(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 969 240**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0775 (2010.01)
A61K 35/28 (2015.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2017 PCT/AU2017/050228**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17156580**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2017 E 17765572 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023 EP 3430129**

(54) Título: **Medio para formar colonias y uso de este**

(30) Prioridad:

16.03.2016 AU 2016900983
05.10.2016 AU 2016904039
02.02.2017 AU 2017900318

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2024

(73) Titular/es:

CYNATA THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Level 3, 62 Lygon Street
Carlton VIC 3053, AU

(72) Inventor/es:

SLUKVIN, IGOR;
UENISHI, GENE;
HEI, DEREK y
DRIER, DIANA

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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 para formar colonias y uso de este

Campo de la invención

La invención se refiere a un método para diferenciar una célula madre pluripotente humana (PSC) en una célula madre mesenquimal (MSC), y a composiciones útiles para tal diferenciación.

Antecedentes de la invención

Las células madre pluripotentes (PSC), en particular las PSC humanas, que incluyen células madre embrionarias (ESC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC), proporcionan la oportunidad de estudiar el desarrollo humano in vitro y desarrollar nuevos productos terapéuticos basados en células. El uso de PSC como material de inicio para la fabricación de productos terapéuticos tiene varias ventajas, que incluyen el potencial para fabricar un número virtualmente ilimitado de células a partir de un solo banco de células, como resultado de la capacidad de las PSC para reproducirse indefinidamente in vitro, y diferenciarse en cualquier tipo celular.

La mayoría de los protocolos diferencian las PSC humanas cultivadas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) o MATRIGEL®, una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Se ha descrito un medio y una matriz libres de xenógenos, definidos químicamente, para la derivación y el mantenimiento de PSC humanas. Se ha descrito, además, un protocolo de diferenciación dirigido a que sea libre de xenógeno, definido químicamente, para derivar progenitores hematopoyéticos a partir de PSC humanas en la patente de los Estados Unidos 2014/0273211 A1.

En particular, la patente de los Estados Unidos 2014/0273211 A1 describe un método para diferenciar células madre pluripotentes humanas que comprende: (a) proporcionar células madre pluripotentes humanas; y (b) cultivar las células madre pluripotentes humanas bajo condiciones hipóxicas en un medio de cultivo que comprende FGF2, BMP4, Activina A, y LiCl por un período de aproximadamente dos días para formar una población celular de células de mesodermo primitivo $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFRalfa^{+}$ con potencial de mesenquimoangioblasto. La patente de los Estados Unidos 2014/0273211 A1 además describe un medio de cultivo libre de xenógeno para diferenciar las células madre pluripotentes humanas, que comprende medio IF9S suplementado con: aproximadamente 50 a aproximadamente 250 ng/mL de BMP4; aproximadamente 10 a aproximadamente 15 ng/mL de Activina A; aproximadamente 10 a aproximadamente 50 ng/mL de FGF2; y aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM de LiCl.

Sin embargo, la patente de los Estados Unidos 2014/0273211 A1 no hace referencia a ningún medio mejorado para formar la colonia mesenquimal (M-CFM).

Las células madre mesenquimales (las MSC) son significativamente prometedoras como terapia celular y actualmente se encuentran en ensayos clínicos para tratar numerosas enfermedades, incluida la enfermedad de injerto contra hospedador. Las MSC derivadas a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) tienen una ventaja única sobre las MSC obtenidas directamente del origen, es decir, derivadas de tejidos tales como médula ósea, sangre del cordón umbilical, tejido adiposo, porque la expansión in vitro de iPSC puede proporcionar un suministro virtualmente ilimitado de MSC.

Sin embargo, a pesar de su promesa, persisten desafíos en la producción de las MSC in vitro, por ejemplo, aumentar la producción de escala de laboratorio a escala de buenas prácticas de fabricación (GMP), que para cualquier producto biológico no es ni fácil ni necesariamente predecible, como se apreciará en la técnica.

De ello se desprende que existe la necesidad de métodos mejorados y escalables para diferenciar las PSC, lo que incluye iPSC, en MSC.

Resumen

Los inventores han identificado una composición específica para un medio de diferenciación que diferencia PSC a MSC, en donde tales MSC poseen propiedades inmunosupresoras superiores en relación a las MSC diferenciadas en ausencia del medio de diferenciación descrito en la presente descripción. Además, el método es aplicable a escala GMP, es decir, una escala suficiente para suministrar MSC para uso terapéutico.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para producir una MSC, método que comprende:

(a) cultivar una célula de mesodermo primitivo en un M-CFM que comprende LiCl y FGF2, pero que excluye PDGF, bajo condiciones normóxicas por tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimal; y

(b) cultivar la colonia mesenquimal de (a) adherentemente para producir la MSC,

en donde la MSC de (b) tiene propiedades inmunosupresoras de células T superiores en relación a una MSC que no se produjo en dicho M-CFM.

La célula de mesodermo primitivo es una célula de mesodermo primitivo con potencial mesenquimoangioblasto que tiene un fenotipo $^{EMH}lin^{-}KDR+APLNR+PDGFRalfa+$.

En una modalidad, el tiempo suficiente para que se produzca la colonia mesenquimal es aproximadamente 8 días a aproximadamente 14 días. En una modalidad, el tiempo suficiente para que se produzca la colonia mesenquimal es 12 días.

En una modalidad, las propiedades inmunosupresoras de células T de la MSC se determinan en relación a una MSC producida por un método que comprende:

(a') cultivar una célula de mesodermo primitivo en un medio que comprende FGF2 y opcionalmente PDGF, pero excluye LiCl, bajo condiciones normóxicas por tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimal; y

(b') cultivar la colonia mesenquimal de (a') adherentemente para producir la MSC.

En una modalidad, las propiedades inmunosupresoras de células T de la MSC se determinan en relación a una MSC producida a partir de una célula de mesodermo primitivo diferenciada a partir de una PSC en un medio de diferenciación que comprende FGF2, BMP4, Activina A, y LiCl bajo condiciones hipóxicas por aproximadamente dos días.

Esto proporciona una MSC producida por el método del primer aspecto y una población de MSC, que comprende la MSC del primer aspecto y una composición terapéutica que comprende la MSC, o la población de MSC, así como también un estuche que comprende un contenedor que contiene la MSC o la población de MSC, o la composición terapéutica.

La invención además proporciona un medio para formar la colonia mesenquimal (M-CFM), que comprende aproximadamente 1 mM de LiCl, y aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL de FGF2, o aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 50 ng/mL de FGF2, aproximadamente 10 ng/mL de FGF2, o aproximadamente 20 ng/mL de FGF2, pero excluye PDGF o una composición que comprende LiCl y FGF2, pero excluye PDGF, que, cuando se mezclan con un líquido que comprende agua, produce un M-CFM que comprende aproximadamente 1 mM de LiCl, y aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL de FGF2, o aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 50 ng/mL de FGF2, aproximadamente 10 ng/mL de FGF2, o aproximadamente 20 ng/mL de FGF2, pero excluye PDGF.

Además, se describe un método para diferenciar una célula madre pluripotente (PSC) en una célula madre mesenquimal (MSC), método que comprende:

(a) cultivar la PSC en un medio de diferenciación que comprende FGF2, BMP4, Activina A, y LiCl bajo condiciones hipóxicas por aproximadamente dos días para formar una célula de mesodermo primitivo;

(b) reemplazar el medio de diferenciación de (a) con un medio para formar la colonia mesenquimal (M-CFM) que comprende LiCl y FGF2, pero excluye PDGF;

(c) cultivar la célula de mesodermo primitivo de (b) en el M-CFM de (b) bajo condiciones normóxicas por tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimal; y

(d) cultivar la colonia mesenquimal de (c) adherentemente para producir la MSC,

en donde la MSC tiene propiedades inmunosupresoras de células T superiores en relación a una MSC que no se produjo en dicho medio.

En una modalidad, el método anterior además comprende:

(e) expandir la MSC de (d).

La célula de mesodermo primitivo es una célula de mesodermo primitivo con potencial de mesenquimoangioblasto (MCA). En una modalidad, la célula de mesodermo primitivo con potencial de MCA es una célula de mesodermo primitivo $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFRalfa^{+}$ con potencial de MCA.

En una modalidad, el tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimal es aproximadamente 8 días a aproximadamente 14 días. En una modalidad, el tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimal es aproximadamente 12 días.

En una modalidad, las propiedades inmunosupresoras de células T de la MSC se determinan en relación a una MSC producida a partir de una célula de mesodermo primitivo cultivada en un medio que comprende FGF2 y opcionalmente PDGF, pero excluye LiCl.

En una modalidad, las propiedades inmunosupresoras de células T de la MSC se determinan en relación a una MSC producida a partir de una célula de mesodermo primitivo diferenciada a partir de una PSC en un medio de diferenciación que comprende FGF2, BMP4, Activina A, y LiCl bajo condiciones hipóxicas por aproximadamente dos días.

Breve descripción de las figuras

Las modalidades de la presente invención se describen más abajo, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las figuras adjuntas en las que

La Figura 1 es una secuencia de amino ácidos (sec. con núm. de ident.: 1) que representa un polipéptido que como un homodímero es un ejemplo de Activina A humana.

La Figura 2 es una secuencia de aminoácido (sec. con núm. de ident.: 2) que representa un polipéptido que como un homodímero es un ejemplo de BMP4 humano. La sec. con núm. de ident.: 2 corresponde a los amino ácidos 303 a 408 de una secuencia de amino ácidos del precursor BMP4 de longitud completa.

La Figura 3 es una secuencia de aminoácido (sec. con núm. de ident.: 3) que representa un polipéptido que es un ejemplo de una cadena alfa1 de colágeno humano de tipo I. El colágeno humano de tipo I (colágeno I) es un trímero de triple hélice que en un ejemplo tiene dos cadenas alfa1 representadas por la sec. con núm. de ident.: 3 y un cadena alfa2. La sec. con núm. de ident.: 3 corresponda a los amino ácidos 162 a 1218 de un precursor de la cadena alfa1 del colágeno de tipo I de longitud completa.

La Figura 4 es una secuencia de aminoácido (sec. con núm. de ident.: 4) que representa un polipéptido que es un ejemplo de una cadena alfa1 del colágeno de tipo IV humano. El colágeno de tipo IV humano (colágeno IV) es un heterotrímero de triple hélice que en un ejemplo comprende una cadena alfa1 representada por la sec. con núm. de ident.: 4. La sec. con núm. de ident.: 4 corresponde a los amino ácidos 173 a 1669 de un precursor de la cadena alfa1 del colágeno tipo IV de longitud completa.

La Figura 5 es una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.: 5) que representa un polipéptido que es un ejemplo de FGF2 humano.

La Figura 6 es una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.: 6) que representa un polipéptido que como dímero es un ejemplo de fibronectina humana. La sec. con núm. de ident.: 6 corresponde a los amino ácidos 32 a 2446 de un precursor de fibronectina de longitud completa.

La Figura 7 es una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.: 7) que representa un polipéptido que como un homodímero es un ejemplo de PDGF humano (PDGF-BB). La sec. con núm. de ident.: 7 corresponde a los amino ácidos 82 a 190 de un precursor de la subunidad B del PDGF de longitud completa.

La Figura 8 es una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.: 8) que representa un polipéptido que como un hexámero es un ejemplo de tenascina C humana. La sec. con núm. de ident.: 8 corresponde a los amino ácidos 23 a 2201 de un precursor de tenascina C de longitud completa.

La Figura 9 es un gráfico que representa un análisis de los componentes principales de la expresión de miRNA de una MSC de la descripción y otras 71 muestras de MSC obtenidas por medios diferentes del presente método. AD, adiposo (■); BM, médula ósea (♦); iPSC_MSC, MSC de la descripción (▲); iPSC, iPSC antes de la diferenciación a una MSC de la descripción (+).

La Figura 10 es una representación esquemática del estudio del ejemplo 6.

La Figura 11 es una representación esquemática de la histología del estudio del ejemplo 6.

La Figura 12 comprende fotomicrografías fluorescentes del injerto (tinción del núcleo humano) de las MSC en los corazones del ejemplo 6. La tinción del núcleo humano se realizó a todos los niveles en VI med (criosecciones). No hubo evidencias de injerto celular en el día 28. La tinción de la mitocondria humana se realizó en el VI basal (secciones de parafina). No hubo evidencias de injerto celular en el día 28.

La Figura 13 muestra la evaluación funcional (TTE) y comprende ejes cortos de imágenes en modo M de los corazones de los receptores de vehículo, BM MSC, y PSC-MSC del ejemplo 6 en el momento inicial y a 1 mes. Las imágenes

muestran una dilatación ventricular reducida y una contractilidad ventricular aumentada en los receptores de PSC-MSC en comparación con los receptores de vehículo y BM MSC.

La Figura 14 muestra la evaluación funcional (TTE) y comprende gráficos de líneas que muestran evaluaciones individuales y gráficos de columna que muestran la evaluación del grupo del acortamiento fraccional (FS) de los corazones infartados del ejemplo 6. En el grupo vehículo, el FS al inicio fue más alto en 1 rata inyectada con el vehículo, pero en general, no hubo cambios o fueron mínimos en el FS en el día 28 en comparación al día 0, excepto por 1 rata (aumento medio 1,39 %). En el grupo BM MSC, 3/3 ratas tuvieron peor FS en el día 28 en comparación con el día 0 (disminución media 2,3 %). En el grupo PSC-MSC, 4/4 ratas tuvieron aumento en FS en el día 28 en comparación con el día 0 (aumento medio 5,48 %).

La Figura 15 comprende fotomicrografías que muestran el tamaño de la cicatriz por medio del uso de la tinción con picosirius rojo en los ratones infartados del ejemplo 6. Las imágenes muestran una reducción obvia en el tamaño de la cicatriz por medio del uso de la tinción con picosirius rojo en los grupos tratados con PSC-MSC en comparación al vehículo y a lo grupos tratados con BM-MSC.

La Figura 16 comprende fotomicrografías fluorescentes que evalúan la angiogénesis (tinción vWF) en los corazones del ejemplo 6. Las imágenes no mostraron diferencias en el tamaño y el número de vasos entre los grupos.

La Figura 17 es una representación esquemática de un estudio similar al ejemplo 6.

La Figura 18 es una gráfica de dispersión del porcentaje de cambio del peso en el día +19 de los ratones del ejemplo 7 en relación a GvHD.

La Figura 19 es un gráfico de líneas que muestra la severidad de la enfermedad GvHD en los ratones del ejemplo 7.

La Figura 20 es un gráfico de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia a GvHD de los ratones del ejemplo 7.

Descripción detallada

Los inventores han definido un protocolo de diferenciación mejorado, libre de xenógenos, definido químicamente, que incluye en particular un protocolo mejorado para formar colonias mesenquimales, libre de xenógenos, definido químicamente. Sorpresivamente, los protocolos mejorados proporcionan MSC con propiedades inmunosupresoras superiores cuando se comparan a los protocolos de diferenciación y para formar colonias mesenquimales existentes.

Al desarrollar el protocolo de diferenciación mejorado libre de xenógenos, definido químicamente, que incluye el protocolo para formar colonias mesenquimales, los inventores investigaron varias variables, que incluyen: presencia/ ausencia de PDGF; presencia/ ausencia de LiCl; baja/alta concentración de Activina A; y baja/ alta densidad de siembra.

