. Las MSC humanas se polarizaron usando un medio que contenía 10 ng/ml de LPS en ausencia (MSC1) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 µM (MSC1*). Las células MSC2 se polarizaron usando un medio que contenía 2 µg/ml de poli(I:C) en ausencia (MSC2) o en presencia de 0,5 ng/ml de eritropoyetina recombinante humana y cloruro de cobalto 200 µM (MSC2*). Las células se incubaron con el medio especificado durante 48 horas. La proliferación celular y la viabilidad de cada muestra se midieron mediante el ensayo CyQUANT (Life Technologies, CA) y el ensayo de azul de tripano, respectivamente. Para la proliferación celular, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 1 x10³ células en 50 µl por pocillo por triplicado y se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂. Las muestras se recogieron a 0, 24, 48, 72 y 96 horas después del tratamiento y se procesaron como lo describe el fabricante (ensayo CyQUANT, Life Technologies, CA). Los datos mostrados se expresan en relación con los controles sin tratar. El ensayo de proliferación celular se realizó en al menos tres experimentos separados con cada muestra repetida a lo largo de 8 pocillos de la placa de 96 pocillos (n=3). Las barras de error indican SEM. Los resultados se presentan en la **Fig. 10**.

Ejemplo 7: validación del ensayo de qPCR para CXCL9 y TNFSF 10

Las MSC humanas se indujeron en MSC1. El ARN total se aisló, purificó y transcribió de forma inversa a ADNc. La

PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando SYBR Green Master Mix. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento de TC comparativo cuantitativo, normalizando la expresión del gen diana al gen constitutivo de ARNr 18S, y se mostraron como un aumento de veces sobre el control no tratado. La expresión del gen Trail aumentó significativamente después de la inducción de MSC1. Las barras de error representan +/- el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). Se establecieron la eficiencia del cebador y la especificidad del producto (**Fig. 11**).

5

Las MSC humanas se indujeron en MSC2. El ARN total se aisló, purificó y transcribió de forma inversa a ADNc. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando SYBR Green Master Mix. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento de TC comparativo cuantitativo, normalizando la expresión del gen diana al gen constitutivo de ARNr 18S, y se mostraron como un aumento de veces sobre el control no tratado. La expresión del gen Cxcl9 aumentó significativamente después de la inducción de MSC2. Las barras de error representan +/- el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). Se establecieron el curso temporal de la expresión génica (**Fig. 12A**) y la especificidad del producto (**Fig. 12B**).

10

Si bien esta invención se ha descrito en detalle con referencia particular a sus realizaciones preferidas, los principios y modos de funcionamiento de la invención también se han descrito en esta memoria descriptiva.

