

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 853**

21 Número de solicitud: 201230919

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.06.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.12.2013

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES
CARLOS III (100.0%)
Melchor Fernández Almagro, 3
28029 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ DE LA PEÑA, Manuel Ángel;
BERNAD MIANA, Antonio y
TOMÉ PIZARRO, María**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Marcador molecular de potencia terapéutica de células madre mesenquimales humanas y sus usos**

57 Resumen:

Marcador molecular de potencia terapéutica de células madre mesenquimales humanas y sus usos. La presente invención se relaciona con métodos para determinar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre, basándose en los niveles de expresión del microARN miR-335. Adicionalmente, la invención también se relaciona con métodos in vitro para incrementar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre, en donde dichos métodos comprenden tratar dicha célula madre con un inhibidor de miR-335. Finalmente, la invención se relaciona con usos y métodos terapéuticos para tratar a un sujeto con una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, la enfermedad de injerto contra huésped, o una enfermedad que requiera la inducción de tolerancia a un trasplante o la regeneración y/o reparación de tejidos, comprendiendo dichos usos y métodos terapéuticos la administración de una célula madre que presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335.

ES 2 434 853 A1

DESCRIPCIÓN

**MARCADOR MOLECULAR DE POTENCIA TERAPÉUTICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
HUMANAS Y SUS USOS**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y la biomedicina. Específicamente, la presente invención se refiere al uso de miR-335 como marcador molecular para cuantificar la potencia terapéutica de las células madre mesenquimales humanas empleadas en medicina regenerativa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células madre mesenquimales (MSC) son un tipo de células madre adultas especialmente prometedor por sus aplicaciones terapéuticas. Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) se aislaron y caracterizaron por primera vez en el estroma de la médula ósea, constituyendo una población totalmente diferente de las células madre hematopoyéticas, y su papel es contribuir a la regeneración de los tejidos conectivos no hematopoyéticos (hueso, cartilago, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo y estroma). En la actualidad, si exceptuamos las células madre hematopoyéticas, tradicionalmente empleadas en los trasplantes de médula ósea, son el principal tipo de células empleadas en ensayos clínicos para el tratamiento de patologías muy variadas. Las MSC tienen un gran potencial terapéutico en la regeneración de tejidos, ya que las MSC aisladas y expandidas en cultivo son capaces de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos, miocitos y adipocitos, entre otros tipos celulares, y pueden ser reintroducidas posteriormente en el cuerpo humano para reparar tejidos perdidos o dañados. Otra característica si cabe aún más valiosa en la práctica clínica es su capacidad de inmunomodulación, lo que las hace tremendamente útiles para el tratamiento de enfermedades de base inmune. Sin embargo, todavía se conoce muy poco sobre los mecanismos que regulan sus propiedades biológicas y terapéuticas.

Para la gran mayoría de las aplicaciones terapéuticas es necesario contar con un número de hMSC muy superior al que es posible obtener directamente de una biopsia. En consecuencia es necesario realizar procedimientos de expansión *ex vivo* que permita conseguir las dosis terapéuticas mínimas (10-100 millones).

Sin embargo, a lo largo de los últimos años, se han ido acumulando evidencias de que dicho proceso de expansión no se realiza en condiciones óptimas y que es recomendable minimizar el tiempo de expansión y reducir la tensión de oxígeno utilizada. El cultivo extenso de hMSC y MSC murinas (mMSC) promueve inestabilidad genética asociada al avance de la senescencia del cultivo. Además, el comportamiento de una biopsia durante la expansión celular es prácticamente impredecible, aunque parece existir una relación significativa con la edad del donante y/o su historial médico.

Recientemente se ha publicado que las hMSC obtenidas de donantes/pacientes con más edad resultan en preparaciones con propiedades terapéuticas reducidas. Los autores proponen que en mMSC la sobreexpresión de PEDF (pigment epithelium-derived factor) que se produce con la edad es un factor crítico que afecta a las propiedades terapéuticas de las células. Otras evidencias marcan alteraciones en diversas rutas. En cuanto a su capacidad osteogénica se ha confirmado que la principal diferencia entre MSC derivadas de donantes jóvenes y viejos es su reducida capacidad de proliferación y su mayor tendencia a la senescencia.

Asimismo, se ha podido confirmar que existen modificaciones epigenéticas en hMSC en genes relevantes asociados tanto con la edad del donante como con el cultivo *ex vivo*. De forma llamativa se ha podido confirmar que estas deficiencias pueden estar relacionadas con la mala calidad de la matriz extracelular.

Las MSC utilizadas para terapia celular son consideradas medicamentos, por lo que su uso debe atenerse a la Ley del medicamento, ser manipuladas según GMP, etc. Habitualmente una entidad terapéutica que va a ser utilizada como medicamento debe pasar por controles de esterilidad (ej: libre de micoplasma), identidad (marcadores), pureza (contaminantes), y potencia. La liberación de lotes de MSC para su uso en clínica debe ser en menos de 24 horas porque si no

las células mueren o se deterioran, por lo que actualmente no se realiza ningún control de potencia porque todos los métodos conocidos tardan semanas por cada lote.

Un problema de los bancos de células para uso clínico es que las MSC presentan una gran variabilidad en su potencial terapéutico. En la actualidad dicho potencial no se puede conocer a priori (son necesarios estudios costosos y dilatados en el tiempo), por lo cual se pueden llegar a almacenar muchas muestras que realmente sean subóptimas, con el consiguiente gasto y posibles perjuicios para los pacientes.

Existe pues la necesidad de desarrollar un método que permita determinar de forma rápida y eficaz el potencial terapéutico de los lotes de MSC con el fin de determinar su idoneidad para su administración a un paciente.

10 COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto que, sorprendentemente, existe una correlación entre los niveles de expresión del microARN miR-335 y el potencial terapéutico de las células madre mesenquimales humanas (hMSC). En concreto, existe una correlación entre los niveles de expresión de miR-335 y la capacidad inmunorreguladora de dichas células, de forma que una célula que expresa altos niveles de miR-335 posee una baja capacidad inmunorreguladora, y por tanto un bajo potencial terapéutico. Así, según se observa en la figura 5, hMSC modificadas de forma que sobreexpresan miR-335 poseen una capacidad de inhibición de la proliferación de linfocitos humanos significativamente menor que las células control. Adicionalmente, según se observa en la figura 6, la administración de MSC que sobreexpresan miR-335 a animales resulta en una mortalidad aumentada e respuesta a la administración de LPS con respecto a los ratones que no recibieron células, lo que indica que las MSC han perdido parte de la capacidad de regular la respuesta a LPS. Por tanto, en un primer aspecto la presente invención se relaciona con un método para determinar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre, que comprende determinar en dicha célula madre los niveles de expresión y/o actividad de miR-335, en donde niveles elevados con respecto a un valor de referencia son indicativos de que dicha célula madre tiene una baja capacidad inmunorreguladora, o en donde niveles disminuidos respecto a un valor de referencia son indicativos de que dicha célula madre tiene una elevada capacidad inmunorreguladora.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para determinar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre que comprende

- (i) reactivos adecuados para determinar el nivel de expresión de miR-335 y
- (ii) reactivos adecuados para determinar el nivel de expresión y/o de actividad de un marcador de la capacidad inmunorreguladora y/o un marcador de senescencia en dicha célula madre.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para incrementar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre, que comprende inhibir en dicha célula madre la expresión y/o actividad de miR-335.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un uso de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo formado por una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, la enfermedad de injerto contra huésped, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y una enfermedad cardiovascular.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un uso de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para preparar un medicamento para inducir tolerancia a un trasplante.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un uso de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para preparar un medicamento para la reparación y regeneración de tejidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para generar células T reguladoras, que comprende poner en contacto una población de células que contiene células T con una población de células madre caracterizadas porque presentan niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 en condiciones adecuadas para la generación de células T reguladoras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Los niveles de expresión de miR-335 en hMSC están directamente relacionados con la edad del donante. Expresión relativa de miR-335 (usando la expresión de RNU6B como control endógeno) medida por RT-PCR cuantitativa a tiempo real en diferentes tipos de hMSC provenientes de distintos donantes. A) Nivel de expresión de miR-335 medido en hMSC provenientes de médula ósea. B) Nivel de expresión de miR-335 medido en hMSC provenientes de tejido adiposo.

Figura 2. Los niveles de senescencia celular en los cultivos de hMSC están directamente relacionados con los niveles de expresión de miR-335. A) Se indujo la sobreexpresión de miR-335 en dos aislados distintos de hMSC (19, barras blancas, y 33, barras grises) mediante la transducción con un vector lentiviral que codifica miR-335, y se midieron los niveles de expresión de β -galactosidasa mediante tinción específica. Como control negativo se emplearon las mismas hMSC transducidas con el mismo vector lentiviral pero sin codificar dicho miRNA. B) Se indujo senescencia celular en los mismos dos aislados de hMSC mediante tratamiento con radiación gamma, y se midieron los niveles de expresión endógenos de miR-335 mediante RT-PCR en las células tratadas (irradiadas) o sin tratar (salvaje). Las barras de error corresponden al error estándar (N=3).

Figura 3. El nivel de expresión de miR-335 está inversamente relacionado con la longitud telomérica en hMSC. A) Se midió la longitud telomérica en hMSC (barras blancas) y hMSC transfectadas con una construcción lentiviral que permite la sobreexpresión de la telomerasa (barras grises). Las medidas se tomaron a los 21 y 89 días de cultivo. B) Expresión relativa de miR-335 medido por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (usando la medida de RNU6B como control endógeno) de hMSC (barras blancas) y hMSC-hTERT (barras grises) a los 5, 21 y 89 días de permanecer en cultivo.

Figura 4. Relación entre los niveles endógenos de miR-335 y la presión parcial de O₂ durante el cultivo. Se cultivaron hMSC de tejido adiposo de tres donantes distintos (Ad 36, Ad 40 y Ad 43) al 3% (barras blancas) o al 20% (barras negras) de O₂ durante una semana. Los niveles endógenos de miR-335 se midieron mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Figura 5. La sobreexpresión de miR-335 disminuye la capacidad inmunorreguladora *in vitro* de las hMSC. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas con SEB (1ng/mL), en ausencia o presencia de un número cada vez mayor de hMSC, las cuales fueron transducidas con la construcción lentiviral pLV-EmGFP-MIR335 o pLV-EmGFP-mock. La respuesta antiproliferativa se determinó a las 96 horas de cultivo midiendo la incorporación de BrdU en las PBMC.

Figura 6. La sobreexpresión de miR-335 disminuye la capacidad inmunorreguladora *in vivo* de las hMSC. Se indujo en un modelo murino (ratones BALBc) la muerte por endotoxemia mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de 400 μ g de LPS. Media hora después de la administración de LPS se administraron hMSC de médula ósea con el fin de evitar dicha muerte por endotoxemia. En este experimento se administraron 10⁵ células a cada animal (excepto los controles negativos) y se emplearon 10 ratones por cada uno de los siguientes grupos de experimentación: control negativo (LPS 400 μ g+PBS), hMSC sin modificar (LPS 400 μ g+bm-hMSC 19 wt), hMSC trasducidas con un vector lentiviral control, que codifica un miRNA sin dianas en el genoma humano (LPS 400 μ g+bm-hMSC 19 mock), y hMSC trasducidas con un vector lentiviral que codifica miR-335 (LPS 400 μ g+bm-hMSC 19 335). La figura muestra la curva de supervivencia de los animales de cada grupo experimental durante las 96 h tras la administración del LPS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los niveles de expresión de miR-335 están directamente relacionados con la senescencia (envejecimiento) celular e inversamente relacionados con la actividad inmunomoduladora de las hMSC, es decir, que células senescentes muestran mayores niveles de miR-335 y que niveles elevados de miR-335 resultan en células con mayor grado de senescencia y en células que tienen una menor capacidad inmunomoduladora. Dado que la actividad terapéutica de las hMSC depende principalmente de su actividad inmunomoduladora/antiinflamatoria, y que la senescencia celular induce un fenotipo proinflamatorio, los presentes inventores han propuesto que los niveles de expresión de dicho miR-335 son predictivos de la potencia terapéutica de dichas células, en concreto de su capacidad

inmunorreguladora, y por tanto, que la medición de dichos niveles en un lote de hMSC para uso clínico posee una gran utilidad en medicina regenerativa, ya que permitiría, mediante un ensayo muy simple y rápido, predecir la actividad terapéutica *in vivo* de dicho lote.

