

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 855**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2007 E 07716359 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1971679**

54 Título: **Células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor de TNF**

30 Prioridad:

13.01.2006 US 759157 P

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

29.07.2013

73 Titular/es:

**OSIRIS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
7015 Albert Einstein Drive
Columbia, MD 21046 , US**

72 Inventor/es:

**DANILKOVITCH, ALLA;
CARTER, DIANE;
TYRELL, ALICIA;
BUBNIC, SIMON;
MARCELINO, MICHELLE y
MONROY, RODNEY**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 415 855 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor de TNF.

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de células troncales (stem) mesenquimatosas que expresan el receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) de Tipo I (TNFRI), en una cantidad de por lo menos $13 \text{ pg}/10^6$ células. Estas células troncales mesenquimatosas inhiben la proliferación de los linfocitos.

10 Las células troncales mesenquimatosas (MSC) son células troncales histoespecíficas que se pueden diferenciar fácilmente en líneas celulares que incluyen osteoblastos, miocitos, condrocitos y adipocitos (Pittenger, et al., Science, Vol. 284, pg. 143 (1999); Haynesworth, et al., Bone, Vol. 13, pg. 69 (1992); Prockop, Science, Vol. 276, pg. 71 (1997)). Los estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de las MSC para diferenciarse en músculo (Wakitani, et al., Muscle Nerve, Vol. 18, pg. 1417 (1995)), precursores neuronales (Woodbury, et al., J. Neurosci. Res., Vol. 69, pg. 908 (2002); Sanchez-Ramos, et al., Exp. Neurol., Vol. 171, pg. 109 (2001)) cardiomiocitos (Toma, et al., Circulation, Vol. 105, pg. 93 (2002); Fakuda, Artif. Organs, Vol. 25, pg. 187 (2001)) y posiblemente otros tipos de células. Además, se ha demostrado que las MSC proporcionan capas de alimentación eficaces para la expansión de las células troncales hematopoyéticas (Eaves, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 938, pg. 63 (2001); Wagers, et al., Gene Therapy, Vol. 9, pg. 606 (2002)). Estudios recientes con diferentes modelos animales han demostrado que las MSC pueden ser útiles en la reparación o regeneración del hueso, del cartílago, del menisco o de los tejidos miocárdicos dañados (Dekok, et al., Clin. Oral Implants Res., Vol. 14, pg. 481 (2003)); Wu et al., Transplantation, Vol. 75, pg. 679 (2003); Noel, et al., Curr. Opin. Investig. Drugs, Vol. 3, pg. 1000 (2002); Ballas, et al., J. Cell. Biochem. Suppl., Vol. 38, pg. 20 (2002); Mackenzie, et al., Blood Cells Mol. Dis., Vol. 27, pgs. 601-604 (2001)). Varios investigadores han utilizado las MSC con resultados esperanzadores para el trasplante en modelos animales de enfermedades que incluyen la osteogénesis imperfecta (Pereira, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 95, pg. 1142 (1998)), el Parkinson (Schwartz, et al., Hum. Gene Ther., Vol. 10, pg. 2539 (1999)), lesiones en la médula espinal (Chopp, et al., Neuroreport, Vol. 11, pg. 3001 (2000); Wu, et al., J. Neurosci. Res., Vol. 72, pg. 393 (2003)) y trastornos cardíacos (Tomita et al., Circulation, Vol. 100, pg. 247 (1999); Shake, et al., Ann. Thorac. Surg., Vol. 73, pg. 1919 (2002)). De forma importante, también se han publicado resultados prometedores de ensayos clínicos para la osteogénesis imperfecta (Horowitz, et al., Blood, Vol. 97, pg. 1227 (2001); Horowitz, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 99, pg. 8932 (2002)) y mejoras en injertos en trasplantes heterólogos de médula ósea (Frasconi, et al., Int. Society for Cell Therapy, SA006 (abstract) (2002); Koc, et al.; J. Clin. Oncol., Vol. 18, págs. 307-316 (2000)).

Además, los estudios *in vitro* de distintos laboratorios han demostrado que las MSC pueden inhibir la proliferación de linfocitos T tanto en cultivos de mezclas de linfocitos o mediante otros estímulos como los antígenos y los mitógenos (Di Nicola, et al., Blood, Vol. 99, pgs. 3638-3843 (2002); Tse et al., Transplantation, Vol. 75, pgs. 389-397 (2003); Aggarwal, et al., Blood, Vol. 105, pgs. 1815-1822 (2005)). Los resultados recientes de estudios *in vitro* demuestran además que las MSC hacen disminuir la secreción de las citocinas proinflamatorias, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón- γ (IFN- γ), y simultáneamente hace aumentar la producción de las citocinas antiinflamatorias Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-4 (IL-4) a través de las células inmunitarias. (Aggarwal, 2005). Estos resultados indican que debido a las actividades inmunoregulatoras y antiinflamatorias, las MSC pueden ser beneficiosas para el tratamiento de respuestas inmunológicas que tienen lugar en patologías de injerto contra el huésped (EICH), trasplantes de órganos sólidos y enfermedades autoinmunitarias como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide. Un informe de un caso clínico que demuestra el efecto terapéutico de las MSC en casos de EICH agudos apoya firmemente esta hipótesis. (Le Blanc, et al., The Lancet, Vol. 363, págs. 1439-1441 (2004)).

Los receptores del TNF- α se expresan en la superficie de las células troncales mesenquimatosas. Los datos acumulados indican que el TNF- α es un regulador importante de la función de las células troncales mesenquimatosas. La incubación de TNF- α en cultivos de células troncales mesenquimatosas humanas sobrerregula la prostaglandina E2 (PGE₂) y la secreción del factor de crecimiento del queratinocito, induce la actividad de la enzima idoleamina 2,3 desoxigenasa (IDO) y estimula la migración celular. Se ha demostrado que el TNF- α está presente en sitios con heridas e inflamación, especialmente en los órganos que son diana de la enfermedad del injerto contra el huésped. (Koide, et al., Transplantation, Vol. 64, pgs. 518-524 (1997); Kuroiwa, et al., J. Clin. Invest., Vol. 107, pgs. 1365-1373 (2001); Deans, et al., Exp. Hematol., Vol. 28, págs. 875-884 (2002); Ellison, et al., J. Clin. Immunol., Vol. 24, pgs. 197-211 (2004)). Por consiguiente, estos datos indican que la expresión de los receptores del TNF- α por parte de las células troncales mesenquimatosas puede ser decisiva para las actividades inmunosupresoras, inmunoregulatoras, antiinflamatorias, de reparación del tejido o de la curación de heridas, así como la migración a los lugares que presentan inflamación.

Existen dos tipos de receptores de TNF- α , o TNFRs: el Tipo I (TNFRI), también conocido como p55, y el Tipo II (TNFRII), también conocido como p75. (Tartaglia, et al., Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 88, págs. 9292-9296 (1991).) Ambos tipos de receptores de TNF- α están presentes en las MSC; sin embargo, el TNFRI es el tipo predominante. (Vancheri, et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., Vol. 22, págs. 628-634 (2000); Debets, et al., Cytokine, Vol. 8, págs. 80-88 (1996)).

