

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 944**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2016** **E 22150277 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025** **EP 4015624**

54 Título: **Ensayo de potencia**

30 Prioridad:

05.05.2015 AU 2015901605

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

19.05.2025

73 Titular/es:

**MESOBLAST INTERNATIONAL SÀRL (100.00%)
c/o Accounting and Management Services SA,
Route de Pre-Bois 20
1217 Meyrin, CH**

72 Inventor/es:

**SIMMONS, PAUL;
SUIRE, COLBY y
SEE, FIONA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 018 944 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de potencia

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a ensayos de potencia para productos de terapia celular. Se proporcionan ensayos de potencia para poblaciones celulares que comprenden células madre o precursoras del linaje mesenquimal.

Antecedentes

10 Varios productos de terapia celular para aplicaciones de terapia regenerativa o inmunológica han avanzado a la evaluación clínica y la autorización de comercialización. Sin embargo, la liberación al mercado de estos productos de terapia celular se ve obstaculizada por su complejidad y heterogeneidad, lo que dificulta la identificación de actividades biológicas relevantes y, por lo tanto, la definición de una calidad consistente del producto de terapia celular.

15 Los parámetros fisicoquímicos (por ejemplo, caracterización del tamaño, morfología, propiedades de dispersión de la luz, resistencia a la tracción, número de células, confluencia, identificación de marcadores fenotípicos, sustancias secretadas, genotipo, perfil de expresión de genes) se utilizan rutinariamente para la identificación y cuantificación de la sustancia activa, los intermedios, las impurezas y los contaminantes. Sin embargo, los parámetros fisicoquímicos no pueden confirmar que un producto será biológicamente activo y potente (es decir, que producirá el efecto deseado). Por el contrario, la caracterización biológica tiene en cuenta el efecto del producto sobre los sistemas biológicos, ya sea modelados en laboratorio o en el ser vivo en animales y, en
20 última instancia, en la clínica.

La legislación farmacéutica en Estados Unidos y Europa exige que las sustancias activas cuya estructura molecular no puede definirse por completo sean evaluadas en cuanto a su potencia antes de su liberación al mercado. Es un requisito legal evaluar la potencia de cada lote de un producto de terapia celular autorizado.

25 Las pruebas de potencia deben demostrar la actividad o actividades biológicas relevantes del producto. No es un requisito que las pruebas de potencia reflejen todas las funciones biológicas del producto, pero deberían indicar una o más funciones biológicas relevantes. Se espera que se establezcan la precisión, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados en las pruebas de potencia y que sean adecuadamente robustos.

30 Es necesario identificar los parámetros que son críticos para la eficacia de los productos de terapia celular y controlarlos (por ejemplo, a través de pruebas de potencia) de modo que se puedan fabricar productos de calidad constante.

Cao et al., 2015, *The Spine Journal* 15:P530-538 describe que las células madre mesenquimales de la médula ósea retardan la degeneración del disco intervertebral a través de la vía NF- κ B.

35 Wen et al., 2014, *Plos One* 9:e101841 describe los efectos inmunomoduladores de las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea sobre las células epiteliales corneales humanas estimuladas con citocinas proinflamatorias.

Kyurkchiev et al., 2014, *World J Stem Cells* 6:552-570 describe la secreción de citocinas inmunorreguladoras por células madre mesenquimales.

40 Wei et al., 2014, *Transl. Pediatr.* 3:71-90 describe la posible aplicación de células madre mesenquimales en la regeneración del disco intervertebral.

Strassburg et al., 2010, *Regenerative Medicine* 5:701-771 describe que el cocultivo induce la diferenciación de células madre mesenquimales y la modulación del fenotipo degenerado de las células del núcleo pulposo humano.

Resumen

45 La presente invención está dirigida a la materia expuesta en las reivindicaciones adjuntas.

Los presentes inventores han desarrollado un ensayo de potencia para medir la actividad biológica o la eficacia terapéutica de productos de terapia celular que comprenden células precursoras de linaje mesenquimal o células madre de linaje mesenquimal, denominadas en adelante "células madre o precursoras de linaje mesenquimal".

50 Por consiguiente, la presente descripción proporciona un método en laboratorio para seleccionar células precursoras mesenquimales humanas (MPC) para su uso en el tratamiento que comprende:

- (i) cultivar una población obtenida de las MPC humanas enriquecidas para STRO-1⁺ o TNAP⁺ de las MPC;
- (ii) determinar la cantidad de TGFβ1 liberada por las MPC humanas en el medio de cultivo; y
- (iii) seleccionar para su uso en el tratamiento las MPC humanas que liberan TGFβ1 en

5 el medio de cultivo en una cantidad de al menos 2800 pg/10⁶ células, en donde una cantidad de al menos aproximadamente 2800 pg/10⁶ células de TGFβ1 son indicativas de actividad biológica o eficacia terapéutica. Por ejemplo, una cantidad de al menos aproximadamente 2810 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2820 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2830 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2840 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2850 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2860 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2870 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2880 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2890 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2900 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2910 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2920 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2930 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2940 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2950 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2960 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2970 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2980 pg/10⁶ células de TGFβ1, al menos aproximadamente 2990 pg/10⁶ células de TGFβ1, o al menos alrededor de 3000 pg/10⁶ células de TGFβ1 son indicativas de actividad biológica o eficacia terapéutica.

En un modo de realización, la actividad biológica de las células comprende la capacidad de estimular la producción de colágeno en células fibrosas del anillo humano en laboratorio.

20 En un modo de realización, la eficacia terapéutica comprende la eficacia terapéutica en el tratamiento de la enfermedad degenerativa del disco.

En un modo de realización, el método comprende sembrar las células en un recipiente de cultivo a aproximadamente 50,000 células viables/cm².

25 En un modo de realización, el método comprende cultivar las células en un medio basal condrogénico suplementado con 0.5 % de albúmina de suero de bovino.

En un modo de realización, el método comprende cultivar células adherentes durante al menos 68 a 76 horas. En un modo de realización, las células adherentes se obtienen primero cultivando la población de células durante la noche en, por ejemplo, medio basal condrogénico suplementado con 0.5 % de albúmina de suero de bovino, para permitir que se adhieran al recipiente de cultivo.

30 En un modo de realización, la etapa de determinación comprende recoger una muestra del medio de cultivo en el que se cultivaron las células. En un modo de realización, la muestra recogida comprende todo el medio de cultivo en el que se cultivaron las células. En un modo de realización, el método comprende activar TGFβ1 latente en el medio de cultivo antes de determinar la cantidad de TGFβ1 en el medio de cultivo.

35 En un modo de realización, la activación de TGFβ1 latente comprende añadir un ácido, por ejemplo, HCl 1 N, al medio de cultivo para reducir el pH del medio de cultivo. En un modo de realización, el método comprende concentrar la muestra de medio de cultivo antes de reducir el pH. En un modo de realización, el método, después de la adición del ácido, comprende neutralizar el pH del medio de cultivo a 7.2 a 7.6 añadiendo, por ejemplo, NaOH 1.2 N/HEPES 0.5 M o NaOH 1N.

40 En un modo de realización, el método comprende determinar la cantidad de TGFβ1 en el medio de cultivo mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

En un ejemplo, el ELISA comprende:

(i) diluir el medio de cultivo 1:5 en un diluyente de muestra;

(ii) añadir el medio de cultivo diluido a un pocillo de una microplaca recubierta previamente con un anticuerpo monoclonal específico para el TGFβ1;

45 (iii) añadir diluyente de muestra a cada pocillo de la microplaca;

(iv) incubar la microplaca durante 2 horas a temperatura ambiente;

(v) lavar la microplaca;

(vi) añadir un conjugado de TGFβ1 al pocillo;

(vii) incubar la microplaca durante 2 horas a temperatura ambiente;

50 (viii) lavar la microplaca;

ES 3 018 944 T3

- (ix) añadir una solución de sustrato al pocillo;
- (x) incubar la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente;
- (xi) añadir una solución de detención al pocillo;
- 5 (xii) leer la densidad óptica en un lector de microplacas ajustado a 450 nm con corrección de longitud de onda a 570 nm;
- (xiii) determinar la concentración de TGF β 1 corregida para dilución.
- En un modo de realización, el diluyente de muestra es un medio basal condrogénico suplementado con 0.5 % de albúmina de suero de bovino.
- En un modo de realización, el método comprende además:
- 10 preparar diluciones en serie de un estándar de TGF β 1 en un diluyente de muestra con concentraciones finales que varían de 31.2-2000 pg/ml;
añadir los estándares a la microplaca antes de la etapa (iii);
construir una curva estándar utilizando un ajuste de curva logística de cuatro parámetros; y
determinar la concentración de TGF β 1 en el medio de cultivo por referencia a la curva estándar.
- 15 La presente descripción también proporciona un método en laboratorio para seleccionar células precursoras del linaje mesenquimal humano para su uso en el tratamiento que comprende:
- (i) obtener una población de células precursoras de linaje mesenquimal;
- (ii) sembrar las células en un recipiente de cultivo a 50,000 células viables/cm²;
- (iii) cultivar las células en medio basal condrogénico suplementado con 0.5 % de albúmina de suero de bovino;
- 20 (iv) recoger el medio de cultivo;
- (v) activar el TGF β 1 latente liberado por las células en el medio de cultivo añadiendo HCl 1 N para reducir el pH del medio de cultivo;
- (vi) neutralizar el pH del medio de cultivo a 7.2 a 7.6 añadiendo NaOH 1.2 N/HEPES 0.5 M o NaOH 1N;
- 25 (vii) diluir el medio de cultivo 1:5 en medio basal condrogénico suplementado con 0.5 % de albúmina de suero de bovino;
- (viii) añadir el medio de cultivo diluido a un pocillo de una microplaca recubierta previamente con un anticuerpo monoclonal específico para el TGF β 1;
- (ix) añadir diluyente de muestra a cada pocillo de la microplaca;
- (x) incubar la microplaca durante 2 horas a temperatura ambiente;
- 30 (xi) lavar la microplaca;
- (xii) añadir un conjugado de TGF β 1 al pocillo;
- (xiii) incubar la microplaca durante 2 horas a temperatura ambiente;
- (xiv) lavar la microplaca;
- (xv) añadir una solución de sustrato al pocillo;
- 35 (xvi) incubar la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente;
- (xvii) añadir una solución de detención al pocillo;
- (xviii) leer la densidad óptica en un lector de microplacas ajustado a 450 nm con corrección de longitud de onda a 570 nm;
- (xix) determinar la concentración de TGF β 1 corregida para dilución.
- 40 En un modo de realización, el método comprende además:
- preparar diluciones en serie de un estándar de TGF β 1 en medio basal condrogénico suplementado con 0.5 % de albúmina de suero de bovino con concentraciones finales que oscilan entre 31.2-2000 pg/ml;

añadir los estándares a la microplaca antes de la etapa (ix);
 construir una curva estándar utilizando un ajuste de curva logística de cuatro parámetros; y
 determinar la concentración de TGFβ1 en el medio de cultivo por referencia a la curva estándar.