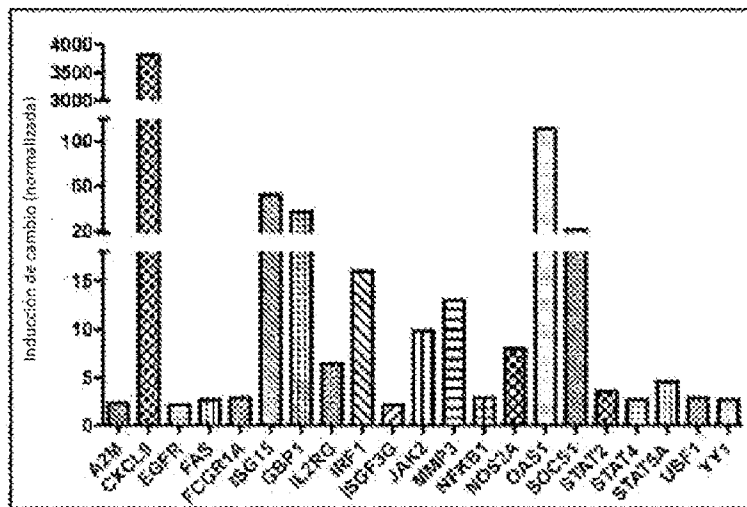
15

REIVINDICACIONES

1. Un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, comprendiendo el medio de inducción:
 - a. un ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3),
 - b. eritropoyetina, y
 - c. un mimético de hipoxia seleccionado de cloruro de cobalto y/o desferrioxamina,donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias marcadas por la expresión de mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.
2. El medio de inducción de la reivindicación 1, donde el ligando del receptor tipo Toll 3 (TLR3) es poli(I:C) o poli(A:U).
3. El medio de inducción de la reivindicación 1 o 2, donde la eritropoyetina está presente a una concentración de menos de 10 ng/ml.
4. El medio de inducción de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cloruro de cobalto está presente a una concentración de entre 5 µM y 500 µM.
5. El medio de inducción de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además interleucina 4 (IL-4) y/o interleucina 13 (IL-13).
6. El medio de inducción de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que no comprende suero de origen humano o animal.
7. El medio de inducción de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una solución concentrada.
8. Un procedimiento para elaborar una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la población de células madre mesenquimales no estimuladas con el medio de inducción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde, en la población de células madre mesenquimales tratada mediante el procedimiento, las células están marcadas por una mayor expresión de ARNm de *CXCL9* en comparación con la población de células madre mesenquimales no estimuladas.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno inflamatorio o autoinmunitario.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, donde el trastorno inflamatorio o autoinmunitario comprende artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, neuritis óptica aguda, enfermedad de Krabbe, retinopatía diabética o lesión pulmonar aguda.
11. El procedimiento de la reivindicación 8, donde las células madre mesenquimales son células madre mesenquimales humanas.
12. Una composición que comprende el medio de inducción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una población de células madre mesenquimales.
13. Un medio de inducción para crear una población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas a partir de una población de células madre mesenquimales no estimuladas, comprendiendo el medio de inducción:
 - (a) poli(I:C) a una concentración de entre 0,1 µg/ml y 100 µg/ml,
 - (b) eritropoyetina a una concentración inferior a 10 ng/ml, y
 - (c) cloruro de cobalto a una concentración de entre 5 µM y 500 µM;donde la población de células madre mesenquimales inmunológicamente polarizadas posee características antiinflamatorias y está marcada por una mayor expresión de ARNm de *CXCL9*, *OAS1* e *ISG15* en comparación con una población de células madre mesenquimales no estimuladas.