Efectivamente, los inventores han observado que los niveles endógenos de miR-335 en hMSC se correlacionan de forma positiva con la edad del donante (Ejemplo 1) y aumentan al inducir senescencia por radiación gamma o por presiones parciales de O₂ elevadas (Ejemplo 2). Asimismo, la sobreexpresión de miR-335 induce senescencia en las hMSC (Ejemplo 2) y, sorprendentemente, produce una reducción significativa en la capacidad inmunorreguladora de dichas hMSC tanto *in vitro* como *in vivo* (Ejemplo 3).

En base a este descubrimiento, se han desarrollado los aspectos inventivos que se explican en detalle a continuación.

Método para determinar la capacidad inmunorreguladora de células madre

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un método, en adelante primer método de la invención, para determinar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre, que comprende determinar en dicha célula madre los niveles de expresión y/o actividad de miR-335, en donde niveles elevados con respecto a un valor de referencia son indicativos de que dicha célula madre tiene una baja capacidad inmunorreguladora, o en donde niveles disminuidos respecto a un valor de referencia son indicativos de que dicha célula madre tiene una elevada capacidad inmunorreguladora.

La expresión “célula madre”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula totipotente, pluripotente o multipotente, capaz de generar uno o más tipos de células diferenciadas, y que además posee la capacidad de auto regenerarse, es decir, de producir más células madre. Las células madre totipotentes pueden dar lugar tanto a los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como a los extraembrionarios (como la placenta). Es decir, pueden formar todos los tipos celulares y dar lugar a un organismo completo. Las células madre pluripotentes pueden formar cualquier tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino. Pueden, por tanto, formar linajes celulares pero a partir de ellas no se puede formar un organismo completo. Las células madre multipotentes son aquellas que sólo pueden generar células de su misma capa o linaje embrionario de origen. En el contexto de la presente invención, la célula madre no es una célula madre embrionaria humana. En una realización preferida, la célula madre del primer método de la invención es una célula madre adulta.

El término “célula madre adulta” significa que la célula madre es aislada de un tejido o un órgano de un animal en un estado de crecimiento posterior al estado embrionario. Preferiblemente, las células madre de la invención han sido aisladas en un estado postnatal. Preferiblemente han sido aisladas de un mamífero, y más preferiblemente de un humano, incluyendo neonatos, juveniles, adolescentes y adultos. Se pueden asilar células madre adultas de una gran variedad de tejidos y órganos, como médula ósea (células madre mesenquimales, células progenitoras adultas multipotentes y células madre hematopoyéticas), tejido adiposo, cartilago, epidermis, folículo piloso, músculo esquelético, músculo cardíaco, intestino, hígado, neuronal, etc. En una realización preferida, la célula madre del primer método de la invención es una célula madre mesenquimal.

Tal y como se usa en la presente invención, el término “célula madre mesenquimal” (en inglés, “*mesenchymal stem cell*” o “MSC”) se refiere a una célula madre somática multipotente derivada de mesodermo, que tiene la capacidad de auto regenerarse y de diferenciarse para producir células descendientes con una amplia variedad fenotípica, incluyendo tejidos conectivos, estroma de médula ósea, adipocitos, dermis y músculo, entre otros. En general, las MSC presentan un perfil de expresión de marcadores celulares caracterizado porque son negativas para los marcadores CD19, CD45, CD14 y HLA-DR, y son positivas para los marcadores CD105, CD106, CD90 y CD73.

En una realización preferida, las MSC proceden de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo. Se pueden aislar MSC de médula ósea mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia. En general, dichos métodos consisten

en aislar células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll, Percoll) de aspirados de médula ósea, y posteriormente sembrar las células aisladas en placas de cultivo de tejido en medio que contiene suero fetal bovino. Estos métodos se basan en la capacidad de las MSC de adherirse al plástico, de forma que mientras que las células no adherentes se retiran del cultivo, las MSC adheridas pueden expandirse en placas de cultivo. Las MSC también pueden

5 asilarse de tejido adiposo subcutáneo siguiendo un procedimiento similar, conocido para el experto en la materia. Un método para aislar MSC de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo ha sido descrito previamente (De la Fuente *et al.*, Exp. Cell Res. 2004, Vol. 297: 313:328).

El primer método de la invención permite determinar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre. Por “capacidad inmunorreguladora” se entiende la propiedad que tienen las células madre de suprimir la respuesta inmune

10 mediante la inhibición de la maduración de las células dendríticas y la supresión de la función de los linfocitos T y B y células Natural Killer en enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

La capacidad inmunorreguladora de las células madre del primer método de la invención puede ser analizada *in vitro* mediante un ensayo de inhibición de proliferación de linfocitos (Ejemplo 3.1.). La capacidad inmunorreguladora de dichas células también puede ser analizada *in vivo* mediante un ensayo de inducción de endotoxemia mediante inyección

15 intraperitoneal de LPS (Ejemplo 3.2.).

Una célula madre con una mayor capacidad inmunorreguladora posee asimismo un mayor potencial terapéutico, tanto cuando es utilizada para el tratamiento de enfermedades en las que existe una actividad indeseada del sistema inmune (enfermedades autoinmunes o inflamatorias), puesto que tienen mayor efecto terapéutico, como para el tratamiento de enfermedades que requieren reparación tisular (puesto que la reparación tisular tiene un componente inflamatorio y una

20 mayor capacidad inmunosupresora permite evitar que el huésped rechace las células cuando son de origen alogénico o xenogénico). El potencial terapéutico de una célula madre es el resultado de un conjunto de propiedades de dicha célula, como su capacidad de proliferación y migración, su potencial de diferenciación y su capacidad inmunorreguladora. La capacidad de proliferación y migración y el potencial de diferenciación de una célula madre correlacionan negativamente con la senescencia de dicha célula madre. El término “senescencia”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a la

25 incapacidad de la célula de dividirse una vez alcanzado un cierto número de divisiones celulares. Según el primer método de la invención, las células madre que tienen niveles de expresión reducidos de miR-335 poseen una mayor capacidad inmunorreguladora, una menor senescencia y una mayor potencia terapéutica.

El término “microARN” (miARN o miRNA por sus siglas en inglés) es un ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos,

30 utilizando para ello la ruta de la ribointerferencia. Los microARN regulan post-traduccionalmente la expresión génica mediante la represión de la traducción de un ARN mensajero diana. Un microARN es complementario a una región de uno o más ARN mensajeros (ARNm).

El término “miR-335” tal y como se emplea en la presente invención, se refiere al microARN humano tal y como se define en la base de microARN “miRBase:Sequences” del Wellcome Trust Sanger Institute

35 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>). miR-335 mapea en el cromosoma humano 7q32.2 y se localiza dentro del segundo intrón del gen MEST/PEG1 que es uno de los pocos genes codificantes humanos que presentan impronta materna. La expresión de miR-335 depende por tanto de la expresión de MEST/PEG1. En el contexto de la presente invención, el término miR-335 incluye tanto la forma prematura del mismo, mir-335 (*Accession number* MI0000816, como las formas maduras miR-335-5p (*Accession number* MIMAT0000765) y miR-335-3p (*Accession number* MIMAT0004703),

40 tal y como se definen en la base de datos “miRBase:Sequences” del Wellcome Trust Sanger Institute (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>), Release 18 (Noviembre 2011).

El primer método de la invención implica, en una primera etapa, determinar en una célula madre o población de células madre los niveles de expresión y/o actividad de miR-335.

Para determinar los niveles de expresión de miR-335, es necesario obtener ARN a partir de las células madre cuya capacidad inmunosupresora se desea analizar. Se puede purificar ARN total de las células madre mediante homogenización en presencia de un tampón de extracción de ácidos nucleicos, seguido de centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan y el ADN se elimina mediante tratamiento con ADNasa y precipitación. Se pueden aislar ácidos nucleicos, específicamente ARN y específicamente miARN mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Hay dos métodos principales para aislar ARN: (i) extracción basada en fenol y (ii) unión a matriz de sílice o filtro de fibra de vidrio (GFF). Los reactivos a base de fenol contienen una combinación de desnaturalizantes e inhibidores de ARNasa para la ruptura de células y tejidos y la posterior separación del ARN de contaminantes. Los procedimientos de aislamiento a base de fenol pueden recuperar especies de ARN en el intervalo de 10-200 nucleótidos por ejemplo, miARN, ARN ribosómico (ARNr) y ARN nuclear pequeño (ARNsn). Si una muestra de ARN total se purificó mediante el procedimiento de GFF o columna de matriz de sílice convencional, puede que se hayan perdido los ARN de pequeño tamaño. Sin embargo, los procedimientos de extracción tales como los que usan Trizol o TriReagent purificarán todos los ARN, grandes y pequeños, y son los métodos recomendados para aislar el ARN total de muestras biológicas que contendrán miARN. Cualquier método requerido para el tratamiento de una muestra antes de la cuantificación del nivel de expresión de miR-335 se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Una vez se dispone de una preparación de ARN de las células madre que se desea analizar, el método de la invención requiere determinar los niveles de expresión de miR-335 en el ARN aislado de células madre. Métodos para determinar los niveles de expresión de microARN en células o muestras biológicas incluyen métodos genéricos para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos, especialmente ARN, métodos optimizados para la detección y cuantificación de especies de ARN pequeñas, puesto que tanto microARN maduros como precursores caen dentro de esta categoría, así como métodos especialmente diseñados para la detección y cuantificación de microARN. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de métodos que pueden ser empleados para determinar los niveles de uno o varios microARN incluyen:

1. Métodos basados en hibridación, como análisis por Northern blot e hibridación *in situ*.
2. RT-PCR en tiempo real multiplex y/o singleplex (reactivos disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems y System Biosciences (SBI)), incluyendo PCR con transcriptasa inversa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) tal como se describe en los documentos US 5.928.907 y US 6.015.674;
3. Detección de moléculas individuales tal como se describe por Neely, *et al.*, Nat. Methods. 3(1):41-6 (2006) y en los documentos US 6.355.420; US 6.916.661 y US 6.632.526;
4. Métodos de citometría de flujo a base de perlas tal como se describen por Lu, *et al.*, Nature 435:7043 (2005) y en el documento US 6.524.793; y
5. Ensayos que usan matrices de ácidos nucleicos tal como se describen por Nelson, *et al.*, Nat. Methods 1(2):155-61 (2004); Wu, *et al.*, RNA 13(1):151-9 (2007) y en los documentos US 6.057.134; US 6.891.032; US 7.122.303; US 6.458.583; US 6.465.183; US 6.461.816; US 6.458.583; US 7.026.124; US 7.052.841; US 7.060.809; US 6.436.640 y US 7.060.809.

En una realización particular, el nivel de expresión de miR-335 se determina mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) en tiempo real, una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usada para medir rápidamente la cantidad de un producto de PCR. Esto se realiza preferiblemente en tiempo real, por tanto es un método indirecto para medir de manera cuantitativa cantidades de partida de ADN, ADN complementario o ARN. Esto se usa comúnmente para el fin de determinar si una secuencia genética está presente o no, y si está presente el número de copias en la muestra. Como otras formas de PCR, el procedimiento se basa en la amplificación de muestras de ADN, usando ciclos térmicos y una ADN polimerasa termoestable. Los tres métodos de PCR cuantitativa usados comúnmente son: mediante electroforesis en gel de agarosa, mediante el uso de SYBR Green (un colorante de ADN bicatenario) y mediante una sonda de indicador fluorescente. Los dos últimos métodos pueden analizarse en tiempo real, constituyendo por lo tanto métodos de PCR en tiempo real.

El método de sonda de indicador fluorescente es el más preciso y el más fiable de los métodos. Usa una sonda a base de ácidos nucleicos específica de secuencia, de manera que sólo cuantifica la secuencia que hibrida con la sonda y no todo el ADN bicatenario. Dicha sonda, que posee en su extremo 3' un fluoróforo y en su extremo 5' una molécula que bloquea su emisión de fluorescencia (apagador o "quencher"), hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR con la sonda más el par de cebadores específicos, la sonda hibrida en el amplicón pero, debido a la cercanía del fluoróforo al apagador, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa empieza a sintetizar la cadena complementaria para el ADN de molde monocatenario cebado, a medida que la polimerización avanza, alcanza la sonda unida a su secuencia complementaria, de forma que la polimerasa hidroliza la sonda mediante su actividad exonucleasa 5'-3', separando de ese modo el indicador fluorescente y el apagador. Esto da como resultado un aumento en la fluorescencia que se detecta. Durante los ciclos térmicos de la reacción de PCR en tiempo real, se monitoriza el aumento de la fluorescencia a medida que se libera de la sonda doblemente marcada hidrolizada en cada ciclo de PCR, lo que permite la determinación precisa de las cantidades de ADN finales, y también iniciales.