65 A continuación se describirá la invención haciendo referencia a las figuras en las que:

La figura 1 es un gráfico que muestra la correlación entre la expresión del TNFRI y la capacidad de las MSC para inhibir la proliferación de PBMC *in vitro*;

5 La Figura 2 es un gráfico que muestra la expresión del TNFRI por células troncales mesenquimatosas almacenadas a una temperatura de -80°C, -70°C, -60°C y -50°C;

La Figura 3 es un gráfico que muestra la expresión del TNFRI y la capacidad para inhibir la proliferación de PBMC *in vitro* de las células troncales mesenquimatosas almacenadas a una temperatura de -80°C y a -50°C; y

10 La Figura 4 es un gráfico que muestra la expresión del TNFRI por las células troncales mesenquimatosas almacenadas a una temperatura de -135°C o inferior, y después descongeladas y mantenidas a temperatura ambiente durante 6, 8, 24 ó 32 horas.

15 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la obtención de células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 13 pg/10⁶ células, que comprende:

20 determinar la cantidad de receptor de TNF- α de Tipo I expresado por las células troncales mesenquimatosas en cada uno de por lo menos una población celular que incluye las células troncales mesenquimatosas obtenidas de por lo menos un donante; y

seleccionar las células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor de TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 13 pg/10⁶ células.

25 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la determinación de la potencia inmunosupresora de las células troncales mesenquimatosas que comprende la medición del nivel de expresión del receptor del TNF- α de Tipo I por las células troncales mesenquimatosas.

30 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la selección de células troncales mesenquimatosas que presentan una actividad inmunosupresora que comprende la selección de una población de células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor del TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 13 pg/10⁶ células.

35 Las células troncales mesenquimatosas expresan el receptor del TNF- α de Tipo I (TNFRI) en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de linfocitos. En una forma de realización, las células troncales mesenquimatosas expresan el TNFRI en una cantidad de por lo menos 13 pg/10⁶ células. En otra forma de realización, las células troncales mesenquimatosas expresan el TNFRI en una cantidad de por lo menos 15 pg/10⁶ células. Y en otra forma de realización, las células troncales mesenquimatosas expresan el TNFRI en una cantidad de por lo menos 18 pg/10⁶ células.

40 Aunque el alcance de la presente invención no está limitado a ningún razonamiento teórico, se ha descubierto que las células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor del TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 13 pg/10⁶ células inhiben la proliferación de linfocitos. Estas células troncales mesenquimatosas son especialmente útiles para inhibir respuestas inmunológicas, y más especialmente estas células troncales mesenquimatosas son útiles para el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped; rechazo del trasplante de órgano sólido como, por ejemplo, rechazo de trasplante de corazón, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de páncreas, rechazo de trasplante de intestinos, y rechazo de trasplante de riñón; y enfermedades autoinmunitarias como, por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes de Tipo I, enfermedad de Crohn, síndrome de Guillain-Barré, lupus eritematoso, miastenia gravis, neuritis óptica, psoriasis, enfermedad de Grave, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis de Ord., anemia aplásica, síndrome de Reiter, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome de opoclonus-mioclonus, arteritis temporal, encefalomiелitis aguda diseminada, síndrome de Goodpasteur, granulomatosis de Wegener, enfermedad celiaca, pénfigo, poliartritis, anemia hemolítica autoinmunitaria por anticuerpos calientes, y esclerodermia.

55 En una forma de realización, las células troncales mesenquimatosas se obtienen de un mamífero. El mamífero puede ser un primate, que incluyen humano y primates no humanos.

60 Las células troncales mesenquimatosas pueden ser una composición homogénea o pueden ser una población celular mezclada enriquecida con MSC. Las composiciones homogéneas de células troncales mesenquimatosas se pueden obtener mediante el cultivo de células adherentes de médula ósea o de células periósticas, y las células troncales mesenquimatosas se pueden definir mediante marcadores de la superficie celular que se identifican con anticuerpos monoclonales únicos. Un procedimiento para la obtención de una población celular enriquecida en células troncales mesenquimatosas se describe, por ejemplo, en la patente US n° 5.486.359. Las fuentes alternativas de células troncales mesenquimatosas comprenden, de manera no limitativa, la sangre, la piel, el cordón umbilical, el músculo, la grasa, el hueso y el pericondrio.

La cantidad de receptor del TNF- α celular, como el receptor del TNF- α de Tipo I, que se expresa en un cultivo de células troncales mesenquimatosas se puede determinar mediante los procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos comprenden de manera no limitativa, ensayos cuantitativos como los ensayos cuantitativos ELISA, por ejemplo. Debe apreciarse, sin embargo, que el alcance de la presente invención no está limitado a un procedimiento en particular para determinar la cantidad de receptor del TNF- α .

En una forma de realización, la cantidad de receptor del TNF- α expresado por un cultivo de células troncales mesenquimatosas se determina mediante un ensayo ELISA. En este ensayo, se añade un lisado celular de un cultivo de células troncales mesenquimatosas en un pocillo de una placa ELISA. El pocillo se puede recubrir con un anticuerpo, tanto anticuerpos monoclonales como policlonales, frente al receptor del TNF- α . Después, se lava el pocillo y se pone en contacto con un anticuerpo, tanto un anticuerpo monoclonal como policlonal, frente al receptor del TNF- α . El anticuerpo se conjuga con una enzima adecuada como, por ejemplo, peroxidasa de rábano. Después, se puede incubar el pocillo, y se lava después del periodo de incubación. Después, los pocillos se ponen en contacto con un sustrato adecuado como, por ejemplo, uno o más cromógenos. Los cromógenos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina. Después de añadir el/ los sustrato(s), el pocillo se incuba durante un periodo de tiempo adecuado.

Cuando se ha completado la incubación, se añade una solución "de parada" al pocillo para detener la reacción de la enzima con el/los sustrato(s). Después, se mide la densidad óptica (DO) de la muestra. La densidad óptica de la muestra se extrapola con la densidad óptica de muestras que contienen cantidades conocidas de receptor del TNF- α para determinar la cantidad de receptor de TNF- α expresada por el cultivo de células troncales mesenquimatosas que se han sometido a prueba.

Por consiguiente, la presente invención proporciona la selección de una población de células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor del TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos $13 \text{ pg}/10^6$ células. Estas células troncales mesenquimatosas se pueden mezclar después con un vehículo farmacéuticamente adecuado para el tratamiento de enfermedades y trastornos indicados anteriormente en la presente memoria. Por ejemplo, las células troncales mesenquimatosas se pueden administrar como una suspensión celular que incluye un medio líquido farmacéuticamente aceptable para su inyección.

Las células troncales mesenquimatosas proporcionadas según la presente invención se administran a un animal en una cantidad eficaz para tratar una o más de las enfermedades o trastornos indicados anteriormente en el animal. El animal puede ser un mamífero, y el mamífero puede ser un primate, que incluye humanos y primates no humanos. Las células troncales mesenquimatosas se pueden administrar por vía sistémica, como, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intrarterial o intraperitoneal. La dosis exacta de células troncales mesenquimatosas que se debe administrar depende de varios factores, que incluyen, pero no se limitan, a la edad, al peso y al sexo del paciente, el/las enfermedad(es) o el/los trastorno(s) que se tratan, y su alcance y gravedad.