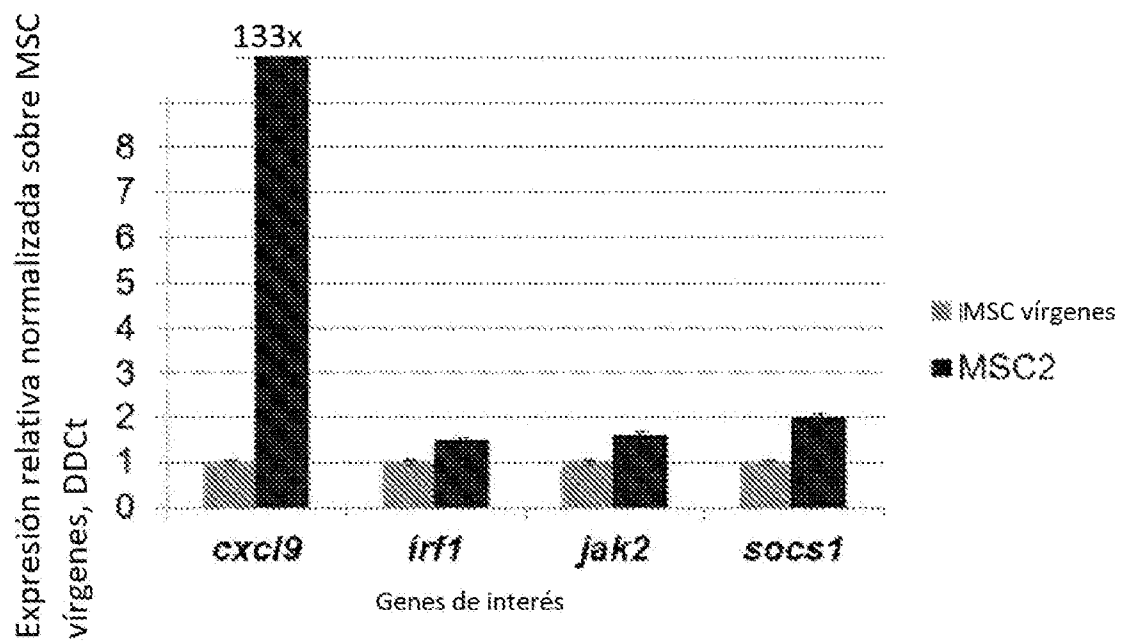
A2M A01	SH2B2 A02	BCL2L 1 A03	CCND1 A04	CDKN1 A A05	CEBPB A06	CRK A07	CRP A08	CSF1R A09	CSF2R B A10	CXCL9 A11	EGFR A12
EPOR B01	F2 B02	F2R B03	FAS B04	FCER1 A B05	FCGR1 A B06	ISG15 B07	GATA3 B08	GBP1 B09	GHR B10	HMGA1 B11	IFNAR1 B12
IFNG C01	IFNGR1 C02	IL10RA C03	IL20 C04	IL2RA C05	IL2RG C06	IL4 C07	IL4R C08	IL6ST C09	INSR C10	IRF1 C11	IRF9 C12
JAK1 D01	JAK2 D02	JAK3 D03	JUN D04	JUNB D05	MMP3 D06	MPL D07	MYC D08	NFKB1 D09	NOS2A D10	NR3C1 D11	OAS1 D12
OSM E01	PDGFR A E02	PIAS1 E03	PIAS2 E04	PPP2R 1A E05	PRLR E06	PTPN1 E07	PTPRC E08	SH2B1 E09	SIT1 E10	SLA2 E11	SMAD1 E12
SMAD2 F01	SMAD3 F02	SMAD4 F03	SMAD5 F04	SOCS1 F05	SOCS2 F06	SOCS3 F07	SOCS4 F08	SOCS5 F09	SP1 F10	SPI1 F11	SRC F12
STAM G01	STAT1 G02	STAT2 G03	STAT3 G04	STAT4 G05	STAT5 A G06	STAT5 B G07	STAT6 G08	STUB1 G09	TYK2 G10	USF1 G11	YY1 G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13 A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