5 La presente descripción también proporciona una población de células humanas aisladas enriquecidas para células precursoras del linaje mesenquimal (MPC) STRO-1⁺ o TNAP⁺ que liberan TGFβ1 en el medio de cultivo en una cantidad de al menos 2800 pg/10⁶ células, para su uso en el tratamiento, en donde la población de células humanas aisladas se selecciona mediante un método en laboratorio que comprende:

- (i) cultivar una población obtenida de las MPC humanas enriquecidas para STRO-1⁺ o TNAP⁺ de las MPC;
 (ii) determinar la cantidad de TGFβ1 liberada por las MPC humanas en el medio de cultivo; y
 10 (iii) seleccionar para su uso en el tratamiento las MPC humanas que liberan TGFβ1 en el medio de cultivo en una cantidad de al menos 2800 pg/10⁶ células.

En un modo de realización, la población aislada de células comprende células madre o precursoras de linaje mesenquimal expandidas en cultivo. En un modo de realización alternativo, la población aislada de células comprende células madre o precursoras de linaje mesenquimal recién aisladas.

15 En un modo de realización, las células madre o precursoras del linaje mesenquimal comprenden al menos el 5 % de la población celular aislada.

En un modo de realización, también se proporciona una composición que comprende una de las poblaciones de células aisladas mencionadas anteriormente y un criopreservante. En un modo de realización, el criopreservante en la composición es DMSO o Profreeze™. En un modo de realización, la composición
 20 comprende la población de células aisladas en 42.5 % (v/v) de Profreeze™ /50 % de αMEM (v/v)/7.5 % (v/v) de DMSO.

En un modo de realización, se proporciona en el presente documento una composición que comprende una de las poblaciones de células aisladas mencionadas anteriormente y hialuronano, por ejemplo, al menos
 25 aproximadamente 0.5 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 0.6 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 0.7 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 0.8 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 0.9 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 1 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 1.5 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 2 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 2.5 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 3 % de HA o sal de HA, al menos
 30 aproximadamente 3.5 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 4 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 4.5 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 5 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 6 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 7 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 8 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 9 % de HA o sal de HA, al menos aproximadamente 10 % de HA o sal de HA.

En un modo de realización, el tratamiento es para tratar a un sujeto con enfermedad de disco degenerativa.

35 En un modo de realización, una composición criopreservada de la descripción se descongela y se mezcla con hialuronano (HA) o una sal de HA, como, por ejemplo, HA sódico antes de la administración.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ubicación y estructura del IVD. (A) Representación que muestra la ubicación del disco intervertebral (IVD) entre 2 cuerpos intervertebrales. (B) Una vista a través de un disco sano que muestra el núcleo pulposo (NP) en el centro rodeado por el anillo fibroso (AF) y la placa terminal vertebral (figura adaptada de (Raj, 2008)).
 40

Figura 2: Efectos del CM de MPC sobre la proliferación y la composición de la matriz de las células NPC humanas en cultivos de micromasa. (A) Datos que muestran la incorporación de EdU en la proliferación de células del núcleo pulposo (NPC) en respuesta a medios acondicionados (CM) de células precursoras mesenquimales (MPC). Los datos se expresan como media ± SD del % de incorporación positiva de EdU. n=3 réplicas/condición. (B) Imágenes representativas de la tinción con Azul Alcian para proteoglicanos GAG sulfatados en cultivos de micromasa de NPC humanas. (C) Semicuantificación de proteoglicanos extraídos de cultivos de micromasa de NP. Los datos se expresan como media ± SD. n=3 réplicas/condición. Significación asignada a p≤ 0.05 frente a control medio basal.
 45

Figura 3: Efectos en laboratorio del CM de MPC sobre la proliferación y producción de matriz de AFC humano en cultivos de micromasa. (A) Datos que muestran la proliferación de células del anillo fibroso (AFC) en respuesta al CM de MPC. Los datos se expresan como media ± SD del % de incorporación positiva de EDU. n=3 réplicas/condición. (B) Cuantificación del colágeno total producido por cultivos de micromasa de AF en respuesta al CM de MPC. Datos representativos de un donante expresados como media ± SD. n=3 réplicas/condición. Significación asignada a p≤ 0.05 frente a control medio basal.
 50

Figura 4: Niveles de TGFβ1 detectados en el CM de MPC. Detección de TGFβ1 en el CM de MPC medida por ELISA. Los datos se expresan como promedio de muestras duplicadas. n=15 lotes de las MPC derivados de 5 donantes diferentes.

5 Figura 5: Efectos del TGFβ1 y el CM de MPC sobre el contenido de hidroxiprolina en cultivos de micromasa de AFC humanos. (A) Respuesta a la dosis de producción de colágeno mediada por el TGFβ1 humano recombinante (rhTGFβ1) en cultivos de micromasa de AF de 3 donantes de AFC. Los datos demuestran una inhibición significativa de la respuesta de rhTGF 1 con anticuerpo neutralizante de anti-TGFβ1. (B) Cuantificación del colágeno total producido por cultivos de micromasa AF en respuesta al CM de MPC después de la neutralización anti-TGFβ1 o el control de IgG. Datos generados a partir de 3 donantes de AFC y 4-7 lotes del CM de MPC. Los datos se expresan como media ± SD. n=3 réplicas/condición. Significación asignada a p ≤ 0.05; * frente a control medio basal; ‡ frente a control IgG.

10 Figura 6: Efectos de rhTGFβ1 sobre el contenido de hidroxiprolina en cultivos de micromasa de AFC humanos fetales frente a adultos. Producción de colágeno en respuesta al rhTGFβ1 por cultivos de micromasa de AFC fetales y adultos. Cada punto de datos representa 3 donantes de AFC fetales o adultos. Los datos se expresan como media ± SD. n=6-9 réplicas/condición.

15 Figura 7: Efectos de TGFβ y el CM de MPC sobre el contenido de hidroxiprolina en cultivos de micromasa de AFC humanos adultos. Producción de colágeno en respuesta al rhTGFβ1 o el CM de MPC por cultivos de micromasa de AFC adultos de 3 donantes de AFC (A, B, C). Los datos se expresan como media ± SD. n=3-8 réplicas/condición. (D) Contenido de hidroxiprolina medio en los 3 lotes de AFC adultos. Significación asignada a p ≤ 0.05 (relativo al control del medio basal (0 ng/ml rhTGFβ1)).

20 Figura 8: Niveles de TGFβ1 en CM de MPC cultivadas en diferentes medios basales. Detección de TGFβ1 en el CM de MPC medida por ELISA después del crecimiento en formulaciones de medios óptimas y subóptimas para la generación de CM. Barras oscuras=Medio basal condrogénico+0.5 % albúmina de suero de bovino (CBM 0.5+% BSA). Barras claras = EBM-2+0.5 % de BSA). Los datos se expresan como promedio de muestras duplicadas. Todos los lotes de la MPC derivan de un único donante.

25 Figura 9: Niveles de TGFβ1 detectados en el CM de MPC. La detección de TGFβ1 requirió un tratamiento ácido de las muestras y, por lo tanto, las mediciones reflejan el TGFβ1 total en CM. Los datos se expresan como media ± SD. n=18 lotes de las MPC derivados de 4 donantes diferentes.

30 Figura 10: Efectos del TGFβ1 y el CM de MPC sobre la composición de la matriz de AFC humanos fetales (lote 4729) en cultivos de micromasa. (A) El producto de la MPC de 4 lotes se transfectó con ARNpi dirigido al TGFβ1 o un control negativo codificado. Se muestran los niveles de TGFβ1 en CM generados a partir de células transfectadas. (B) Producción media de colágeno por parte de las AFC fetales (lote 4729) en respuesta a CM derivadas de la MPC no manipuladas o transfectadas con ARNpi. Los datos demuestran una inhibición significativa de la bioactividad del CM con ARNpi de TGFβ1. Los datos se expresan como media ± DE. n=18 CM normales (3-8 réplicas/CM) y las 4 MPC modificadas o transfectadas con ARNpi de TGFβ1 (3 réplicas/condición). Significación asignada a p ≤ 0.05 relativa al control basal no estimulado (*) o al control codificado (+).

35 Figura 11: Análisis de regresión de los niveles de TGFβ1 en el CM de MPC *contra* Producción de colágeno de AFC.

40 Figura 12: Secreción de TGF-β1 por dos lotes de la MPC en función de la densidad de siembra celular inicial, el tiempo y el operador. (A) Análisis del trascurso temporal de células sembradas a 25,000 células/cm². (B) Análisis del trascurso temporal de células sembradas a 50,000 células/cm².

45 Figura 13. Linealidad de las curvas estándar de TGFβ1 utilizando estándares de 3 lotes de kits de ELISA. (A) Curvas estándar preparadas en diluyente de calibrador. (B) Curvas estándar preparadas en CBM + 0.5 % de BSA.

50 Figura 14. Comparación de curvas estándar para el ensayo ELISA de TGFβ1 preparado en diluyente de calibrador y medio basal condrogénico (CBM) + 0.5 % de BSA. El efecto de la matriz se evaluó comparando curvas estándar preparadas en diluyente de calibrador y CBM + 0.5 % de BSA (analizadas en paralelo en las mismas placas). Cada estándar se representó por duplicado y se realizaron dos experimentos independientes. Las OD fueron ligeramente más altas cuando los estándares se prepararon en CBM en comparación con el diluyente de calibrador, lo que indica la presencia de un efecto de matriz.

Descripción de modos de realización

Técnicas generales y definiciones

55 A lo largo de toda esta memoria descriptiva, a menos que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a una sola etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de

composiciones de materia se considerará que abarca uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de esas etapas, composiciones de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia.

5 Los expertos en la técnica apreciarán que la descripción descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las específicamente descritas. Se debe entender que la descripción incluye todas esas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o se indican en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones o dos o más de dichas etapas o características.