A continuación, se describirá la invención haciendo referencia a los ejemplos no limitativos del alcance de la presente invención siguientes.

Ejemplo 1

Para investigar el papel del TNFRI en la actividad inmunosupresora de las hMSC, se transfectaron hMSC de forma transitoria mediante oligonucleótidos del tipo TNFRI antisentido con el propósito de disminuir la expresión del TNFRI (Shen, et al., *J.Biol. Chem.* Vol. 272, pgs. 3550-3553 (1997)). Para alcanzar diferentes niveles de inhibición de la expresión del TNFRI, se utilizaron tres concentraciones diferentes de oligonucleótidos para los experimentos de transfección. Se utilizaron MSC no transfectadas y MSC transfectadas con un oligonucleótido sentido como controles. Se analizó la expresión del TNFRI en las hMSC en los lisados celulares mediante ELISA, y se investigó el efecto de la reducción en la expresión del TNFRI sobre la capacidad de las hMSC para inhibir la proliferación de hPBMC *in vitro*.

Para el análisis, se utilizaron las MSC derivadas de la médula ósea humana en el pase 5 a 7 de donantes diferentes. Las células se obtuvieron a partir de aspirados en la médula ósea y se aislaron utilizando hespano. Después, las células se cultivaron a través del pase 5, y se congelaron en una solución crioconservante estándar que contenía 5% de albúmina sérica bovina (HSA) y un 10% de dimetilsulfóxido en Plasmalyte A. (Baxter). Las células se guardaron a una temperatura de -80°C antes de su análisis. El día del experimento, las hMSC se descongelaron, se contaron y se colocaron en unas placas de cultivo de 6 pocillos a $2,5 \times 10^5$ células/pocillo. Después de la incubación durante la noche, las células se transfectaron con oligonucleótidos de TNFRI sentido o antisentido a unas concentraciones de 1,25, 2,5 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ según el protocolo de transfección del fabricante del reactivo (Invitrogen, el producto de inserción del reactivo de transfección Cellfectin). Tras 24 horas de la transfección, las células se extrajeron de las placas. Se lisó un grupo de células, y se analizó mediante ELISA la expresión del TNFRI en las células lisadas según el protocolo del ELISA de sTNFRI (R&D Systems, inserto de producto). La expresión del TNFRI se expresó en pg del receptor por 1×10^6 células.

Para el ensayo ELISA, se lisaron $2,5 \times 10^5$ MSC directamente en los pocillos que utilizan 250 μ l/pocillo de reactivo Cell Lytic de lisis celular/extracción de células de mamíferos (Sigma, Catálogo No. C-2978) que contenía una mezcla completa de inhibidor de proteínas (Roche). Después, los lisados celulares se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000-14.000 rpm en una centrifuga Eppendorf para extraer el material insoluble de la solución del tampón del lisado. Después, se recogieron los lisados celulares en un nuevo tubo para su utilización en un ensayo ELISA.

También se realizó un procedimiento alternativo del lisado celular, es decir, la lisis de sedimentos celulares en tubos, para las células congeladas y para las células recogidas de las placas o frascos de cultivo. Ambos procedimientos, la lisis directa en placas de cultivo y la lisis de los sedimentos celulares en tubos, proporcionaron resultados comparables.

Se utilizó el kit ELISA comercialmente disponible por Quantikine®, Human sTNFR1 (Catalogo No. DRT 100, R&D Systems) para la detección del TNFR1 en lisados celulares. Este ensayo proporcionó las mediciones tanto del TNFR1 soluble como del asociado a células (Qjwang, et al., *Biochemistry*, Vol. 36, pg. 6033 (1997)). El ensayo utiliza la técnica del inmunoensayo enzimático cuantitativo de tipo sándwich. El ensayo utiliza una microplaca que incluye pocillos que se han recubierto previamente con un anticuerpo monoclonal específico para el TNFR1. Los TNFR1 presentes en las muestras del calibrador, en las muestras de control de calidad o en las muestras de los lisados celulares de MSC se capturan por el anticuerpo del TNFR1 inmovilizado. Después de un lavado para extraer las sustancias no unidas, se añaden a los pocillos anticuerpos policlonales unidos por enzima específicos para el TNFR1. Después de una etapa de lavado para extraer los anticuerpos unidos a enzima no unidos, se añadió una solución de sustrato a los pocillos, y el color aparece en proporción a la cantidad de TNFR1 unido. Después, se detiene el desarrollo de color, y se mide la intensidad del color utilizando un lector de ELISA.

Los detalles del ELISA se proporcionan a continuación en la presente memoria.

Se añadieron a los pocillos de una placa ELISA 50 μ l del diluyente de ensayo HD-1-7, una base de proteína tamponada con conservante. Los pocillos se recubrieron con un anticuerpo monoclonal específico para el TNFR1. Después, se añadieron a los pocillos 200 μ l de muestras calibradas (que contenían 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml ó 7,813 pg/ml de TNFR1 humano soluble), o de muestras de control de calidad (que contenían 45 pg/ml, 100 pg/ml ó 250 pg/ml de TNFR1 humano) o de lisados celulares. Antes de la adición de las muestras de control de calidad y de calibración, estas muestras se trataron con el Cell Lytic de lisis celular/extracción de células de mamíferos (Sigma) y una mezcla completa de inhibidor de proteínas (Roche) tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Después, la placa se cubrió con una tira adhesiva y se incubó durante 2 horas \pm 10 minutos a temperatura ambiente.

Después, el líquido de cada pocillo se decantó poniendo boca abajo la placa sobre el fregadero, y después la placa se lavó tres veces. La placa se lavó cada vez con 400 μ l de un tampón de lavado añadido a cada pocillo. Se extrajo el líquido residual poniendo boca abajo la placa y secándola.

Después, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de anticuerpos policlonales de TNFR1 soluble conjugados con peroxidasa de rábano. La placa se incubó durante 2 horas \pm 10 minutos a temperatura ambiente. El líquido de cada pocillo se decantó, y se lavó cada pocillo tres veces con 400 μ l de tampón de lavado como se ha descrito anteriormente en el documento presente.

Después, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de una solución de sustrato de peróxido de hidrógeno estabilizado y cromógeno de tetrametilbencidina estabilizado. La placa se incubó durante 2 horas \pm 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadieron a cada pocillo 50 μ l de una solución de ácido sulfúrico 2N. Se midió la densidad óptica (DO) de cada muestra a los 30 minutos con un test de 450 nm y un filtro de referencia de 570 nm. Los valores de la densidad óptica se extrapolaron con las cantidades de TNFR1 en las muestras de lisado celular.

La cuantificación se consiguió comparando la señal de las muestras de los lisados celulares de MSC con los estándares de TNFR1 sometidos a prueba al mismo tiempo. Cada test ELISA realizado proporcionó una curva de calibración e incluyó unas muestras de control de calidad duplicadas colocadas en placas antes y después de las muestras de prueba. Las muestras de control de calidad se utilizaron para evaluar la validez del test ELISA.