FIG.1



A

Expresión génica 4 horas después de la inducción mediante ensayo de qPCR



B

FIG. 2

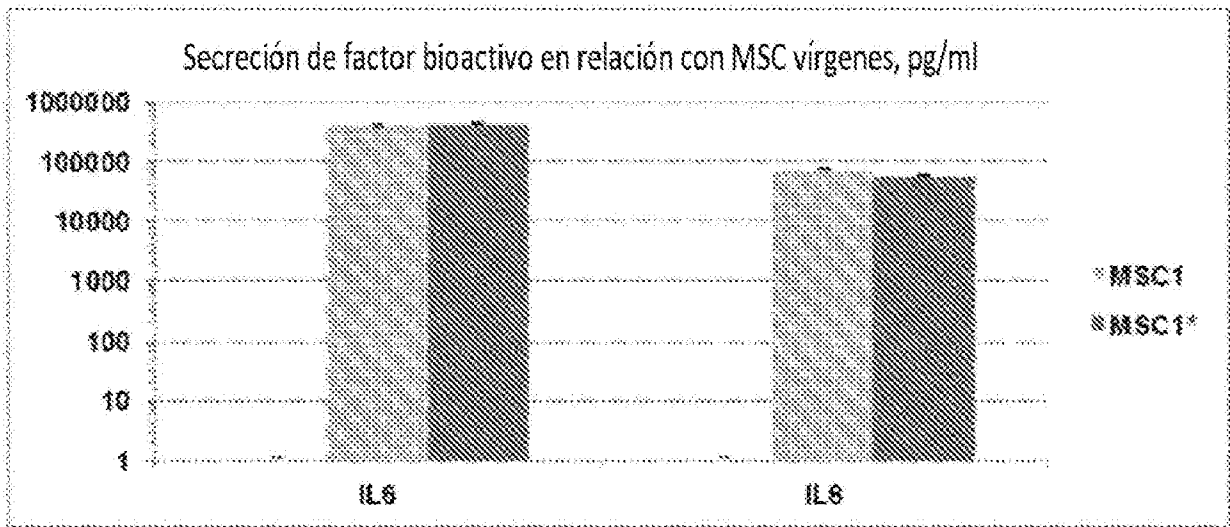