PDGF se probó porque se afirmó en la patente de los Estados Unidos 7.615.374 que “PDGF-BB mejoraba el crecimiento de las células mesenquimales, pero no era esencial para la formación de colonias”. Sorprendentemente, sin embargo, los inventores describen en la presente descripción que contrario a esta enseñanza anterior, la ausencia de PDGF generó MSC con propiedades inmunosupresoras superiores en relación a MSC generadas por diferenciación en medio que comprende PDGF.

Con respecto a la Activina A, los inventores sorprendentemente encontraron que la inmunosupresión mejoró en las MSC diferenciadas en el medio que comprende la concentración de Activina A más baja en relación a la concentración de Activina A más alta.

LiCl activa la señalización mediada por Wnt y se incluye en el medio de diferenciación para mejorar la inducción a mesodermo durante las primeras 48 horas de diferenciación, lo que se entiende en la técnica.

Sin embargo, antes de la presente invención, no se había usado LiCl en un M-CFM para mejorar la formación de colonias en cultivos clonogénicos. Nuevamente, esto fue una ventaja sorpresiva del método descrito en la presente descripción.

En concordancia, en la presente descripción se describen métodos para diferenciar PSC (por ejemplo ESC humanas o iPSC humanas) bajo condiciones definidas. Tal diferenciación proporciona una MSC o poblaciones de MSC que pueden ser una fuente para estudios funcionales de estos linajes así como una fuente para terapias clínicas.

La habilidad de las MSC para ejercer efectos inmunomoduladores/ inmunosupresores, en particular suprimir a las células T, se cree que es central para los efectos terapéuticos de las MSC en un amplio intervalo de condiciones, lo que incluye GvHD, desórdenes inmunitarios que incluyen desórdenes autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades ortopédicas y rechazo de trasplante de órganos sólidos. Algunos ejemplos específicos incluyen, quistes óseos, neoplasmas óseas, fracturas, defectos de los cartílagos, osteoartritis, lesión de los ligamentos, osteogénesis

imperfecta, osteonecrosis, osteoporosis, anemia aplástica, síndrome mielodisplástico; diabetes de Tipo 1, diabetes de Tipo 2, hepatitis autoinmune, cirrosis del hígado, fallo del hígado, cardiomiopatía dilatada, fallo cardíaco, infarto del miocardio, isquemia del miocardio, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, quemaduras, epidermolisis bullosa, lupus eritematoso, artritis reumatoide, enfermedad de Sjogren, esclerosis sistémica, displasia broncopulmonar, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, enfisema, fibrosis pulmonar, ALS, enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral, ataxia, enfermedad degenerativa del disco, atrofia de múltiples sistemas, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, retinitis pigmentosa, enfermedad de Romberg, lesión de la médula espinal, infarto, distrofia muscular, isquemia de las extremidades, lesión del riñón, lupus nefritis, endometriosis y complicaciones de trasplante de médula ósea u órgano sólido,

Se piensa que las MSC realizan un papel crítico en la cura de lesiones y han mostrado ser efectivas en el tratamiento de las lesiones de tejidos y las enfermedades degenerativas, que incluyen las del sistema digestivo, por ejemplo en la cirrosis del hígado, en el fallo del hígado, en el sistema musculoesquelético, en el tejido periodontal, en la isquemia crítica de las extremidades en la diabetes, en la osteonecrosis, en enfermedades relacionadas con las quemaduras, en el infarto del miocardio, en el daño de la córnea, en el cerebro, en la médula ósea, en los pulmones, y en el tratamiento de la exposición a radiaciones.

Las MSC han mostrado resultados terapéuticos en desórdenes inmunitarios, que incluyen la enfermedad del injerto contra el hospedero, el lupus eritematoso sistémico (SLE), la enfermedad de Crohn, atrofia de múltiples sistemas, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, y el infarto.

Las MSC han mostrado ejercer actividades inmunosupresoras contra las células T, las células B, las células dendríticas, los macrófagos, y las células asesinas naturales. Mientras no deseamos atarnos a la teoría, el mecanismo subyacente puede comprender mediadores inmunosupresores, por ejemplo óxido nítrico, la indoleamina 2,3, dioxigenasa, la prostaglandina E2, la proteína del gen 6 inducible por el factor de necrosis tumoral, CCL-2, y el ligando 1 de muerte programada. Estos mediadores se expresan a un bajo nivel hasta que se estimulan, por ejemplo, por una citoquina inflamatoria, tal como IFNγ, TNFα, e IL-17.

Las MSC pueden injertarse en tejidos dañados después de la administración y la migración.

Las MSC pueden administrarse sistémicamente o periféricamente, por ejemplo, por rutas que incluyen la intravenosa (IV), intrauterina, intramuscular, intraperitoneal, intracerobroespinal, subcutánea (SC), intra-articular, intrasinovial, intratecal, intracoronaria, transendocardial, implante quirúrgico, tópica e inhalación (por ejemplo, intrapulmonarmente). Las MSC pueden administrarse en combinación con un soporte de un material biocompatible.

Las MSC pueden administrarse antes, durante o después de la progresión de la enfermedad. En una modalidad, las MSC se administran durante la inflamación. Las MSC pueden administrarse (a) como una medida preventiva, (b) tan pronto como se diagnostica una condición relevante, (c) cuando fallan otro tratamientos, y/o (d) cuando una condición avanza a un grado predefinido de severidad.

En una modalidad, las MSC obtenidas se pretratan antes de la administración. El pretratamiento puede ser con un factor de crecimiento o por edición genética, por ejemplo, cuando un factor de crecimiento puede preparar a la MSC y la edición genética puede conferir una nueva propiedad terapéutica a la MSC.

A menos que se defina de otra manera en esta especificación, los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado comúnmente entendido por la persona experta en la técnica a la que pertenece esta invención y por referencia a textos publicados.

Debe notarse que el término “un” o “una” se refiere a uno o más, por ejemplo, “una molécula,” se entiende que representa una o más moléculas. Como tal, los términos “un” o “una”, “uno o más”, y “al menos uno” pueden usarse indistintamente en la presente descripción.

En las reivindicaciones que siguen y en la descripción de la invención, excepto cuando el contexto lo requiera de otra manera debido al lenguaje expreso o implicaciones necesarias, la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” se usan en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características establecidas, pero no excluye la presencia o adición de características adicionales en varias modalidades de la invención.

El término “aproximadamente” como se usa en la presente descripción contempla un intervalo de valores para un número dado de ±25 % la magnitud de aquel número. En otras modalidades, el término “aproximadamente” contempla un intervalo de valores para un número dado de ±20 %, ±15 %, ±10 %, o ±5 % la magnitud de aquel número. Por ejemplo, en una modalidad, “aproximadamente 3 gramos” indica un valor de 2,7 a 3,3 gramos (es decir, 3 gramos ±10 %), y lo similar.

Similarmente, mientras los procesos de diferenciación incluyen eventos ordenados, secuenciales, el momento de los eventos puede variar por al menos 25 %. Por ejemplo, mientras una modalidad particular puede describir que una

etapa puede durar al menos un día, el evento puede durar más o menos de un día. Por ejemplo, "un día" puede incluir un período de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 horas. En otras modalidades, los períodos pueden variar por ±20 %, ±15 %, ±10 %, o ±5 % de aquel período de tiempo. Los períodos de tiempo indicados que son períodos de múltiples días pueden ser múltiplos de "un día," tal como, por ejemplo, dos días puede abarcar un período de aproximadamente 36 a aproximadamente 60 horas, y lo similar. En otra modalidad, la variación del tiempo puede disminuirse, por ejemplo, donde el día 2 es 48±3 horas a partir del día 0; día 4 es 96±3 horas a partir del día 0, y día 5 es 120 horas±3 horas a partir del día 0.

Como se usa en la presente descripción, "células madre pluripotentes" o "PSC" se refiere a una célula que tiene la habilidad de reproducirse por si misma indefinidamente, y diferenciarse a cualquier otro tipo de célula. Hay dos tipos principales de células madre pluripotentes: células madre embrionarias (ESCs) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

Como se usa en la presente descripción, "células madre pluripotentes inducidas" o "iPSC" se refiere a una célula similar a ESC derivada a partir de células adultas. Las iPSC tienen características muy similares a las ESC, pero evitan las preocupaciones éticas asociadas con las ESC, ya que las iPSC no se derivan de embriones. En su lugar, las iPSC típicamente se derivan a partir de una célula adulta completamente diferenciada que se ha "reprogramado" de regreso a un estado pluripotente.

Las iPSC humanas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, iPSC 19-9-7T, MIRJT6i-mND1-4 y MIRJT7i-mND2-0 derivadas a partir de fibroblastos e iPSC BM119-9 derivada a partir de células mononucleares de médula ósea. Otras iPSC adecuadas pueden obtenerse a partir del Cellular Dynamics International (CDI; Nasdaq: ICEL) de Madison, WI, Estados Unidos.

En algunas modalidades, las PSC se siembran a una densidad inicial de aproximadamente 5000 células/cm^2 a aproximadamente 15.000 células/cm^2, por ejemplo, 6000 células/cm^2, 7000 células/cm^2, 8000 células/cm^2, 9000 células/cm^2, 10.000 células/cm^2, 11.000 células/cm^2, 12.000 células/cm^2, 13.000 células/cm^2, o 14.000 células/cm^2.

En una modalidad, el tiempo suficiente para que se produzca la colonia mesenquimal es aproximadamente 8 días a aproximadamente 14 días. En una modalidad, el tiempo suficiente para que se produzca la colonia mesenquimal es aproximadamente 10 días a aproximadamente 14 días. En una modalidad, el tiempo suficiente para que se produzca la colonia mesenquimal es aproximadamente 11 días a aproximadamente 13 días. En una modalidad, el tiempo suficiente para que se produzca la colonia mesenquimal es aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 13 días, o aproximadamente 14 días. En una modalidad, el tiempo suficiente para que se produzca la colonia mesenquimal es aproximadamente 12 días.

Como se usa en la presente descripción, "célula de mesodermo primitivo "^{EMH}lin$^-$KDR$^+$APLNR$^+$PDGFRalfa$^+$ con potencial de mesenquimoangioblasto (MCA)" se refiere a una célula que expresa los genes típicos del mesodermo primitivo extraembrionario de la estría y la placa lateral. Estas células tienen el potencial para formar colonias de mesenquimoangioblastos (MCA) y hemangioblastos en medio libre de suero en respuesta a FGF2. Según el método de la presente invención, estas células se convierten en células madre mesenquimales (MSC).

El término ^{EMH}lin− denota la falta de expresión de los marcadores endoteliales CD31, VE-caderina, marcadores mesenquimales/endoteliales CD73 y Cd105, y los marcadores hematopoyéticos CD43 y CD45.

Como se usa en la presente descripción, "mesénquima" o "mesenquimal" se refiere al tejido conectivo embrionario que se deriva a partir del mesodermo y que se diferencia a tejido hematopoyético (linfático y sistema circulatorio) y tejido conectivo, tal como hueso y cartílago. Sin embargo, las MSC no se diferencian a células hematopoyéticas.

Como se usa en la presente descripción, "colonia mesenquimal" se refiere a progenitores mesenquimales CD73- que preceden a las verdaderas MSC. Se requiere cultivo adherente adicional de las colonias mesenquimales, por ejemplo, sobre placas recubiertas con fibronectina/colágeno, para producir las MSC CD73+.

Como se usa en la presente descripción, "célula madre mesenquimal" o "MSC" se refiere a un tipo particular de célula madre que puede aislarse a partir de una amplia gama de tejidos, lo que incluye médula ósea, tejido adiposo (grasa), placenta y sangre de cordón umbilical. Las MSC se conocen además como "células estromales mesenquimales". Según el método de la presente invención, las MSC se forman a partir de célula de mesodermo primitivo ^{EMH}lin$^-$KDR$^+$APLNR$^+$PDGFRalfa$^+$ con potencial de mesenquimoangioblasto (MCA).

Las MSC secretan moléculas bioactivas tales como citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento y tienen la habilidad de modular al sistema inmune. Se ha mostrado que las MSC facilitan la regeneración y ejercen su efecto sobre el sistema inmune sin depender del injerto. En otras palabras, las propias MSC no necesariamente se incorporan dentro del hospedero- sino más bien ejercen sus efectos y después se eliminan en un corto período de tiempo. Sin embargo, las MSC pueden injertarse.

Las MSC terapéuticas pueden ser "autólogas" o "alogénicas". Como se usa en la presente descripción, "autólogas" significa que un paciente se trata con sus propias células aisladas a partir de la médula ósea o tejido adiposo, por ejemplo, mientras que "alogénica" significa que las células de un donante se usan para tratar otra persona. Según la presente descripción, las MSC alogénicas se derivan a partir de un donante vía una iPSC.

No se ha mostrado que las MSC alogénicas causen reacciones inmunes en otras personas, por lo que no requieren compatibilidad inmune del donante con el receptor. Esto tiene importantes ventajas comerciales.

Como se usa en la presente descripción, "mesenquimoangioblasto" o "MCA" se refiere a una célula que es un precursor de MSC. Una MSC puede producirse por el método de la invención.

Como se usa en la presente descripción, "diferenciar" se refiere al proceso del cambio de una célula de un tipo celular a otro, en particular un tipo de célula menos especializada que se convierte en un tipo de célula más especializada.

Como se usa en la presente descripción, "medio" o su plural "medios" se refiere a un líquido o gel diseñado para sostener el crecimiento de células. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende un medio IF9S. En algunas modalidades, el medio emplea un suplemento de medio concentrado 9S, en donde la dilución del suplemento de medio concentrado 9S en un medio base IMDM/F12 rinde un medio de cultivo celular IF9S. El suplemento de medio concentrado 9S comprende 9 suplementos como sigue: Sal de L-ácido ascórbico 2-fosfato Mg^{2+}, 1-tioglicerol (monotioglicerol), selenito de sodio adicional, alcohol polivinílico, GLUTAMAX™ (o glutamina), amino ácidos no esenciales, concentrado de lípidos químicamente definido, holo-transferrina, e insulina. En algunas modalidades, el suplemento de medio concentrado 9S comprende cada componente a una concentración 10× a 1000× de la concentración de trabajo final una vez diluido en el medio base. En una modalidad, un medio IF9S comprende IMDM, F12 y 9S como sigue: IMDM 0,5x, F12 0,5x, bicarbonato de sodio 2,1 mg/mL, sal de L-ácido ascórbico 2-fosfato Mg^{2+} (64 µg/mL), 1-tioglicerol(50 µg/mL (460 µM, 40 µL/L)), selenito de sodio (adicional a cualquiera presente en el medio base; 8,4 ng/mL), alcohol polivinílico (10 mg/mL), GLUTAMAX™ (1×), amino ácidos no esenciales(1×), concentrado de lípidos químicamente definido (1×), Holo-Transferrina (10,6 µg/mL), e insulina (20µg/mL).

Aunque el medio descrito en este momento puede incluir componentes específicos (por ejemplo morfógenos, pequeñas moléculas, y citoquinas hematopoyéticas), se contempla que otros componentes con propiedades iguales, equivalentes, o similares puedan usarse adicionalmente a o en lugar de aquellos descritos, como se conoce en la técnica.