Los datos de la expresión del TNFR1 se expresaron en picogramos del receptor por 1×10^6 células. Los datos en crudo (en pg/ml) reflejan el TNFR1 en picogramos por 1×10^6 células ($2,5 \times 10^5$ células se lisaron en 250 μ l de reactivo de lisado, correspondiente, por consiguiente, a 1×10^6 células/ml).

Los valores del test ELISA para las muestras de calibración se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1. Cálculos para los estándares de calibración del test ELISA

Muestra de calibración	Concentración teórica de calibradores (pg/ml)	Valores de la DO*	Valor medio de DO	Desviación estándar	Cálculo de la concentración control para los estándares (pg/ml)	Cálculo de la concentración media de los estándares (pg/mL)	% de DFT*	% de CV*
Estándar 01	500	2,431	2,437	0,008	498,003	499,923	-	0,3
		2,443						
Estándar 02	250	1,487	1,476	0,016	252,746	250,306	0,123	1,1
		1,484						
Estándar 03	125	0,804	0,815	0,015	122,64	124,447	-	1,8
		0,825						
Estándar 04	62,5	0,453	0,442	0,016	64,774	63,024	0,839	3,5
		0,431						
Estándar 05	31,25	0,25	0,239	0,016	32,724	30,939	-0,996	6,8
		0,227						
Estándar 06	15,625	0,143	0,145	0,002	15,765	16,007	2,446	1,5
		0,146						
Estándar 07	7,813	0,092	0,093	0,001	7,368	7,537	-	1,5
		0,094						
					7,706			

*Nota: DO – densidad óptica; % de DFT - % de diferencia con el teórico; % de CV - % de coeficiente de variación.

5

Los valores ELISA para las muestra de control de calidad se muestran en la Tabla 2

Tabla 2. Cálculos del test ELISA de las muestras de control de calidad (CC)

Muestras de CC:	Concentraciones teóricas para las mCC (pg/mL)	Valores de CO*	Valor medio de CO	Desviación estándar	Cálculo de la concentración control para las MCC (pg/ml)	Cálculo de la concentración media de las mCC (pg/mL)	% de DFT*	% de CV*
mCC Frente								
CC01	45	0,366	0,372	0,008	50,991	51,938	15,417	2,3
		0,378						
CC02	100	0,753	0,733	0,028	113,944	110,572	10,572	3,9
		0,713						
CC03	250	0,503	1,509	0,008	256,165	257,454	2,982	0,6
		1,515						
mCC posterior								
CC01	45	0,315	0,332	0,024	42,964	45,638	1,418	7,2
		0,349						
CC02	100	0,712	0,698	0,021	107,033	104,609	4,609	2,9
		0,683						
CC03	250	1,547	1,558	0,015	265,671	267,967	7,187	1
		1,568						
					270,263			

*Nota: DO – densidad óptica; % de DFT - % de diferencia con el teórico; % de CV - % de coeficiente de variación.

10

Sobre la base a los valores ELISA para las muestras de calibración y de control de calidad que se muestran en las Tablas 1 y 2 anteriores, se determinó la expresión del TNFRI en pg por 1×10^6 células por muestras de células troncales mesenquimatosas de donantes. Tal como se ha descrito anteriormente, las células troncales mesenquimatosas de cada donante no eran transfectadas o transfectadas con un oligonucleótido TNFRI sentido o

15

antisentido a una concentración de 1,25, 2,5 o 5 µg/ml. Los valores ELISA y la cantidad de TNFRI expresado por cada una de las muestras de células troncales mesenquimatosas de cada uno de los donantes se muestran en la Tabla 3 a continuación.

5 **Tabla 3. Cálculos del test ELISA para las muestras.**

Donante de hMSC	Descripción de la muestra:	Valores de DO*	Valor medio de DO	DE*	Concentración calculada en (pg/mL)	Concentración media (pg/mL)	TNFRI en pg por 1x10 ⁶ células	% de CV *
24	Control (células no transfectadas)	0,385	0,384	0,001	53,989	53,831	53,831	0,4
		0,383			53,674			
	Control de células transfectadas con oligos a 5 µg/mL	0,278	0,266	0,018	37,15	35,186	35,186	6,7
		0,253			33,221			
	Control de células transfectadas con oligos a 2,5 µg/mL	0,348	0,352	0,006	48,155	48,785	48,785	1,6
		0,356			49,415			
	Control de células transfectadas con oligos a 1,25 µg/mL	0,386	0,378	0,012	54,147	52,806	52,806	3,2
		0,369			51,464			
	Células transfectadas con oligonucleótidos de TNFRI antisentido a 5 µg/mL	0,117	0,113	0,006	11,533	10,79	10,79	5,7
		0,108			10,047			
	Células transfectadas con oligos de TNFRI antisentido a 2,5 µg/mL	0,254	0,245	0,013	33,378	31,962	31,962	5,2
		0,236			30,546			
	Células transfectadas con oligos de TNFRI antisentido a 1,25 µg/mL	0,321	0,311	0,015	43,907	42,257	42,257	4,8
		0,3			40,607			
007	Control (células no transfectadas)	0,368	0,367	0,002	51,306	51,07	51,07	0,6
		0,365			50,833			
	Control de células transfectadas con oligos a 5 µg/mL	0,226	0,219	0,01	28,97	27,866	27,866	4,5
		0,212			26,761			
	Control de células transfectadas con oligos a 2,5 µg/mL	0,293	0,272	0,03	39,507	36,128	36,128	11,2
		0,25			32,749			
	Control de células transfectadas con oligos a 1,25 µg/mL	0,308	0,286	0,032	41,864	38,329	38,329	11,1
		0,263			34,793			

ES 2 415 855 T3

	µg/mL							
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 5 µg/mL	0,123	0,114	0,013	12,517	10,494	10,494	11,8
		0,104			9,382			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 2,5 µg/mL	0,269	0,243	0,037	35,736	31,565	31,565	15,5
		0,216			27,393			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 1,25 µg/mL	0,313	0,303	0,014	42,65	41,078	41,078	4,7
		0,293			39,507			
014	Control (células no transfectadas)	0,377	0,38	0,004	52,726	53,2	53,2	1,1
		0,383			53,674			
	Control de células transfectadas con oligos a 5 µg/mL	0,251	0,249	0,003	32,907	32,592	32,592	1,1
		0,247			32,277			
	Control de células transfectadas con oligos a 2,5 µg/mL	0,338	0,315	0,033	46,581	42,887	42,887	10,6
		0,291			39,193			
	Control de células transfectadas con oligos a 1,25 µg/mL	0,356	0,347	0,013	49,415	47,919	47,919	3,9
		0,337			46,424			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 5 µg/mL	0,11	0,104	0,008	10,378	9,379	9,379	8,2
		0,098			8,379			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 2,5 µg/mL	0,211	0,206	0,008	26,603	25,733	25,733	3,8
		0,2			24,864			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 1,25 µg/mL	0,3	0,294	0,008	40,607	39,664	39,664	2,9
		0,288			38,722			
	Control (células no transfectadas)	0,475	0,469	0,009	68,284	67,246	67,246	2
		0,462			66,209			
	Control de células transfectadas con oligos a 5 µg/mL	0,278	0,279	0,001	37,15	37,308	37,308	0,5
		0,28			37,465			
	Control de	0,34	0,343	0,004	46,896	47,289	47,289	1