Cualquier método de PCR que permita determinar la expresión de miR-335 se encuentra dentro del alcance de la presente invención. En una forma particular de realización, miR-335 se detecta mediante PCR a tiempo real empleando la sonda TaqMan (Applied Biosystems) como sonda doblemente marcada.

Se pueden cuantificar los niveles de miR-335 mediante comparación con un estándar interno, por ejemplo, el nivel de ARN mensajero de un gen de mantenimiento o "housekeeping" presente en la misma muestra. Genes de mantenimiento adecuados para su uso como estándares internos incluyen, aunque no se limitan a, miosina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) o el ARNsn U6. En una forma particular de realización el estándar interno es U6.

En una forma de realización, el primer método de la invención comprende determinar los niveles de actividad de miR-335. En el contexto de la presente invención, la "actividad de miR-335" se refiere a la capacidad de miR-335 de inhibir la expresión de un gen diana. Por lo tanto, la actividad de miR-335 se puede detectar mediante ensayos en los que se cuantifican los niveles de expresión de sus genes diana. Por "genes diana de miR-335" se entienden todos aquellos genes cuya expresión está directamente regulada por miR-335. De este modo, de acuerdo con una forma de realización del primer método de la invención, cuando la expresión de los genes diana de miR-335 está aumentada en una célula madre, esto implica que los niveles de actividad de miR-335 son reducidos en dicha célula madre. De acuerdo con otra forma de realización del primer método de la invención, cuando la expresión de los genes diana de miR-335 está disminuida en una célula madre, esto implica que los niveles de actividad de miR-335 son elevados en dicha célula madre.

Preferentemente, los genes diana de miR-335 son aquellos que tienen en su región codificante o en sus regiones 5' o 3' UTR al menos un sitio de unión de miR-335. Ejemplos ilustrativos no limitativos de genes diana de miR-335 son los que figuran en la Tabla 1.

Tabla 1
Ejemplos ilustrativos de genes diana de miR-335

Símbolo del gen	Gen
AIG1	Androgen-induced 1
AMOT	Angiomotin
APLN	Apelin
ARHGAP24	Rho GTPase activating protein 24
ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)
ARMC8	Armadillo repeat containing 8
C14orf43	Chromosome 14 open reading frame 43
CA5B	Carbonic anhydrase VB, mitochondrial
CCDC115	Coiled-coil domain containing 115
CCDC28A	Coiled-coil domain containing 28A
CHN1	Chimerin (chimaerin) 1
COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1

Símbolo del gen	Gen
DAAM1	Dishevelled associated activator of morphogenesis 1
EFNB1	Ephrin-B1
EGR2	Early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)
EGR3	Early growth response 3
ENAH	Enabled homolog (Drosophila)
EPHA3	EPH receptor A3
FILIP1L	Filamin A interacting protein 1-like
FNBP1L	Formin binding protein 1-like
FOXP1	Forkhead box P1
GAS1	Growth arrest-specific 1
GLI3	GLI family zinc finger 3
IRF2BP2	Interferon regulatory factor 2 binding protein 2
ITGB8	Integrin, beta 8
KIAA0355	KIAA0355
LBH	Limb bud and heart development homolog (mouse)
LYPD6	LY6/PLAUR domain containing 6
MAF	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)
MAN1C1	Mannosidase, alpha, class 1C, member 1
MYLK	Myosin light chain kinase
NFATC1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NFYB	Nuclear transcription factor Y, beta
NHS	Nance-Horan syndrome (congenital cataracts and dental anomalies)
PARP14	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
PARP9	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9
PIGK	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K
PKIB	Protein kinase (camp-dependent, catalytic) inhibitor beta
PRKD1	Protein kinase D1
PRR5L	Proline rich 5 like
PSD3	Pleckstrin and Sec7 domain containing 3
PURB	Purine-rich element binding protein B
RBM12	RNA binding motif protein 12
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SALL2	Sal-like 2 (Drosophila)
SDC1	Syndecan 1
SEMA4F	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F
SEMA6D	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
SH3BP5	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)
SLC6A6	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
TBL1X	Transducin (beta)-like 1X-linked
TBL1XR1	Transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1
THOC7	THO complex 7 homolog (Drosophila)
TMEM35	Transmembrane protein 35
TPD52L1	Tumor protein D52-like 1
TPM1	Tropomyosin 1 (alpha)
TPST1	Tyrosylprotein sulfotransferase 1
TRIB2	Tribbles homolog 2 (Drosophila)
WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1
ZSCAN2	Zinc finger and SCAN domain containing 2

En una forma preferida de realización, el gen diana de miR-335 es *RUNX2*. El término “*RUNX2*”, tal y como se entiende en la presente invención, se refiere a un factor transcripcional implicado en osteogénesis. Existen tres variantes transcripcionales de *RUNX2*, (GenBank Accesion Numbers NM_001015051, NM_004348), y dichas variantes presentan un

sitio de unión de miR-335 en su región 3'UTR. De esta manera, la expresión de *RUNX2* está regulada negativamente por miR-335.

En otra forma preferida de realización del segundo método de la invención, el gen diana de miR-335 es "*SOX4*". El término "*SOX4*", tal y como se entiende en la presente invención, se refiere a un factor de transcripción implicado en la regulación del desarrollo de células progenitoras y de la migración (GeneBank Accession Number: NM_003107.2).

Para determinar la actividad de miR-335 de acuerdo con el primer método de la invención, se pueden determinar los niveles de expresión de los genes diana de miR-335 analizando los niveles del ácido nucleico de dichos genes o analizando los niveles de la proteína codificada por dichos genes, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, para analizar los niveles de ácido nucleico de los genes diana de miR-335, por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*, pueden emplearse técnicas convencionales para determinar los niveles de expresión de un gen determinado en una determinada célula, tales como RT-PCR, Northern blot y similares para determinar la expresión del ARNm. En este caso, el primer método de la invención adicionalmente puede incluir la realización de una etapa de extracción con el fin de obtener el ARN total, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por los genes diana de miR-335, (por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*) y de su ADN complementario (ADNc) correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dichos genes pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, Northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm de los genes de interés o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando juegos de sondas y cebadores apropiados. Análogamente, el nivel de ADNc correspondiente al ARNm codificado por los genes diana de miR-335 (por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*) también puede ser cuantificado mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales para cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001, "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3. En una realización preferida de la invención, la cuantificación del nivel de expresión de los genes diana de miR-335 (por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*) se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en cualquiera de sus variantes.

La expresión de los genes diana de miR-335 también puede determinarse a nivel de proteína, es decir, midiendo el nivel de polipéptidos codificados por dichos genes diana. Tales métodos se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, Western Blot, ELISA, RIA, inmunofluorescencia, citometría de flujo, etc, que utilizan anticuerpos frente a proteínas codificadas por los genes. El nivel de expresión de los genes diana de miR-335 (por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*) puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dichas proteínas en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de genes diana de miR-335 por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*) pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a las proteínas codificadas por dichos y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays

de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dichas proteínas de genes diana de miR-335 (por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*), incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de la proteína codificada por los genes que diana de miR-335, se realiza mediante western blot, ELISA, inmunohistoquímica o un array de proteínas.

Para la detección de la expresión de genes diana de miR-335 también se puede hacer uso de genes reporteros, es decir, se puede emplear una construcción de ADN que comprende el promotor del gen objeto de estudio operativamente acoplado a un gen reportero. Así, en una forma de realización, la alteración de los niveles de los genes diana de miR-335 (por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*) es un aumento y, consiguientemente, el cambio de expresión en el gen reportero es indicativo de que la actividad de miR-335 está siendo inhibida. Genes reporteros adecuados para su uso en la presente invención incluyen luciferasa.

El primer método de la invención requiere comparar los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 en una célula madre con un valor de referencia. El término “valor de referencia”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a un valor que deriva de una colección de muestras que está constituida por células madre del mismo tipo que las células madre cuya capacidad inmunorreguladora está siendo ensayada mediante el primer método de la invención. Dicha colección de muestras procede de un sujeto, preferiblemente de dos ó más sujetos, que se sabe que no tiene una enfermedad susceptible de ser tratada mediante la administración de células madre o, alternativamente, de la población general. El valor de referencia puede ser un valor de expresión o un valor de actividad de miR-335. El valor de referencia de expresión de miR-335 determinarse mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, aislando ARN de cada muestra de células madre de la colección, determinando los niveles de expresión de miR-335 en cada ARN aislado y calculando la media de los niveles de expresión de miR-335 determinados en cada muestra de células madre. Alternativamente, el valor de referencia podría determinarse midiendo los niveles de expresión de miR-335 en una muestra de ARN obtenida mezclando cantidades iguales de ARN de cada una de las muestras de células madre de la colección anteriormente mencionada. El valor de referencia de actividad de miR-335 puede determinarse mediante las técnicas descritas previamente, es decir, mediante la determinación de los niveles de expresión de genes diana de miR-335 (por ejemplo, los genes *RUNX2* y *SOX4*) en cada muestra de células madre de la colección y el cálculo del promedio de todos los valores. Alternativamente, el valor de actividad de miR-335 de referencia podría determinarse midiendo los niveles de expresión de los genes diana de miR-335 en una muestra obtenida mezclando cantidades iguales de cada una de las muestras de células madre de la colección anteriormente mencionada. La colección de muestras de células madre que va a ser analizada para calcular el valor de referencia deriva preferiblemente de una población de dos o más sujetos; por ejemplo, la población puede comprender 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más sujetos.

Un “sujeto”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un mamífero, humano o no humano, preferiblemente un ser humano. El sujeto puede ser cualquier sujeto, un sujeto predispuesto a una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad susceptible de ser tratada con células madre) o un sujeto que padece dicha enfermedad.

El término “enfermedad susceptible de ser tratada con célula madre” incluye, sin limitarse a, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, la enfermedad injerto contra huésped, una enfermedad que precisa la inducción de tolerancia al trasplante o una enfermedad que precisa la reparación y/o regeneración de tejidos.

Una vez establecido el valor de referencia, el primer método de la invención comprende comparar los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 en una célula madre con dicho valor de referencia, de forma que niveles elevados respecto al valor de referencia son indicativos de que dicha célula madre tiene una baja capacidad inmunorreguladora, mientras que niveles disminuidos respecto al valor de referencia son indicativos de que dicha célula madre tiene una elevada capacidad inmunorreguladora.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “niveles elevados respecto al valor de referencia” cualquier variación de los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 por encima del nivel de referencia. Una variación del nivel de

expresión y/o actividad de miR-335 por encima del valor de referencia puede ser de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más comparado con el valor de referencia.

Por otra parte, en el contexto de la presente invención, se entiende por “niveles disminuidos respecto al valor de referencia” cualquier variación de los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 por debajo del valor de referencia. Una variación del nivel de expresión de miR-335 por debajo del valor de referencia puede ser de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos comparado con el valor de referencia.

Una vez que se ha realizado dicha comparación, el primer método de la invención permite determinar si la célula madre cuyos niveles de expresión y/o actividad de miR-335 se han analizado tiene una baja o una elevada capacidad inmunorreguladora. Adicionalmente, el primer método de la invención también permite determinar si dicha célula madre tiene una baja o una elevada potencia terapéutica.

En una realización particular, cuando los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 en una célula madre son elevados respecto al valor de referencia, es indicativo de que dicha célula madre tiene una baja capacidad inmunorreguladora baja. En otra realización de la invención, cuando los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 en una célula madre son elevados respecto al valor de referencia, es indicativo de que dicha célula madre tiene una baja potencia terapéutica.

En una realización particular, cuando los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 en una célula madre están disminuidos respecto al valor de referencia, es indicativo de que dicha célula madre tiene una capacidad inmunorreguladora elevada. En otra realización de la invención, cuando los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 en una célula madre están disminuidos respecto al valor de referencia, es indicativo de que dicha célula madre tiene una elevada potencia terapéutica.

Los términos “elevada” o “baja”, tal y como se usan en la presente descripción, referidos a la potencia terapéutica y/o capacidad inmunorreguladora, se refieren a la idoneidad de una célula madre para ser eficaz en el tratamiento de una determinada enfermedad.