10 Cualquier ejemplo descrito en el presente documento se considerará aplicable por analogía a cualquier otro ejemplo a menos que se indique específicamente lo contrario.

A menos que se defina específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento se considerarán que tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto medio en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, diferenciación de células madre, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).

15 A menos que se indique lo contrario, las células madre, el cultivo celular y las técnicas quirúrgicas utilizadas en la presente descripción son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Estas técnicas se describen y explican a lo largo de toda la literatura en fuentes, tal como (Perbal, 1984) (Sambrook y Green, 2012) (Brown, 1991) (Glover y Hames, 1995 y 1996) (Ausubel F. M., 1987 incluidas todas las actualizaciones hasta el presente) (Harlow y Lane, 1988) y (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, 20 1991 incluidas todas las actualizaciones hasta el presente).

El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se entenderá que significa "X e Y" o "X o Y" y se considerará que proporciona apoyo explícito para ambos significados o para cualquiera de los significados.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término aproximadamente, a menos que se indique lo contrario, se refiere a +/- 10 %, más preferiblemente +/- 5 %, del valor designado.

25 A lo largo de toda esta memoria descriptiva, la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicadas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Células precursoras de linaje mesenquimal

30 Como se utiliza en el presente documento, el término "células madre o precursoras de linaje mesenquimal" se refiere a células multipotentes indiferenciadas que tienen la capacidad de autorenovarse manteniendo la multipotencia y la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células, ya sea de origen mesenquimal, por ejemplo, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células estromales, fibroblastos y tendones, o de origen no mesodérmico, por ejemplo, hepatocitos, células neurales y células epiteliales.

35 El término "células madre o precursoras del linaje mesenquimal" incluye tanto a las células progenitoras como a su progenie indiferenciada. El término también incluye células precursoras mesenquimales, células estromales multipotentes, células madre mesenquimales, células precursoras mesenquimales perivasculares y su progenie indiferenciada.

40 Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal pueden ser autólogas, xenogénicas, singénicas o isogénicas. Las células autólogas se aíslan del mismo individuo al que serán reimplantadas. Las células alogénicas se aíslan de un donante de la misma especie. Las células xenogénicas se aíslan de un donante de otra especie. Las células singénicas o isogénicas se aíslan de organismos genéticamente idénticos, como gemelos, clones o modelos animales de investigación altamente endogámicos.

45 Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal residen principalmente en la médula ósea, pero también se ha demostrado que están presentes en diversos tejidos del huésped, incluidos, por ejemplo, la sangre del cordón umbilical, la sangre periférica de adultos, el tejido adiposo, el hueso trabecular y la pulpa dental.

50 Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal se pueden aislar de los tejidos del huésped y enriquecer mediante la selección de células STRO-1+. Por ejemplo, un aspirado de médula ósea de un sujeto puede ser tratado además con un anticuerpo contra STRO-1 o TNAP para permitir la selección de células madre o precursoras del linaje mesenquimal. En un ejemplo, las células madre o precursoras del linaje mesenquimal se pueden enriquecer mediante el uso del anticuerpo de STRO-1 descrito en (Simmons y Torok-Storb, 1991).

- Las células STRO-1+ son células que se encuentran en la médula ósea, la sangre, las células de la pulpa dental, el tejido adiposo, la piel, el bazo, el páncreas, el cerebro, el riñón, el hígado, el corazón, la retina, los folículos pilosos, el intestino, los pulmones, los ganglios linfáticos, el timo, los huesos, los ligamentos, los tendones, el músculo esquelético, la dermis y el periostio; y son capaces de diferenciarse en líneas germinales como el mesodermo y/o el endodermo y/o el ectodermo. Por tanto, las células STRO-1+ son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos de células, incluidos, entre otros, los tejidos adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y conectivo fibroso. La vía específica de compromiso de linaje y diferenciación en la que ingresan estas células depende de diversas influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos del huésped. El término "enriquecido" como se utiliza en el presente documento describe una población de células en la que la proporción de un tipo de célula particular o la proporción de una cantidad de tipos de células particulares aumenta en comparación con una población de células no tratada (por ejemplo, células en su entorno nativo). En un ejemplo, una población enriquecida con células STRO-1+ comprende al menos aproximadamente 0.1 % o 0.5 % o 1 % o 2 % o 5 % o 10 % o 15 % o 20 % o 25 % o 30 % o 50 % o 75 % de células STRO-1+. A este respecto, se tomará que el término "población de células enriquecida con células STRO-1+" proporciona apoyo explícito al término "población de células que comprende X% de células STRO-1+", en donde X% es un porcentaje como se cita en el presente documento. Las células STRO-1+ pueden, en algunos ejemplos, formar colonias clonogénicas, por ejemplo, CFU-F (fibroblastos) o un subconjunto de las mismas (por ejemplo, 50 % o 60 % o 70 % o 70 % o 90 % o 95 %) pueden tener esta actividad.
- En un ejemplo, la población de células se enriquece a partir de una preparación celular que comprende células STRO-1+ en una forma seleccionable. A este respecto, se entenderá por el término "forma seleccionable" que las células expresan un marcador (por ejemplo, un marcador de superficie celular) que permite la selección de las células STRO-1+. El marcador puede ser STRO-1, pero no es necesario. Por ejemplo, como se describe y/o ejemplifica en el presente documento, las células (por ejemplo, MPC) que expresan STRO-2 y/o STRO-3 (TNAP) y/o STRO-4 y/o VCAM-1 y/o CD146 y/o 3G5 también expresan STRO-1 (y pueden ser STRO-1^{brillante}). Por consiguiente, una indicación de que las células son STRO-1+ no significa que las células sean seleccionadas por la expresión de STRO-1. En un ejemplo, las células se seleccionan basándose al menos en la expresión de STRO-3, por ejemplo, son STRO-3+ (TNAP+).
- La referencia a la selección de una célula o población de la misma no requiere necesariamente la selección de una fuente de tejido específica. Como se describe en el presente documento, las células STRO-1+ pueden seleccionarse, aislarse o enriquecerse a partir de una gran variedad de fuentes. Dicho esto, en algunos ejemplos, estos términos brindan respaldo para la selección de cualquier tejido que comprenda células STRO-1+ o tejido vascularizado o tejido que comprenda pericitos (por ejemplo, pericitos STRO-1+) o cualquiera de los tejidos citados en el presente documento.
- En un ejemplo, las células madre o precursoras del linaje mesenquimal de la descripción expresan uno o más marcadores seleccionados individual o colectivamente del grupo que consiste en TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+ (HSP-90β), CD45+, CD146+, 3G5+.
- Por "individualmente" se entiende que la descripción abarca los marcadores o grupos de marcadores enumerados por separado y que, a pesar de que los marcadores individuales o grupos de marcadores no se pueden enumerar por separado en el presente documento, las reivindicaciones adjuntas pueden definir dichos marcadores o grupos de marcadores por separado y de manera indivisible entre sí.
- Por "colectivamente" se entiende que la descripción abarca cualquier número o combinación de los marcadores o grupos de péptidos citados, y que, a pesar de que dichos números o combinaciones de marcadores o grupos de marcadores pueden no estar específicamente enumerados en el presente documento, las reivindicaciones adjuntas pueden definir dichas combinaciones o subcombinaciones por separado y de manera indivisible de cualquier otra combinación de marcadores o grupos de marcadores.
- En un ejemplo, las células STRO-1+ son STRO-1^{brillante} (sin. STRO-1^{bri.}). En un ejemplo, las células STRO-1^{bri.} se enriquecen preferentemente con respecto a las células STRO-1^{tenuo} o STRO-1^{intermedio}.
- En un ejemplo, las células STRO-1^{brillante} son además una o más de TNAP+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, STRO-4+(HSP-90β) y/o CD146+. Por ejemplo, las células se seleccionan para uno o más de los marcadores anteriores y/o se muestra que expresan uno o más de los marcadores anteriores. A este respecto, no es necesario probar específicamente una célula que demuestre que expresa un marcador, sino que se pueden analizar células previamente enriquecidas o aisladas y utilizarlas posteriormente; se puede asumir razonablemente que las células aisladas o enriquecidas también expresan el mismo marcador.
- En un ejemplo, las células STRO-1^{brillante} son células precursoras mesenquimales perivasculares como se define en el documento WO 2004/85630, caracterizado por la presencia del marcador perivascular 3G5.
- Una célula considerada "positiva" para un marcador determinado puede expresar un nivel bajo (baj. o tenue) o alto (brillante, bri.) de ese marcador dependiendo del grado en que el marcador esté presente en la superficie

celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de la fluorescencia u otro marcador utilizado en el proceso de clasificación de las células. La distinción entre baj. (o tenue u opaco) y bri. se entenderá en el contexto del marcador utilizado en una población celular particular que se esté clasificando. Una célula considerada "negativa" para un marcador determinado no necesariamente está completamente ausente de esa célula. Este término significa que el marcador se expresa en un nivel relativamente muy bajo por esa célula y que genera una señal muy baja cuando está marcado de forma detectable o es indetectable por encima de los niveles de fondo, por ejemplo, los niveles detectados utilizando un anticuerpo de control de isotipo.

El término "brillante" o bri. como se utiliza en el presente documento, se refiere a un marcador en una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando está marcado de manera detectable. Sin querer limitarnos a la teoría, se propone que las células "brillantes" expresan más proteína marcadora objetivo (por ejemplo, el antígeno reconocido por un anticuerpo de STRO-1) que otras células de la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri.} producen una mayor señal fluorescente, cuando se etiquetan con un anticuerpo de STRO-1 conjugado con FITC, según lo determinado por el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), que las células no brillantes (STRO-1^{opaco/tenue}). En un ejemplo, las células madre o precursoras del linaje mesenquimal se aíslan de la médula ósea y se enriquecen mediante la selección de células STRO-1+. En este ejemplo, las células "brillantes" constituyen al menos aproximadamente el 0.1 % de las células mononucleares de médula ósea marcadas con mayor brillo contenidas en la muestra inicial. En otros ejemplos, las células "brillantes" constituyen al menos aproximadamente el 0.1 %, al menos aproximadamente el 0.5 %, al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente el 1.5 % o al menos aproximadamente el 2 % de las células mononucleares de médula ósea marcadas más brillantemente contenidas en la muestra de partida. En un ejemplo, las células STRO-1^{brillante} tienen una expresión de superficie de STRO-1 más de 2 magnitudes logarítmicas que el "fondo", es decir, las células que son STRO-1-. En comparación, las células STRO-1^{tenue} y/o STRO-1^{intermedio} tienen una expresión de superficie de STRO-1 menos de 2 magnitudes logarítmicas mayores, típicamente alrededor de 1 logarítmica o menos que el "fondo".