ES 2 415 855 T3

015	células transfectadas con oligos a 2,5 µg/mL	0,345			47,683			
	Control de células transfectadas con oligos a 1,25 µg/mL	0,419	0,413	0,009	59,37	58,34	58,34	2,2
		0,406			57,31			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 5 µg/mL	0,13	0,125	0,007	13,658	12,842	12,842	5,7
		0,12			12,025			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 2,5 µg/mL	0,253	0,262	0,012	33,221	34,557	34,557	4,6
		0,27			35,893			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 1,25 µg/mL	0,377	0,381	0,005	52,726	53,279	53,279	1,3
		0,384			53,381			
	23	Control (células no transfectadas)	0,260	0,255	0,008	40,591	39,632	39,632
0,249					38,672			
Control de células transfectadas con oligos a 5 µg/mL		0,191	0,184	0,010	28,560	27,339	27,339	5,4
		0,177			26,117			
Control de células transfectadas con oligos 2,5 µg/mL		0,216	0,209	0,009	32,919	31,786	31,786	4,4
		0,203			30,653			
Control de células transfectadas con oligos a 1,25 µg/mL		0,222	0,222	0,000	33,965	33,965	33,965	0,0
		0,222			33,965			
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 5 µg/mL		0,107	0,106	0,001	13,798	13,620	13,620	1,3
		0,105			13,441			
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 2,5 µg/mL		0,206	0,187	0,027	31,176	27,860	27,860	14,4
		0,168			24,544			
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 1,25 µg/mL		0,213	0,212	0,001	32,396	32,222	32,222	0,7
		0,211			32,048			
Control (células no	0,249	0,249	0,001	41,244	41,148	41,148	0,3	
	0,248			41,053				

ES 2 415 855 T3

486	transfectadas)							
	Control de células transfectadas con oligos a 5 µg/mL	0,149	0,136	0,018	22,401	19,981	19,981	13,5
		0,123			17,560			
	Control de células transfectadas con oligos a 2,5 µg/mL	0,246	0,231	0,022	40,672	37,732	37,732	9,5
		0,215			34,792			
	Control de células transfectadas con oligos a 1,25 µg/mL	0,263	0,253	0,015	43,915	41,913	41,913	5,9
		0,242			39,911			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 5 µg/mL	0,071	0,068	0,004	7,917	7,361	7,361	6,2
		0,065			6,805			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 2,5 µg/mL	0,142	0,142	0,000	21,096	21,096	21,096	0,0
		0,142			21,096			
	Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 1,25 µg/mL	0,193	0,179	0,021	30,644	27,924	27,924	11,5
		0,164			25,204			
	13	Control (células no transfectadas)	0,211	0,209	0,003	34,037	33,659	33,659
0,207					33,282			
Control de células transfectadas con oligos a 5 µg/mL		0,134	0,134	0,015	19,606	19,513	19,513	0,5
		0,133			19,420			
Control de células transfectadas con oligos a 2,5 µg/mL		0,195	0,188	0,011	31,020	29,611	29,611	5,7
		0,180			28,201			
Control de células transfectadas con oligonucleótidos a 1,25 µg/mL		0,207	0,192	0,022	33,282	30,366	38,329	11,4
		0,176			27,451			
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 5 µg/mL		0,087	0,080	0,010	10,882	9,585	9,585	12,4
		0,073			8,288			
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 2,5 µg/mL		0,156	0,135	0,030	23,708	19,706	19,706	22,6
		0,113			15,703			

Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 1,25 µg/mL	0,208	0,174	0,048	33,470	27,097	27,097	27,6
	0,140			20,723			

*Nota: DO – densidad óptica; % de DFT - % de diferencia con el teórico; % de CV - % de coeficiente de variación.

5 A partir de los datos anteriores mostrados en la Tabla 3, se determinó la expresión media del TNFRI, en picogramos por 1×10^6 células para las células troncales mesenquimatosas no transfectadas (control), y también para las células troncales mesenquimatosas transfectadas con 1,25, 2,5 o 5 µl/ml de oligonucleótido sentido o antisentido. Los valores medios de la expresión del TNFRI se muestran en la Tabla 4 siguiente.

10 **Tabla 4. Expresión del TNFRI por las hMSC transfectadas con oligonucleótido antisentido y control (con sentido): resumen de 7 donantes de hMSC testados.**

Donante de hMSC #:	Expresión de TNFRI en pg por 1×10^6 células							Media para 7 donantes	DE
	486	13	24	007	14	15	23		
Control (células no transfectadas)	41*	34	54	51	53	67	40	48,57	11,09
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 5 µg/mL	7	10	11	11	9	13	14	10,71	2,36
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 2,5 µg/mL	21	20	32	32	26	35	28	27,71	5,74
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 1,25 µg/mL	28	27	42	41	40	53	32	37,57	9,22
Control (sentido) transfectadas con oligos a 5 µg/mL	20	20	35	28	33	37	27	28,57	6,85
Control (sentido) transfectadas con oligos a 2,5 µg/mL	38	30	49	36	43	47	32	39,29	7,30
Control (sentido) transfectadas con oligos a 1,25 µg/mL	42	30	53	38	48	58	34	43,29	10,21

*Nota: estos valores representan la media de las cantidades de TNFRI (de la Tabla 3, columna 8: TNFRI en pg por 1×10^6 células) redondeando a números enteros.

15 Se utilizó un segundo grupo de células transfectadas para investigar el efecto de las hMSC en la proliferación de hPBMC *in vitro*. En este ensayo se utilizaron PBMC humanas de dos donantes diferentes. Las PBMC se aislaron a partir de sangre por leucoféresis utilizando una centrifugación por gradiente de Ficoll-Paque según el protocolo del fabricante (Amersham Biosciences, Ficoll-Paque Plus producto inserto). Las células se guardaron congeladas a una temperatura de -80°C en un medio que incluía un 90% de PBS a y un 10% de DMSO antes del análisis. El día del experimento las hPBMC se descongelaron, se contaron y se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos a 1×10^5 células/pocillo junto con las hMSC (1×10^4 células/pocillo). Se utilizó una combinación de anticuerpos anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (1 µg/mL) para estimular la proliferación de linfocitos que representa un modelo *in vitro* para las características de la activación de células inmunológicas de EICH y de rechazo de órganos alogénos. (Trickett, et al., *J. Immunol. Methods*, Vol. 275, págs. 251-255 (2003); Koulova, et al., *J. Exp. Med.*, Vol. 173, No. 3, pgs. 759-762 (1991); Foster, et al., *Transplantation*, Vol. 76, No. 6; Czitrom, *Clin. Ortho. Relat. Res.*, Vol. 326, págs. 11-24 (1996)). Después, las placas se incubaron en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂. Se midió la proliferación de PBMC solas y en presencia de MSC el día 5 después del inicio del cultivo mediante la adición de [Metil-³H]-timidina a 1 µCi/pocillo durante las 18-20 horas finales de cultivo. Después del marcaje, las células se transfirieron a un filtro de vidrio utilizando un recolector de placas de 96 pocillos, y se midió la radioactividad incorporada al ADN mediante un contador beta de centelleo. La absorción de [Metil-³H]-timidina en el ADN en un recuento por minutos (CPM) representa la proliferación de hPBMC. Los resultados finales se expresan en % de inhibición de la proliferación de PBMC en presencia de MSC calculado como:

35 $100\% - [Proliferación (PBMC+MSC, cpm) \times 100 / Proliferación (PBMC, cpm)]$

Los resultados de las células troncales mesenquimatosas de cada uno de los donantes se muestran en la Tabla 5 siguiente.