Kit de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante kit de la invención, para determinar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre que comprende

- (i) reactivos adecuados para determinar el nivel de expresión de miR-335 y
- (ii) reactivos adecuados para determinar el nivel de expresión y/o de actividad de un marcador de la capacidad inmunorreguladora y/o un marcador de senescencia en dicha célula madre.

Por “reactivos adecuados para determinar el nivel de expresión de miR-335” se entiende cualquier reactivo necesario para detectar de manera específica la expresión de miR-335 mediante los métodos de detección descritos previamente en el contexto del primer método de la invención. En una forma particular de realización, los reactivos adecuados para determinar el nivel de expresión de miR-335 son una o más parejas de oligonucleótidos diseñados específicamente para amplificar miR-335 usando los métodos de la invención en un ensayo de RT-PCR, preferiblemente un ensayo de RT-PCR a tiempo real.

Las células madre, en concreto las MSC, se consideran inmunológicamente privilegiadas debido a su reducida expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, así como a la ausencia de expresión en su superficie de CD40, CD80 y CD86, moléculas coestimuladoras requeridas para la activación de linfocitos T. Por tanto, en una forma particular de realización, el marcador de la capacidad inmunorreguladora de una célula madre se selecciona del grupo formado por MHC de clase I, MHC de clase II, CD40, CD80 (B71), CD86 (B72), B7-DC (PD-L2), B7H1 (PD-L1), B7H2 (CD275/ICOSL), B7H3 (CD276), B7H4 (VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7. En una forma preferida de realización, el marcador de la capacidad inmunorreguladora de una célula madre es B7H1.

En otra forma de realización, el marcador de senescencia se selecciona del grupo formado por β -galactosidasa, Ki67, p21 (CDKN1A), γ H2AX, SAHF, p53 y, Lamin B.

En una forma preferida de realización, el marcador de senescencia de una célula madre es β -galactosidasa. El uso de β -galactosidasa como marcador de senescencia celular se basa en la detección de la actividad de β -galactosidasa a pH subóptimo. La β -galactosidasa lisosomal es activa a pH 4, pero en células senescentes, debido al incremento característico de la masa de lisosomas en dicho estado, se produce un incremento en la actividad β -galactosidasa que permite su detección a pH 6. Los reactivos adecuados para medir la actividad β -galactosidasa son aquellos que permitan detectar la actividad de β -galactosidasa a pH 6, y son conocidos por el experto en la materia. Estos reactivos pueden incluir, sin estar limitados a, soluciones de fijación, soluciones de tinción y sustratos artificiales de la enzima los cuales, tras ser hidrolizados por la β -galactosidasa, liberan una sustancia cromogénica que puede ser observada a través de técnicas de microscopía. Estos compuestos generalmente son derivados de los galactopiranosidos. Ejemplos de compuestos que son sustratos artificiales de la beta-galactosidasa y que pueden formar parte del kit de la invención incluyen, sin limitarse a: nitro-fenil- β -Dgalactopiranosido (ONPG), clorofenil rojo β -D-galactopiranosido (CPRG), bromo-cloroindolil β -D-galactopiranosido (X-gal), fluoreseín di- β -D-galactopiranosido (FDG) y el sustrato galactón. En una forma de realización preferida, el kit de la invención comprende X-gal como reactivo adecuado para determinar los niveles de expresión y/o actividad de β -galactosidasa.

Método in vitro para incrementar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro*, de aquí en adelante segundo método de la invención, para incrementar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre, que comprende inhibir en dicha célula madre la expresión y/o actividad de miR-335.

El segundo método de la invención comprende inhibir la expresión y/o actividad de miR-335 en una célula madre. Para inhibir la expresión y/o actividad de miR-335 se pueden utilizar diferentes procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, se puede tratar la célula madre en cuestión con un inhibidor de miR-335. El término “inhibidor de miR-335”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a cualquier agente o molécula pequeña que inhibe, reduce o disminuye la expresión y/o la actividad de miR-335. En una forma de realización, el inhibidor de miR-335 hibrida con miR-335 y de esta manera inhibe su actividad. Ejemplos ilustrativos no limitativos de inhibidores de miR-335 incluyen: oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ribozimas, enzimas de ADN, compuestos de pequeño tamaño naturales o sintéticos, preferiblemente compuestos orgánicos de pequeño tamaño, etc.

Los oligonucleótidos antisentido son cadenas simples de ADN o ARN que son complementarias a una secuencia elegida. Los ARN antisentido impiden la traducción de proteínas al unirse a sus ARN mensajeros. Los ADN antisentido se pueden unir a una secuencia específica y complementaria de ARN (codificación o no codificante), dando lugar a un híbrido de ADN / ARN que puede ser degradado por la enzima RNasa H. Para su empleo en la presente invención, una construcción que comprende un oligonucleótido antisentido se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario al menos en parte a la secuencia de miR-335. Alternativamente, la construcción antisentido puede ser una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, hibrida con miR-335 impidiendo su función. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ilustrativas para su uso como oligonucleótidos antisentido incluyen análogos de ADN de fosforamidoato, fosfotionato y metilfosfonato (véanse, por ejemplo, US5176996, US5264564 y US5256775). Adicionalmente, para una revisión de las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en terapia antisentido véanse, por ejemplo, Van der Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988; y Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988.

Preferentemente, se deben realizar estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la función de miR-335. Ventajosamente, dichos estudios utilizarán controles que distingan entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con los de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica a la secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en la base, en el azúcar o en el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (WO89/10134), agentes intercalantes (Zon, Pharm. Res. 1988. 5: 539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, un agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del oligonucleótido antisentido suficientes para suprimir la función de miR-335 endógeno. Por tanto, una aproximación preferida usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II.

El inhibidor de miR-335 puede ser un ARN de interferencia. Un ARN de interferencia (ARNi) es un ARN que modula la expresión de un gen mediante el mecanismo de interferencia de ARN. En una forma de realización, el ARNi es un ARNi pequeño. Los ARN de interferencia pequeños o ARNip (siRNA en su denominación en inglés) son agentes capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia del ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, o, alternativamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o bien se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en una cadena doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud, que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

Los ARNip pueden ser los llamados shRNA (short hairpin RNA), caracterizados porque las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región bucle u horquilla. Los shRNAs pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus, y estar bajo el control de promotores tales como el promotor U6 de la ARN polimerasa III.

En una realización particular, los ARNip que pueden ser utilizados en la presente invención son sustancialmente homólogos al miR-335. Por “sustancialmente homólogos” se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar a la secuencia de miR-335, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

- ARNip en el que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato;
- conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo;
- modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2';

- nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alkilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa o 2'-O-fluorosibosa;
- nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosina).

Los ARNip y ARNsh que pueden ser utilizados en la presente invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia.

En otra forma de realización, el inhibidor de miR-335 es una ribozima específicamente diseñada para cortar de forma catalítica la secuencia de miR-335. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN [para una revisión véase Rossi, 1994. Current Biology 4: 469-471]. La secuencia de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARN diana, es este caso miR-335, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARN o una secuencia funcionalmente equivalente [véase, por ejemplo, US5093246]. Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de distribución implica usar una construcción de ADN que “codifica” la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III ó pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una menor concentración intracelular para que sean eficaces.

En otra forma de realización, el inhibidor de miR-335 es una enzima de ADN. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecanísticas tanto de las tecnologías de los oligonucleótidos antisentido como de las tecnologías de los ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana del ácido nucleico particular (en este caso, la secuencia de miR-335), de forma similar al oligonucleótido antisentido; sin embargo, de forma similar a la ribozima, son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

En una forma preferida de realización, el inhibidor de miR-335 es un ácido nucleico, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido o un RNAi. En una forma más preferida de realización, el inhibidor de miR-335 es polinucleótido de cadena sencilla que presenta la capacidad de hibridar específicamente con miR-335 impidiendo su función. Por “impedir su función” se entiende que bloquea al menos parcialmente la actividad de miR-335.

El inhibidor de miR-335 se puede introducir en la célula diana usando cualquier protocolo adecuado. Cuando el inhibidor de miR-335 es un ácido nucleico, como un oligonucleótido antisentido o un RNAi, puede introducirse en la célula diana empleando cualquier técnica conocida de transferencia de ácidos nucleicos a células *in vitro*. Tales técnicas incluyen, sin limitarse a, electroporación, nucleofección, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, magnetofección, o infección vírica (transducción). Usualmente, el procedimiento de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después, las células se someten a selección para aislar las células que han incorporado y expresan el gen transferido. La transferencia del ácido nucleico inhibidor de miR-335 a la célula diana puede ser transitoria o estable. En una realización preferida, la transferencia es estable, de manera que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferentemente heredable y expresable por su progenie celular. En una forma preferida de realización, el ácido nucleico inhibidor de miR-335 es transferido a la célula madre mediante lipofección con un reactivo como por ejemplo Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

En una forma particular de realización del segundo método de la invención, la célula madre cuya capacidad inmunorreguladora va a ser incrementada es una célula madre adulta, preferiblemente una célula madre mesenquimal, más preferiblemente una célula madre mesenquimal procedente de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo.

Métodos para detectar los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 han sido expuestos previamente, en el contexto del primer método de la invención.

Los términos “capacidad inmunorreguladora”, “célula madre”, “célula madre adulta”, “célula madre mesenquimal” y “miR-335” han sido descritos en el contexto del primer método de la invención.

Métodos terapéuticos de la invención

El uso de células madre, en concreto el uso de MSC, en el tratamiento de enfermedades está siendo estudiado, entre otras razones, en base a sus propiedades antiinflamatorias *in vitro*, a su eficacia en modelos animales y a algunos resultados aislados conseguidos en ensayos clínicos en humanos. Se están desarrollando ensayos clínicos en fase I/II para estudiar su uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y de la esclerosis múltiple y se planea comenzarlos en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, vasculitis sistémica, diabetes tipo 1 y otras muchas enfermedades de base inmune.

También es conocido del estado de la técnica la capacidad de las MSC de interactuar con células del sistema inmunológico para controlar una respuesta inmunológica, que en el caso de las enfermedades autoinmunes, es la responsable de la destrucción de los diferentes tejidos o células específicas provocando su deterioro. En estos casos, el uso de MSC logra anergizar a los linfocitos T, B y NK logrando un estado asintomático libre de medicamentos inmunosupresores.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para su uso en medicina.

En otro aspecto, la presente invención también se relaciona con una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, de una enfermedad inflamatoria, de la enfermedad injerto contra huésped, en la inducción de la tolerancia al trasplante o en la reparación y regeneración de tejidos.

En otro aspecto, la invención también se relaciona con un método, en adelante método terapéutico de la invención, para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, de una enfermedad inflamatoria, de la enfermedad injerto contra huésped, de la diabetes tipo 1, de la diabetes tipo 2, de una enfermedad cardiovascular, para la inducción de la tolerancia al trasplante, o para la reparación y regeneración de tejidos en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335.

En otro aspecto, la presente invención también se relaciona con un uso de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 respecto a un valor de referencia para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo formado por una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria y la enfermedad de injerto contra huésped.

El término “enfermedad inflamatoria” incluye cualquier enfermedad causada por una activación descontrolada y continuada de las respuestas inflamatorias que causan daño en los tejidos; dicha respuesta inflamatoria puede ser desencadenada por agentes infecciosos, agentes físicos, agentes químicos, tumores y muerte celular. Las “enfermedades autoinmunes”, en la medida en que también tienen un componente inflamatorio, caen dentro del término “enfermedades inflamatorias” tal como aquí se utiliza. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes incluyen, la enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, anemia hemolítica, anemia perniciosa, aftas, estomatitis aftosa, artritis, arterioesclerosis, osteoartritis, artritis reumatoide, aspermiogénesis, asma bronquial, asma autoinmune, hemolisis autoinmune, enfermedad de Bechet, enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, linfoma de Burkitt, enfermedad de Crohn, corioiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, crioglobulinemia, dermatitis herpetiformis, dermatomiositis, diabetes dependiente de insulina, diabetes juvenil, enfermedades demielinizantes autoinmunes, contractura de Dupuytren, encefalomiелitis, encefalomiелitis alérgica, endoftalmia, enteritis alérgica, síndrome enteropatía autoinmune, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Harnman-Rich, enfermedad de Hashimoto, pérdida repentina de audición, hepatitis crónica, enfermedad de Hodgkin, hemoglobinuria paroximástica, hipogonadismo, ileitis regionales, iritis, leucopenia, lupus eritematoso diseminado, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia gravis, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis,

oftalmia simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, pénfigo vulgar, poliarteritis nodosa, poliartritis crónica, polimiositis, poliradiculitis aguda, psoriasis, purpura, pioderma gangrenoso, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, infertilidad debida a anticuerpos anti-espermatozoides, trombocitopenia, timoma, uveitis anterior aguda, vitíligo, enfermedades asociadas al SIDA, SCID y virus de Epstein Barr tales como el síndrome de Sjorgren, el linfoma de células B asociado a SIDA o a virus de Epstein-Barr, enfermedades parasitarias tales como leishmaniosis y estados inmunosuprimidos tales como infecciones virales tras trasplantes, SIDA, cáncer, hepatitis activa crónica, el rechazo de trasplante a consecuencia del trasplante de un tejido u órgano y la enfermedad de injerto contra huésped que puede resultar del trasplante de médula ósea o de células madre hematopoyéticas.