FIG. 3

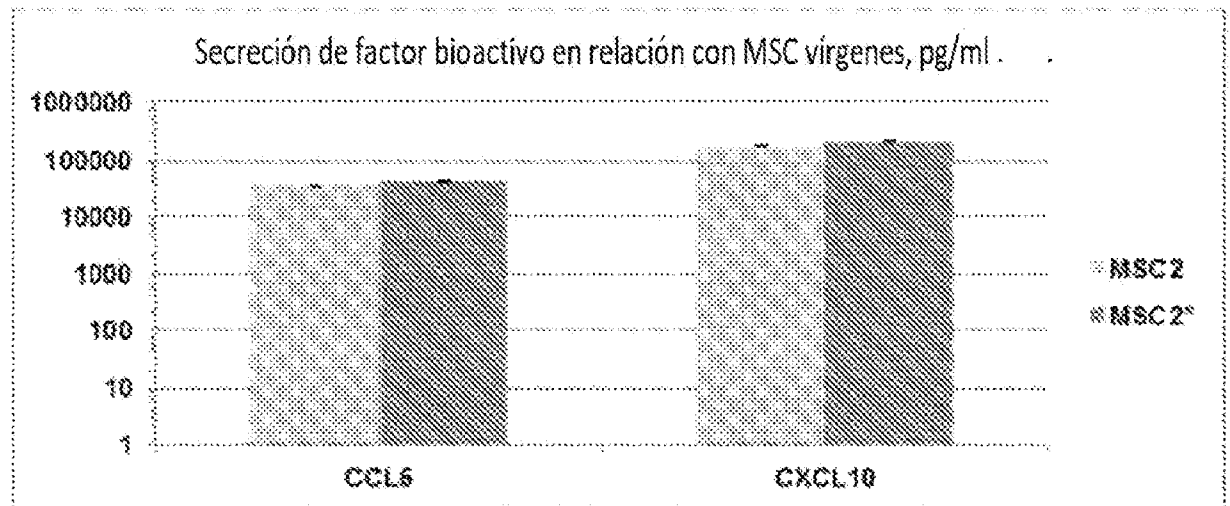


FIG. 4

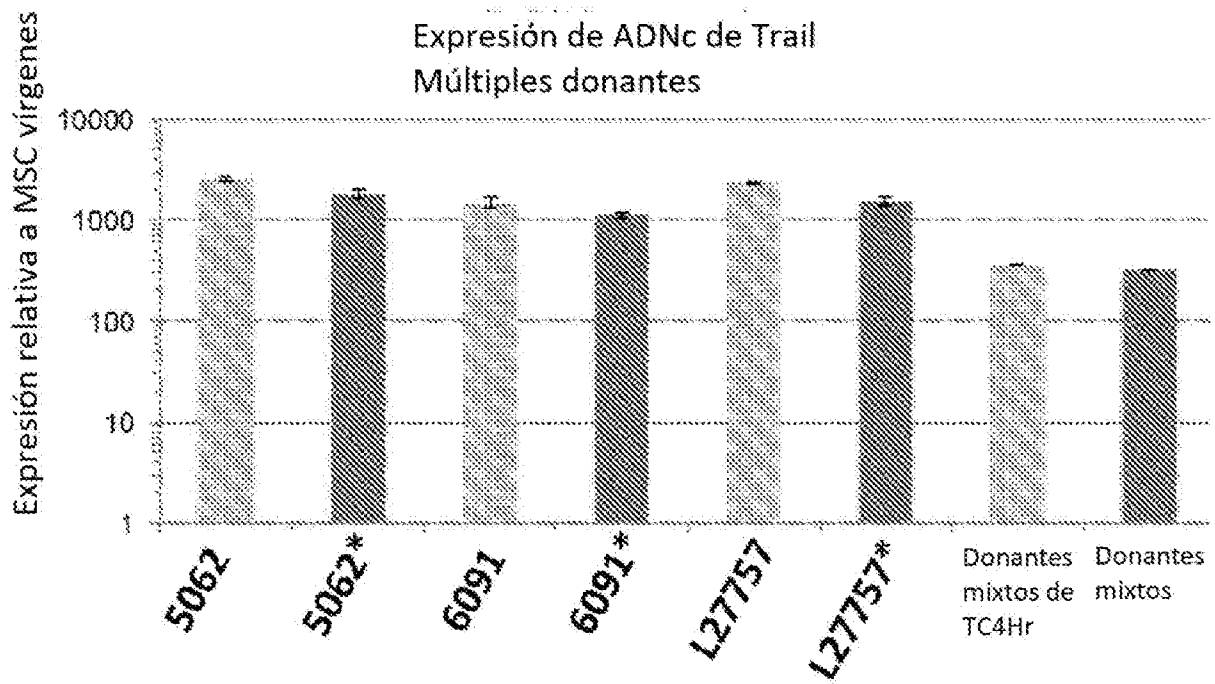