5 **Tabla 5. Inhibición de la proliferación de hPBMC inducida por CD3/CD28 por hMSC transfectadas con oligonucleótidos antisentido y control (con sentido): resumen de 7 donantes de hMSC testados.**

Donante de hMSC #:	% inhibición de la proliferación de hPBMC por hMSC										% Media para 7 donantes	SD
	486		13		24	007	14	15	23			
Donante de hPBMC #:	2	3	2	3	3	3	3	2	2	3		
Control (células no transfectadas)	65	73	82	94	70	66	82	62	68	91	75,30	11,26
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 5 µg/mL	40	45	46	68	32	10	39	19	38	52	38,90	16,29
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 2,5 µg/mL	83	90	59	86	ND	73	ND	63	47	58	69,88	15,48
Células transfectadas con oligos antisentido de TNFRI a 1,25 µg/mL	62	74	86	ND	72	64	57	ND	72	80	70,88	9,58
Control (sentido) transfectadas con oligos a 5 µg/mL	38	87	60	77	58	77	62	44	52	53	60,80	15,50
Control (sentido) transfectadas con oligos a 2,5 µg/mL	60	91	67	ND	ND	62	66	57	70	95	71,00	14,22
Control (sentido) transfectadas con oligos a 1,25 µg/mL	87	ND	68	71	66	68	36	ND	49	85	70,57	12,77

Nota: ND – sin datos

10 Los datos anteriores en relación con la inhibición de la proliferación de hPBMC inducida por CD3/CD28 se correlacionaron con los datos de la expresión media del TNFRI mostrados en la Tabla 4 anterior. Los datos correlacionados en relación con la expresión media del TNFRI y la inhibición de la proliferación de hPBMC inducida por CD3/CD28 se muestran en la Tabla 6 siguiente.

15 **Tabla 6. Expresión del TNFRI y efecto sobre la proliferación de hPBMC *in vitro* por hMSC transfectadas con oligonucleótidos de TNFRI.**

Estado de las MSC	Concentración de oligonucleótido (µg/ml)	% de inhibición de la proliferación de hPBMC (media ± DE)	Expresión de TNFRI en pg /1x 10 ⁶ MSC (media ± DE)
No transfectadas (MSC control)	No aplicable	75,30 ± 11,26	78,57 ± 11,09
Oligonucleótido antisentido	1,25	70,88 ± 9,58	37,57 ± 9,22
	2,5	69,88 ± 15,48	27,71 ± 5,74
	5	38,90 ± 16,29	10,71 ± 2,36
Oligonucleótido con sentido (oligonucleótido control)	1,25	70,57 ± 12,77	43,29 ± 10,21
	2,5	71,00 ± 14,22	39,29 ± 7,30
	5	60,80 ± 15,50	28,57 ± 6,85

20 Los resultados de estos experimentos muestran que las hMSC con una expresión disminuida del TNFR de Tipo I (TNFRI) pierden su capacidad de inhibir la proliferación de hPBMC *in vitro*. Los datos apoyan la premisa de que la expresión del TNFRI es un vínculo esencial para la supresión de la proliferación de PBMC por parte de las MSC. Por consiguiente, el TNFRI se puede utilizar como un marcador potencial para la actividad inmunomoduladora de las MSC. Basándose en los datos obtenidos, un umbral de potencial de 13,07 pg de TNFRI (media ± DE) por 1 x 10⁶ células correlaciona con menos de un 50% de inhibición de la proliferación de hPBMC (Tabla 6, Figura 1). Por
 25 consiguiente, las células MSC no potentes son células que expresan menos de 13 pg de TNFRI por 1 x 10⁶ células.

Ejemplo 2**El TNFRI es un marcador sensible a la temperatura de la funcionalidad de las hMSC.**

5 La manipulación *ex vivo* de células de mamíferos está restringida por varios factores incluyendo la temperatura. Por ejemplo, para el almacenamiento de células se requieren temperaturas bajas como $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$, o inferior, incluso tan bajas como -135°C o inferior (nitrógeno líquido) mientras que la expansión celular *ex vivo* requiere una temperatura de $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. La exposición celular a temperaturas fuera de los intervalos óptimos puede conducir a una disminución de la funcionalidad celular o a la muerte celular. Las células de mamíferos son capaces de soportar fluctuaciones de temperatura menores a corto plazo; sin embargo, cada tipo de célula presenta su propio rango de tolerancia para el mantenimiento, transporte y almacenamiento del cultivo celular.

15 El nivel de expresión del TNFRI en las hMSC se correlaciona con la actividad inmunosupresora de la hMSC. Se ha determinado como umbral el nivel de la expresión del TNFRI por parte de las hMSC inferior a $13\text{ pg}/10^6$ células, por de bajo del cual las hMSC comienzan a perder su capacidad de suprimir una respuesta inmunológica (ver Figura 1). Por consiguiente, la expresión del TNFRI es un marcador de la inmunosupresión de la hMSC, una actividad que se cree que es esencial para que las MSC sean eficaces para el tratamiento de reacciones inmunológicas que tienen lugar en EICH, rechazo de órganos, enfermedades autoinmunitarias, y otras enfermedades. En este documento se han investigado los efectos de las fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento de hMSC congeladas así como el efecto del tiempo de exposición de las células a temperatura ambiente del TNFRI en las hMSC.

Efecto de las fluctuaciones de la temperatura de almacenamiento en la expresión del TNFRI y en el potencial inmunosupresor de la hMSC

25 El objetivo de estos experimentos fue investigar la capacidad de las hMSC para mantener sus características funcionales después de una exposición a temperaturas superiores a -80°C , que no son las temperaturas óptimas de almacenamiento de las células congeladas. Se congelaron células MSC humanas en el Pase 5 y se almacenaron en un congelador a una temperatura de $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$. Después de varias semanas, se extrajeron del congelador a una temperatura de $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ bolsas de las células congeladas y se colocaron a $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$, a $-60\pm 5^{\circ}\text{C}$ o a $-50\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 72 \pm 2 horas. Después de 72 \pm 2 horas, las bolsas se volvieron a almacenar a una temperatura de $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante por lo menos 24 horas antes de descongelarlas y analizarlas. Un grupo de bolsas que se trasladó de un congelador a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ a otro, siguiendo el mismo esquema que para las otras bolsas que se utilizaron como control. El día del experimento, las bolsas que contenían las células se descongelaron, se contaron las células, y se prepararon los lisados celulares para el ELISA TNFRI tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se resumen en la Figura 2 (bars muestran los valores medios TNFRI SD para 3 hMSC bolsas). Se realizó el test ELISA TNFRI tal como se describe en el Ejemplo 1. Los datos mostraron que la exposición de las hMSC a temperaturas de $-60\pm 5^{\circ}\text{C}$ y $-50\pm 5^{\circ}\text{C}$ hizo disminuir el nivel de expresión del TNFRI: el nivel del TNFRI detectado para el test ELISA fue inferior al umbral potencial de las hMSC determinado de $13\text{ pg}/10^6$ células (representado por la línea continua en el gráfico).