En algunas modalidades, los componentes de un medio IF9S pueden sustituirse. Por ejemplo, el ácido ascórbico y el 1-tioglicerol pueden sustituirse con un suplemento opcional de un compuesto y/o un compuesto que contenga tiol con propiedades antioxidantes. El GLUTAMAX™ puede reemplazarse con un suplemento opcional de L-glutamina. Los "amino ácidos no esenciales", que es un término general para los amino ácidos que el cuerpo humano puede producir a partir de otros amino ácidos, pueden reemplazarse con un suplemento opcional de amino ácidos. El "concentrado de lípidos químicamente definido", que es una solución específicamente distribuida por Life Technologies, puede reemplazarse con un suplemento opcional de lípidos. El selenito, la insulina, y la holo-transferrina adicionales pueden reemplazarse con cualquier suplemento insulina-transferrina-selenito. El alcohol polivinílico puede reemplazarse con un suplemento opcional de un compuesto espesante de medio biológicamente inactivo.

Como se usa en la presente descripción, "medio de diferenciación" se refiere a un medio diseñado para sostener la diferenciación de células, que es, sostener el proceso de una célula que cambia de un tipo celular a otro. Según el método de la presente invención, un medio de diferenciación se usa para sostener el proceso de cambio de una célula PSC humana en una célula de mesodermo primitivo $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFRalfa^{+}$ con potencial de mesenquimoangioblasto (MCA).

En algunas modalidades, la concentración, en el medio de diferenciación de: BMP4 es aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 250 mg/mL; Activina A es aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 15 ng/mL; FGF2 es aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 50 ng/mL; y LiCl es aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, la concentración de BMP4 en el medio de diferenciación es aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 45 ng/mL, aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 60 ng/mL, aproximadamente 70 ng/mL, aproximadamente 80 ng/mL, aproximadamente 90 ng/mL, aproximadamente 100 ng/mL, aproximadamente 110 ng/mL, aproximadamente 120 ng/mL, aproximadamente 130 ng/mL, aproximadamente 140 ng/mL, aproximadamente 150 ng/mL, aproximadamente 160 ng/mL, aproximadamente 170 ng/mL, aproximadamente 180 ng/mL, aproximadamente 190 ng/mL, aproximadamente 200 ng/mL, aproximadamente 210 ng/mL, aproximadamente 220 ng/mL, aproximadamente 230 ng/mL, aproximadamente 240 ng/mL, o aproximadamente 250 ng/mL.

La concentración de Activina A en el medio de diferenciación puede ser aproximadamente 1 ng/mL, aproximadamente 2 ng/mL, aproximadamente 3 ng/mL, aproximadamente 4 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente

6 ng/mL, aproximadamente 7 ng/mL, aproximadamente 8 ng/mL, aproximadamente 9 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 11 ng/mL, aproximadamente 12 ng/mL, aproximadamente 13 ng/mL, aproximadamente 14 ng/mL, o aproximadamente 15 ng/mL.

La concentración de FGF2 en el medio de diferenciación puede ser aproximadamente 1 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 45 ng/mL, o aproximadamente 50 ng/mL.

La concentración de LiCl en el medio de diferenciación puede ser aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 0,6 mM, aproximadamente 0,7 mM, aproximadamente 0,8 mM, aproximadamente 0,9 mM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 1,1 mM, aproximadamente 1,2 mM, aproximadamente 1,3 mM, aproximadamente 1,4 mM, aproximadamente 1,5 mM, aproximadamente 1,6 mM, aproximadamente 1,7 mM, aproximadamente 1,8 mM, aproximadamente 1,9 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 2,1 mM, aproximadamente 2,2 mM, aproximadamente 2,3 mM, aproximadamente 2,4 mM, o aproximadamente 2,5 mM. Preferentemente, como se entiende en la técnica, la concentración de LiCl en el medio de diferenciación puede ser aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, el medio de diferenciación comprende un medio base, sal de L-ácido-ascórbico 2-fosfato Mg^{2+}, 1-tioglicerol, selenito de sodio (adicional a cualquiera presente en el medio base), alcohol polivinílico, GLUTAMAX™, amino ácidos no esenciales, concentrado de lípidos químicamente definido, Holo-Transferrina, e insulina. Medios base adecuados descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, Medio de Dulbeco modificado de Iscove/F12 (IMDM/F12), medio base TeSR1(medio base mTeSR1™, Stem Cell Technologies) sin FGF2 y TGF-beta; medio base DF4S, que es medio Essential 8™ (Life Technologies; además conocido como medio "E8") sin FGF2 y TGF-beta, medio base I4S, que es base DF4S base con medio de Dulbeco modificado de Iscove (IMDM) en lugar de DMEM/F12, y base IF4S es DF4S con IMDM/F12 en lugar de DMEM/F12. Preferentemente, el medio base a usar es libre de albúmina. IMDM/F12 es un medio sintético altamente enriquecido para cultivos celulares de alta densidad, que proliferan rápidamente, con una mezcla de nutrientes añadida. Tales medios se conocen por la persona experta en la técnica.

En algunas modalidades, el medio al que se hace referencia en la presente descripción como "IF9S", comprende IMDM/F12, sal de L-ácido-ascórbico 2-fosfato Mg^{2+}, 1-tioglicerol (monotioglicerol), selenito de sodio (adicional a cualquiera presente en el medio), alcohol polivinílico, GLUTAMAX™, amino ácidos no esenciales, concentrado de lípidos químicamente definido, Holo-transferrina, e insulina.

Como se usa en la presente descripción, "medio para formar la colonia mesenquimal (M-CFM)" se refiere a un medio diseñado para sostener la formación de colonias mesenquimales a partir de célula de mesodermo primitivo $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFRalfa^{+}$ con potencial de mesenquimoangioblasto (MCA).

En algunas modalidades, la concentración, en elM-CFM, de: LiCl es aproximadamente 1 mM y FGF2 es aproximadamente 10 ng/mL; o LiCl es aproximadamente 1 mM y FGF2 es aproximadamente 20 ng/mL.

La concentración de FGF2 en el M-CFM puede ser aproximadamente 1 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 45 ng/mL, o aproximadamente 50 ng/mL.

La concentración de LiCl en el M-CFM puede ser aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 0,6 mM, aproximadamente 0,7 mM, aproximadamente 0,8 mM, aproximadamente 0,9 mM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 1,1 mM, aproximadamente 1,2 mM, aproximadamente 1,3 mM, aproximadamente 1,4 mM, aproximadamente 1,5 mM, aproximadamente 1,6 mM, aproximadamente 1,7 mM, aproximadamente 1,8 mM, aproximadamente 1,9 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 2,1 mM, aproximadamente 2,2 mM, aproximadamente 2,3 mM, aproximadamente 2,4 mM, o aproximadamente 2,5 mM. Preferentemente, la concentración de LiCl en el M-CFM es 1 mM. Como se señaló anteriormente, la inclusión de LiCl en un M-CFM para mejorar la formación de colonias en cultivo clonogénicos no se conocía antes de la presente invención y proporciona claras ventajas para el método descrito en la presente descripción sobre métodos conocidos en la técnica.

Como se hace referencia en la presente descripción, el término "medio definido" significa que la identidad y cantidad de cada componente de un medio se conocen.

En algunas modalidades, el medio descrito en la presente descripción comprende materiales xenogénicos. Como se usa en la presente descripción, "xenógeno" o "xenogénico" se refiere a materiales biológicamente derivados, no humanos. Sin embargo, los materiales xenogénicos pueden definirse. Por ejemplo, un material xenogénico puede ser una proteína recombinante de origen xenogénico. En una modalidad, el medio de diferenciación y/o el M-CFM comprende uno o más xenogénicos (por ejemplo, proteínas no humanas recombinantes).

En algunas modalidades, el medio es o los medios son libres de xenógenos. Es de central importancia para las terapias clínicas la ausencia de materiales xenogénicos en las poblaciones celulares derivadas, es decir, no células no humanas, fragmentos de células, suero, proteínas, y los similares. En una modalidad, se obtienen células diferenciadas libres de xenógenos por medio del uso de tenascina C o colágeno IV, que esencialmente reemplazan el contacto con las células OP9 usadas en sistema de diferenciación anteriores.

Ventajosamente, los medios definidos pueden ser libres de xenógenos, e incorporar proteínas humanas aisladas de fuentes naturales, tales como a partir de la placenta u otros tejidos humanos, o que pueden producirse por medio del uso de tecnología recombinante. En algunas modalidades, todas las proteínas descritas en la presente descripción son humanas. En algunas modalidades, todas las proteínas usadas en el medio de diferenciación son proteínas humanas. En algunas modalidades todas las proteínas usadas en el medio M-CFM son proteínas humanas. En algunas modalidades, todas las proteínas descritas en la presente descripción son proteínas recombinantes humanas. En algunas modalidades, todas las proteínas usadas en el medio de diferenciación son proteínas recombinantes humanas. En algunas modalidades todas las proteínas usadas en el medio M-CFM son proteínas recombinantes humanas.

Todas las proteínas descritas en la presente descripción se conocen por los expertos en la técnica, y la mayoría sino todas las proteínas descritas en la presente descripción están disponibles comercialmente.

Los medios descritos en la presente descripción pueden además fabricarse en formas concentradas, lo que incluye secos, que se diluyen antes del uso, tal como concentraciones 2×, 10×, 100×, o 1000×.

Como se usa en la presente descripción, "cultivar" se refiere al proceso por el cual las células crecen bajo condiciones controladas.

Las células no pueden mantenerse en cultivo indefinidamente debido a la creciente concentración de metabolitos tóxicos, decreciente concentración de nutrientes, y para las células en división, un número creciente de células. Como se usa en la presente descripción, "pasar" se refiere al proceso de producir un nuevo cultivo con concentraciones de nutrientes frescas, metabolitos no tóxicos, y opcionalmente una densidad más baja de células que en el cultivo de origen.

En una modalidad, pasar comprende: cultivar la colonia mesenquimal por aproximadamente 3 días; cultivar la colonia mesenquimal sobre fibronectina y/o colágeno I; y/o 1, 2, 3, 4, 5, o 6 pases. El número de pases puede ser 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25. Preferentemente el número de pases es 10 o menos. Con mayor preferencia, el número de pases es 5 o 6.

Como se usa en la presente descripción, "hipóxica" se refiere a condiciones en que la concentración de oxígeno de la mezcla de gases es aproximadamente 3 % O_2 a aproximadamente 10 % O_2. En algunas modalidades, las condiciones hipóxicas son aproximadamente 5 % O_2, pero pueden ser aproximadamente 4 % O_2, aproximadamente 6 % O_2, aproximadamente 7 % O_2, aproximadamente 8 % O_2, o aproximadamente 9 % O_2. En modalidades donde un medio de cultivo celular se deja equilibrar en condiciones hipóxicas, el medio de cultivo celular se vuelve hipóxico debido a la más baja concentración de oxígeno disuelto en el medio en comparación a un medio de cultivo celular equilibrado en condiciones normóxicas.

Como se usa en la presente descripción, "normóxica" se refiere a condiciones en las que la concentración de oxígeno de la mezcla de gases es aproximadamente 20 % O_2, pero puede ser aproximadamente 18 % O_2, aproximadamente 19 % O_2, aproximadamente 21 % O_2, o aproximadamente 22 % O_2.

Como se usa en la presente descripción "AA" se refiere a Activina A. En una modalidad, la Activina A existe como un homodímero de un polipéptido representado por la secuencia de amino ácidos proporcionada en la Figura 1 como sec. con núm. de ident.: 1.

Como se usa en la presente descripción, "BMP4" se refiere la proteína morfogénica de hueso 4. En una modalidad, BMP4 existe como un homodímero del polipéptido representado por la secuencia de amino ácidos proporcionada en la Figura 2 como sec. con núm. de ident.: 2.

En una modalidad, "colágeno de tipo I" o "colágeno I" existe como un trímero de triple hélice que comprende dos de los polipéptidos representados por la secuencia de amino ácidos proporcionada en la Figura 3 como sec. con núm. de ident.: 3, y una tercera cadena de colágeno I.

En una modalidad, "colágeno de tipo IV" o "colágeno IV" existe como un heterotrímero de triple hélice que comprende uno de los polipéptidos representados como la secuencia de amino ácidos proporcionada en la Figura 4 como sec. con núm. de ident.: 4, y dos cadenas adicionales de colágeno IV.

Como se usa en la presente descripción, "FGF2" se refiere al factor de crecimiento de fibroblastos 2, además conocido como factor de crecimiento de fibroblastos básico. En una modalidad, FGF2 existe como un polipéptido representado como la secuencia de amino ácidos proporcionada en la Figura 5 como sec. con núm. de ident.: 5.

En una modalidad, la fibronectina existe como un dímero del polipéptido representado por la secuencia de amino ácidos proporcionada en la Figura 6 como sec. con núm. de ident.: 6.

Como se usa en la presente descripción, "PDGF" se refiere al factor de crecimiento derivado de plaquetas. En una modalidad, el PDGF existe como un homodímero del polipéptido de la subunidad B representado por la secuencia de amino ácidos proporcionada en la Figura 7 como sec. con núm. de ident.: 7 (PDGF-BB). Se describe en la presente descripción que suplementar el M-CFM con PDGF (10 ng/mL) durante el cultivo tiene un impacto negativo significativo sobre la supresión inmune de las MSC derivadas de iPSC (reducción de 4 veces).

En una modalidad, la "tenascina C" existe como un hexámero del polipéptido representado por la secuencia de amino ácidos proporcionada en la Figura 8 como sec. con núm. de ident.: 8.

En algunas modalidades, las PSC humanas adherentes se cultivan sobre tenascina C o se proporcionan sobre un sustrato tratado con tenascina C. En algunas modalidades, cualquiera de las células referidas anteriormente (por ejemplo, PSC humanas, iPSC humanas) se cultivan sobre tenascina C. En algunas modalidades, cualquiera de las células descritas se siembra sobre un sustrato tratado con una cantidad de tenascina C suficiente para adherir 10.000 células/cm^2 al sustrato. En algunas modalidades, la tenascina C es tenascina C humana (por ejemplo que comprende una secuencia de amino ácidos representada por sec. con núm. de ident.: 8. o proporcionada por el número de acceso del GenBank CAA55309.1, o comercialmente disponible, por ejemplo, Millipore Núm. de Cat. CC065). En algunas modalidades, el sustrato se trata con tenascina C a una concentración de al menos aproximadamente 0,25 µg/cm^2 a aproximadamente 1 µg/cm^2, por ejemplo, 0,3 µg/cm^2, 0,4 µg/cm^2, 0,5 µg/cm^2, 0,6 µg/cm^2, 0,7 µg/em^2, 0,8 µg/cm^2, o 0,9 µg/cm^2. Las células pueden crecer sobre, por ejemplo, placas de cultivo celular recubiertas con tenascina C, placas de cultivo celular multi pozo, o perlas microtransportadoras.

El uso de tenascina C y condiciones hipóxicas puede permitir la generación de células de mesodermo primitivo $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFRalfa^{+}$ con potencial de mesenquimoangioblasto (MCA) y células madre mesenquimales a porcentajes más altos en comparación a las células cultivadas sobre colágeno IV o células OP9, tal como mayor que 10 %, o mayor que aproximadamente 20 %, o mayor que aproximadamente 30 %, o mayor que aproximadamente 35 %, o mayor que aproximadamente 40 %, o mayor que aproximadamente 50 %, o mayor que aproximadamente 60 %, o mayor que aproximadamente 70 %, o mayor que aproximadamente 80 %, cuando se compara por estado por plataforma.