FIG. 5

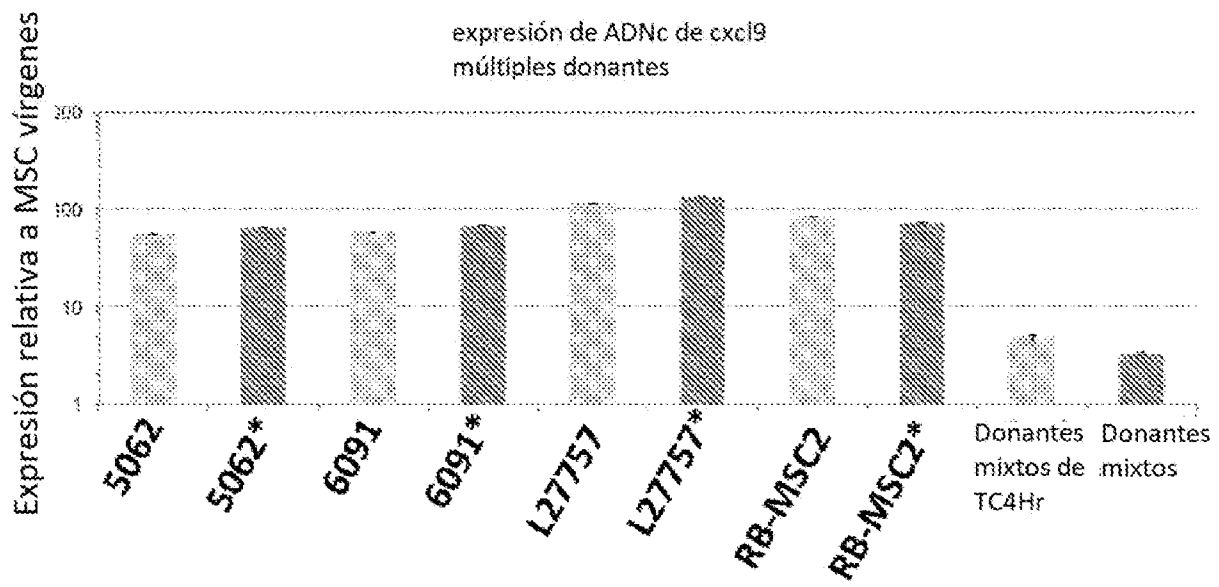


FIG. 6

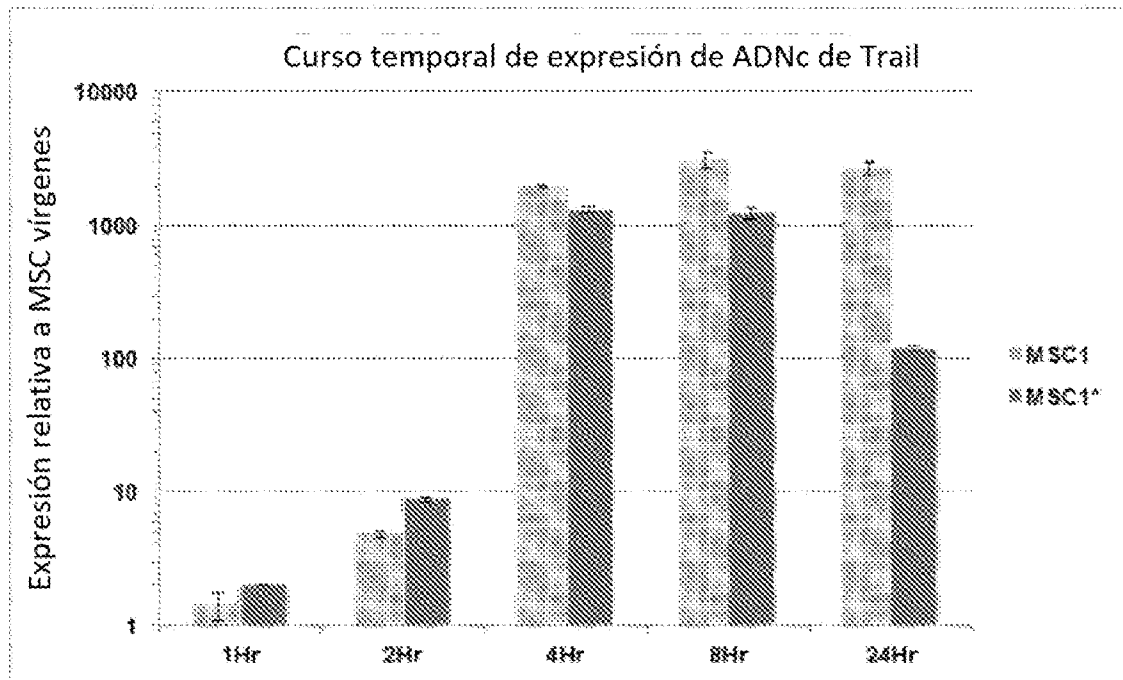


FIG. 7