40 Paralelamente a la medición del TNFRI, se utilizaron dos bolsas con hMSC almacenadas a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ (la temperatura de almacenamiento óptima que sirvió como control) y a una temperatura de $-50\pm 5^{\circ}\text{C}$ (correspondiente a $+30^{\circ}\text{C}$ más que la temperatura de almacenamiento óptima de $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$) para investigar la actividad inmunosupresora de la hMSC. Se evaluó la capacidad de las MSC para suprimir la proliferación de hPBMCs inducida por anti-CD3/CD28 *in vitro* tal como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados mostraron que las hMSC almacenadas a $-50\pm 5^{\circ}\text{C}$ perdieron su capacidad de suprimir la proliferación de hPBMC, mientras que las células almacenadas a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ inhibieron la proliferación de hPBMC en un 92% (Figura 3, las barras oscuras representan la media del $\pm\%$ DE de la inhibición de la proliferación de hPBMC. Los números en el interior de las barras oscuras muestran los valores numéricos). La actividad inmunosupresora de las MSC depende del nivel de expresión del TNFRI: las células que expresan más de $13\text{ pg}/10^6$ células de TNFRI, que se había determinado como el umbral potencial de inmunosupresión de MSC, son biológicamente activas, y las células con un nivel de TNFRI inferior a $13\text{ pg}/10^6$ células no lo son (Figura 3, las barras claras representan la media del $\pm\%$ DE del nivel de expresión del TNFRI. Los números en el interior de las barras claras muestran los valores numéricos). Por consiguiente, las temperaturas de almacenamiento que no óptimas hacen disminuir la expresión del TNFRI en las hMSC, lo cual está correlacionado con una disminución de la funcionalidad de la hMSC.

Efecto del tiempo de la exposición celular a temperatura ambiente sobre la expresión del TNFRI en la hMSC

60 Los resultados de este experimento sirven como una evidencia adicional de que la expresión del TNFRI en las hMSC disminuye bajo una exposición celular a temperaturas no óptimas. En este experimento se estudió el efecto del almacenamiento de una suspensión celular a temperatura ambiente en la expresión del TNFRI. Se utilizaron dos lotes de hMSC en el experimento. Antes del experimento, las bolsas que contenían hMSC se almacenaron a $\leq -135^{\circ}\text{C}$. El día del experimento las células se descongelaron y se diluyeron con una solución fisiológica Plasmalyte A (Baxter) de una forma que imita el procesamiento celular actual para la administración intravenosa de hMSC en situaciones clínicas. Las células descongeladas y diluidas se mantuvieron a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} - 24^{\circ}\text{C}$), y se tomaron muestras que se testaron para comprobar la cantidad de TNFRI a 0 (inmediatamente después de la descongelación), 6, 8, 10, 24 y 32 horas después de la descongelación. Los resultados mostraron que la exposición

5 de las hMSC a la temperatura ambiente hace disminuir el nivel de expresión del TNFRI en las hMSC (Figura 1, las barras representan la media \pm DE del nivel de expresión del TNFRI en dos lotes de hMSC. La línea oscura representa el nivel de expresión del TNFRI de $13 \text{ pg}/10^6$ células, que es el umbral potencial de la hMSC). La disminución significativa en la expresión del TNFRI se observó a las 24 horas y a las 32 horas, y está correlacionado con una disminución significativa de la viabilidad celular (inferior a un 20%, los datos no se muestran).

10 Por consiguiente, los experimentos descritos anteriormente muestran que la expresión del TNFRI por parte de las hMSC es sensible a la temperatura, y que el TNFRI se puede utilizar como marcador de la funcionalidad de las hMSC que han estado expuestas a temperaturas no óptimas durante el almacenamiento, transporte o procesamiento celular.

15 Se ha de entender, sin embargo, que el alcance de la presente invención no se limita a las formas de realización específicas descritas anteriormente. La invención se puede poner en práctica de otra forma diferente a la descrita en particular y mantenerse de todas formas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la obtención de células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor de TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 13 pg/10⁶ células, que comprende:
- 10 determinar la cantidad de receptor de TNF- α de Tipo I expresado por las células troncales mesenquimatosas en cada una de por lo menos una población celular que incluye las células troncales mesenquimatosas obtenidas de por lo menos un donante; y
- 15 seleccionar las células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor de TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 13 pg/10⁶ células.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que dichas células troncales mesenquimatosas expresan el receptor de TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 15 pg/10⁶ células, preferentemente 18 pg/10⁶ células.
- 20 3. Procedimiento para la determinación de la potencia inmunosupresora de las células troncales mesenquimatosas que comprende la medición del nivel de expresión del receptor de TNF- α de Tipo I por parte de las células troncales mesenquimatosas.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 3 en el que la expresión del receptor de TNF- α de Tipo I se mide mediante un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que dichas células troncales mesenquimatosas son células troncales mesenquimatosas humanas.
- 30 6. Procedimiento para la selección de células troncales mesenquimatosas con actividad inmunosupresora que comprende la selección de una población de células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor de TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 13 pg/10⁶ células.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6 en el que se selecciona una población de células troncales mesenquimatosas que expresan el receptor de TNF- α de Tipo I en una cantidad de por lo menos 18 pg/10⁶ células.
8. Procedimiento según la reivindicación 6 o 7 que comprende además la mezcla de dicha población celular seleccionada con un vehículo farmacéutico.