Como se usa en la presente descripción, "propiedades inmunosupresoras de células T superiores" se refiere a la capacidad de una MSC para producir una magnitud mayor de supresión de la proliferación de linfocitos T auxiliadores (CD4+), en relación a una referencia, por ejemplo según se determina por medio del uso de un ensayo de Inmunopotencia.

Propiedades inmunosupresoras de células T superiores pueden ser aproximadamente un 1 % de aumento, aproximadamente un 2 % de aumento, aproximadamente un 3 % de aumento, aproximadamente a 4 % de aumento, aproximadamente a 5 % de aumento, aproximadamente a 6 % de aumento, aproximadamente a 7 % de aumento, aproximadamente a 8 % de aumento, aproximadamente a 9 % de aumento, aproximadamente a 10 % de aumento, aproximadamente a 20 % de aumento, aproximadamente a 30 % de aumento, aproximadamente a 40 % de aumento, aproximadamente a 50 % de aumento, aproximadamente a 60 % de aumento, aproximadamente a 70 % de aumento, aproximadamente a 80 % de aumento, aproximadamente a 90 % de aumento, aproximadamente a 100 %, o un aumento mayor en las propiedades inmunosupresoras de células T en una MSC o una población de MSC producidas de acuerdo al método descrito en la presente descripción. Alternativamente, las propiedades inmunosupresoras de células T superiores pueden ser aproximadamente un aumento de 2-veces, aproximadamente 3-veces, aproximadamente 4-veces, aproximadamente 5-veces, aproximadamente 6-veces, aproximadamente 7-veces, aproximadamente 8-veces, aproximadamente 9-veces, aproximadamente 10-veces, o más en las propiedades inmunosupresoras de las células T en una MSC o una población de MSC producidas de acuerdo al método descrito en la presente descripción.

Un ensayo de Inmunopotencia adecuado usa una MSC irradiada de prueba (por ejemplo iPSC-MSC producida de acuerdo al método descrito en la presente descripción) y una MSC muestra de referencia irradiada, que se siembran separadamente a varias concentraciones con leucocitos marcados con ester de succinimidil carboxifluoresceina purificados a partir de sangre periférica de donante sano. Los linfocitos T auxiliadores (CD4+) que representan un subconjunto de la muestra de referencia se estimulan por la adición de anticuerpos CD3 y CD28. Las células T CD4 marcadas se enumeran por medio del uso de citometría de flujo para evaluar la proliferación de células T. Los valores IC50 se reportan como una función de la muestra de referencia. Un valor de IC50 más alto indica una magnitud mayor de supresión de la proliferación de los linfocitos T auxiliadores (CD4+) y así es indicativo de propiedades inmunosupresoras de células T superiores. Las muestras de MSC se irradian antes de usarse en este ensayo para eliminar los factores que confunden su potencial proliferativo.

Se apreciará por el experto en la técnica que la manera exacta de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una MSC o una población de MSC diferenciadas de acuerdo al presente método para tratar una condición, enfermedad o trastorno será a la discreción del médico practicante. El modo de administración, que incluye dosificación, combinación con otros agentes, momento y frecuencia de administración, y lo similar, puede afectarse por el diagnóstico de la respuesta probable de un sujeto al tratamiento con la MSC o población de MSC, así como también por la condición e historia del sujeto.

Aunque se contempla particularmente que el método y su MSC o población de MSC resultante descritos en la presente descripción son adecuados para el tratamiento médico en humanos, ellos además son aplicables al tratamiento veterinario, que incluye el tratamiento de animales domésticos tales como caballos, ganado y ovejas, animales de compañía tales como perros y gatos, o animales del zoológico tales como felinos, cánidos, bóvidos y ungulados.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Reactivos

Tabla 1. Reactivos

Descripción	Vendedor / Cat # o Ref #
Medio base DMEM/F12	Invitrogen / A1516901
Suplemento E8	Invitrogen / A1517101
vitronectina	Life Technologies / A14700
colágeno IV	Sigma / C5533
Inhibidor ROCKH-1152	EMD Millipore / 555550
Inhibidor ROCK dihidrocloruro Y27632	Tocris / 1254
FGF2	Waisman Biomanufacturing / WC-FGF2-FP
SFM endotelial humano	Life Technologies / 11111-044
medio de expansión de células madres hematopoyéticas línea madre II	Sigma / S0192
GLUTAMAX	Invitrogen / 35050-061
insulina	Sigma / I9278
cloruro de litio (LiCl)	Sigma / L4408
solución de colágeno I	Sigma / C2249
fibronectina	Life Technologies / 33016-015
DMEM/F12	Invitrogen / 11330032
BMP4 recombinante humano	Peprotech / 120-05ET
activina A	Peprotech / 120-14E
Medio de Dulbeco modificado de Iscove (IMDM)	Invitrogen / 12200036
Mezcla de nutrientes F12 de Ham	Invitrogen / 21700075
bicarbonato sódico	Sigma / S5761
Fosfato de ácido L-ascórbico 2 Mg^{2+}	Sigma / A8960
1-tioglicerol	Sigma / M6145
selenito de sodio	Sigma / S5261
amino ácidos no esenciales	HyClone / SH30853.01
concentrado de lípidos químicamente definido	Invitrogen / 11905031
agua con grado para transferencia de embriones	Sigma / W1503
alcohol polivinílico (PVA)	MP Bio / 151-941-83
holo-transferrina	Sigma / T0665
ES-CULT M3120	Stem Cell Technologies / 03120
STEMSPAN medio de expansión libre de suero (SFEM)	Stem Cell Technologies / 09650
Ácido L-ascórbico	Sigma / A4544
PDGF-BB	Peprotech / 110-14B

Los reactivos enumerados en la Tabla 1 se conocen por lo expertos en la técnica y tienen composiciones aceptadas, por ejemplo, IMDM y F12 de Ham. El GLUTAMAX comprende el dipéptido L-alanil-L-glutamina, usualmente suministrado a 200 mM en 0,85 % NaCl. El GLUTAMAX libera la L-glutamina a partir de la escisión del enlace dipéptidico por las células cultivadas. El concentrado de lípidos químicamente definido comprende ácido araquidónico 2 mg/L, colesterol 220 mg/L, acetato de DL-alfa-tocoferol 70 mg/L, ácido linoleico 10 mg/L, ácido linolénico 10 mg/L,

ácido mirístico 10 mg/L, ácido oleico 10 mg/L, ácido palmítico 10 mg/L, ácido palmitoleico 10 mg/L, plurónico F-68 90 g/L, ácido esteárico 10 mg/L, TWEEN 80® 2,2 g/L, y alcohol etílico. H-1152 y Y27632 son inhibidores ROCK selectivos, altamente potentes, permeables a la célula (quinasa de proteína serina/treonina formadora de enrollado helicoidal asociada a Rho).

Tabla 2. Medio IF6S (concentración 10X)

10X IF6S	Cantidad	Concentración Final
IMDM	1 paquete, polvo para 1 L	5X
mezcla de nutrientes F12 de Ham	1 paquete, polvo para 1 L	5X
bicarbonato sódico	4,2 g	21 mg/mL
L-ácido ascórbico 2-fosfato Mg^{2+}	128 mg	640 µg/mL
1-tioglicerol	80 µL	4,6 mM
selenito de sodio (solución 0,7 mg/mL)	24 µL	84 ng/mL
GLUTAMAX	20 mL	10X
amino ácidos no esenciales	20 mL	10X
concentrado de lípidos químicamente definido	4 mL	10X
agua con grado para transferencia de embriones	Para 200 mL	NA

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

IF9S	Cantidad	Concentración Final
IF6S	5 mL	1X
alcohol polivinílico (PVA; solución 20 mg/mL)	25 mL	10 mg/mL
holo-transferrina (solución 10,6 mg/mL)	50 µL	10,6 µg/mL
insulina	100 µL	20 µg/mL
agua con grado para transferencia de embriones	Para 50 mL	NA

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

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

Tabla 5. Medio para formar una colonia mesenquimal (concentración 1X)

M-CFM	Cantidad	Concentración Final
ES-CULT M3120	40 mL	40 %
STEMSPAN SFEM	30 mL	30 %
SFM endotelial humana	30 mL	30 %
GLUTAMAX	1 mL	1X
Ácido L-ascórbico (solución 250 mM)	100 µL	250 µM
LiCl (solución 2M)	50 µL	1 mM
1-tioglicerol (solución 100 mM)	100 µL	100 µM
FGF2	600 ng	20 ng/mL

Tabla 6. Medio de expansión mesenquimal libre de suero (concentración 1X)

M-SFEM	Cantidad	Concentración Final
SFM endotelial humana	5 L	50 %
STEMLINE II HSFM	5 L	50 %
GLUTAMAX	100 mL	1X
1-tioglicerol	87 µL	100 µM
FGF2	100 µg	10 ng/mL

Ejemplo 2 – Protocolo para diferenciar una PSC humana en una MSC

1. Descongelar las iPSC en medio completo E8 (medio base DMEM/F12 + suplemento E8) + 1 µM H1152 sobre frascos plástico recubiertos con vitronectina (0,5 µg/cm^2). Incubar las iPSC sembradas a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica).

2. Expandir las iPSC tres pases en medio completo E8 (sin inhibido ROCK) sobre frascos plásticos recubiertos con vitronectina (0.5 µg/cm^2 e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) antes de iniciar el proceso de diferenciación.

3. Cosechar y sembrar las iPSC como células individuales/colonias pequeñas a 5x103 células/cm^2 en frascos plásticos recubiertos con colágeno IV (0.5 µg/cm^2) en medio completo E8 + 10 µM Y27632 e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) por 24 h.

4. Reemplazar el medio completo E8 + 10 µM Y27632 con medio de diferenciación e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 5 % O_2 (hipóxica) por 48 h.

5. Cosechar la células formadora de colonias a partir del cultivo adherente en medio de diferenciación como una suspensión de células individuales, transferir para el cultivo en suspensión M-CFM e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) por 12 días.

6. Cosechar y sembrar las colonias (Pase 0) en frascos plásticos recubiertos con Fibronectina/Colágeno I (0,67 µg/cm^2 Fibronectina, 1,2 µg /cm^2 Colágeno I) en M-SFEM e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) por 3 días.

7. Cosechar las colonias y sembrarlas como células individuales (Pase 1) a 1,3x10^4 células/cm^2 en frascos plásticos recubiertos con Fibronectina/Colágeno 1 en M-SFEM e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) por 3 días.

8. Cosechar y sembrar como células individuales (Pase 2) a 1,3x10^4 células/cm^2 en frascos plásticos recubiertos con Fibronectina/Colágeno 1 en M-SFEM e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) por 3 días.

9. Cosechar y sembrar como células individuales (Pase 3) a 1,3x10^4 células/cm^2 en frascos plásticos recubiertos con Fibronectina/Colágeno 1 en M-SFEM e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) por 3 días.

10. Cosechar y sembrar como células individuales (Pase 4) a 1,3x10^4 células/cm^2 en frascos plásticos recubiertos con Fibronectina/Colágeno 1 en M-SFEM e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) por 3 días.

11. Cosechar y sembrar como células individuales (Pase 5) a 1,3x10^4 células/cm^2 en frascos plásticos recubiertos con Fibronectina/Colágeno 1 en M-SFEM e incubar a 37 °C, 5 % CO_2, 20 % O_2 (normóxica) por 3 días.

12. Cosechar como células individuales y congelar el producto final.

Se ejecutaron dos experimentos (TAC-A-96 y DAD-V-90) para investigar el impacto de suplementar M-CFM con PDGF-BB (10 ng/mL) y/o LiCl (1 mM) sobre la supresión de las células T de iPSC-MSC. La supresión de las células T se evaluó generada por medio del uso del ensayo de InmunoPotencia de Waisman Biomanufacturin (IPA).

Como se señala en la Tabla 7, se evaluaron las siguientes combinaciones de PDGF y LiCl: PDGF+/LiCl+, PDGF-/LiCl-, PDGF+/LiCl- y PDGF-/LiCl+. Nótese que se compararon dos densidades de siembra Dneg1 diferentes (5x10^3 células/cm^2 y 1x10^4 células/cm^2) y dos concentraciones diferentes de Activina A (AA) en el Medio de Diferenciación (1X AA = 15 ng/mL y 0,1X AA = 1,5 ng/mL) en el experimento TC-A-96. Se usó una única densidad de siembra Dneg1 (5x10e^3 células/cm^2) y concentración de Activina A (1,5 ng/mL) en el experimento DAD-V-90. Además nótese que se usó un único leukopak (LPK7) en el primer IPA (IPA 1) y se usaron dos leukopak (LPK7 y LPK8) en el segundo IPA (IPA 2).

Este ensayo está diseñado para evaluar el grado en que cada línea de MSC puede suprimir la proliferación de los linfocitos T (CD4+) auxiliadores. Las MSC criopreservadas se prueban por medio del uso de leucocitos purificados a partir de sangre periférica de individuos sanos (células mononucleocitos de sangre periférica (PBMC) derivadas a partir de Leucopaks (LPK)). Como tal, se espera una variación de la población celular de LPK de donante a donante. Cada muestra de prueba MSC se prueba contra las PBMC de dos individuos diferentes para el material con grado clínico con la opción de limitar la prueba a una única muestra de PBMC para el material con grado de investigación. El ensayo para cada muestra de prueba de MSC se corre junto con una línea de MSC estándar de referencia para garantizar la integridad/reproducibilidad y normalizar las muestras de prueba. El ensayo se describe en Bloom et al. Cytotherapy, 2015, 17(2):140-51.

En breve, las MSC de prueba se exponen a 21 Gy de irradiación Gamma. En una placa de cultivo de tejido de 48 pozos se siembran 4x10e^5, 2x10e^5, 4x10e^4, y 2x10e^4 MSC irradiadas en pozos individuales. Las PMBC se marcan

separadamente con éster de succinimidil carboxiflureseína. Las células PBMC marcadas se siembran a $4x10^5$ células por pozo que contienen las MSC anteriores. Esto da como resultado las relaciones PBMC:MSC titradas de 1:1, 1:0,5, 1:0,1, y 1:0,05. Un pozo adicional se siembra con PBMC estimuladas solas, otro con las MSC solas, y otro con la relación 1:0,05 sin estimulación, todos los cuales sirven como controles. Subsecuentemente, se añaden a cada pozo anticuerpos monoclonales estimuladores de las células T, anti-CD3-épsilon humano y anti- CD28 humano (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN).

En el día cuatro de cultivo, las células se cosechan de los pozos individuales. Las células de cada pozo se incuban con anti-CD4 humano marcado con aloficocianina. Después las células CD4 se analizan para proliferación mediante la intensidad de la carboxifluoresceina por medio del uso de un citómetro de flujo. El control de MSC solas sirve para sacar del análisis las MSC de los pozos con cocultivos. El control de PBMC solas sirve como control positivo para el máximo de proliferación de células T contra el cual se mide el grado de la supresión mediada por MSC. El pozo de la relación 1:0,05 no estimulado se usa para generar una ventana de control negativo contra la cual se mide la proliferación.