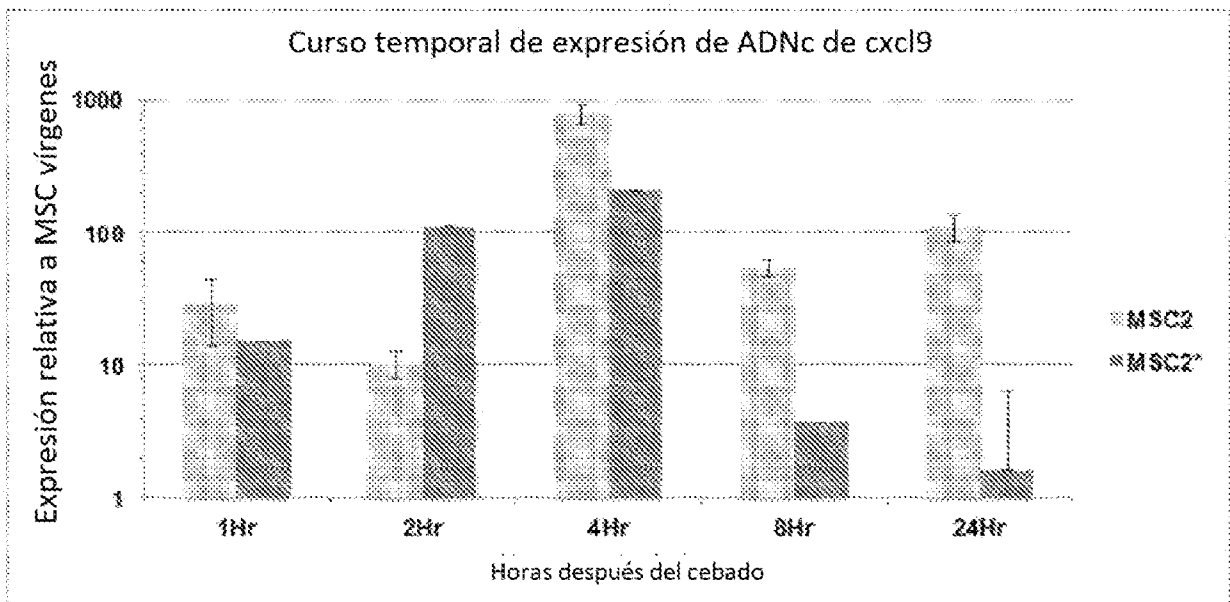


FIG. 8

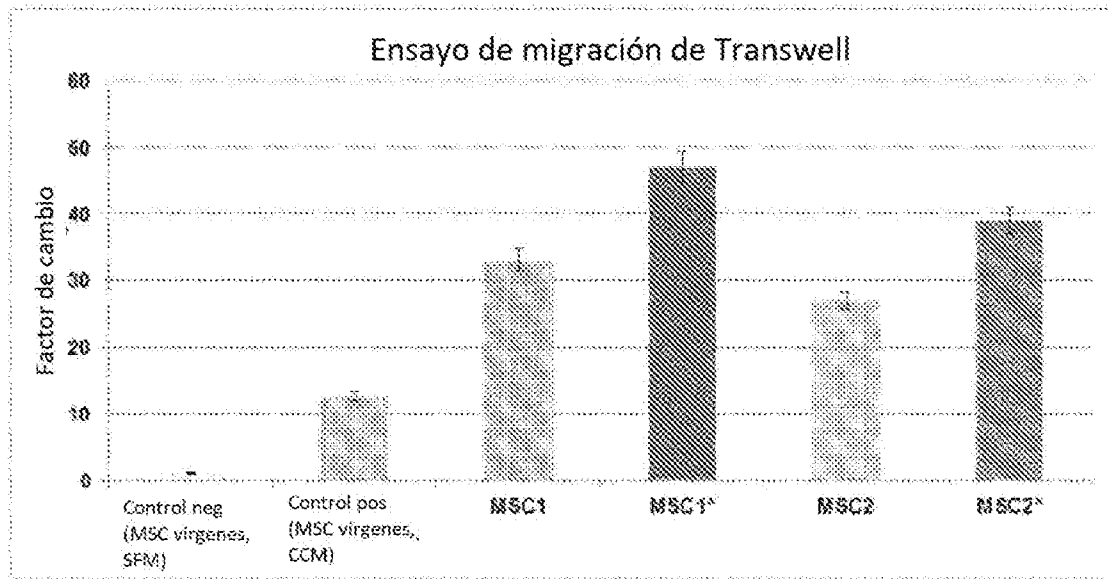


FIG. 9

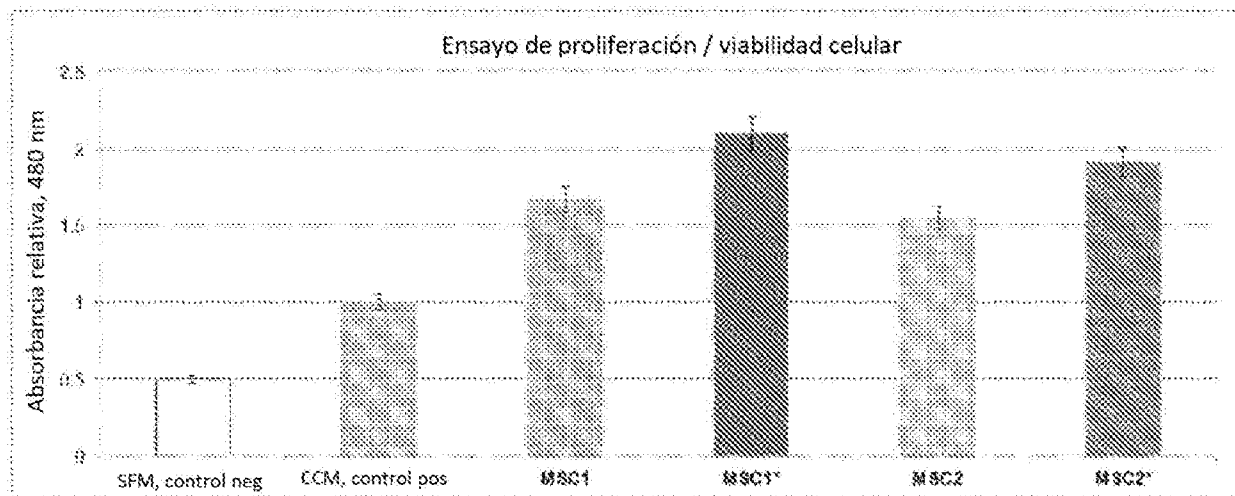