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "TNAP" pretende abarcar todas las isoformas de la fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma del hígado (LAP), la isoforma del hueso (BAP) y la isoforma del riñón (KAP). En un ejemplo, el TNAP es BAP. En un ejemplo, TNAP se refiere a una molécula que puede unirse al anticuerpo de STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 según las disposiciones del Tratado de Budapest con el número de acceso al depósito PTA-7282.

Además, en un ejemplo, las células STRO-1+ son capaces de dar lugar a CFU-F clonogénicas.

En un ejemplo, una proporción significativa de las células STRO-1+ son capaces de diferenciarse en al menos dos líneas germinales diferentes. Los ejemplos no limitantes de los linajes a los que se pueden comprometer las células incluyen células precursoras óseas; progenitores de hepatocitos, que son multipotentes para las células epiteliales del conducto biliar y los hepatocitos; células neuronales restringidas, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que progresan a neuronas; precursores de músculo cardíaco y cardiomiocitos, líneas de células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a la glucosa. Otros linajes incluyen, pero no se limitan a, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos, y células precursoras de los siguientes: células epiteliales del pigmento de la retina, fibroblastos, células de la piel como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales del conducto renal, células del músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartilago, adipocito, fibroblasto, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocitos y oligodendrocitos.

En un ejemplo, las células madre o precursoras del linaje mesenquimal son MSC. Las MSC pueden ser una composición homogénea o pueden ser una población celular mixta enriquecida en las MSC. Se pueden obtener composiciones homogéneas de las MSC cultivando células periósticas o de médula ósea adherentes, y las MSC se pueden identificar mediante marcadores de superficie celular específicos que se identifican con anticuerpos monoclonales únicos. Un método para obtener una población celular enriquecida en las MSC se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense 5486359. Fuentes alternativas de las MSC incluyen, entre otras, sangre, piel, sangre del cordón umbilical, músculo, grasa, hueso y pericondrio.

Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal aisladas o enriquecidas se pueden expandir en laboratorio por cultivo. Como apreciarán los expertos en la técnica, las células madre o precursoras del linaje mesenquimal aisladas o enriquecidas se pueden criopreservar, descongelar y posteriormente expandir en laboratorio por cultivo.

En un ejemplo, las células madre o precursoras del linaje mesenquimal aisladas, enriquecidas o cultivadas se sembraron a 50,000 células viables/cm² en un medio de cultivo suplementado con suero, por ejemplo, medio esencial mínimo alfa (αMEM) suplementado con 10 % de suero de feto de bovino (FBS) y glutamina, y se dejó adherir al recipiente de cultivo durante la noche a 37 °C, 20 % de O₂. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó con medio basal condrogénico (CBM; Lonza, Walkersville, MD) suplementado con 0.5 % de

albúmina de suero de bovino (BSA) y las células se cultivaron durante 68 a 72 horas más a 37 °C, 5 % de O₂ antes de determinar la cantidad de TGFβ1 liberada por las células en el medio de cultivo.

5 Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal cultivadas son fenotípicamente diferentes a las células en un ser vivo. Por ejemplo, en un modo de realización expresan uno o más de los siguientes marcadores, CD44, NG2, DC146 y CD140b.

Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal cultivadas son biológicamente diferentes a las células en un ser vivo, que tienen una tasa de proliferación más alta en comparación con las células en gran medida no cíclicas (quiescentes) en un ser vivo.

10 Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal pueden criopreservarse antes de su administración a un sujeto.

Determinación de la cantidad de niveles de TGFβ1

15 La presente descripción contempla cualquier forma de ensayo, incluyendo Western blot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo inmunoabsorbente ligado a fluorescencia (FLISA), ensayo de competencia, radioinmunoensayo, inmunoensayo de flujo lateral, inmunoensayo de flujo continuo, ensayo electroquimioluminiscente, ensayos basados en nefelometría, ensayo basado en turbidometría, ensayos basados en clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la detección de TGFβ1 en medio de cultivo utilizado para cultivar células precursoras o de linaje mesenquimal, y resonancia de plasmón de superficie (SPR o Biacore).

Una forma de ensayo adecuado es, por ejemplo, un ELISA o FLISA.

20 En una forma, dicho ensayo implica inmovilizar una proteína de unión al TGFβ1 sobre una matriz sólida, tal como, por ejemplo, un micropocillo o una tira reactiva de poliestireno o policarbonato, una membrana o un soporte de vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). Luego, una muestra de prueba se pone en contacto directo con la proteína de unión al TGFβ1 y el TGFβ1 en la muestra se une o captura. Después del lavado para eliminar cualquier proteína no unida en la muestra, una proteína que se une al TGFβ1 en un epitopo distinto se
25 pone en contacto directo con el TGFβ1 capturado. Esta proteína detectora generalmente está marcada con una molécula indicadora detectable, como, por ejemplo, una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP)), fosfatasa alcalina (AP) o β-galactosidasa) en el caso de un ELISA o un fluoróforo en el caso de un FLISA. Alternativamente, se puede utilizar una segunda proteína marcada que se une a la proteína detectora. Después del lavado para eliminar cualquier proteína no unida, la molécula reportera detectable se detecta mediante la adición de un sustrato en el caso de un ELISA, como, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, TMB o toluidina, o 5-bromo-4-cloro-3-indol-beta-D-galactopiranosido (x-gal). Por supuesto, la proteína inmovilizada (de captura) y la proteína detectora pueden utilizarse de manera opuesta.

Luego se determina el nivel del antígeno en la muestra utilizando una curva estándar que se ha elaborado utilizando cantidades conocidas del marcador o por comparación con una muestra de control.

35 Los ensayos descritos anteriormente se pueden modificar fácilmente para utilizar la quimioluminiscencia o la electroquimioluminiscencia como base para la detección.

40 Como será evidente para el experto en la técnica, otros métodos de detección basados en un ensayo inmunoabsorbente son útiles en la realización de la presente descripción. Por ejemplo, un método inmunoabsorbente basado en la descripción anterior que utiliza una radioetiqueta para la detección, o una etiqueta de oro (por ejemplo, oro coloidal) para la detección, o un liposoma, por ejemplo, que encapsula NAD⁺ para la detección o un ensayo inmunoabsorbente ligado a acridinio.

45 En algunos ejemplos de la descripción, el nivel de TGFβ1 se determina utilizando un detector de resonancia de plasmón de superficie (por ejemplo, BIAcore™, GE Healthcare, Piscataway, N.J.), un dispositivo de flujo continuo (por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense 7205159), un dispositivo de micro o nanoinmunoensayo (por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense 7271007), un dispositivo de flujo lateral (por ejemplo, como se describe en la publicación estadounidense 20040228761 o la publicación estadounidense 20040265926), un inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense 4593089 o la patente estadounidense 4751190), o un ensayo inmunoturbidimétrico (por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense 5571728 o la patente estadounidense 6248597).

Composiciones y administración

55 Se puede preparar una composición que comprende células madre o precursoras del linaje mesenquimal en un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en el presente documento se refiere a composiciones de materia que facilitan el almacenamiento, la administración y/o mantienen la actividad biológica del precursor del linaje mesenquimal o de las células madre.

- En un ejemplo, el portador no produce un efecto adverso local o sistémico significativo en el receptor. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser sólido o líquido. Ejemplos útiles de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, solventes, surfactantes, excipientes, agentes de suspensión, agentes tampón, agentes lubricantes, adyuvantes, vehículos, emulsionantes, absorbentes, medios de dispersión, recubrimientos, estabilizadores, coloides protectores, adhesivos, espesantes, agentes tixotrópicos, agentes de penetración, agentes secuestrantes, andamiajes, agentes isotónicos y retardantes de la absorción que no afectan la viabilidad y actividad del precursor del linaje mesenquimal o de las células madre. La selección de un portador adecuado es competencia de los expertos en la técnica.
- Portadores farmacéuticos adecuados incluyen, entre otros, hialuronano, hialuronano modificado químicamente, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, sulfato de condroitina, glucosamina, manosamina, proteoglicano, fragmentos de proteoglicano, quitina, quitosano u otro material polisacárido o polimérico.
- Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal también pueden incorporarse o incrustarse dentro de los andamiajes. Andamiajes adecuados incluyen, entre otros, andamiajes biológicos y degradables. Los andamiajes biodegradables naturales incluyen, entre otros, andamiajes de colágeno, fibronectina y laminina. Los andamiajes biodegradables sintéticos incluyen, entre otros, andamiajes de ácido poliglicólico (por ejemplo, como se describe en (Vacanti, Morse y Saltzman, 1988) (Cima, Ingber, Vacanti y Langer, 1991) (Vacanti, Langer, Schloo y Vacanti, 1991)), polímeros sintéticos tales como, por ejemplo, polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico; y esponjas reabsorbibles de gelatina tales como, por ejemplo, Gelform™ (Pfizer).
- Las composiciones de la descripción pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. El término "forma unitaria de dosificación" como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico o profiláctico deseado en asociación con el portador farmacéutico. La dosis de células madre o precursoras del linaje mesenquimal puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto a tratar.
- Las dosis de ejemplo incluyen al menos aproximadamente 1×10^6 células. Por ejemplo, una dosis puede comprender entre aproximadamente 1.0×10^6 hasta aproximadamente 1×10^{10} células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.1×10^6 hasta aproximadamente 1×10^9 células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.2×10^6 hasta aproximadamente 1×10^8 células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.3×10^6 hasta aproximadamente 1×10^7 células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.4×10^6 hasta aproximadamente 9×10^6 células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.5×10^6 hasta aproximadamente 8×10^6 células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.6×10^6 hasta aproximadamente 7×10^6 células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.7×10^6 hasta aproximadamente 6×10^6 células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.8×10^6 hasta aproximadamente 5×10^6 células, por ejemplo, entre aproximadamente 1.9×10^6 hasta aproximadamente 4×10^6 células, por ejemplo, entre aproximadamente 2×10^6 hasta aproximadamente 3×10^6 células.
- En un ejemplo, la dosis comprende entre aproximadamente 5×10^5 hasta 2×10^7 células, por ejemplo, entre aproximadamente 6×10^6 células a aproximadamente 1.8×10^7 células. La dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 6×10^6 células o aproximadamente 1.8×10^7 células.
- Las células madre o precursoras del linaje mesenquimal comprenden al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % de la población celular de la composición.
- Las composiciones de la descripción pueden criopreservarse. La criopreservación de células madre o precursoras del linaje mesenquimal se puede llevar a cabo utilizando métodos de enfriamiento a velocidad lenta o protocolos de congelación "rápida" conocidos en la técnica. Preferiblemente, el método de criopreservación mantiene fenotipos similares, marcadores de superficie celular y tasas de crecimiento de las células criopreservadas en comparación con las células no congeladas.
- La composición criopreservada puede comprender una solución de criopreservación. El pH de la solución de criopreservación suele ser de 6.5 a 8, preferiblemente 7.4.
- La solución de criopreservación puede comprender una solución isotónica estéril, no pirogénica, tal como, por ejemplo, PlasmaLyteA™. 100 ml de PlasmaLyteA™ contienen 526 mg de cloruro de sodio, USP (NaCl); 502 mg de gluconato de sodio ($C_6H_{11}NaO_7$); 368 mg de acetato de sodio trihidrato, USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); 37 mg de

cloruro de potasio, USP (KCl); y 30 mg de cloruro de magnesio, USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$). No contiene agentes antimicrobianos. El pH se ajusta con hidróxido de sodio. El pH es 7.4 (6.5 a 8.0).