A partir de las relaciones de las muestras de prueba se usa una curva de mejor ajuste para generar los valores de IC50. Los valores de IC50 se normalizan al estándar de referencia (IC50 Est Ref/IC50 muestra prueba). Estos IC50 normalizados rinden valores mayores para las muestras más potentes (más supresoras) y valores menores para las muestras menos potentes.

Resultados

Los datos de IC50 presentados en la Tabla 7 muestran que M-CFM suplementado con LiCl, pero que excluye PDGF (es decir, PDGF-/LiCl+) es óptimo para diferenciar iPSC para producir iPSC-MSC que son inmunosupresoras. Además, una concentración más baja de Activina A mejora la inmunosupresión de las iPSC-MSC.

Tabla 7. Ensayo de Inmunopotencia

IC50 (LPK7)	IC50 (LPK8)	Muestra	PDGF	LiCl	Activina A	Densidad de siembra (D2)
NA	no supresora	TC-A-96-B3	+	+	0,1X (1,5 ng/mL)	$5x10^3$ células/cm^2
NA	0,17	TC-A-96-B1	+	+	1X (15 ng/mL)	$5x10^3$ células/cm^2
NA	0,17	DAD-V-90-4	+	+	0,1X (1,5 ng/mL)	$5x10^3$ células/cm^2
NA	0,19	TC-A-96-D3	+	+	0,1X (1,5 ng/mL)	$1x10^4$ células/cm^2
NA	0,36	DAD-V-90-2	+	-	0,1X (1,5 ng/mL)	$5x10^3$ células/cm^2
NA	0,57	DAD-V-90-1	-	-	0,1X (1,5 ng/mL)	$5x10^3$ células/cm^2
0,39	0,54	TC-A-96-B2	-	+	1X (15 ng/mL)	$5x10^3$ células/cm^2
0,37	0,58	TC-A-96-D2	-	+	1X (15 ng/mL)	$1x10^4$ células/cm^2
0,69	0,93	DAD-V-90-3	-	+	0,1X (1,5 ng/mL)	$5x10^3$ células/cm^2

NA - no aplicable

Ejemplo 3 – análisis de microARN de MSC

Las MSC producidas de acuerdo al Ejemplo 2 se sometieron a un análisis contra un microarreglo de microARN (miRNA) que comprende 1194 miRNAs y un panel de miRNA propietario que consiste de miR-127-3p, miR-145-5p, miR-181b-5p, miR-214-3p, miR-299-5p. Cada uno de los paneles de 5 miRNAs se expresó en la totalidad de las 71 muestras de MSC, pero no en las 94 muestras no-MSC, lo que permitió la clasificación de las células como MSC o no-MSC.

Las MSC producidas de acuerdo al Ejemplo 2 expresaron cada uno de los miR-145-5p, miR-181b-5p, y miR-214-3p, pero no miR-127-3p y miR-299-5p.

Un análisis del componente principal de los 233 miRNAs del microarreglo detectado confiablemente en los datos normalizados (presente en al menos una muestra probada) generados para todas las muestras probadas demostró que las MSC producidas de acuerdo al Ejemplo 2 fueron diferentes de cada una de las otras 71 muestras de MSC (Figura 9).

Ejemplo 4 – Ensayo de inmunopotencia alternativo 1

La inmunopotencia de las MSC se evaluó como sigue: PBMC humanas de varios donantes se unieron (para minimizar la variabilidad entre individuos en la respuesta inmune) en salina tamponada con fosfato y se tiñeron con éster de succinimidil carboxifluoresceína (CFSE, 2 µM) por 15 minutos a 37 °C en la oscuridad, a una densidad celular de $2x10^7$ PBMCs/mL. La reacción se detuvo por la adición de una cantidad igual de medio RPMI-1640 suplementado con

10 % de suero humano del grupo sanguíneo AB. 3 x 10^5 PBMC marcados con CFSE resuspendidas en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de lisado de plaquetas humanas agrupadas, 2 IU/mL de heparina libre de preservativos (Biochrom), 2 mM de L-glutamina, 10 mM (4-(2-hidroxietil)-ácido 1-piperazinaetanosulfónico) (HEPES; Gibco), 100 IU/mL de penicilina (Sigma) y 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) después se siembran por pozo en triplicado en placas de fondo plano de 96 pozos (Corning). La proliferación de las células T se determina por medio del uso de un citómetro de flujo Gallios de 10 colores y el programa Kaluza G1.0 (ambos Coulter). Las células T viables 7-aminoactinomicina-D-excluyentes (7-AAD-; BD Pharmingen) CD3-APC + (eBioscience) se analizan después de 4 a 7 días. La cinética de proliferación y distribución de la población se analizaron por medio del uso del programa Modfit 4.1 (Verity).

Ejemplo 5 –Ensayo de inmunopotencia alternativo 2

La inmunopotencia de las MSC se evaluó como sigue: Los linfocitos T auxiliadores (CD4+) se tiñeron con CellTrace violeta (CTV; Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y después se estimularon con perlas recubiertas con anti-CD3/CD28 (Dynabeads, Invitrogen) en una relación célula-T/perla de 5:1 en placas de fondo en U de 96 pozos. Las células T CD4 respondedoras se incubaron después con células Karpas 299 (células K299; Sigma) irradiadas (a 100 Gy) como un estándar de referencia, o MSC. Las células cocultivadas se incubaron a 37 °C en 5 % CO_2 en medio RPMI-1640 por 72 h. Las células después se lavaron con solución tampón de unión de Anexina V (BD Biosciences) y se tiñeron con Anexina V isotiocianato de fluoresceína o APC (BD Biosciences) por 15 min en la oscuridad temperatura ambiente. Después de esta incubación, las células se tiñeron con ioduro de propidio (PI) (Molecular Probes) y después se adquirieron inmediatamente en un LSRII Fortessa (BD Biosciences). Los datos recogidos se analizaron con el uso del programa FlowJo (versión 8.8.6; Tree Star). La viabilidad se midió por la población de células T Anexina V-negativas y PI-negativas. Esta proporción de células viables se analizó para CTV dim (% proliferación). La supresión de la proliferación de células T se calculó por medio de la ecuación: % Supresión = 100 – (a/b * 100), donde a es el porcentaje de proliferación en presencia de las células supresoras y b es el porcentaje de proliferación en ausencia de las células supresoras.

Ejemplo 6 – Tratamiento del infarto del miocardio

Las células madre mesenquimales (MSC) de la presente descripción se usaron en un modelo experimental de rata de infarto del miocardio (ataque al corazón) para reparar el corazón de la rata después de un ataque al corazón.

Se evaluaron la función cardíaca y el tamaño de la cicatriz durante un período de 28 días después de que se indujo un ataque al corazón en un total de 11 ratas. Cuatro animales se trataron con las MSC de la descripción, tres animales se trataron con MSC derivadas de médula, y cuatro animales más recibieron un control placebo/ vehículo (Figura 10).

La evaluación del injerto celular (Figuras 11 y 12) mostró:

- No evidencias de injerto celular por medio del uso de las tinciones de núcleo humano y mitocondria humana al día 28 en los grupos BM-MSC y PSC-MSC.

La evaluación funcional (Figuras 13 y 14) por medio del uso de acortamiento fraccional (FS %) en el día 28 en comparación al día 0 mostró:

- mínimo/ no cambio en la contractilidad del VI en el grupo vehículo.
- contractilidad del VI en el grupo BM MSC
- contractilidad del VI en el grupo PSC-MSC

La evaluación del tamaño de la cicatriz (Figura 15) mostró:

- Reducción aparente en el tamaño de la cicatriz en el día 28 en el grupo PSC-MSC (picosirius rojo) en comparación al vehículo y al grupo BM-MSC.

La evaluación de la angiogénesis (Figura 16) mostró:

- No diferencias obvias en el tamaño y el número de vasos entro los grupos (tinción vWF).

Los resultados mostraron que la función cardíaca mejoró y el tamaño de la cicatriz se redujo en las MSC recipientes en el día 28 en comparación con los animales en los otros dos grupos. Los resultados mostraron que las MSC de la descripción causaron una mejoría funcional y estructural sustancial después del ataque al corazón.

En una modificación del estudio del ejemplo 6 como se muestra en la figura 17, se evaluará la arritmia por medio del uso de la estimulación ventricular programada (EPS).

Ejemplo 7 – Tratamiento de GvHD

Los animales se asignaron al azar a los grupos de tratamiento, y en todos los casos, el tratamiento relevante se inyecto a través de la vena de la cola. En el día 0, ratones NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) hembras de seis semanas de edad se irradiaron ligeramente con 2,5Gy, después descansaron por 4 horas. La GvHD se indujo por transferencia intravenosa (vena de la cola) de 10 millones de PBMC humanas. Después de la inducción de la enfermedad, los ratones se alojaron en condiciones libres de patógenos en cajas micro-aislantes y recibieron agua acidificada, suplementada con antibióticos durante la duración del procedimiento experimental. El diseño del estudio se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen del diseño del estudio de GvHD

Grupo	Descripción del grupo	Dosis de PBMC1	Dosis de MSC	n
Partes 1 y 2 – Estudios de supervivencia				
1A	Controles de irradiación (no GvHD)	0	0	8
1B	Controles GvHD2	$10x10^6$	0	8
1C	Controles de dosis única (no GvHD)	0	$2x10^6$ en d14	8
1D	Tratadas con MSC - dosis única	$10x\ 10^6$	$2x10^6$ en d14	12
2A	Controles de dosis doble (no GvHD)	0	$2x10^6$ en d14 & d18	8
2B	Tratados con MSC - dosis doble	$10x10^6$	$2x10^6$ en d14 & d18	12

1. Todos los animales se irradiaron ligeramente (2,5Gy)en el Día 0. Las PBMC se administraron 4 horas después de la irradiación para inducir GvHD (si fuera aplicable).
2. Los controles GvHD recibieron solución salina tamponada con fosfato (PBS) en lugar del tratamiento de MSC.

Los animales se evaluaron diariamente para signos/ síntomas de GvHD – es decir, pérdida de peso, postura, actividad, textura del pelaje e integridad de la piel – como se describe en la Tabla 9. Se calculó una puntuación global asignando 1 punto para cada signo/ síntoma de Grado 1 y 2 puntos para cada signo/ síntoma de Grado 2. Una vez que se alcanzó una puntuación de GvHD de 8 o más alta en cualquier animal, éste fue sacrificado.

Tabla 9. Grados de GvHD

Síntomas	Grado 0	Grado 1	Grado 2
Pérdida de peso	<10 %	>10 %; <20 %	>20 %
Postura	Normal	Encorvamiento que se nota solo en el descanso	Encorvamiento severo y/o deterioro del movimiento
Actividad	Normal	Disminución suave-moderada	Estacionario a menos que se estimule
Textura de pelaje	Normal	Erizamiento suave a moderado	Erizamiento severo y pobre acicalamiento
Integridad de la piel	Normal	Descamación de las patas/cola	Áreas obvias de piel desnuda

El objetivo primario fue la duración de la supervivencia.

Resultados

Las iPSC-MSC se descongelaron, lavaron, y resuspendieron en PBS estéril. Se administraron dos millones de iPSC-MSC a los animales relevantes a través de la vena de la cola en los días +14 (d14, régimen de dosis única) o en los días +14 y +18 (d14, d18, régimen de dosis doble).

La severidad de la GvHD se evaluó por medio del uso de un sistema de puntuación estandarizado, que incluye cinco criterios diferentes: pérdida de peso, postura, actividad, textura del pelaje, e integridad de la piel. Los ratones se evaluaron diariamente y recibieron una puntuación de 0 (menos severa) a 2 (la más severa) para cada criterio. Las puntuaciones clínicas se generaron adicionando las puntuaciones para los cinco criterios. Cundo se alcanzó una puntuación clínica de “8”, los ratones se sacaron del estudio y se sacrificaron humanamente. El día que se sacan del estudio se recoge como el día de la inducción de GvHD letal. El beneficio para la supervivencia se determinó por medio del uso del análisis de Kaplan–Meier con la aplicación de una prueba de log-rank. Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron significativamente diferentes.

Los animales que recibieron regímenes de única o doble dosis de iPSC-MSC mostraron un alivio significativo de la pérdida de peso típicamente asociada con este modelo pre-clínico (Figura 18).

Los ratones tratados con regímenes de dosis única o doble mostraron una disminución significativa de los síntomas de la enfermedad, con más diferencias significativas en los síntomas entre los tratamientos de dosis única y doble en los días +24 y +25 después de la inducción de la GvHD (Figura 19).

En lo estudios de supervivencia, los tratamientos de dosis única y doble confirieron beneficios significativos para la supervivencias sobre los controles de GVHD($p<0.0001$). La supervivencia de los animales que recibieron regímenes de dosis doble mejoró ligeramente por encima de los animales tratados con dosis única, aunque este aumento no alcanzó significación estadística ($p=0,0715$). Figura 20.

A partir de estos estudios de supervivencia, concluimos que CYMERUS™ iPSC-MSC protege a los animales de la pérdida de peso, atenúa significativamente la severidad de la enfermedad, y proporciona un robusto beneficio para la supervivencia cuando se administra ya sea en tratamientos de dosis única o doble, en un modelo preclínico de GvHD.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una célula madre mesenquimal (MSC), el método comprende:

(a)cultivar una célula de mesodermo primitivo con potencial mesenquimoangioblástico (MCA) que tiene un fenotipo $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFRalpha^{+}$ en un medio formador de colonia mesenquimal (M-CFM) que comprende LiCl y FGF2, pero que excluye PDGF, en condiciones normóxicas por tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimal; y
(b)cultivar la colonia mesenquimal de (a) adherentemente para producir la MSC,

en donde la MSC de (b) tiene propiedades inmunosupresoras de células T superiores en relación a una MSC que no se produjo en dicho M-CFM.

2. El método según la reivindicación 1, en donde las propiedades inmunosupresoras de células T superiores comprenden la supresión de la proliferación de linfocitos T auxiliadores ($CD4^{+}$).

3. El método según la reivindicación 1, en donde el tiempo suficiente para la formación de la colonia mesenquimal es de aproximadamente 8 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 10 días a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 11 a aproximadamente 13 días, o de aproximadamente 12 días.

4. El método según la reivindicación 1, en donde las propiedades inmunosupresoras de las células T de las MSC se determinan en relación a una MSC producida por un método que comprende:

(a')cultivar una célula de mesodermo primitivo en un medio que comprende FGF2 y opcionalmente PDGF, pero que excluye LiCl, en condiciones normóxicas por tiempo suficiente para que se forme una colonia mesenquimal; y
(b')cultivar la colonia mesenquimal de (a') adherentemente para producir la MSC,

opcionalmente en donde las propiedades inmunosupresoras de las células T de la MSC se determinan en relación a una MSC producida a partir de una célula de mesodermo primitivo diferenciada a partir de una PSC en un medio de diferenciación que comprende FGF2, BMP4, Activina A, y LiCl en condiciones hipóxicas por dos días.

5. El método según la reivindicación 1, en donde el M-CFM comprende:

aproximadamente 1 mM LiCl; o
aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 100 ng/mL de FGF2, o aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 50 ng/mL de FGF2, aproximadamente 10 ng/mL de FGF2, o aproximadamente 20 ng/mL; o
aproximadamente 1 mM de LiCl y aproximadamente 10 ng/mL de FGF2, o aproximadamente 1 mM de LiCl y aproximadamente 20 ng/mL de FGF2.