El término “enfermedad injerto contra huésped” o “EICH” se refiere a un síndrome observado tras un trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas y presumiblemente transmitido por los linfocitos T del donante inmunocompetente al reaccionar contra los tejidos del receptor. La EICH puede ser aguda o crónica.

Ciertas enfermedades no inflamatorias pero que presentan un componente inflamatorio, como la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular, también caen dentro del alcance de los métodos y usos terapéuticos de la invención. El término “diabetes tipo 1”, también denominada “diabetes mellitus tipo I” o “diabetes juvenil” o “diabetes mellitus insulino dependiente”, tal y como se emplea en el contexto de la presente invención, es una enfermedad metabólica caracterizada por una destrucción selectiva de las células beta del páncreas causando una deficiencia absoluta de insulina. Se diferencia de la diabetes tipo 2 porque es un tipo de diabetes caracterizada por darse en época temprana de la vida, generalmente antes de los 30 años. Sólo 1 de cada 20 personas diabéticas tiene diabetes tipo I, la cual se presenta más frecuentemente en jóvenes y niños. La administración de insulina en estos pacientes es esencial. La diabetes tipo 1 se clasifica en casos autoinmunes—la forma más común—y en casos idiopáticos. La susceptibilidad a contraer diabetes mellitus tipo 1 parece estar asociada a factores genéticos múltiples, aunque solo el 15-20% de los pacientes tienen una historia familiar positiva.

El término “diabetes tipo 2”, según se usa en la presente invención, se refiere a una enfermedad caracterizada por una elevación inapropiada de los niveles de glucosa en sangre que genera complicaciones crónicas por la afectación de grandes y pequeños vasos y nervios. La alteración subyacente en esta enfermedad es la dificultad para la acción de la insulina (como una pérdida de sensibilidad de los tejidos a esta hormona) que se denomina insulinoresistencia y una secreción inadecuada de insulina por las células encargadas de su producción en el páncreas. Además de aumentar la concentración de glucosa la acción deficiente de la insulina se traduce frecuentemente en elevación de los niveles de colesterol y/o triglicéridos.

El término “enfermedad cardiovascular”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier enfermedad o disfunción o alteración del corazón o del resto del sistema cardiovascular o de la sangre.

La capacidad inmunomoduladora de las células madre no sólo tiene importancia en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, sino que también se perfilan como un elemento de tratamiento indispensable para propiciar la tolerancia hacia órganos sólidos tales como el corazón, pulmón y riñón; a modo ilustrativo, es posible la co-infusión de células madre en el momento del trasplante.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención también se relaciona con un uso de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para preparar un medicamento para inducir tolerancia al trasplante.

Una vez que las células madre entran al torrente sanguíneo, son capaces de detectar las moléculas que son secretadas por los tejidos dañados o moribundos en lo que se conoce como el fenómeno de “*homing*” o anidamiento. Una vez que está en la proximidad del tejido dañado, la célula madre se adhiere a la superficie del órgano a través de receptores moleculares que expresa en la superficie de la membrana celular. Esto da inicio a una serie de eventos que permiten a la célula madre integrarse al órgano dañado y comenzar a secretar factores de crecimiento que estimulan localmente a las

células madre residentes del propio órgano afectado, además de cambiar el microambiente inflamatorio para dar origen a un microambiente permisible a la regeneración celular, en donde comienza un proceso de fusión o diferenciación celular convirtiéndose entonces en una célula fisiológicamente madura, además de propiciar la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un uso de una célula madre caracterizada porque

5 presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 respecto a un valor de referencia para preparar un medicamento para la reparación y regeneración de tejidos. La célula madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención es preferiblemente una célula madre adulta, más preferiblemente una célula madre mesenquimal, aún más preferiblemente una célula madre mesenquimal de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo.

En una forma particular de realización, la célula madre se encuentra modificada mediante un inhibidor de miR-335.

10 El término “inhibidor de miR-335” así como los métodos para incorporar dicho inhibidor a la célula madre han sido descritos previamente en el contexto del segundo método de la invención. El inhibidor de miR-335 preferiblemente es un polinucleótido de cadena sencilla que hibrida específicamente con miR-335 impidiendo su función. Más preferiblemente, el inhibidor de miR-335 contiene la secuencia SEQ ID No: 1 o una secuencia claramente relacionada. El término “secuencia claramente relacionada” incluye secuencias funcionalmente equivalentes, es decir, secuencias que presentan una identidad

15 con la secuencia SEQ ID NO:1 de al menos un 85%, típicamente al menos un 90%, ventajosamente al menos un 95%, preferentemente al menos un 99%, y mantienen la capacidad de hibridar con miR-335 e impedir su función. Ensayos ilustrativos para detectar los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 han sido expuestos previamente por lo que el experto en la materia podría identificar fácilmente si una secuencia está claramente relacionada con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o es funcionalmente equivalente a la misma.

20 Las células según los usos y métodos terapéuticos de la invención presentan niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335. En el contexto de la presente invención, “niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335” se refieren a niveles reducidos de expresión y/o actividad de dicho miR-335 respecto a un valor de referencia. Por “niveles reducidos de expresión y/o actividad respecto al valor de referencia” se entiende cualquier variación en los niveles de expresión y/o actividad de miR-335 por debajo del valor de referencia.

25 Una variación del nivel de expresión y/o actividad de miR-335 por debajo del valor de referencia puede ser de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos comparado con el valor de referencia.

La célula madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención puede ser autóloga, alogénica o xenogénica respecto al sujeto a ser tratado. El término “autóloga”, tal y como se usa en la presente descripción, significa que el donante y

30 el receptor de la célula madre es el mismo sujeto. El término “alogénica” significa que el donante y el receptor de la célula madre son sujetos diferentes. El término “xenogénica” significa que el donante y el receptor de la célula madre son sujetos de diferentes especies.

El término sujeto ha sido previamente descrito.

El método terapéutico de la invención comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de

35 una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 respecto a un valor de referencia. Por “cantidad terapéuticamente eficaz de una célula madre” en el contexto del método terapéutico de la invención, se entiende una cantidad de una célula madre, o una población de células madre sustancialmente homogénea, que es capaz de producir el efecto terapéutico deseado, y en general se determinará, entre otros factores, teniendo en cuenta las características del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración, etc. Por este motivo, las dosis

40 mencionadas en esta invención deben tenerse en cuenta sólo como guía para el experto en la materia, el cual debe ajustar esa dosis dependiendo de los factores anteriormente descritos. A modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, las células madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención pueden administrarse como una dosis única, que contenga entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 10×10^6 de células madre de la invención por kilogramo (kg) de peso corporal del receptor, preferentemente entre aproximadamente 5×10^5 y aproximadamente 5×10^6 células madre de la invención por kg de

peso corporal del receptor, más preferentemente entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 2×10^6 células madre de la invención por kg del peso corporal del receptor, dependiendo de los factores descritos anteriormente. La dosis de células madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención puede repetirse, dependiendo del estado y evolución del sujeto, en intervalos temporales de días, semanas o meses que debe establecer el especialista en cada caso.

La administración de la célula madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención al sujeto se llevará a cabo por medios convencionales. Por ejemplo, dicha célula madre se puede administrar a dicho sujeto por vía intravenosa utilizando los dispositivos adecuados, tales como jeringas, catéteres (un catéter intravenoso periférico estándar, un catéter venoso central o un catéter arterial pulmonar, etc.), trocates, cánulas, etc. El flujo de las células se puede controlar por inflado y desinflado en serie de globos distales y proximales ubicados dentro de la vasculatura del sujeto, creando así zonas temporales sin flujo que promueven la acción terapéutica celular. En todos los casos, la célula madre se administrará utilizando los equipos, aparatos y dispositivos adecuados a la administración de composiciones celulares y conocidos por el experto en la técnica.

Como entiende el experto en la materia, en ocasiones la administración directa de la célula madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de dichas células madre al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (e.g., por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, e.g., una cánula apropiada, por perfusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios conocidos en la técnica.

Las células madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención, si se desea, se pueden almacenar hasta el momento de su aplicación mediante los procedimientos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Para el almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas), dichas células pueden almacenarse a temperatura ambiente o por debajo de ésta en un recipiente sellado complementándola o no con una solución nutritiva. El almacenamiento a medio plazo (menos de 48 horas) se realiza preferentemente a $2-8^{\circ}\text{C}$, en una solución iso-osmótica y tamponada en un contenedor compuesto de, o revestido de, un material que previene la adhesión celular. El almacenamiento a más largo plazo se lleva a cabo preferentemente por medio de criopreservación adecuada y almacenamiento en condiciones que promueven la retención de la función celular.

Las células madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención pueden utilizarse en una terapia combinada con otros compuestos adicionales que puedan ser útiles para el tratamiento de la enfermedad que vaya a ser tratada. Dichos compuestos adicionales se pueden administrar junto con dichas células madre formando parte de una misma composición o, alternativamente, se pueden administrar en forma de una composición aparte para la administración simultánea o sucesiva (secuencial en el tiempo) con respecto a la administración de las células madre según los usos y métodos terapéuticos de la invención.

Método in vitro para la generación de células T reguladoras

Las células madre mesenquimales cuando se mantienen en co-cultivo con células mononucleares de sangre periférica son capaces de incrementar la proporción de subpoblaciones de linfocitos T con fenotipo de células reguladoras como $\text{CD4}^{+}/\text{CD25}^{\text{alto}}$, $\text{CD4}^{+}/\text{CTLA-4}^{+}$, $\text{CD4}^{+}/\text{CD25}^{+}/\text{CTLA-4}^{+}$. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro*, en adelante tercer método de la invención, para generar células T reguladoras, que comprende poner en contacto una población de células que contiene células T con una población de células madre caracterizadas porque presentan niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 en condiciones adecuadas para la generación de células T reguladoras.

El término “células T reguladoras”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a células T cuya principal función es controlar la inflamación y mantener la autotolerancia mediante la expansión y control de la activación de las células T efectoras CD4^{+} autorreactivas. Las células T reguladoras se encuentran principalmente entre la subpoblación de

células T CD4⁺ que presentan altos niveles de expresión de CD25 y del factor de transcripción Foxp3. En concreto, se consideran células T reguladoras las subpoblaciones CD4⁺CD25^{alto} Foxp3⁺ (células Treg), CD4⁺IL10⁺Foxp3⁻ (células Tr1) y CD4⁺TGF-β⁺ (células Th3). Sin embargo, también existen subpoblaciones de células T CD8⁺, como las subpoblaciones CD8⁺CD25⁺, CD8⁺CD28⁻ y CD8⁺IL-10⁺, que también son capaces de reprimir la activación y proliferación de linfocitos, y por tanto se incluyen dentro de la definición de células T reguladoras de acuerdo con el tercer método de la invención.

El tercer método de la invención comprende poner en contacto una población que contiene células T con células madre. En una forma particular de realización, la población que contiene células T es una población de células mononucleares de sangre periférica. Las “células mononucleares de sangre periférica” o “PBMC” incluyen linfocitos, monocitos y macrófagos. Los métodos para aislar estas PBMC de una muestra de sangre se conocen bien en la técnica. En otra forma de realización particular, la población que contiene células T es una población de PBMC que ha sido enriquecida en linfocitos CD4⁺, o bien en linfocitos CD8⁺ o bien en ambos tipos de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

Las células madre que presentan niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 han sido descritas previamente, en el contexto de los usos y métodos terapéuticos de la invención. Dichas células madre son preferiblemente células madre adultas, más preferiblemente células madre mesenquimales.