La solución de criopreservación puede incluir Profreeze™. La solución de criopreservación puede comprender adicional o alternativamente un medio de cultivo, por ejemplo, α MEM.

5 Para facilitar la congelación, normalmente se añade a la solución de criopreservación un crioprotector como, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO). Lo ideal es que el crioprotector no sea tóxico para las células ni los pacientes, no sea antigénico, sea químicamente inerte, proporcione una alta tasa de supervivencia después de la descongelación y permita el trasplante sin lavado. Sin embargo, el crioprotector más utilizado, DMSO, muestra cierta citotoxicidad. El almidón hidroxietilado (HES) se puede utilizar como sustituto o en combinación
10 con DMSO para reducir la citotoxicidad de la solución de criopreservación.

La solución de criopreservación puede comprender uno o más de DMSO, almidón hidroxietilado, componentes de suero humano y otros agentes de relleno de proteínas. En un ejemplo, la solución criopreservada comprende aproximadamente un 5 % de albúmina de suero humano (HSA) y aproximadamente un 10 % de DMSO. La solución de criopreservación puede comprender además uno o más de metilcelulosa, polivinilpirrolidona (PVP) y trehalosa.
15

En un modo de realización, las células se suspenden de 42.5 % de Profreeze™/50 % de α MEM/7.5 % de DMSO y enfriado en un congelador de velocidad controlada.

La composición criopreservada puede descongelarse y administrarse directamente al sujeto o añadirse a otra solución, por ejemplo, que comprende HA. Alternativamente, la composición criopreservada se puede descongelar y las células madre o precursoras del linaje mesenquimal se pueden volver a suspender en un portador alternativo antes de la administración.
20

Las composiciones de la descripción se pueden administrar mediante una vía que sea adecuada para el estado de enfermedad particular que se va a tratar. Por ejemplo, las composiciones de la descripción se pueden administrar por vía sistémica, es decir, por vía parenteral, intravenosa o mediante inyección. Las composiciones de la descripción pueden estar dirigidas a un tejido u órgano en particular.
25

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis.
30

En algunos modos de realización, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir a un paciente antes de iniciar la terapia con composiciones celulares. De hecho, el trasplante de células STRO-1+ alogénicas en ovejas fue bien tolerado en ausencia de inmunosupresión. Sin embargo, en otros casos puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse administrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células pueden estar encapsuladas en una cápsula que es permeable a los nutrientes y al oxígeno, requeridos por la célula y los factores terapéuticos, pero es impermeable a los factores humorales inmunes y a las células. Preferiblemente, el encapsulante es hipoalergénico, se sitúa de manera fácil y estable en un tejido objetivo y proporciona protección adicional a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, las células pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.
35
40

Se apreciará que las células madre o precursoras del linaje mesenquimal pueden administrarse con otros fármacos o moléculas biológicas beneficiosas (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando se administran con otros agentes, pueden administrarse juntos en una única composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (ya sea antes o después de la administración de los otros agentes). Los factores bioactivos que pueden coadministrarse incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de MAPK p38, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST™, TRANILAST™, REMICADE™, SIROLIMUS™, y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como TEPOXALINA™, TOLMETÍN™, SUPROFENO™); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina como ciclosporina, tacrolimus); inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS™, EVEROLIMUS™); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2R α (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-células T (por ejemplo, globulina anti-timocito (ATG); globulina anti-linfocito (ALG); anticuerpo de célula anti-T monoclonal OKT3); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona),
45
50
55

compuestos antitrombina, antagonistas del receptor plaquetario, anticuerpos antitrombina, anticuerpos antirreceptor plaquetario, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e inhibidores plaquetarios); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), así como anestésicos locales.

5 Tratamiento de la enfermedad degenerativa del disco

Cualquiera de las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción debe interpretarse como referencia a compuestos, composiciones, composiciones farmacéuticas y medicamentos descritos en el presente documento para su uso en métodos de tratamiento en un sujeto, incluidos los seres humanos.

10 El disco intervertebral (IVD) es una unidad funcional que conecta los cuerpos vertebrales de la columna y es responsable de la absorción de impactos y la movilidad de la unidad espinal (Raj, 2008). Está compuesto por un núcleo pulposo central (NP) y un anillo fibroso periférico (AF), y está separado de los cuerpos vertebrales por dos placas terminales cartilaginosas (EP) (figura 1). El NP forma el núcleo interno gelatinoso del IVD. Comprende una malla irregular de fibras de colágeno tipo II junto con grandes cantidades del proteoglicano agregano que, con su alto contenido de glicosaminoglicanos (GAG) aniónicos y la unión del agua, proporciona viscoelasticidad, rigidez y resistencia a la compresión del tejido (Watanabe, Yamada y Kimata, 1998). El AF se subdivide en AF externo, que está formado por láminas diferenciadas, compuestas de fibras de colágeno tipo I orientadas oblicuamente entre cada lámina (Marchand y Ahmed, 1990) y un AF interno menos fibroso y menos organizado, caracterizado por una transición a colágeno tipo II y un mayor contenido de proteoglicanos (Humzah y Soames, 1988). Esta arquitectura permite que el AF restrinja las presiones hidrostáticas generadas dentro del NP tras la compresión, lo que facilita la movilidad entre los segmentos espinales (Guerin y Elliott, 2007) (Schmidt, Kettler, Heuer, Simon, Claes y Wilke, 2007). Con excepción del AF más externo, el IVD es aneural (Roberts, Eisenstein, Menage, Evans y Ashton, 1995) y está prácticamente desprovisto de vasos sanguíneos (Crock y Goldwasser, 1984) y, por consiguiente, depende de la difusión a través del EP para el suministro de nutrientes y oxígeno (Urban, Smith y Fairbank, 2004). La homeostasis del IVD como unidad requiere el funcionamiento óptimo de las 3 estructuras y el deterioro de una o más de estas estructuras puede conducir a la degeneración del IVD.

La integridad del IVD se mantiene mediante un delicado equilibrio de la actividad de las citocinas, los factores de crecimiento, las enzimas y los inhibidores de enzimas, de manera paracrina y/o autocrina, que regulan colectivamente el equilibrio entre la síntesis/aposición y la degradación de la matriz extracelular (ECM).

30 En la degeneración del IVD, la perturbación de este delicado equilibrio se desencadena por múltiples factores etiológicos (tales como el envejecimiento, la infección, el tabaquismo, la disposición genética, la carga biomecánica anormal o el estado nutricional del IVD) (Roberts, Evans, Trivedi y Menage, 2006) (Cheung, et al., 2009). Aunque no es necesariamente el sitio primario del defecto, los cambios histopatológicos se observan primero en el NP con evidencia de una mayor degradación de la ECM, una síntesis de matriz alterada (que consiste principalmente en un cambio de la producción de colágeno tipo II a la producción de colágeno tipo I y una disminución de la síntesis de agregano) y pérdida de células a través de la apoptosis y una replicación en el lugar de células supervivientes para formar grupos (Adams y Roughley, 2006) (Johnson y Roberts, 2007) (Le Maitre, Pockert, Buttle, Freemont y Hoyland, 2007). La consiguiente pérdida de presión de hinchamiento en el NP conduce a una pérdida del equilibrio normal de fuerzas entre el NP y el AF y a la extensión del proceso degenerativo al AF, lo que da como resultado microtraumatismos ("desgarros") que permiten que los vasos sanguíneos y los nervios tengan una ruta hacia el IVD (Hilton y Ball, 1984), lo que lleva a una generación de dolor asociado con la enfermedad degenerativa del disco.

Independientemente del evento iniciador específico, se cree que la degeneración del IVD está mediada por la síntesis y secreción anormales de moléculas proinflamatorias tanto por las células de NP (NPC) y las células de AF (AFC) endógenas como por células no residentes del sistema inmunológico, como los macrófagos y las células de T (revisado por (Freemont, 2009) (Risbud y Shapiro, 2014)). Los mediadores proinflamatorios secretados de la degeneración del disco incluyen el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-17 e IL-17, además de varias quimiocinas (Risbud y Shapiro, 2014) (Seguin, Pilliar, Roughley y Kandel, 2005) (Le Maitre, Hoyland y Freemont, 2007) (Shamji, et al., 2010) (Purmessur, Walter, Roughley, Laudier, Hecht y latridis, 2013), entre las cuales las funciones del TNF α y la IL-1 β son las más ampliamente estudiadas. Ambas citocinas inducen la regulación positiva de los genes implicados en la degradación de la ECM (Le Maitre, Hoyland y Freemont, 2007) (Le Maitre, Freemont y Hoyland, 2005) (Le Maitre, Hoyland y Freemont, 2007). Tanto la IL-1 β como su receptor se regulan positivamente en el tejido IVD degenerado (Le Maitre, Hoyland y Freemont, 2007) (Le Maitre, Hoyland y Freemont, 2007), mientras que la expresión de TNF α también se ha visto implicada en el crecimiento y la irritación de las neuritas (Murata, Onda, RyDevik, Takahashi y Olmarker, 2006) (Wang, Markova, Anderson, Zheng, Shapiro y Risbud, 2011).