6. El método según la reivindicación 1, que además comprende, antes de cultivar la célula de mesodermo primitivo, diferenciar una célula madre pluripotente (PSC), opcionalmente una PSC inducida (iPSC), en una célula de mesodermo primitivo que comprende:

cultivar la PSC en un medio de diferenciación que comprende FGF2, BMP4, Activina A, y LiCl en condiciones hipóxicas por dos días para formar el mesodermo primitivo; y
reemplazar el medio de diferenciación con el M-CFM que comprende LiCl y FGF2, pero que excluye PDGF.

7. El método según la reivindicación 1, en donde las células son humanas.

8. El método según la reivindicación 6, en donde el medio de diferenciación comprende:

aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 50 ng/mL de FGF2, o aproximadamente 50 ng/mL de FGF2;
aproximadamente 50 ng/mL a aproximadamente 250 ng/mL de BMP4, o aproximadamente 50 ng/mL de BMP4;
aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 15 ng/mL de Activina A, aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 15 ng/mL de Activina A, aproximadamente 12,5 ng/mL de Activina A, o aproximadamente 1,5 ng/mL de Activina A; y/o
aproximadamente 1 mM a 2 mM de LiCl.

9. El método según la reivindicación 6, en donde el medio de diferenciación comprende:

aproximadamente 50 ng/mL de FGF2;
aproximadamente 50 ng/mL de BMP4;
aproximadamente 1,5 ng/mL de Activina A; y
aproximadamente 2 mM de LiCl.

10. El método según la reivindicación 1, que comprende cultivar sobre colágeno IV y/o tenascina C.

11. El método según la reivindicación 1, que además comprende pasar la colonia mesenquimal y/o MSC, opcionalmente en donde el pase comprende:

cultivar la colonia mesenquimal y/o MSC por 3 días;
cultivar la colonia mesenquimal y/o MSC sobre fibronectina y/o colágeno I; y/o 1, 2, 3, 4, 5, o 6 pases.

GLECDGKVNI CCKKQFFVSF KDIGWNDWII APSGYHANYC EGECPSHIAG TSGSSLSFHS
TVINHYRMRG HSPFANLKSC CVPTKLRPMS MLYYDDGQNI IKKDIQNMIV EECGCS

Figura 1

KKNKNCRRHS LYVDFSDVGW NDWIVAPPGY QAFYCHGDCP FPLADHLNST NHAIVQTLVN
SVNSSIPKAC CVPTELSAIS MLYLDEYDKV VLKNYQEMVV EGCGCR

Figura 2

QLSYGYDEKS TGGISVPGPM GPSGPRGLPG PPGAPGPQGF QGPPGEPGEP GASGPMGPRG
PPGPPGKNGD DGEAGKPGRP GERGPPGPQG ARGLPGTAGL PGMKGHRGFS GLDGAKGDAG
PAGPKGEPGS PGENGAPGQM GPRGLPGERG RPGAPGPAGA RGNDGATGAA GPPGPTGPAG
PPGFPGAVGA KGEAGPQGPR GSEGPQGVRG EPGPPGPAGA AGPAGNPGAD GQPGAKGANG
APGIAGAPGF PGARGPSGPQ GPGGPPGPKG NSGEPGAPGS KGDTGAKGEP GPVGVQGPPG
PAGEEGKRGA RGEPGPTGLP GPPGERGGPG SRGFPGADGV AGPKGPAGER GSPGPAGPKG
SPGEAGRPGE AGLPGAKGLT GSPGSPGPDG KTGPPGPAGQ DGRPGPPGPP GARGQAGVMG
FPGPKGAAGE PGKAGERGVP GPPGAVGPAG KDGEAGAQGP PGPAGPAGER GEQGPAGSPG
FQGLPGPAGP PGEAGKPGEQ GVPGDLGAPG PSGARGERGF PGERGVQGPP GPAGPRGANG
APGNDGAKGD AGAPGAPGSQ GAPGLQGMPG ERGAAGLPGP KGDRGDAGPK GADGSPGKDG
VRGLTGPIGP PGPAGAPGDK GESGPSGPAG PTGARGAPGD RGEPGPPGPA GFAGPPGADG
QPGAKGEPGD AGAKGDAGPP GPAGPAGPPG PIGNVGAPGA KGARGSAGPP GATGFPGAAG
RVGPPGPSGN AGPPGPPGPA GKEGGKGPRG ETGPAGRPGE VGPPGPPGPA GEKGSPGADG
PAGAPGTPGP QGIAGQRGVV GLPGQRGERG FPGLPGPSGE PGKQGPSGAS GERGPPGPMG
PPGLAGPPGE SGREGAPGAE GSPGRDGSPG AKGDRGETGP AGPPGAPGAP GAPGPVGPAG
KSGDRGETGP AGPAGPVGPV GARGPAGPQG PRGDKGETGE QGDRGIKGHR GFSGLQGPPG
PPGSPGEQGP SGASGPAGPR GPPGSAGAPG KDGLNGLPGP IGPPGPRGRT GDAGPVGPPG
PPGPPGPPGP PSAGFDFSFL PQPPQEKAHD GGRYYRA

Figura 3

GERGFPGIPG TPGPPGLPGL QGPVGPPGFT GPPGPPGPPG PPGEKGQMGL SFQGPKGDKG
DQGVSGPPGV PGQAQVQEKG DFATKGEKGQ KGEPGFQGMP GVGEKGEPGK PGPRGKPGKD
GDKGEKGSPG FPGEPGYPGL IGRQGPQGEK GEAGPPGPPG IVIGTGPLGE KGERGYPGTP
GPRGEPGPKG FPGLPGQPGP PGLPVPGQAG APGFPGERGE KGDRGFPGTS LPGPSGRDGL
PGPPGSPGPP GQPGYTNGIV ECQPGPPGDQ GPPGIPGQPG FIGEIGEKGQ KGESCLICDI
DGYRGPPGPQ GPPGEIGFPG QPGAKGDRGL PGRDGVAGVP GPQGTPGLIG QPGAKGEPGE
FYFDLRLKGD KGDPGFPGQP GMPGRAGSPG RDGHPGLPGP KGSPGSVGLK GERGPPGGVG
FPGSRGDTGP PGPPGYGPAG PIGDKGQAGF PGGPGSPGLP GPKGEPGKIV PLPGPPGAEG
LPGSPGFPGP QGDRGFPGTP GRPGLPGEKG AVGQPGIGFP GPPGPKGVDG LPGDMGPPGT
PGRPGFNGLP GNPGVQGQKG EPGVGLPGLK GLPGLPGIPG TPGEKGSIGV PGVPGEHGAI
GPPGLQGIRG EPGPPGLPGS VGSPGVPGIG PPGARGPPGG QGPPGLSGPP GIKGEKGFPG
FPGLDMPGPK GDKGAQGLPG ITGQSGLPGL PGQQGAPGIP GFPGSKGEMG VMGTPGQPGS
PGPVGAPGLP GEKGDHGFPG SSGPRGDPGL KGDKGDVGLP GKPGSMDKVD MGSMKGQKGD
QGEKGQIGPI GEKGSRGDPG TPGVPGKDGQ AGQPGQPGPK GDPGISGTPG APGLPGPKGS
VGGMGLPGTP GEKGVPGIPG PQGSPGLPGD KGAKGEKGQA GPPGIGIPGL RGEKGDQGIA
GFPGSPGEKG EKGSIGIPGM PGSPGLKGSP GSVGYPGSPG LPGEKGDKGL PGLDGIPGVK
GEAGLPGTPG PTGPAGQKGE PGSDGIPGSA GEKGEPGLPG RGFPGFPGAK GDKGSKGEVG
FPGLAGSPGI PGSKGEQGFM GPPGPQGQPG LPGSPGHATE GPKGDRGPQG QPGLPGLPGP
MGPPGLPGID GVKGDKGNPG WPGAPGVPGP KGDPGFQGMP GIGGSPGITG SKGDMGPPGV
PGFQGPKGLP GLQGIKGDQG DQGVPGAKGL PGPPGPPGPY DIIKGEPGLP GPEGPPGLKG
LQGLPGPKGQ QGVTGLVGIP GPPGIPGFDG APGQKGEMGP AGPTGPRGFP GPPGPDGLPG
SMGPPGTPSV DHGFLVTRHS QTIDDPQCPS GTKILYHGYS LLYVQGNERA HGQDLGTAGS
CLRKFSTMPF LFCNINNVCN FASRNDYSYW LSTPEPMPMS MAPITGENIR PFISRCAVCE
APAMVMAVHS QTIQIPPCPS GWSSLWIGYS FVMHTSAGAE GSGQALASPG SCLEEFRSAP
FIECHGRGTC NYYANAYSFW LATIERSEMF KKPTPSTLKA GELRTHVSRC QVCMRRT

Figura 4

MVGVGGGDVE DVTPRPGGCQ ISGRGARGCN GIPGAAAWEA ALPRRRPRRH PSVNPRSRAA
GSPRTRGRRT EERPSGSRLG DRGRGRALPG GRLGGRGRGR APERVGGRGR GRGTAAPRAA
PAARGSRPGP AGTMAAGSIT TLPALPEDGG SGAFPPGHFK DPKRLYCKNG GFFLRIHPDG
RVDGVREKSD PHIKLQLQAE ERGVVSIKGV CANRYLAMKE DGRLLASKCV TDECFFFERL
ESNNYNTYRS RKYTSWYVAL KRTGQYKLGS KTGPGQKAIL FLPMSAKS

Figura 5

QAQQMVQPQS PVAVSQSKPG CYDNGKHYQI NQQWERTYLG NALVCTCYGG SRGFNCESKP
EAEETCFDKY TGNTYRVGDT YERPKDSMIW DCTCIGAGRG RISCTIANRC HEGGQSYKIG
DTWRRPHETG GYMLECVCLG NGKGEWTCKP IAEKCFDHAA GTSYVVGETW EKPYQGWMMV
DCTCLGEGSG RITCTSRNRC NDQDTRTSYR IGDTWSKKDN RGNLLQCICT GNGRGEWKCE
RHTSVQTTSS GSGPFTDVRA AVYQPQPHPQ PPPYGHCVTD SGVVYSVGMQ WLKTQGNKQM
LCTCLGNGVS CQETAVTQTY GGNSNGEPCV LPFTYNGRTF YSCTTEGRQD GHLWCSTTSN
YEQDQKYSFC TDHTVLVQTR GGNSNGALCH FPFLYNNHNY TDCTSEGRRD NMKWCGTTQN
YDADQKFGFC PMAAHEEICT TNEGVMYRIG DQWDKQHDMG HMMRCTCVGN GRGEWTCIAY
SQLRDQCIVD DITYNVNDTF HKRHEEGHML NCTCFGQGRG RWKCDPVDQC QDSETGTFYQ
IGDSWEKYVH GVRYQCYCYG RGIGEWHCQP LQTYPSSSGP VEVFITETPS QPNSHPIQWN
APQPSHISKY ILRWRPKNSV GRWKEATIPG HLNSYTIKGL KPGVVYEGQL ISIQQYGHQE
VTRFDFTTTS TSTPVTSNTV TGETTPFSPL VATSESVTEI TASSFVVSWV SASDTVSGFR
VEYELSEEGD EPQYLDLPST ATSVNIPDLL PGRKYIVNVY QISEDGEQSL ILSTSQTTAP
DAPPDPTVDQ VDDTSIVVRW SRPQAPITGY RIVYSPSVEG SSTELNLPET ANSVTLSDLQ
PGVQYNITIY AVEENQESTP VVIQQETTGT PRSDTVPSPR DLQFVEVTDV KVTIMWTPPE
SAVTGYRVDV IPVNLPGEHG QRLPISRNTF AEVTGLSPGV TYYFKVFAVS HGRESKPLTA
QQTTKLDAPT NLQFVNETDS TVLVRWTPPR AQITGYRLTV GLTRRGQPRQ YNVGPSVSKY
PLRNLQPASE YTVSLVAIKG NQESPKATGV FTTLQPGSSI PPYNTEVTET TIVITWTPAP
RIGFKLGVRP SQGGEAPREV TSDSGSIVVS GLTPGVEYVY TIQVLRDGQE RDAPIVNKVV
TPLSPPTNLH LEANPDTGVL TVSWERSTTP DITGYRITTT PTNGQQGNSL EEVVHADQSS
CTFDNLSPGL EYNVSVYTVK DDKESVPISD TIIPEVPQLT DLSFVDITDS SIGLRWTPLN
SSTIIGYRIT VVAAGEGIPI FEDFVDSSVG YYTVTGLEPG IDYDISVITL INGGESAPTT
LTQQTAVPPP TDLRFTNIGP DTMRVTWAPP PSIDLTNFLV RYSPVKNEED VAELSISPSD
NAVVLTNLLP GTEYVVSVSS VYEQHESTPL RGRQKTGLDS PTGIDFSDIT ANSFTVHWIA
PRATITGYRI RHHPEHFSGR PREDRVPHSR NSITLTNLTP GTEYVVSIVA LNGREESPLL
IGQQSTVSDV PRDLEVVAAT PTSLLISWDA PAVTVRYYRI TYGETGGNSP VQEFTVPGSK
STATISGLKP GVDYTITVYA VTGRGDSPAS SKPISINYRT EIDKPSQMQV TDVQDNSISV
KWLPSSSPVT GYRVTTTPKN GPGPTKTKTA GPDQTEMTIE GLQPTVEYVV SVYAQNPSGE
SQPLVQTAVT NIDRPKGLAF TDVDVDSIKI AWESPQGQVS RYRVTYSSPE DGIHELFPAP
DGEEDTAELQ GLRPGSEYTV SVVALHDDME SQPLIGTQST AIPAPTDLKF TQVTPTSLSA
QWTPPNVQLT GYRVRVTPKE KTGPMKEINL APDSSSVVVS GLMVATKYEV SVYALKDTLT
SRPAQGVVTT LENVSPPRRA RVTDATETTI TISWRTKTET ITGFQVDAVP ANGQTPIQRT
IKPDVRSYTI TGLQPGTDYK IYLYTLNDNA RSSPVVIDAS TAIDAPSNLR FLATTPNSLL
VSWQPPRARI TGYIIKYEKP GSPPREVVPR PRPGVTEATI TGLEPGTEYT IYVIALKNNQ
KSEPLIGRKK TDELPQLVTL PHPNLHGPEI LDVPSTVQKT PFVTHPGYDT GNGIQLPGTS
GQQPSVGQQM IFEEHGFRRT TPPTTATPIR HRPRPYPPNV GQEALSQTTI SWAPFQDTSE
YIISCHPVGT DEEPLQFRVP GTSTSATLTG LTRGATYNII VEALKDQQRH KVREEVVTVG
NSVNEGLNQP TDDSCFDPYT VSHYAVGDEW ERMSESGFKL LCQCLGFGSG HFRCDSSRWC
HDNGVNYKIG EKWDRQGENG QMMSCTCLGN GKGEFKCDPH EATCYDDGKT YHVGEQWQKE
YLGAICSCTC FGGQRGWRCD NCRRPGGEPS PEGTTGQSYN QYSQRYHQRT NTNVNCPIEC
FMPLDVQADR EDSRE