Según el tercer método de la invención, la población de células T y las células madre deben mantenerse en co-cultivo en condiciones adecuadas para la generación de células T reguladoras. Las “condiciones adecuadas para la generación de células T reguladoras” son aquellas que permiten obtener células T capaces de llevar a cabo las funciones propias de las células T reguladoras, como la inhibición de la reacción linfocitaria mixta (MLR), y son conocidas por el experto en la materia.

La “reacción linfocitaria mixta” o “MLR” es un método *in vitro* para analizar la proliferación de células T helper. Dicho método consiste en el co-cultivo de linfocitos alogénicos, lo que provoca la expansión de la población de células T helper. Las células T reguladoras, cuando se añaden a un cultivo de una MLR, son capaces de inhibir la proliferación de dichos linfocitos T helper. Según el tercer método de la invención, cuando se co-cultiva una población que contiene células T con una población de células madre caracterizadas porque presentan niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335, se obtienen células T reguladoras que, cuando se añaden a una MLR son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T helper. Dicha inhibición de la proliferación de los linfocitos T helper puede ser de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o incluso un 100%.

En una forma particular de realización, las condiciones adecuadas para la generación de células T reguladoras consisten en el co-cultivo de células madre, preferiblemente MSC, con una población que contiene células T, preferiblemente una población de PBMC, durante un periodo de tiempo de 1 a 5 días, preferiblemente 4 días. Los co-cultivos pueden llevarse a cabo usando diferentes proporciones de MSC y células T, por ejemplo, 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000 y 1:20000. En una forma preferida de realización, la proporción de MSC y células T es de 1:2000.

En una forma particular de realización del tercer método de la invención, durante el co-cultivo de la población de células madre con la población que contiene células T se pueden añadir agentes que estimulan la activación de células T reguladoras, adicionalmente a las señales de activación proporcionadas por las células madre. Los agentes que estimulan la activación de células T pueden ser anticuerpos, estímulos químicos de la función de las células T e inhibidores de la inhibición de las células T. En otra forma particular de realización, el co-cultivo de la población de células madre con la población que contiene células T se puede hacer con un antígeno de forma que se induzca la expansión de células T reguladoras específicas de antígeno. El antígeno puede ser un autoantígeno.

Según el tercer método de la invención, la población de células madre puede ser autóloga o alogénica respecto a la población que contiene células T. El término “autóloga”, de acuerdo al tercer método de la invención, se refiere a que la población de células madre y la población que contiene células T derivan del mismo sujeto. El término “alogénica”, de

acuerdo al tercer método de la invención, se refiere a que la población de células madre y la población que contiene células T derivan de distintos sujetos. El término sujeto ha sido descrito previamente.

Los ejemplos específicos que se proporcionan a continuación sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Relación del nivel de expresión de miR-335 en hMSCs con la edad del donante.

Objetivo

Estudiar si existe una correlación significativa entre los niveles endógenos de miR-335 en células madre mesenquimales humanas (hMSC) y la edad del donante.

Método

Se aislaron hMSC de médula ósea y de tejido adiposo subcutáneo a partir de donantes humanos de diferentes edades (entre 18 y 55 años). Tras ser cultivadas *ex vivo* en condiciones estándar (DMEM bajo en glucosa, 10% suero fetal bovino, 5 mM glutamina, a 37°C en incubador con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad) durante una semana, se recogieron y se emplearon para el aislamiento de RNA total mediante el kit miRNAeasy (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión relativa de miR-335 se cuantificaron en las distintas muestras de RNA mediante PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Como control endógeno se utilizó U6.

Resultados

En la Figura 1 se muestran los niveles de expresión relativa de miR-335 en hMSC de donantes de distintas edades. Puede observarse claramente que las hMSC de donantes de mayor edad poseen unos niveles endógenos de miR-335 significativamente mayores que las hMSC de donantes más jóvenes. Esto sugiere que miR-335 podría ser un marcador positivo de senescencia celular en hMSC, y por tanto un marcador negativo de la capacidad terapéutica de dichas células.

EJEMPLO 2

Correlación del nivel de expresión de miR-335 en hMSC con la senescencia celular en cultivo.

2.1. Niveles de senescencia celular en hMSC que sobre-expresan miR-335.

Objetivo

Determinar si la sobreexpresión exógena de miR-335 afecta a los niveles de senescencia celular en cultivos de hMSC.

Método

La senescencia celular en cultivo se mide habitualmente por la expresión de β -galactosidasa. Un mayor porcentaje de células positivas para dicha expresión indica un mayor nivel de senescencia celular. Se indujo la sobreexpresión de miR-335 en dos aislados distintos de hMSC de médula ósea mediante la transducción con un vector lentiviral que codifica dicho miRNA. Como control negativo se emplearon las mismas hMSC transducidas con el mismo vector lentiviral pero sin codificar miR-335. Tras aislar las células transducidas mediante citometría de flujo, se midieron los niveles de expresión de β -galactosidasa

mediante tinción específica empleando un kit comercial (Stemgent). El número de células positivas para β -galactosidasa se cuantificó mediante observación directa al microscopio.

Resultados

- 5 Como se muestra en la Figura 2A, la sobreexpresión exógena de miR-335 induce un nivel significativamente mayor de senescencia celular en hMSC de médula ósea.

2.2. Niveles de miR-335 en hMSC senescentes.

10 *Objetivo*

Determinar si los niveles de expresión endógena de miR-335 correlacionan positivamente con los niveles de senescencia celular en hMSC.

Método

- 15 Se indujo senescencia celular en cultivos de hMSC de médula ósea mediante irradiación gamma (10 Gy). Tras diez días en cultivo, se comprobó mediante tinción con β -galactosidasa (ver Ejemplo 2.1) que más de un 85% de las células eran senescentes. A partir de dichas células, se aisló RNA total y se cuantificó la expresión relativa de miR-335 siguiendo el método anteriormente descrito, en comparación con células no irradiadas de los mismos donantes.

20 *Resultados*

Los resultados (Figura 2B) demuestran que en las hMSC tratadas con radiación gamma (senescentes) aumentan de forma significativa sus niveles endógenos de miR-335.

2.2. Relación de los niveles de expresión de miR-335 con la longitud telomérica en hMSC.

25

Objetivo

Comprobar si existe una correlación entre los niveles de expresión de miR-335 y la longitud telomérica en hMSC, puesto que dicha longitud telomérica es considerada generalmente como un marcador negativo de senescencia celular.

30 *Método*

Se transdujeron hMSC de médula ósea con un vector lentiviral que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT). Con ello, se consiguió que dichas células poseyeran actividad telomerasa (de la que carecen en condiciones fisiológicas). Se midió la longitud telomérica en dichas células transducidas y en células control mediante un ensayo específico de PCR cuantitativa, así como la expresión relativa de miR-335 mediante RT-PCR.

35

Resultados

Los resultados (Figura 3) mostraron que las hMSC con telómeros de mayor longitud poseen menores niveles endógenos de miR-335 en comparación con células control del mismo donante y cultivadas *ex vivo* durante el mismo tiempo.

40 **2.3. Efecto de la pO₂ en la expresión de miR-335.**

Objetivo

Desde hace algún tiempo, se sabe que las células de mamífero crecidas a una concentración de O₂ del 3% muestran una mayor capacidad proliferativa y una estabilidad cromosómica significativamente mayores que las crecidas en condiciones

estándar de cultivo (20% O₂) (Samper et al., 2003; Estrada et al., 2011). En el siguiente experimento se pretende determinar si existe una correlación entre los niveles de expresión de miR-335 en hMSC y la tensión de O₂ a la que se realiza el cultivo.

Método

- 5 Se cultivaron hMSC de médula ósea en condiciones estándar (20% O₂) o al 3% de O₂, durante 10 días. A continuación, se aisló el RNA de ambos cultivos y se cuantificó el nivel relativo de miR-335 mediante el método ya descrito.

Resultados

- 10 Como se aprecia claramente en la Figura 4, los niveles de expresión de miR-335 disminuyen en hMSC cultivadas al 3% de O₂, en comparación con las que se cultivaron al 20% de O₂. Este resultado también confirma que miR-335 puede ser considerado como un marcador positivo de la senescencia celular.

EJEMPLO 3

Correlación del nivel de expresión de miR-335 en hMSC con su actividad inmunorreguladora.

15

Objetivo

Comprobar que la sobreexpresión de miR-335 en hMSC afecta a su actividad inmunorreguladora.

3.1. Actividad inmunorreguladora *in vitro*.

20

Método

- 25 Se realizó un ensayo de inhibición de proliferación de linfocitos mediante el siguiente protocolo. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) y se cultivaron por triplicado (10⁵ células/pocillo) con medio de cultivo completo en presencia de fitohemaglutinina (1 µg/ml), en presencia o en ausencia de hMSC de médula ósea (2x10³ a 5x10⁴ células/pocillo), en placas de 96 pocillos de fondo cóncavo. Tras 96 h de cultivo, se evaluó la proliferación celular empleando un ensayo colorimétrico de incorporación de BrDU (Roche). Se ensayaron en paralelo hMSCs transducidas con un vector lentiviral que codifica miR-335 y hMSCs control (transducidas con un vector lentiviral similar que no codifica dicho miRNA).

30

Resultados

Los resultados (Figura 5) demuestran que las hMSC que sobreexpresan miR-335 poseen una capacidad de inhibición de la proliferación de linfocitos humanos significativamente menor que las células control. Este resultado sugiere que miR-335 puede considerarse un marcador negativo de la capacidad inmunorreguladora de las hMSC.

35

3.2. Actividad inmunorreguladora *in vivo*.

Método

- 40 Se indujo endotoxemia experimental en ratones machos BALB/c de 10 semanas mediante la inyección intraperitoneal de 400 µg/ratón de LPS. 30 minutos después, los ratones recibieron por la misma vía 10⁶ hMSC o suero fisiológico (control negativo). Un grupo de animales recibió hMSC transducidas con un vector lentiviral que codifica miR-335 y otro grupo hMSC control (transducidas con un vector lentiviral similar que no codifica dicho miRNA). Se emplearon grupos experimentales formados por 10 animales cada uno. Posteriormente, se monitorizó la supervivencia de los animales durante las 96 h siguientes a la administración del LPS.

Resultados

96 h después de la administración del LPS, los ratones que recibieron las células control mostraron una supervivencia superior al 80%, frente a una mortalidad del 100% en los ratones que no recibieron células. Por el contrario, los animales que recibieron las hMSC que sobeexpresaban miR-335 mostraron una supervivencia significativamente menor (menos del 40%,
5 Figura 6).

Este resultado también apunta al valor de miR-335 como marcador negativo de la capacidad inmunorreguladora de las hMSC.

**TRADUCCIÓN AL CASTELLANO DE TÉRMINOS EN INGLÉS QUE APARECEN
10 EN LA LISTA DE SECUENCIAS**

El término “sequence listing” significa “lista de secuencias”. El término “artificial sequence” significa “secuencia artificial”.