En un modo de realización, se inyectan células madre o precursoras del linaje mesenquimal en un NP para restaurar las propiedades mecánicas y/o fisiológicas normales de un disco intervertebral dañado.

Se contemplan numerosos materiales biológicos y sintéticos para la coinyección con el precursor del linaje mesenquimal o células madre en un NP. Por ejemplo, uno o más glicosaminoglicanos (GAG) o mucopolisacáridos naturales o sintéticos, tales como, por ejemplo, hialuronano (ácido hialurónico; HA), sulfato de condroitín, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, heparina, sulfato de heparina, sulfato de galactosaminoglicano (GGGS), incluidas sus sales fisiológicas, pueden inyectarse directamente en el NP. Se ha sugerido que el HA desempeña una función en la estimulación de la síntesis endógena de HA por las células sinoviales y la síntesis de proteoglicanos por los condrocitos, inhibe la liberación de enzimas condrodegradativas y actúa como eliminador de radicales libres de oxígeno que se sabe que participan en el deterioro del cartílago. También se ha demostrado que las inyecciones de sulfato de condroitina y glucosamina bloquean la progresión de la degeneración del cartílago articular. Podría decirse que otros GAG pueden proporcionar propiedades protectoras o restauradoras similares que tienen valor terapéutico, lo que los convierte en candidatos ideales para inyección en un disco sometido a una DDD. Otra propiedad valiosa de los GAG es su fuerte capacidad para atraer y retener agua. Por lo tanto, puede ser apropiado mezclar GAG con agua u otros materiales acuosos para formar un gel viscoso que luego puede inyectarse en el espacio creado a partir de la aspiración de una NP o, alternativamente, añadirse a una NP existente como suplemento. De este modo se pueden formar "hidrogeles" naturales capaces de rellenar el espacio en tres dimensiones y actuar como materiales de relleno que resisten el aplastamiento y permiten que un disco absorba adecuadamente el impacto asociado al movimiento.

Geles hialurónicos sintéticos tales como, por ejemplo, Euflexxa[®], (Ferring Pharmaceuticals) o Restylane[™]. (Q-Med Aktiebolag Co., Suecia) también son adecuados para su uso.

Ejemplos de otros materiales sintéticos inyectables que pueden usarse para la coadministración incluyen sílicona de grado médico, Bioplastique[™] (partículas sólidas de sílicona suspendidas en un soporte de polivinilpirrolidona; Uroplasty BV, Países Bajos), Arteplast[™] (microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) suspendidas en un soporte de gelatina; Arts Medical, EE. UU.), Artecoll[™] (esferas lisas de PMMA suspendidas en un soporte de cartílago de bovino; Artepharma Pharmazeu Tische, GMBH Co., Alemania). Además, se pueden emplear composiciones de hidrogel sintético como material de relleno para restaurar la forma normal de un disco, restaurando por tanto las funciones biomecánicas normales.

Los antioxidantes que tienen propiedades condroprotectoras conocidas también son candidatos para ser inyectados en el NP. Algunos ejemplos de estos incluyen tocoferol (vitamina E), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato (vitamina C), catalasa y otros. Además, en el presente documento también se contemplan derivados anfífilos de alginato de sodio y similares para inyección. Además, la proteína osteogénica recombinante-1 (OP-1) es una buena candidata para inyección debido a su capacidad para promover la formación de una matriz rica en proteoglicanos por parte de las NPC y las AFC.

También se contempla el uso de inyectables sintéticos. Estos son particularmente aplicables a situaciones donde el objetivo principal es restaurar la función biomecánica de un disco.

El HA solo o en combinación con otros GAG se puede utilizar como transportador para administrar células madre o precursoras del linaje mesenquimal. La concentración y la viscosidad de la composición de HA/GAG se pueden determinar de forma rutinaria. En un modo de realización, la composición comprende al menos aproximadamente 0.5 % de HA o sal de HA. Por ejemplo, una población de células que comprende células madre o precursoras del linaje mesenquimal podría suspenderse en Euflexxa[™] (1 de % hialuronato de sodio) en proporción 1:1.

En otro ejemplo, el precursor del linaje mesenquimal o las células madre pueden administrarse mezclados con pegamento de fibrina. El término "pegamento de fibrina" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la matriz insoluble formada por la reticulación de polímeros de fibrina en presencia de iones de calcio. El pegamento de fibrina puede formarse a partir de fibrinógeno, o un derivado o metabolito del mismo, fibrina (monómeros o polímeros solubles) y/o complejos de los mismos derivados de tejido o fluido biológico que forma una matriz de fibrina. Alternativamente, el pegamento de fibrina puede formarse a partir de fibrinógeno, o un derivado o metabolito del mismo, o fibrina, producida mediante tecnología de ADN recombinante.

El pegamento de fibrina también puede formarse mediante la interacción del fibrinógeno y un catalizador de la formación de pegamento de fibrina (tal como la trombina y/o el factor XIII). Como comprenderán los expertos en la técnica, el fibrinógeno se escinde proteolíticamente en presencia de un catalizador (como la trombina) y se convierte en un monómero de fibrina. Los monómeros de fibrina pueden entonces formar polímeros que pueden reticularse para formar una matriz de pegamento de fibrina. La reticulación de los polímeros de fibrina puede mejorarse mediante la presencia de un catalizador tal como el factor XIII. El catalizador de la formación del pegamento de fibrina puede derivar del plasma sanguíneo, crioprecipitado u otras fracciones de plasma que contengan fibrinógeno o trombina. Alternativamente, el catalizador puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante.

La combinación de fibrinógeno con trombina conduce a la formación de coágulos. La velocidad a la que se forma el coágulo depende de la concentración de trombina mezclada con fibrinógeno. Al ser una reacción

dependiente de enzimas, cuanto mayor sea la temperatura (hasta 37 °C) más rápida será la tasa de formación del coágulo. La resistencia a la tracción del coágulo depende de la concentración de fibrinógeno utilizada.

5 Cuando el coágulo de fibrina se genera en presencia de HA, sufre interacciones y se entrelaza con la matriz reticulada. Se sabe que esta matriz desempeña una función importante en la regeneración de tejidos y realiza funciones reguladoras celulares en la reparación de tejidos (Weigel, Fuller y Le Boeuf, 1986). La tasa de disolución de HA también se prolonga en la matriz de HA-fibrina, lo que podría ser beneficioso para prolongar los efectos terapéuticos de este GAG (Wadstrom y Tengblad, 1993).

10 Varias publicaciones describen el uso de pegamento de fibrina para la administración de agentes terapéuticos. Por ejemplo, la patente estadounidense 4983393 describe una composición para uso como inserto intravaginal que comprende agarosa, agar, solución salina, glicosaminoglicanos, colágeno, fibrina y una enzima. Además, la patente estadounidense 3089815 describe una preparación farmacéutica inyectable compuesta de fibrinógeno y trombina y la patente estadounidense 6468527 describe un pegamento de fibrina que facilita la administración de diversos agentes biológicos y no biológicos a sitios específicos dentro del cuerpo.

15 Las composiciones de la descripción se pueden "añadir quirúrgicamente" al espacio del disco. Es decir, las composiciones pueden ser añadidas por la intervención de personal médico, a diferencia de ser "añadidas" por los procesos naturales de crecimiento o regeneración del cuerpo. El procedimiento quirúrgico incluye preferiblemente la inyección a través de una aguja hipodérmica, aunque se pueden utilizar otros métodos quirúrgicos para introducir la composición en el disco. Por ejemplo, la composición puede introducirse en un disco mediante extrusión a través de una abertura anular dilatada, infusión a través de un catéter, inserción a través de una abertura creada por un traumatismo o una incisión quirúrgica, o mediante otros medios de deposición invasiva o mínimamente invasiva de la composición en el espacio del disco.

Células modificadas genéticamente

25 En un modo de realización, las células madre o precursoras del linaje mesenquimal se modifican genéticamente, por ejemplo, para expresar y/o secretar una proteína de interés, por ejemplo, una proteína que proporciona un beneficio terapéutico y/o profiláctico, por ejemplo, insulina, glucagón, somatostatina, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa pancreática o amilasa o un polipéptido asociado con o causante de una angiogénesis mejorada o un polipéptido asociado con la diferenciación de una célula en una célula pancreática o una célula vascular.

30 Los métodos para modificar genéticamente una célula serán evidentes para el experto en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico que se va a expresar en una célula está ligado operativamente a un promotor para inducir la expresión en la célula. Por ejemplo, el ácido nucleico está ligado a un promotor operable en una variedad de células de un sujeto, tal como, por ejemplo, un promotor viral, por ejemplo, un promotor CMV (por ejemplo, un promotor CMV-IE) o un promotor SV-40. Se conocen en la técnica promotores adecuados adicionales.

35 Preferiblemente, el ácido nucleico se proporciona en forma de un constructo de expresión. El término "constructo de expresión" como se utiliza en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que tiene la capacidad de conferir expresión a un ácido nucleico (por ejemplo, un gen reportero y/o un gen reportero contraseleccionable) al que está conectado operativamente, en una célula. En el contexto de la presente descripción, se debe entender que un constructo de expresión puede comprender o ser un plásmido, un bacteriófago, un fagémido, un cósmido, un fragmento subgenómico o genómico de virus, u otro ácido nucleico capaz de mantener y/o replicar ADN heterólogo en un formato expresable.

40 Los métodos para la construcción de un constructo de expresión adecuado para el modo de realización de la descripción serán evidentes para el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en (Ausubel F.M., 1987 incluidas todas las actualizaciones hasta el presente) o (Sambrook y Green, 2012). Por ejemplo, cada uno de los componentes del constructo de expresión se amplifica a partir de un ácido nucleico de plantilla adecuado utilizando, por ejemplo, PCR y posteriormente se clona en un constructo de expresión adecuado, tal como, por ejemplo, un plásmido o un fagémido.

50 Los vectores adecuados para dicho constructo de expresión se conocen en la técnica y/o se describen en el presente documento. Por ejemplo, un vector de expresión adecuado para el método de la presente descripción en una célula de mamífero es, por ejemplo, un vector del conjunto de vectores pcDNA (Invitrogen), un vector del conjunto de vectores pCI (Promega), un vector del conjunto de vectores pCMV (Clontech), un vector pM (Clontech), un vector pSI (Promega), un vector VP 16 (Clontech), o un vector del conjunto de vectores pcDNA (Invitrogen).