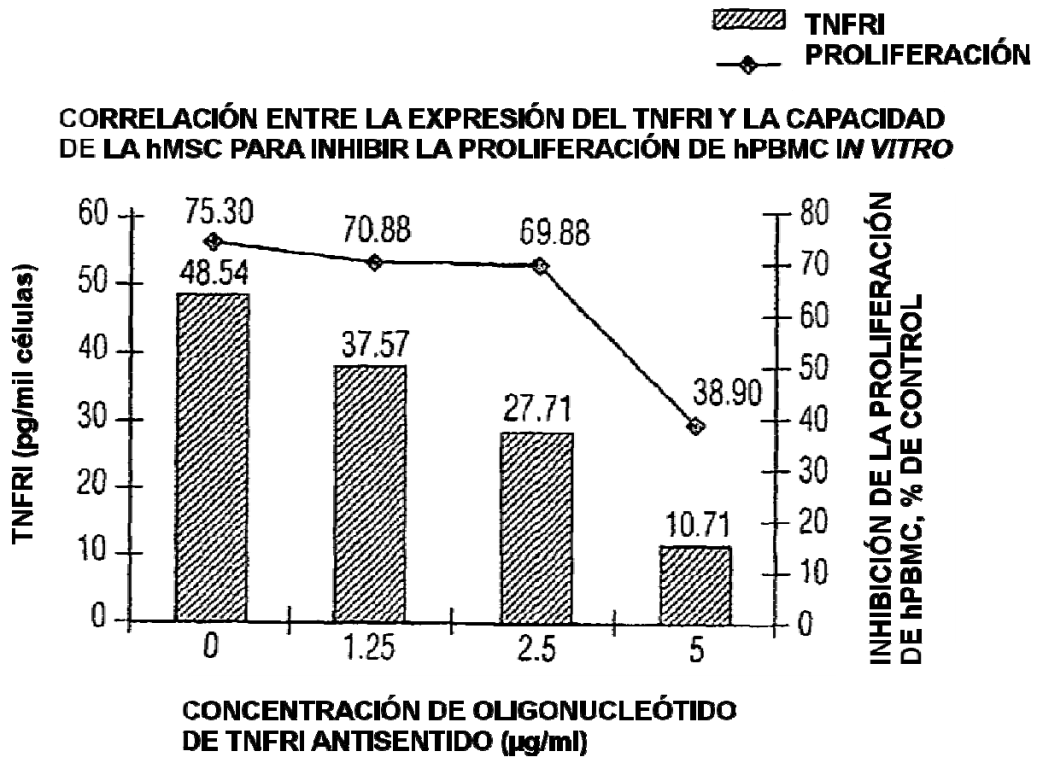


FIG. 1

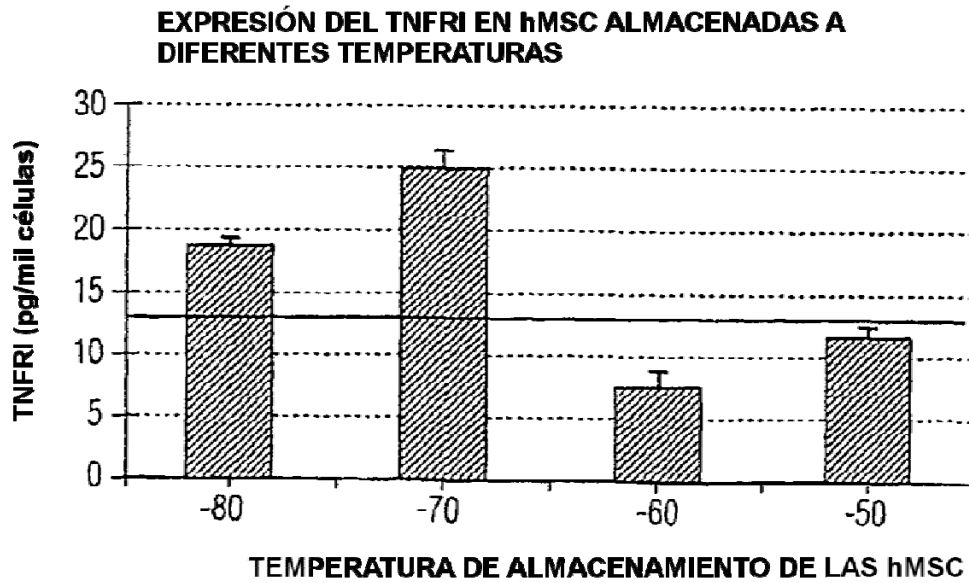


FIG. 2

DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNFRI EN hMSC CORRELACIONADA CON LA REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA DE LA MSC *IN VITRO*

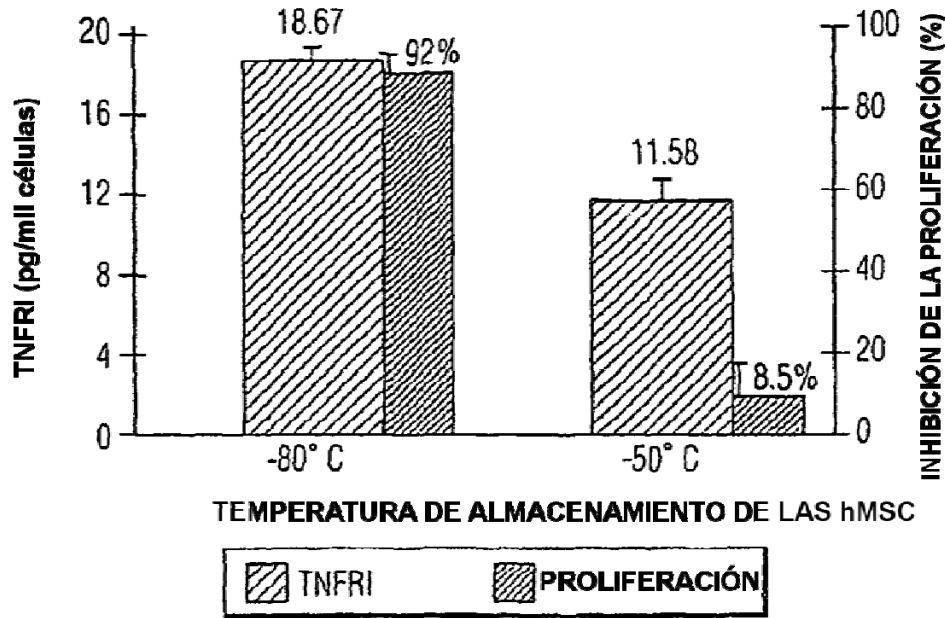


FIG. 3

EL ALMACENAMIENTO DE LA SUSPENSIÓN CELULAR DESCONGELADA A TEMPERATURA AMBIENTE DISMINUYE LA EXPRESIÓN DEL TNFRI EN LAS hMSC

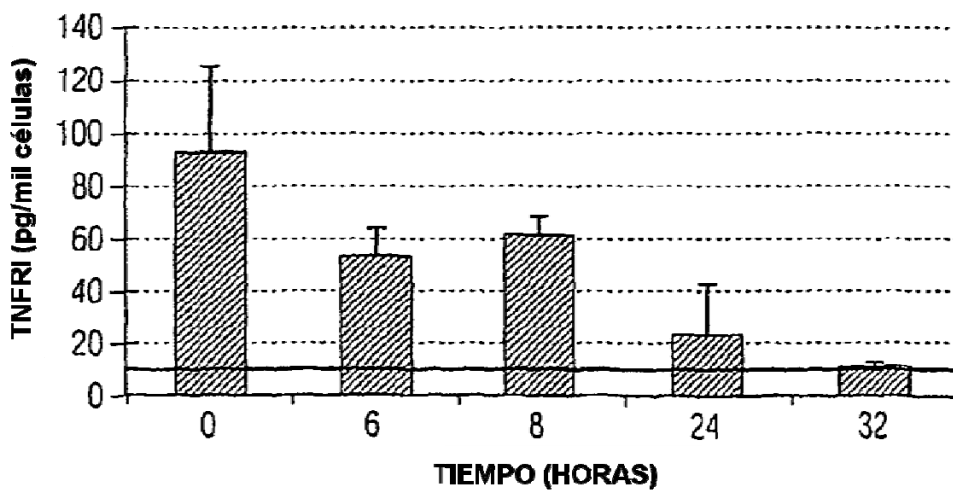


FIG. 4