REIVINDICACIONES

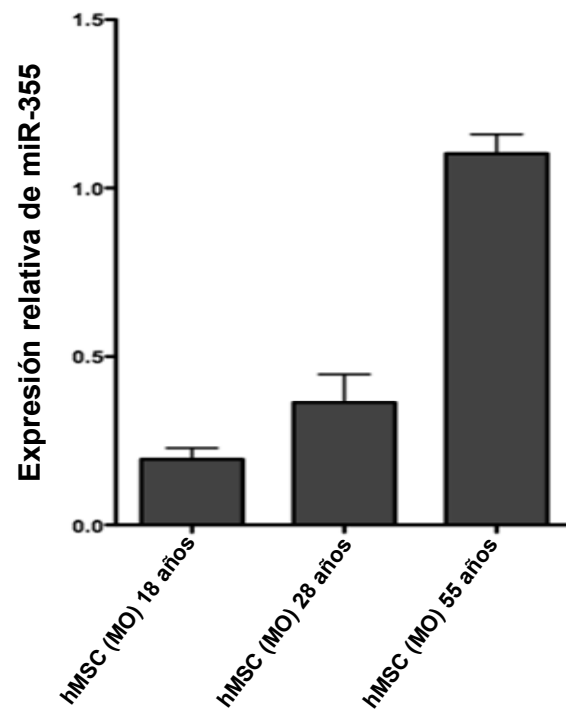
1. Un método para determinar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre, que comprende determinar en dicha célula madre los niveles de expresión y/o actividad de miR-335, en donde niveles elevados con respecto a un valor de referencia son indicativos de que dicha célula madre tiene una baja capacidad inmunorreguladora, o en donde niveles disminuidos respecto a un valor de referencia son indicativos de que dicha célula madre tiene una elevada capacidad inmunorreguladora, en donde dicha célula madre no se obtiene mediante métodos que destruyan embriones humanos o utilicen embriones humanos como materia prima.
2. Método según la reivindicación 1, en donde la célula madre es una célula madre adulta.
3. Método según las reivindicaciones 1 y 2, en donde la célula madre es una célula madre adulta mesenquimal.
4. Método según la reivindicación 3, en donde la célula madre adulta mesenquimal procede de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo.
5. Un kit para determinar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre que comprende
 - (i) reactivos adecuados para determinar el nivel de expresión de miR-335, en donde dichos reactivos son una o más parejas de oligonucleótidos diseñados específicamente para amplificar miR-335 mediante RT-PCR y
 - (ii) reactivos adecuados para determinar el nivel de expresión y de al menos un marcador adicional de la capacidad inmunorreguladora, en donde dichos reactivos son una o más parejas de oligonucleótidos diseñados específicamente para amplificar dicho marcador de la capacidad inmunorreguladora mediante RT-PCR y en donde dicho marcador de la capacidad inmunorreguladora se selecciona del grupo formado por MHC de clase I, MHC de clase II, CD40, CD80, CD86, B7-DC (PD-L2), B7H1 (PD-L1), B7H2 (CD275/ICOSL), B7H3 (CD276), B7H4 (VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, y/o reactivos adecuados para determinar el nivel de actividad de un marcador de senescencia en dicha célula madre, en donde dicho marcador de senescencia es beta-galactosidasa y dichos reactivos son uno o más sustratos artificiales de beta-galactosidasa,
 en donde dicha célula madre no se obtiene mediante métodos que destruyan embriones humanos o utilicen embriones humanos como materia prima.
6. Un kit según reivindicación 5 en donde el sustrato artificial de beta-galactosidasa se selecciona del grupo formado por nitro-fenil-β-Dgalactopiranosido (ONPG), clorofenil rojo β-D-galactopiranosido (CPRG), bromo-cloroindolil β-D-galactopiranosido (X-gal), fluoresceín di-β-D-galactopiranosido (FDG) y el sustrato galactón.
7. Un método *in vitro* para incrementar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre, que comprende inhibir en dicha célula madre la expresión y/o actividad de miR-335, en donde dicha célula madre no se obtiene mediante métodos que destruyan embriones humanos o utilicen embriones humanos como materia prima.
8. Método según la reivindicación 7, en donde dicha célula madre es una célula madre adulta.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8, en donde dicha célula madre es una célula madre mesenquimal.

10. Método según la reivindicación 9, en donde dicha célula madre adulta mesenquimal procede de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo.
- 5 11. Uso de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo formado por una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, la enfermedad de injerto contra huésped, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y una enfermedad cardiovascular, en donde dicha célula madre no se obtiene mediante métodos que destruyan embriones humanos o utilicen embriones humanos como materia prima.
- 10 12. Uso de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para preparar un medicamento para inducir tolerancia a un trasplante, en donde dicha célula madre no se obtiene mediante métodos que destruyan embriones humanos o utilicen embriones humanos como materia prima.
- 15 13. Uso de una célula madre caracterizada porque presenta niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 para preparar un medicamento para la reparación y regeneración de tejidos, en donde dicha célula madre no se obtiene mediante métodos que destruyan embriones humanos o utilicen embriones humanos como materia prima.
- 20 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en donde dicha célula madre se encuentra modificada mediante un inhibidor de miR-335.
15. Uso según la reivindicación 14, en donde el inhibidor de miR-335 es un polinucleótido de cadena sencilla que hibrida específicamente con miR-335 impidiendo su función.
- 25 16. Uso según la reivindicación 15, en donde el polinucleótido de cadena sencilla que hibrida específicamente con miR-335 impidiendo su función contiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o una secuencia claramente relacionada.
- 30 17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en donde la célula madre es una célula madre adulta.
18. Uso según la reivindicación 17, en donde la célula madre es una célula madre adulta mesenquimal.
19. Uso según la reivindicación 18, en donde la célula madre adulta mesenquimal procede de médula ósea o de tejido adiposo subcutáneo.
- 35 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en donde la célula madre es autóloga, alogénica o xenogénica con respecto al sujeto a ser tratado.
- 40 21. Un método *in vitro* para generar células T reguladoras, que comprende poner en contacto una población de células que contiene células T con una población de células madre caracterizadas porque presentan niveles reducidos de expresión y/o actividad de miR-335 en condiciones adecuadas para la generación de células T reguladoras, en donde dichas células madre no se obtienen mediante métodos que destruyan embriones humanos o utilicen embriones humanos como materia prima y en donde dichas condiciones adecuadas

comprenden co-cultivar dicha población de células madre con dicha población de células que contiene células T durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 5 días, en donde la proporción de células madre y células T en el co-cultivo está comprendida entre 1:2 y 1:20000.

- 5 22. Método *in vitro* según la reivindicación 21, en donde la población que contiene células T es una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
23. Método *in vitro* según las reivindicaciones 21 y 22, en donde la población de células madre es una población de células madre adultas.
- 10 24. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en donde la población de células madre es una población de células madre mesenquimales.
25. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en donde la población de células madre es
15 autóloga o alogénica respecto a la población que contiene células T.

A



B

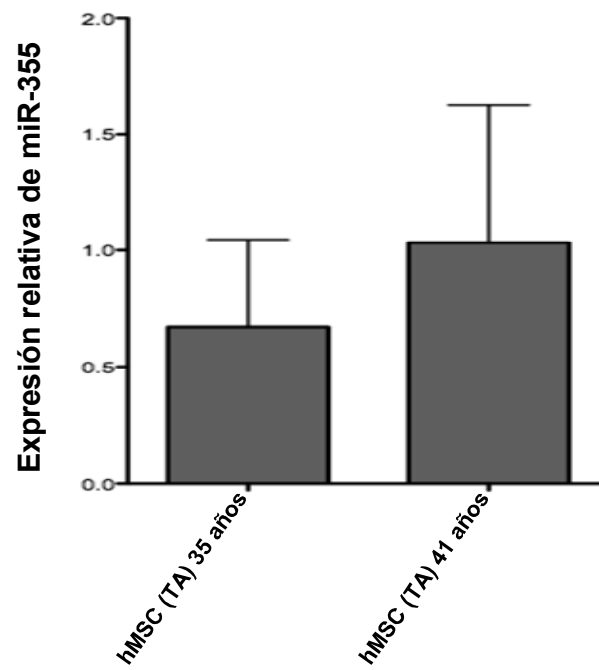


FIG. 1

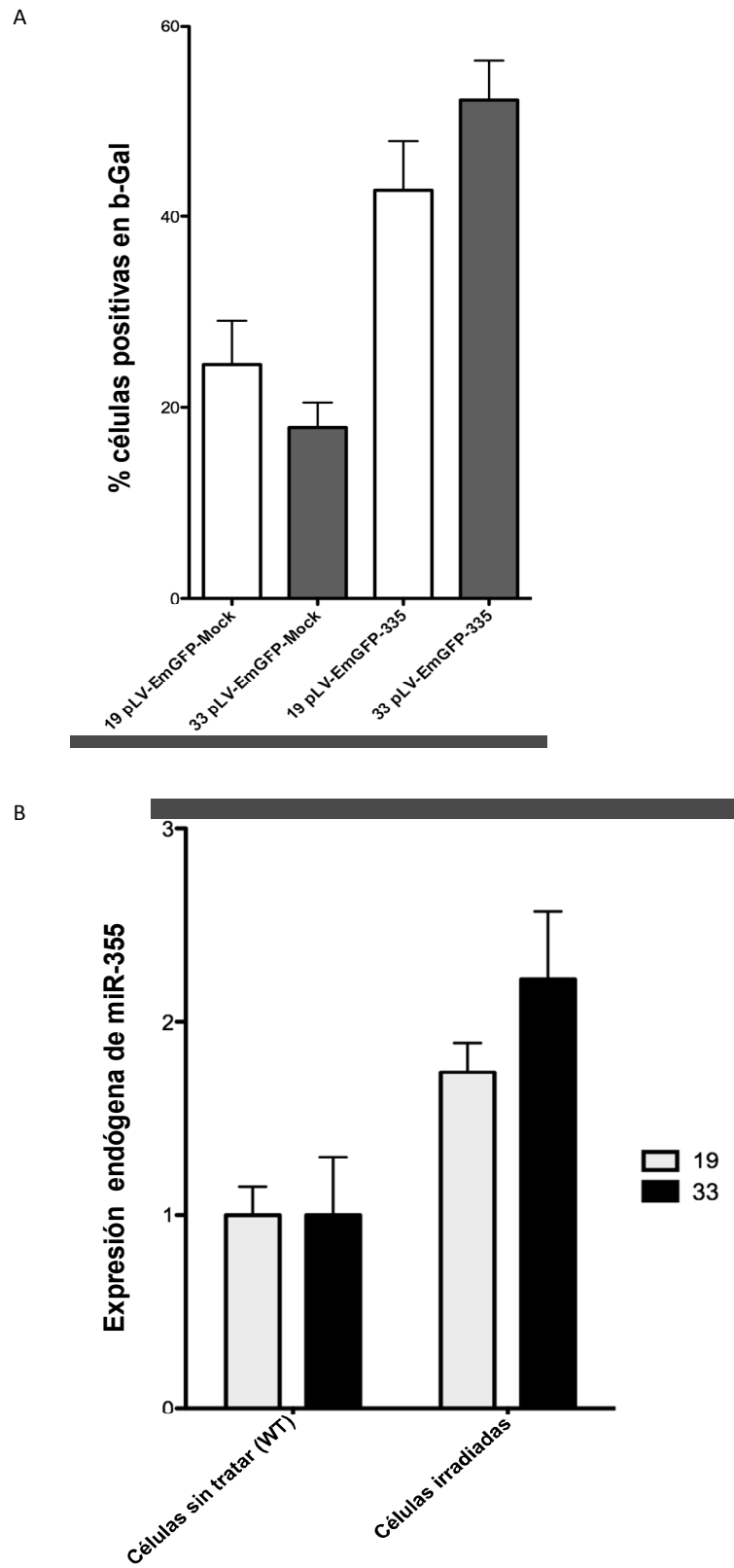
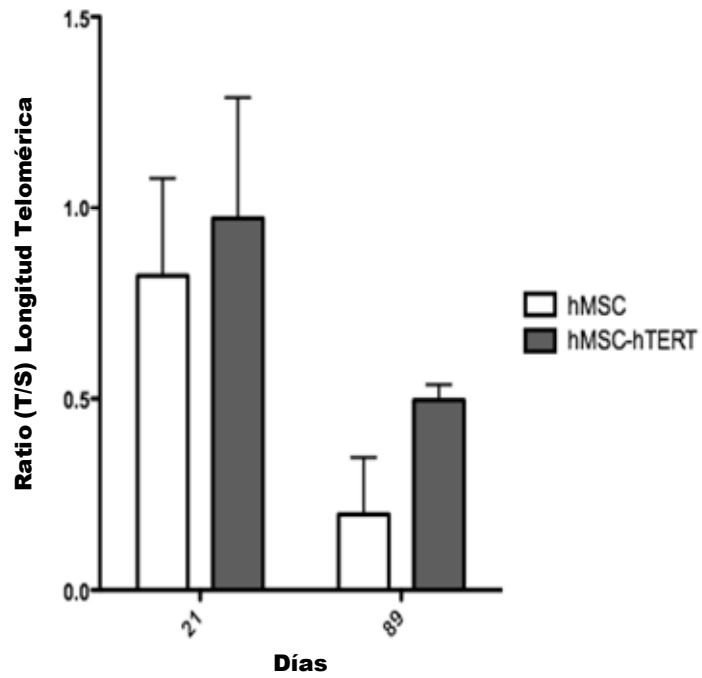