55 El experto en la técnica conocerá vectores adicionales y fuentes de dichos vectores, tales como, por ejemplo, Invitrogen Corporation, Clontech o Promega.

Los expertos en la técnica conocen medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislada o un constructo genético que la comprende en una célula para su expresión. La técnica utilizada para un organismo

determinado depende de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en células incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas como mediante el uso de lipofectamina (Gibco, MD, EE. UU.) y/o cellfectin (Gibco, MD, EE. UU.), captación de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo de micropartículas como mediante el uso de partículas de tungsteno u oro recubiertas de ADN (Agracetus Inc., WI, EE. UU.), entre otros.

Alternativamente, un constructo de expresión de la descripción es un vector viral. Se conocen vectores virales adecuados en la técnica y están disponibles comercialmente. Los sistemas convencionales basados en virus para la administración de un ácido nucleico y la integración de ese ácido nucleico en el genoma de una célula huésped incluyen, por ejemplo, un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector viral adenoasociado. Alternativamente, un vector adenoviral es útil para introducir un ácido nucleico que permanece episomal en una célula huésped. Los vectores virales son un método eficiente y versátil de transferencia de genes en células y tejidos objetivo. Además, se han observado altas eficiencias de transducción en muchos tipos de células y tejidos objetivo diferentes.

Por ejemplo, un vector retroviral generalmente comprende repeticiones terminales largas (LTR) que actúan en cis con capacidad de empaquetamiento de hasta 6-10 kb de secuencia extraña. Los LTR mínimos que actúan en cis son suficientes para la replicación y el empaquetamiento de un vector, que luego se utiliza para integrar el constructo de expresión en la célula objetivo para proporcionar expresión a largo plazo. Los vectores retrovirales ampliamente utilizados incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), el virus de la inmunodeficiencia de los simios (Srv), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO1994/026877, (Buchschacher y Panganiban, 1992) (Johann, Gibbons y O'Hara, 1992) (Sommerfelt y Weiss, 1990) (Wilson, Reitz, Okayama y Eiden, 1989) (Miller, García, von Suhr, Lynch, Wilson y Eiden, 1991) (Miller y Rosman, 1989) (Miller, 1990) (Scarpa, Cournoyer, Munzy, Moore, Belmont y Caskey, 1991) (Burns, Friedmann, Driever, Burrascano y Yee, 1993)).

También se han desarrollado varios sistemas de vectores de virus adenoasociados (AAV) para la administración de ácidos nucleicos. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente utilizando técnicas conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5173414 y 5139941, las publicaciones internacionales WO 92/01070 y WO 93/03769, (Lebkowski, McNally, Okarma y Lerch, 1988) (Vincent, Moore y Haigwood, 1990) (Carter, 1992) (Muzyczka, 1992); (Kotin, 1994) (Shelling y Smith, 1994) (Zhou, et al., 1994)).

Los vectores virales adicionales útiles para administrar un constructo de expresión de la descripción incluyen, por ejemplo, aquellos derivados de la familia de virus de la viruela, tales como el virus vaccinia y el virus de la viruela aviar o un alfavirus o un vector de virus conjugado (por ejemplo, el descrito en (Fisher-Hoch, et al., 1989)).

Ejemplo 1 Materiales y métodos

Immunoselección de la MPC mediante selección de células STRO-3+

La médula ósea (BM) se recogió de voluntarios adultos normales y sanos (de 20-35 años de edad). Brevemente, se aspiran 40 ml de BM de la cresta ilíaca posterior en tubos que contienen anticoagulante de litio-heparina.

Las células mononucleares de BM (BMMNC) se prepararon mediante separación por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) como se describió previamente (Zannettino, Buhning, Niutta, Watt, Benton y Simmons, 1998). Tras la centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C, la capa tamponada se retiró con una pipeta de transferencia y se lavó tres veces en "HHF", compuesto de solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD), que contiene un 5 % de suero de feto de bovino (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia).

Las células STRO-3+ (o TNAP+) se aislaron posteriormente mediante clasificación celular activada magnéticamente como se describió previamente (Gronthos y Simmons, 1995) (Gronthos, 2003). En resumen, aproximadamente $1-3 \times 10^8$ de BMMNC se incubaron en un tampón de bloqueo, que consiste en 10 % (v/v) de suero de conejo normal en HHF durante 20 minutos en hielo. Las células se incubaron con 200 µl de una solución de 10 µg/ml de STRO-3 mAb en tampón de bloqueo durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron posteriormente dos veces en HHF mediante centrifugación a 400 x g. Se añadió una dilución 1/50 de γ -biotina de cabra anti-ratón (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Reino Unido) en tampón HHF y las células se incubaron durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron dos veces en tampón de MACS (Ca²⁺ - y Mg²⁺ -PBS libre suplementado con 1 % de BSA, 5 mM de EDTA y 0.01 % de azida sódica) como se indicó anteriormente y resuspendido en un volumen final de 0.9 ml de tampón de MACS.

Se añadieron cien µl de microesferas de estreptavidina (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania) a la suspensión celular y se incubaron en hielo durante 15 minutos. La suspensión celular se lavó dos veces y se resuspendió en 0.5 ml de tampón de MACS y, posteriormente, se cargó en una minicolumna de MACS (columnas MS, Miltenyi Biotec) y se lavó tres veces con 0.5 ml de tampón de MACS para recuperar las células

que no se unieron al mAb STRO-3 (depositado el 19 de diciembre de 2005 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con el número de acceso PTA-7282; véase la publicación internacional WO 2006/108229). Después de añadir 1 ml adicional de tampón de MACS, la columna se retiró del imán y las células TNAP+ se aislaron mediante presión positiva. Se puede teñir una alícuota de células de cada fracción con estreptavidina-FITC y evaluar la pureza mediante citometría de flujo.

Las células precursoras mesenquimales (CPM) aisladas de esta manera son STRO-1^{brillante} de las MPC.

Generación del CM de MPC

El medio condicionado (CM) se generó a partir de lotes de productos MPC disponibles (263873, 22-12-001US, 22-12-02US, 345938, 2011CC053, 2011CC011, 2012CC010, 322509, 376232, 376233, 380505, 380507, 385470, 385471, 1857469) y representa diferentes donantes y ejecuciones de fabricación de desarrollo clínico y de productos. El producto MPC criopreservado se descongeló y se sembraron células a 50,000 células/cm² en medio de crecimiento suplementado con suero y se dejó adherir durante la noche a 37 °C, 20 % de O₂. Para generar CM compatible con ensayos funcionales basados en células de disco, el medio de crecimiento MPC se reemplazó con medio basal condrogénico (CBM; Lonza, Walkersville, MD) suplementado solo con 0.5 % de albúmina de suero de bovino (BSA) en un volumen de 209 µl de medio/cm² y las células se cultivaron durante 3 días a 37 °C, 5 % de O₂. Al final de este período de cultivo, se recogió el medio y se centrifugó para eliminar todas las células en suspensión, y el sobrenadante resultante se recogió y almacenó a -80 °C hasta su uso.

Bioensayo para la proliferación de células NPC

La proliferación de células del núcleo pulposo (NPC) en respuesta al CM de MPC se evaluó mediante la cuantificación de la incorporación de ADN de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) en células en división activa. Los NPC humanos se sembraron en placas de cultivo recubiertas de poli-L-lisina a 2,500 células/cm² en medio de crecimiento que contiene suero. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche mediante incubación a 37 °C, 5 % de O₂, luego se privaron de suero durante 48 h. Después de la privación de suero, las células se estimularon con el CM de MPC durante 48 h. Se añadió EdU a las células durante las últimas 18 h de cultivo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Kit Click-iT™, Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, las células se desprendieron con tripsina y se tiñeron para viabilidad. Luego, las células se fijaron para la incorporación de EdU y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células EdU⁺ dentro de la población viable se identificaron en relación con las células de control que no se tiñeron con EdU.

Bioensayo para la síntesis de proteoglicanos NPC

Los efectos del CM de MPC en la producción de la matriz NPC en laboratorio se examinaron mediante medición semicuantitativa del colorante azul alcian extraído de cultivos de micromasa después de la tinción de proteoglicanos depositados dentro de la matriz extracelular (ECM). Para establecer cultivos de micromasa de NP humanos, las NPC se sembraron en cultivos bidimensionales (2D) de alta densidad añadiendo una gota de 10 µl de medio de crecimiento que contenía 100,000 células a cada pocillo de una placa de 48 pocillos recubierta con fibronectina humana a 5 µg/cm². Se dejó que las células se adhirieran durante 2 horas, seguido de la adición de medio de crecimiento completo para inundar el pocillo y la incubación de las células durante la noche. Al día siguiente, las células se lavaron una vez en PBS tibio y se dejaron sin suero durante 48 horas antes de la estimulación con CM de MPC durante 7 días. Al final del período de cultivo, las células se fijaron en formalina de zinc al 10 % en el lugar y se tiñeron con azul alcian para detectar proteoglicanos. Se capturaron imágenes digitales de pocillos representativos y las placas se secaron al aire durante 1-2 h. Se extrajo la tinción de azul alcian de cada pocillo en HCl de guanidina 6N con 0.25 % de Triton X-100 y se midió la densidad óptica (OD) a 600 nm para cada muestra utilizando un lector de placas (Bjornsson, 1993).

Bioensayo para la proliferación de AFC

De manera similar a los métodos utilizados para medir la proliferación de NPC, la proliferación de células del anillo fibroso (AFC) en respuesta al CM de MPC se midió mediante la incorporación de EdU, con modificaciones en los períodos de cultivo que se consideraron apropiadas para las AFC. En resumen, las AFC se sembraron a 2,500 células/cm² en medio de crecimiento AFC suplementado con suero. Después de la fijación durante la noche, las células se privaron de suero durante 48 horas, antes del tratamiento con el CM de MPC durante 3 días. En las últimas 18 h de cultivo, las células fueron pulsadas con EdU. Luego se recolectaron las células, se tiñeron y se analizaron mediante citometría de flujo.