FIG. 10

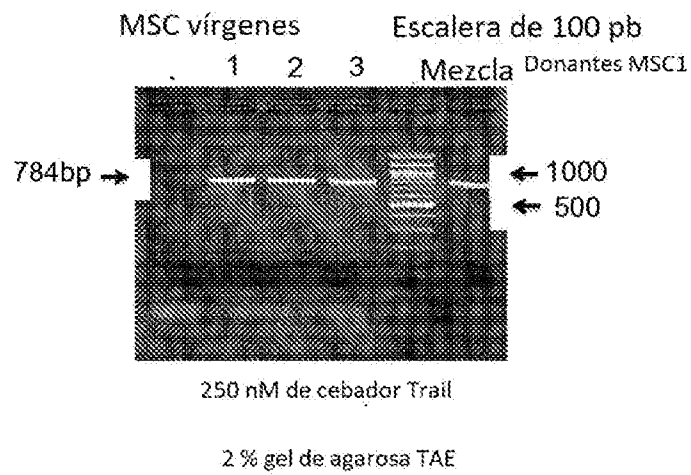


FIG. 11

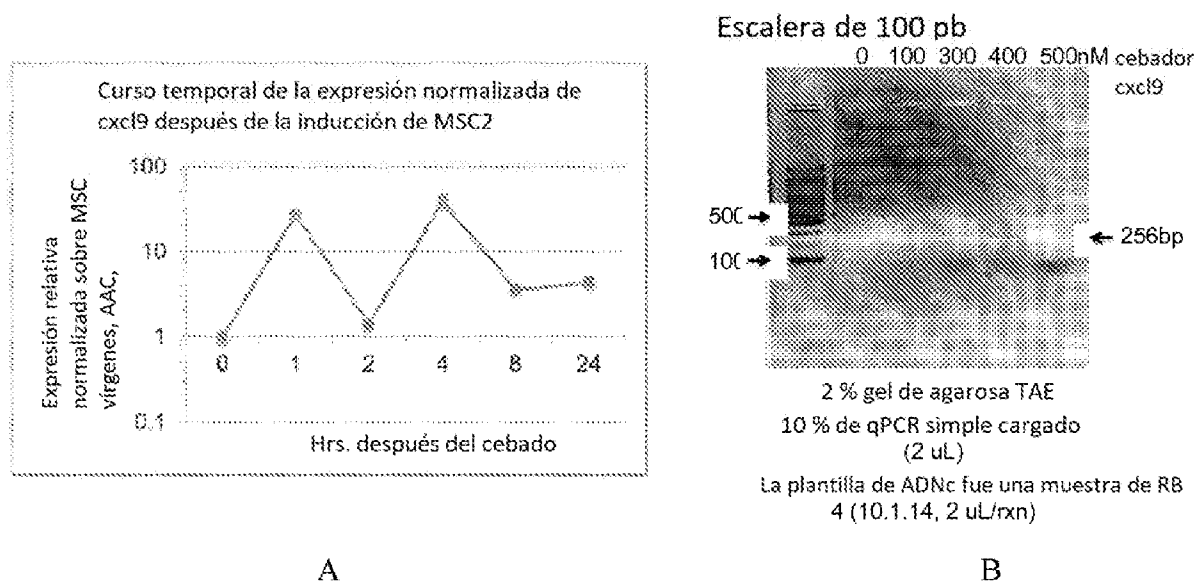


FIG. 12