FIG. 2

A



B

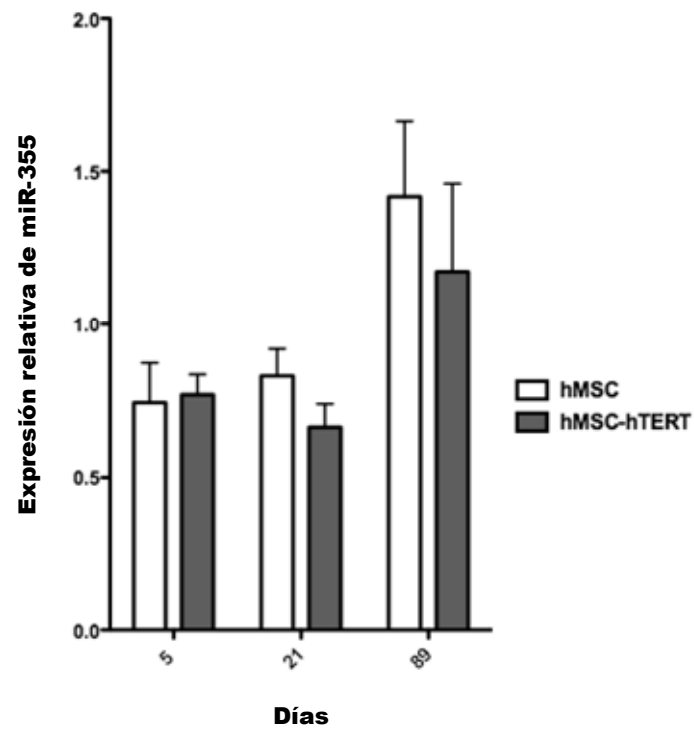


FIG. 3

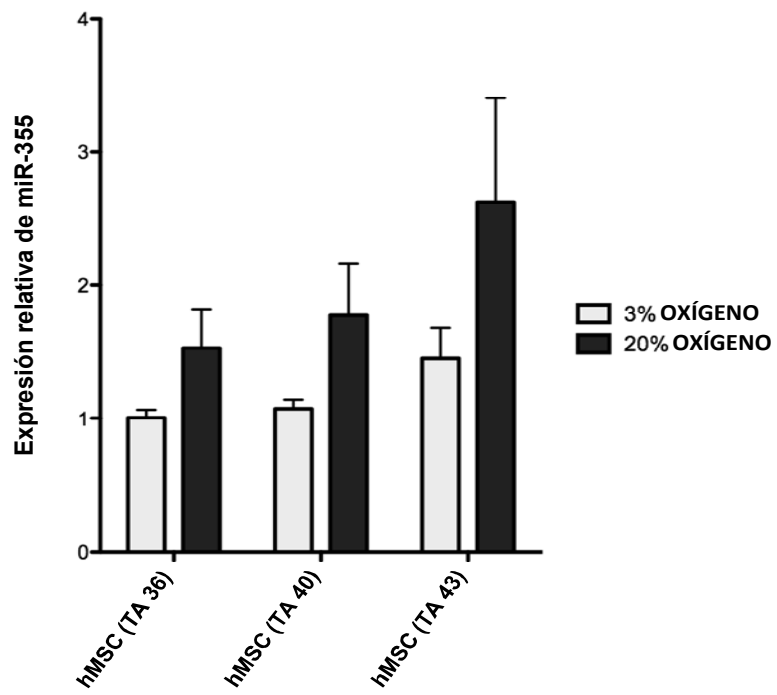


FIG. 4

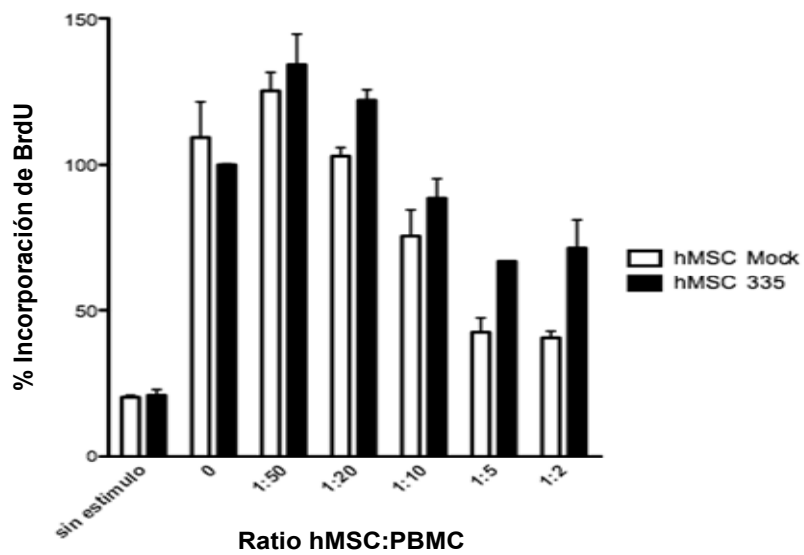


FIG. 5

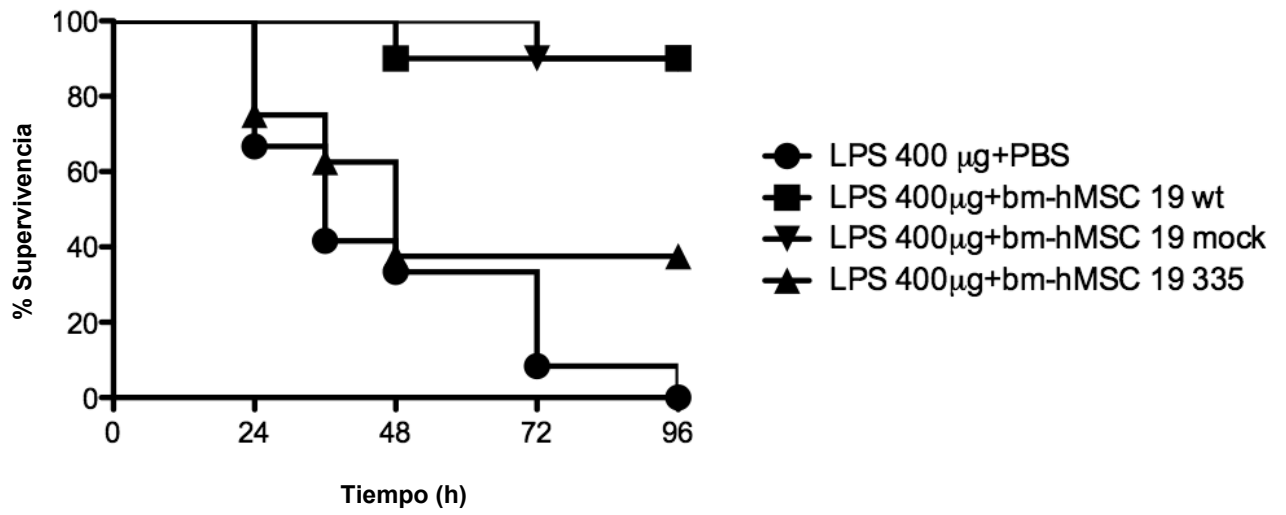


FIG. 6

ES 2 434 853 A1

Lista de Secuencias

<110> FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CARDIOVASCULARES CARLOS III (CNIC)

<120> MARCADOR MOLECULAR DE POTENCIA TERAPÉUTICA DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES HUMANAS Y SUS USOS

<130> P8509ES00

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleótido inhibidor de miR-335

<400> 1
uuuuucaua uugcuccuga cc

22



- ②① N.º solicitud: 201230919
②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.06.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BAI XUE-YUAN <i>et al.</i> miR-335 and miR-34 ^a Promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. Journal of the American Society of Nephrology: Jul 2011 VOL: 22 No: 7 Págs: 1252-1261 ISSN 1533-3450 (Electrónico). Doi: doi:10.1681/ASN.2010040367 pubmed:21719785. Ver todo el documento, especialmente resumen, párrafos 6, 11 y 12 de Resultados, Tabla 1 y Figura 2.	1-25
A	TOMÉ M <i>et al.</i> miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. Cell death and differentiation England. Junio 2011 VOL: 18 No: 6 Págs: 985-995 ISSN 1476-5403 (Electrónico) Doi: doi:10.1038/cdd.2010.167 pubmed:21164520. Ver todo el documento, especialmente resumen, párrafo 3 de Resultados y Discusión.	1-25
A	GRACIAS DONALD T <i>et al.</i> MicroRNAs: key components of immune regulation. Advances in experimental medicine and biology. 2011 VOL: 780 Págs: 15-26 ISSN 0065-2598 (Impreso) Doi: doi:10.1007/978-1-4419-5632-3_2 pubmed:21842361. Ver todo el documento.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
11.10.2013

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2006.01)**C12N5/0775** (2010.01)**A61K31/7105** (2006.01)

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

C12Q, C12N, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, Google Academics, EBI (EMBL Release, EMBL Patents) DGENE, REGISTRY, HCAPLUS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-25	SI
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-25	SI
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BAI XUE-YUAN <i>et al.</i> Journal of the American Society of Nephrology : Jul 2011 VOL: 22 No: 7 Págs: 1252-1261 ISSN 1533-3450 (Electrónico) Doi: doi:10.1681/ASN.2010040367 pubmed:21719785.	Julio 2011
D02	TOMÉ M <i>et al.</i> Cell death and differentiation England. Junio 2011 VOL: 18 No: 6 Págs: 985-995 ISSN 1476-5403 (Electrónico) Doi: doi:10.1038/cdd.2010.167 pubmed:21164520.	Junio 2011
D03	GRACIAS DONALD T <i>et al.</i> Advances in experimental medicine and biology. 2011 VOL: 780 Págs: 15-26 ISSN 0065-2598 (Impreso) Doi: doi:10.1007/978-1-4419-5632-3_2 pubmed:21842361.	2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método para determinar la capacidad inmunorreguladora de células madre adultas mesenquimales, que consiste en medir los niveles del microARN miR-335, de forma que si estos niveles son elevados respecto a un valor de referencia, es indicativo de que la célula madre tiene una baja capacidad inmunorreguladora, y si son niveles disminuidos respecto al nivel de referencia, la célula madre tiene una elevada capacidad inmunorreguladora. La solicitud reivindica también un método *in vitro* para incrementar la capacidad inmunorreguladora de una célula madre mediante la inhibición de la expresión y/o actividad del miR-335, y los usos terapéuticos de esa célula para tratar enfermedades autoinmunes, inflamatorias, enfermedad de injerto contra huésped o para inducir tolerancia a un trasplante. Finalmente, se reivindica un método *in vitro* para generar células T reguladoras, que comprende poner en contacto células T reguladoras con células madre mesenquimales que tienen niveles reducidos de expresión y/o actividad del miR-335.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue los métodos y usos de la solicitud tal y como están reivindicados, ni se han encontrado documentos que, solos o en combinación con otros, pudieran conducir al experto en la materia a los métodos y usos de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 25 de la solicitud tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.

Se citan en este informe tres documentos del campo técnico de la solicitud que se consideran cercanos a la misma pero que no afectan su novedad ni su actividad inventiva.

Así, el documento D01 divulga la capacidad del miR-335 y del miR-34a para inducir senescencia en células renales primarias, demostrando que estos dos microARNs están sobreexpresados en células viejas frente a células jóvenes, que la sobreexpresión de estos microARNs en células jóvenes induce senescencia, y que su inhibición retrasa los procesos senescentes en células viejas. Si bien en la presente solicitud de patente se describen estos mismos efectos para miR-335, en ella se estudia el efecto sobre células madre mesenquimales. Además de eso, en el documento D01 no se relaciona el efecto sobre senescencia con la capacidad inmunorreguladora de las células, por lo que no se considera que el documento D01 afecte la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 25 de la solicitud, según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.

En el documento D02 se divulga el efecto inhibitor de miR-335 sobre la proliferación, migración y diferenciación osteogénica y adipogénica de células madre mesenquimales humanas, de forma que se concluye que este microARN es parte de una ruta reguladora de células madre mesenquimales, y que su inhibición es necesaria para la proliferación, migración y diferenciación de estas células. Dado que en D02 no se hace referencia al efecto del miR-335 sobre la capacidad inmunorreguladora de las células madre mesenquimales, este documento no afecta la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 25 de la solicitud, según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

Finalmente, el documento D03 es una revisión del papel de diversos microARNs en la regulación del sistema inmune, pero sin incluir los efectos sobre células madre mesenquimales, ni citar específicamente el miR-335, por lo que tampoco este documento afectará la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 25 de la presente solicitud.