Figura 6

SLGSLTIAEP AMIAECKTRT EVFEISRRLI DRTNANFLVW PPCVEVQRCS GCCNNRNVQC
RPTQVQLRPV QVRKIEIVRK KPIFKKATVT LEDHLACKCE TVAAARPVT

Figura 7

GVLKKVIRHK RQSGVNATLP EENQPVVFNH VYNIKLPVGS QCSVDLESAS GEKDLAPPSE
PSESFQEHTV DGENQIVFTH RINIPRRACG CAAAPDVKEL LSRLEELENL VSSLREQCTA
GAGCCLQPAT GRLDTRPFCS GRGNFSTEGC GCVCEPGWKG PNCSEPECPG NCHLRGRCID
GQCICDDGFT GEDCSQLACP SDCNDQGKCV NGVCICFEGY AGADCSREIC PVPCSEEHGT
CVDGLCVCHD GFAGDDCNKP LCLNNCYNRG RCVENECVCD EGFTGEDCSE LICPNDCFDR
GRCINGTCYC EEGFTGEDCG KPTCPHACHT QGRCEEGQCV CDEGFAGVDC SEKRCPADCH
NRGRCVDGRC ECDDGFTGAD CGELKCPNGC SGHGRCVNGQ CVCDEGYTGE DCSQLRCPND
CHSRGRCVEG KCVCEQGFKG YDCSDMSCPN DCHQHGRCVN GMCVCDDGYT GEDCRDRQCP
RDCSNRGLCV DGQCVCEDGF TGPDCAELSC PNDCHGQGRC VNGQCVCHEG FMGKDCKEQR
CPSDCHGQGR CVDGQCICHE GFTGLDCGQH SCPSDCNNLG QCVSGRCICN EGYSGEDCSE
VSPPKDLVVT EVTEETVNLA WDNEMRVTEY LVVYTPTHEG GLEMQFRVPG DQTSTIIQEL
EPGVEYFIRV FAILENKKSI PVSARVATYL PAPEGLKFKS IKETSVEVEW DPLDIAFETW
EIIFRNMNKE DEGEITKSLR RPETSYRQTG LAPGQEYEIS LHIVKNNTRG PGLKRVTTTR
LDAPSQIEVK DVTDTTALIT WFKPLAEIDG IELTYGIKDV PGDRTTIDLT EDENQYSIGN
LKPDTEYEVS LISRRGDMSS NPAKETFTTG LDAPRNLRRV SQTDNSITLE WRNGKAAIDS
YRIKYAPISG GDHAEVDVPK SQQATTKTTL TGLRPGTEYG IGVSAVKEDK ESNPATINAA
TELDTPKDLQ VSETAETSLT LLWKTPLAKF DRYRLNYSLP TGQWVGVQLP RNTTSYVLRG
LEPGQEYNVL LTAEKGRHKS KPARVKASTE QAPELENLTV TEVGWDGLRL NWTAADQAYE
HFIIQVQEAN KVEAARNLTV PGSLRAVDIP GLKAATPYTV SIYGVIQGYR TPVLSAEAST
GETPNLGEVV VAEVGWDALK LNWTAPEGAY EYFFIQVQEA DTVEAAQNLT VPGGLRSTDL
PGLKAATHYT ITIRGVTQDF STTPLSVEVL TEEVPDMGNL TVTEVSWDAL RLNWTTPDGT
YDQFTIQVQE ADQVEEAHNL TVPGSLRSME IPGLRAGTPY TVTLHGEVRG HSTRPLAVEV
VTEDLPQLGD LAVSEVGWDG LRLNWTAADN AYEHFVIQVQ EVNKVEAAQN LTLPGSLRAV
DIPGLEAATP YRVSIYGVIR GYRTPVLSAE ASTAKEPEIG NLNVSDITPE SFNLSWMATD
GIFETFTIEI IDSNRLLETV EYNISGAERT AHISGLPPST DFIVYLSGLA PSIRTKTISA
TATTEALPLL ENLTISDINP YGFTVSWMAS ENAFDSFLVT VVDSGKLLDP QEFTLSGTQR
KLELRGLITG IGYEVMVSGF TQGHQTKPLR AEIVTEAEPE VDNLLVSDAT PDGFRLSWTA
DEGVFDNFVL KIRDTKKQSE PLEITLLAPE RTRDITGLRE ATEYEIELYG ISKGRRSQTV
SAIATTAMGS PKEVIFSDIT ENSATVSWRA PTAQVESFRI TYVPITGGTP SMVTVDGTKT
QTRLVKLIPG VEYLVSIIAM KGFEESEPVS GSFTTALDGP SGLVTANITD SEALARWQPA
IATVDSYVIS YTGEKVPEIT RTVSGNTVEY ALTDLEPATE YTLRIFAEKG PQKSSTITAK
FTTDLDSPRD LTATEVQSET ALLTWRPPRA SVTGYLLVYE SVDGTVKEVI VGPDTTSYSL
ADLSPSTHYT AKIQALNGPL RSNMIQTIFT TIGLLYPFPK DCSQAMLNGD TTSGLYTIYL
NGDKAEALEV FCDMTSDGGG WIVFLRRKNG RENFYQNWKA YAAGFGDRRE EFWLGLDNLN
KITAQGQYEL RVDLRDHGET AFAVYDKFSV GDAKTRYKLK VEGYSGTAGD SMAYHNGRSF
STFDKDTDSA ITNCALSYKG AFWYRNCHRV NLMGRYGDNN HSQGVNWFHW KGHEHSIQFA
EMKLRPSNFR NLEGRRKRA

Figura 8

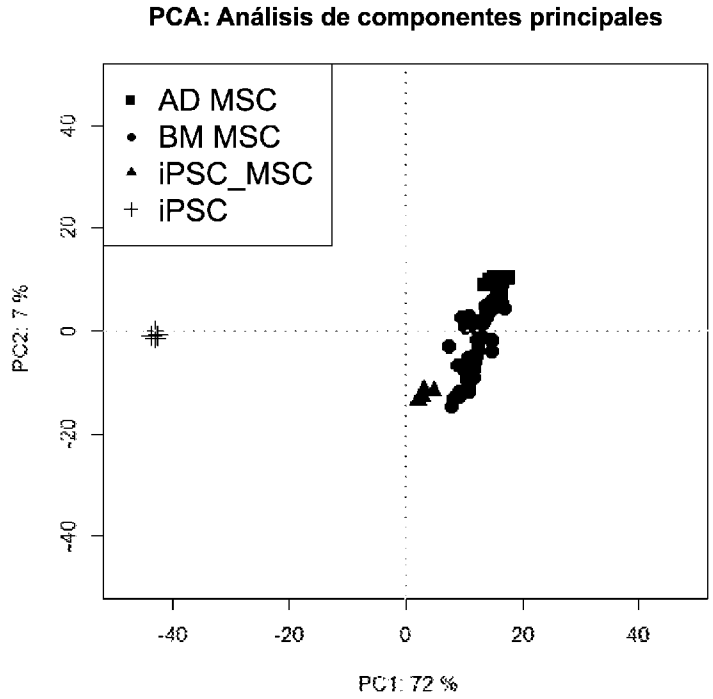


Figura 9

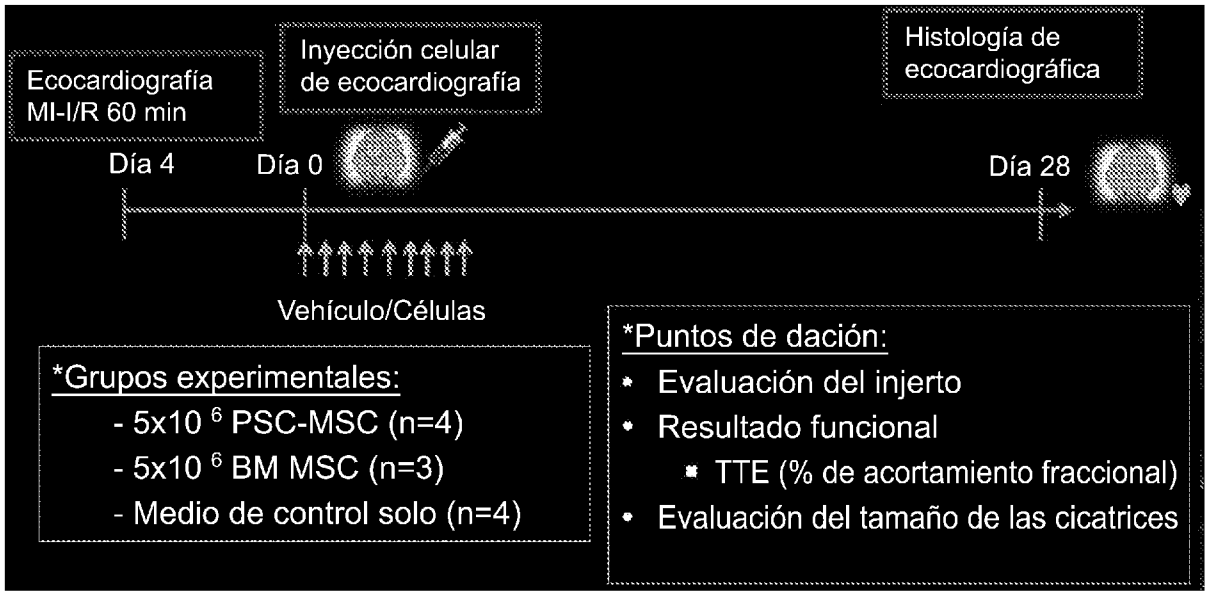


Figura 10

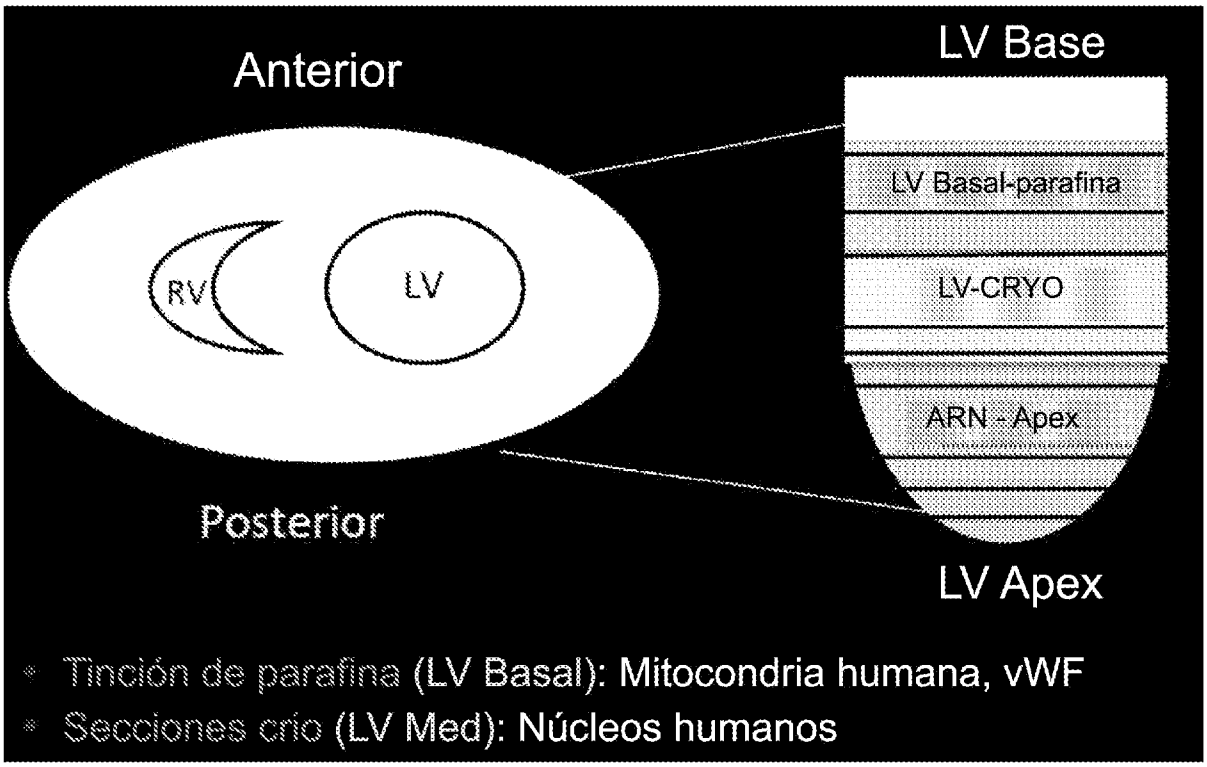


Figura 11

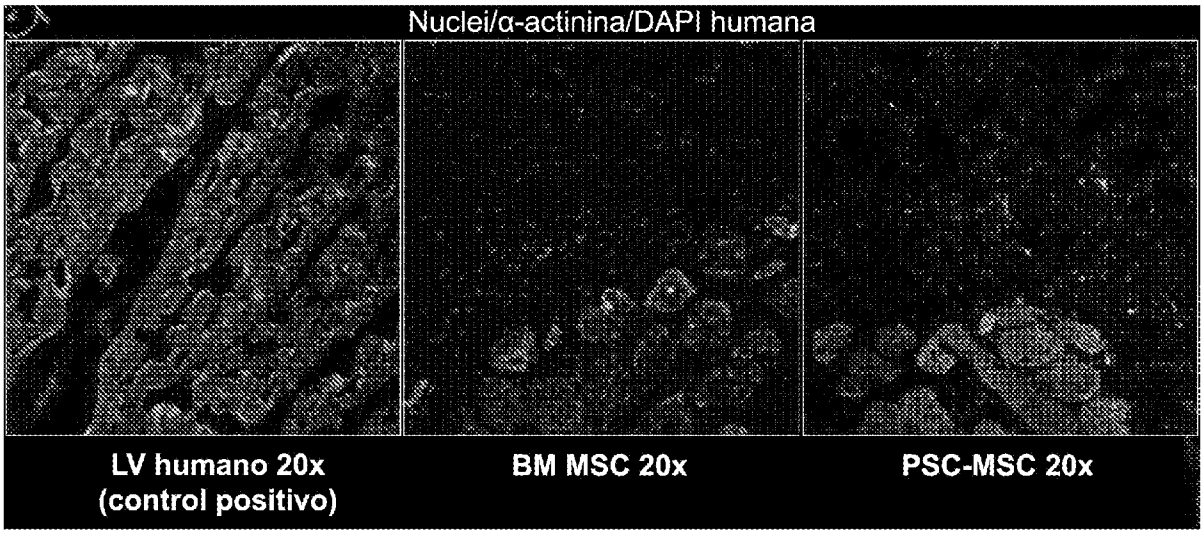


Figura 12

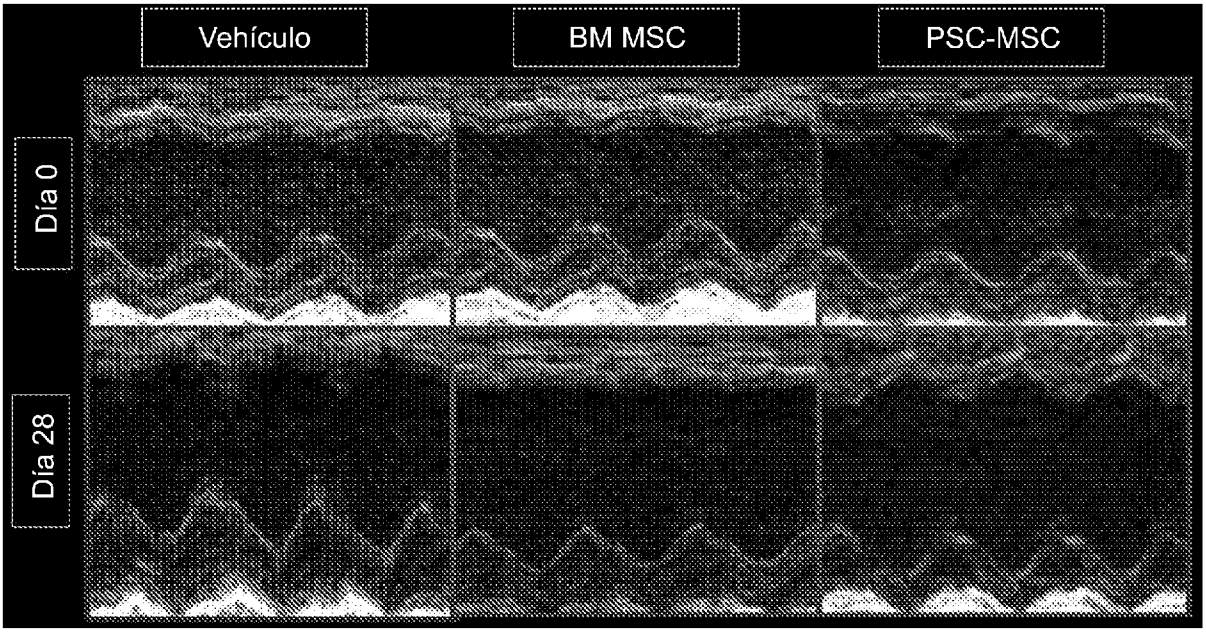
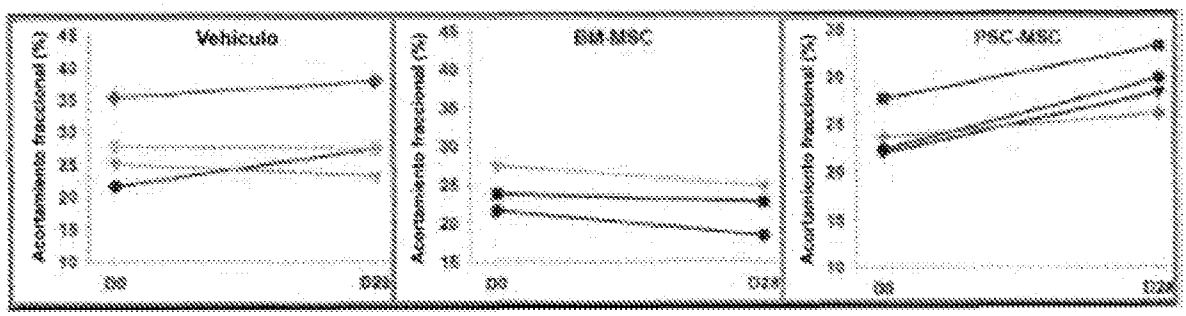


Figura 13



Aleatorización	Día -4 FS (%) (media ±SE)	Día 0 FS (%) (media ±SE)	Día 28 FS (%) (media ±SE)	δEF (D0 a D28) (%)
Vehículo (n=4)	49,85±1,13	27,56±2,92	28,95±3,14	1,39±1,72
BM MSC (n=3)	49,57±0,05	24,35±1,70	22,03±1,90	-2,33±0,65
PSC-MSC (n=4)	50,67±0,61	23,95±1,31	29,43±1,47	5,48±1,06*

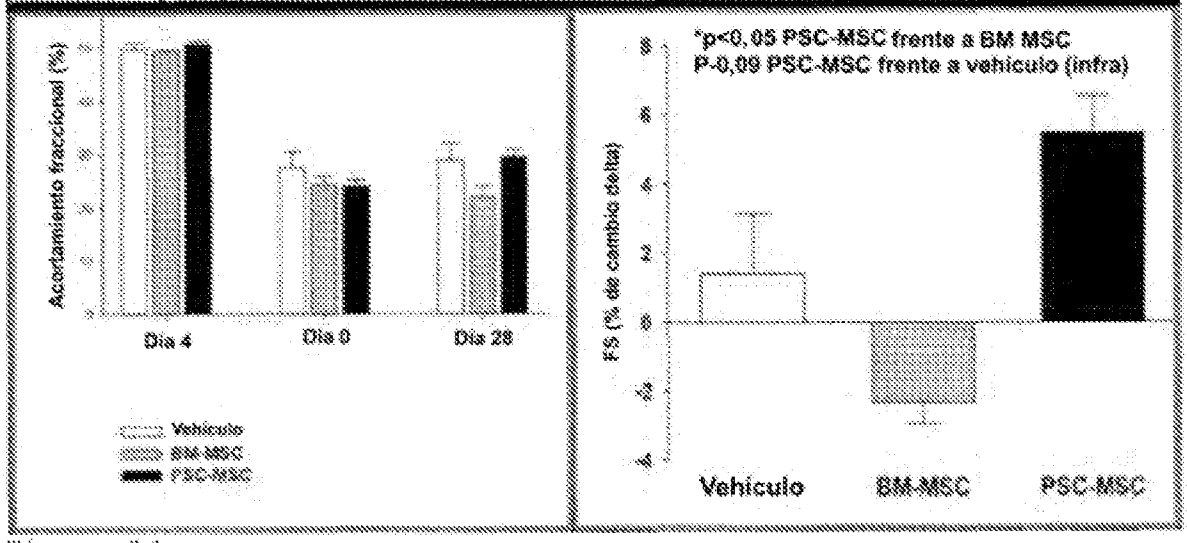


Figura 14

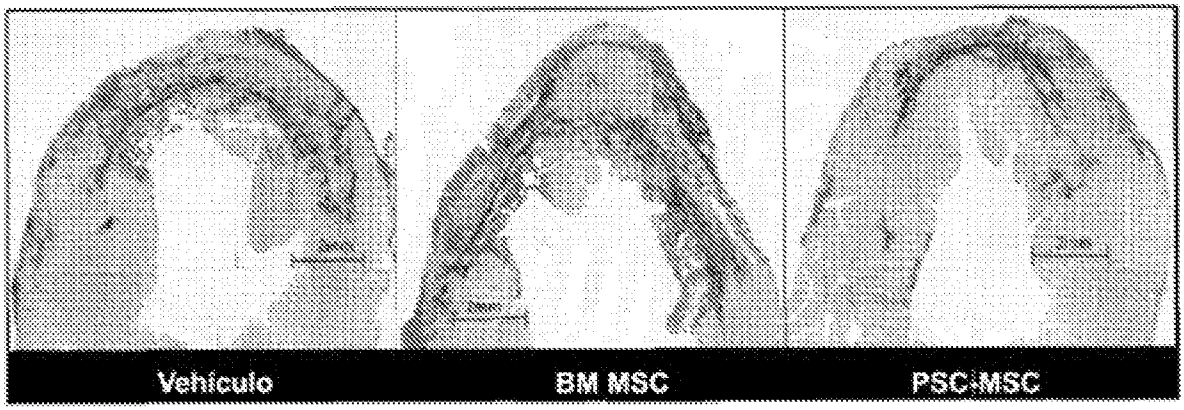


Figura 15

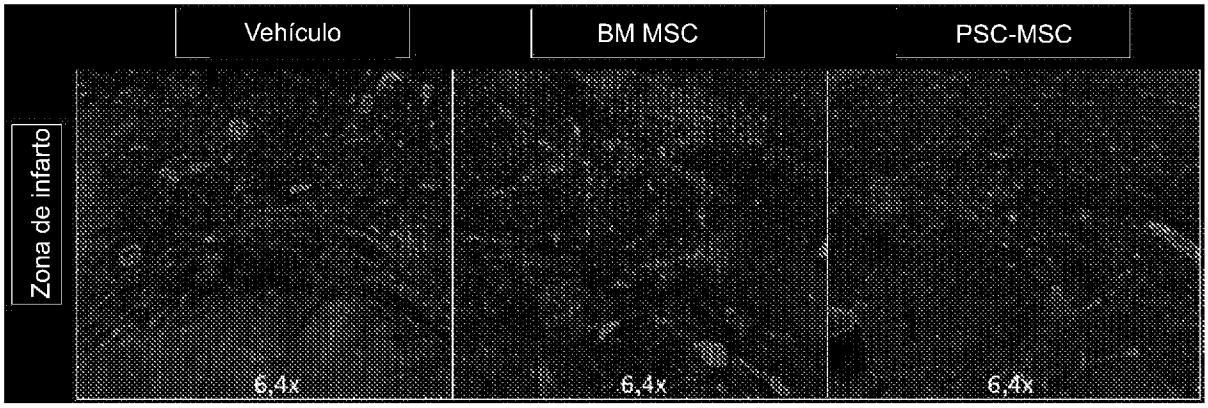


Figura 16

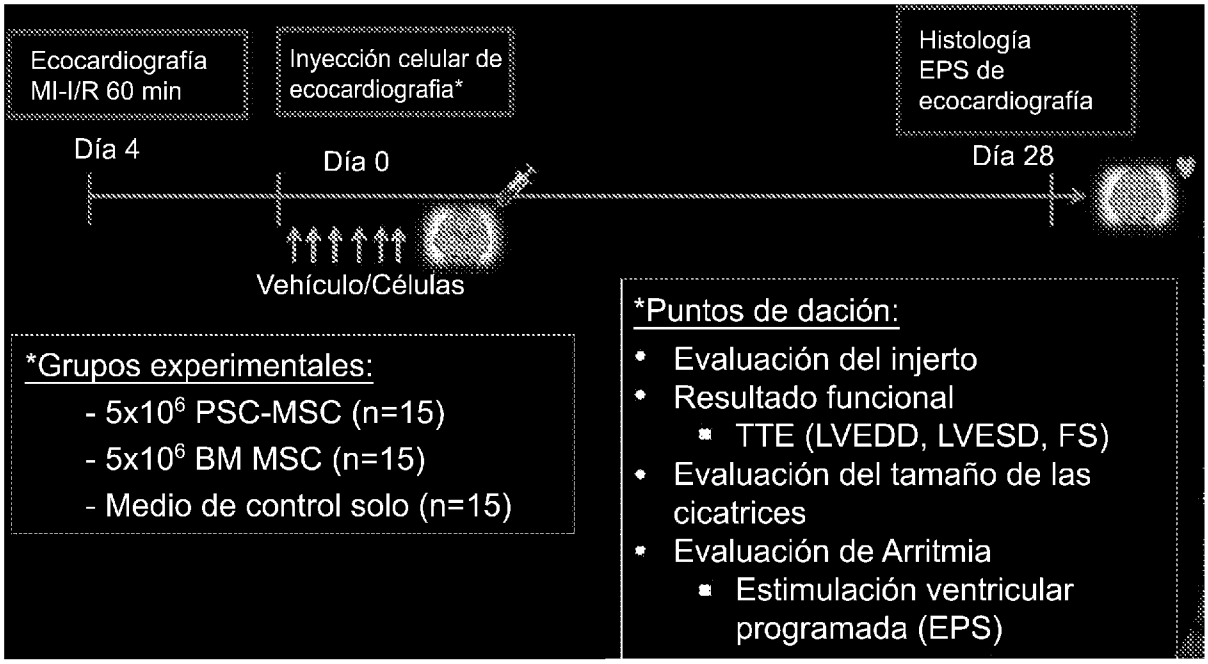


Figura 17

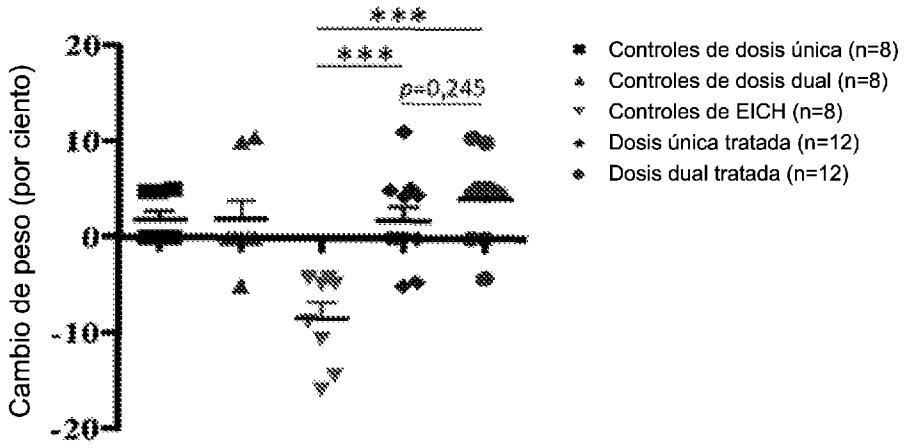


Figura 18

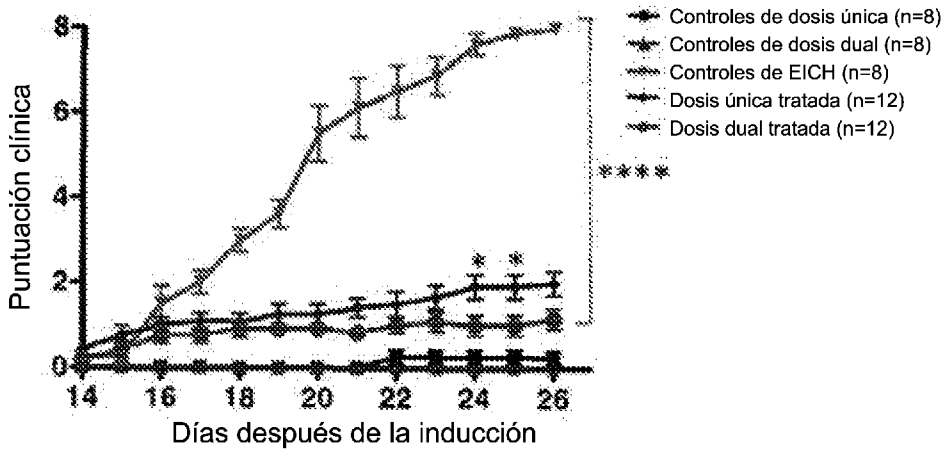


Figura 19

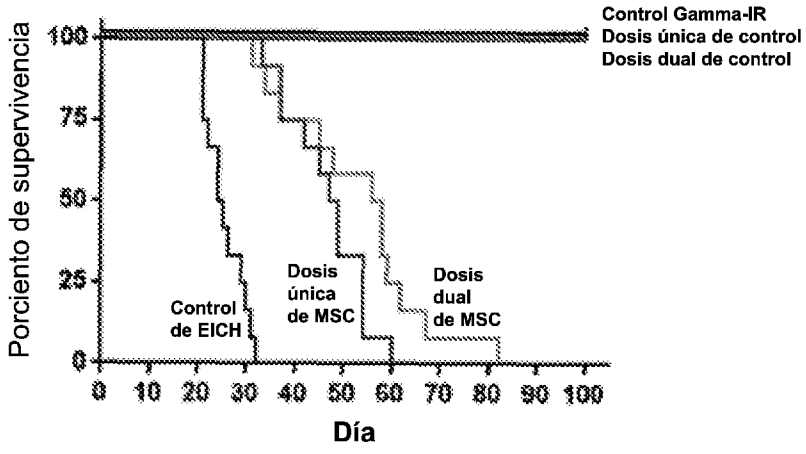


Figura 20