Bioensayo para la síntesis de colágeno de AFC

Para establecer cultivos de micromasa del anillo fibroso (AF), las células del anillo fibroso (AFC) se sembraron en cultivos bidimensionales (2D) de alta densidad añadiendo una gota de 10 µl de medio de crecimiento que contenía 100,000 células a cada pocillo de una placa de 48 pocillos recubierta con fibronectina humana a 5 µg/cm². Se dejó que las células se adhirieran durante 2 horas, seguido de la adición de medio de crecimiento completo para inundar el pocillo y la incubación de las células durante la noche. Al día siguiente, las células se lavaron una vez en PBS tibio y se dejaron sin suero durante 48 horas antes de la estimulación con el CM de

MPC durante 7 días. Al final de este período de cultivo, se midió la producción de colágeno estimulada por el CM de MPC mediante un ensayo de hidroxiprolina utilizando un kit disponible comercialmente (Sigma, St Louis, MO). Se aspiró el medio y las células se lavaron con agua. El colágeno depositado se hidrolizó en ácido clorhídrico y el sobrenadante resultante se recogió y se evaporó. Cada muestra se incubó brevemente en presencia de cloramina T para oxidar la hidroxiprolina. Finalmente, se añadió 4-(dimetilamino)benzaldehído a cada muestra, dando como resultado un producto colorimétrico que se leyó a 560 nm. En cada experimento, se estableció una curva estándar utilizando cantidades conocidas de hidroxiprolina (0.2-1 µg), lo que permitió la determinación cuantitativa de la síntesis de colágeno en respuesta al tratamiento con el CM de MPC.

Aislamiento y cultivo de las AFC humanas de adultos

Los tejidos de discos cadavéricos de adultos se obtuvieron de donantes seleccionados según los siguientes criterios de exclusión:

Tabla 1: Criterios de exclusión para donantes de tejido intervertebral

Edad	< 50 años
Género	Sin restricciones
Causa de muerte	Traumatismos con efectos directos sobre la columna vertebral Cáncer con afectación musculoesquelética
Historial de la enfermedad	Osteoartritis Artritis reumatoide Otras enfermedades del colágeno/cartilago/hueso
Deambulaci3n	Postrado en cama > 1 mes antes de la muerte

El tejido se sumergió en un medio de preservaci3n compuesto por DMEM-Ham's F12 (1:1)-10 % de suero de feto de bovino (FBS) con antibióticos (por ejemplo, penicilina (200 U/ml), estreptomycin (200 mg/ml) y Fungizone (1.25 mg/ml) o gentamicina (50 mg/ml)) a una concentraci3n final de 0.1 % (v/v) para su transporte al laboratorio para su digesti3n. Para preparar los tejidos para la digesti3n, se diseccionó cuidadosamente el tejido AF del tejido NP, que se sometió a digesti3n y aislamiento por separado. Cada disco fue disecado y cultivado por separado. Todas las digestiones se realizaron en 45 ml de un DMEM-Hams F12-10 % FBS estéril como se describi3n anteriormente (Melrose, Ghosh, Taylor, Latham y Moore, 1997) (Melrose, Smith, Ghosh y Taylor, 2001) (Shen, Melrose, Ghosh y Taylor, 2003). En resumen, los tejidos fueron cortados finamente con un bisturí en condiciones asépticas. Se transfirieron aproximadamente 2.5 g de tejido cortado en cubitos a un tubo cónico de 50 ml que contenía una soluci3n enzimática de 0.2 % p/v de pronasa y 0.01 % p/v de ADNasa. El tejido se digiri3 durante 90 minutos a 37 °C. El tejido restante se lavó con 10 ml de PBS y se descartó el sobrenadante. Luego, el tejido residual se digiri3 con 0.05 % p/v de colagenasa bacteriana tipo 1A de *Clostridium histolyticum*, 0.01 % p/v de DNasa (45 ml/tubo) en DMEM-Hams F12-10 % FBS que contiene antibióticos durante varias horas hasta que el tejido se desagregó por completo. Las células se recolectaron por centrifugaci3n (800 g x 10 min) y se lavaron una vez en DMEM-Hams F12-10 % FBS. La suspensi3n celular resultante se pasó a trav3s de un colador de células de 70 µm y se resuspendió para determinar el recuento celular y la viabilidad. Tanto los NPC como las AFC se sembraron en matraces de cultivo de tejidos tratados en DMEM-Hams F12-5 % FBS y 2 mM L-glutamina. Las NPC y AFC primarias se cultivaron hasta una confluencia del 80-90 % y se enviaron a los laboratorios Mesoblast en Houston. Los cultivos primarios se recolectaron con 0.05 % de tripsina/0.1 % de EDTA y se criopreservaron. Las AFC adultas primarias se descongelaron y se sembraron a 10,000 células/cm² para 1 paso, luego se recolectaron para preparar bioensayos.

Las AFC fetales se obtuvieron de un proveedor comercial (ScienCell, Carlsbad, CA).

Medici3n de los niveles de TGFβ1 en células madre de MPC mediante ELISA

Los niveles de TGFβ1 en el CM de MPC se midieron mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems).

Antes de su uso, el CM de MPC se concentró aproximadamente 40 veces para facilitar la etapa de activaci3n ácida necesaria para la medici3n de los niveles totales de TGFβ1 según el protocolo del fabricante. Después del tratamiento ácido, las muestras se reconstituyeron al volumen original en CBM para su uso en el bioensayo.

El ELISA se realizó siguiendo el protocolo del fabricante con modificaciones en el diluyente utilizado para la reconstituci3n y preparaci3n de estándares y diluci3n de muestras. El TGFβ1 estándar proporcionado en el kit se reconstituy3 en CBM suplementado con 0.5 % de BSA (CBM + 0.5 % de BSA). Se prepararon diluciones seriadas en CBM + 0.5 % de BSA con concentraciones finales que variaban entre 31.2 y 2000 pg/ml. Las muestras se activaron con ácido y se diluyeron 1:5 en CBM + 0.5 % de BSA. Los estándares, muestras y

controles se añadieron a una microplaca recubierta previamente con un anticuerpo monoclonal específico para el TGFβ1. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente (RT), se lavó la placa. Se añadió el conjugado de TGFβ1 a cada pocillo y la placa se incubó durante 2 h a RT. Luego se lavó nuevamente la placa y se añadió solución de sustrato a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a RT. Se añadió una solución de detención a cada pocillo y se leyó la densidad óptica (OD) de cada muestra en un lector de microplacas configurado a 450 nm con corrección de longitud de onda a 570 nm. Se construyó una curva estándar utilizando un ajuste de curva logística de cuatro parámetros. La concentración de TGFβ1 en cada muestra se derivó de la curva estándar y se corrigió por diluciones para obtener un resultado final.

Generación de MPC con inhibición de TGFβ1

Los productos de MPC recién descongelados (n=4) se transfectaron con ARNpi de TGFβ1 o un oligonucleótido de control codificado. Las células se suspendieron en αMEM sin suero y se combinaron con una mezcla de transfección que contenía ARNpi de TGFβ1 o ARNpi codificado (500 pmol, Life Technologies, Carlsbad, CA) y Lipofectamina (Life Technologies). Luego, las células se sembraron a alta densidad en placas recubiertas de fibronectina y se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, se lavaron las células y se reemplazó el medio con CBM + 0.5 % de BSA. Las células se devolvieron a la incubadora y se dejaron sin tocar a 37 °C, 5 % de O₂/95 % de CO₂ durante 72 h. Al final de este período de cultivo, se recogió el sobrenadante del cultivo, se centrifugó para sedimentar las células o los desechos en suspensión, luego se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta el ensayo.

Ejemplo 2 Experimentos de prueba de concepto

Se realizaron una serie de estudios en laboratorio para modelar y evaluar los mecanismos potenciales por los cuales las MPC pueden mediar el beneficio terapéutico en la enfermedad degenerativa del disco (DDD), con el objetivo de establecer ensayos de potencia apropiados para las MPC en la reparación del disco.

En condiciones de laboratorio, las MPC poseen potencial multilíneaje, incluida la capacidad de diferenciación condrogénica en laboratorio en respuesta a señales inductivas apropiadas. El ensayo de condrogénesis en laboratorio clásico implica el cultivo de células en gránulos de alta densidad en presencia de TGFβ1 durante un período de 3 semanas (Johnstone, Hering, Caplan, Goldberg y Yoo, 1998). Luego, el gránulo se fijó, se cortó y se tiñó para detectar la presencia de proteoglicanos, un sello distintivo de la actividad de los condrocitos. Dado el tiempo necesario para realizar este ensayo y los métodos no cuantitativos para su evaluación, se consideró que este ensayo no era apto para la calificación y validación como ensayo de liberación. Por lo tanto, no se realizó el desarrollo de un ensayo de liberación condrogénica en laboratorio. En cambio, los esfuerzos se centraron en identificar los mecanismos de acción paracrinos de las MPC en las células del disco intervertebral (IVD) como base para el desarrollo de ensayos de potencia.

Las MPC secretan una amplia gama de factores solubles bioactivos, incluidos factores conocidos para atenuar la inflamación, promover la proliferación celular y estimular la producción de matriz (See, et al., 2011). Se examinó el perfil de citocina de múltiples lotes de producto de MPC y se confirmó la secreción de una amplia gama de moléculas bioactivas. Basándose en estos datos, se planteó la hipótesis de que después de su introducción en el IVD, las MPC pueden estimular procesos de reparación endógenos mediante mecanismos paracrinos a través de la liberación de moléculas solubles que actúan sobre las células residentes en el disco. Los presentes inventores se centraron en la identificación de factores secretados que pueden contribuir a la supervivencia, proliferación y diferenciación de las NPC y/o AFC, lo que lleva a una mejora sostenida de la función del disco. Se realizó un análisis exhaustivo de la literatura relevante para identificar factores secretados con efectos anabólicos sobre las células del disco. Los factores identificados en esta encuesta se seleccionaron posteriormente en el CM de MPC mediante inmunoensayos y, a partir de estos datos, se identificó al TGFβ1 como el candidato principal.

Para determinar si los mecanismos de acción mediados por el TGFβ1 pueden proporcionar una base para el desarrollo de un ensayo de potencia para la evaluación del producto de MPC, se realizaron experimentos de prueba de concepto en laboratorio con los siguientes objetivos:

1. Determinar si el CM de MPC estimula la proliferación de NPC y la producción de matriz; y
2. Determinar si el CM de MPC estimula la proliferación de AFC y la producción de matriz; y

3. Determinar si el TGFβ1 en el CM de MPC media la bioactividad en laboratorio del CM de MPC en células del disco.

Los factores solubles derivados de MPC estimulan la proliferación de NPC y la producción de proteoglicanos

El NP está compuesto principalmente por el proteoglicano, agregano, una molécula que se une al agua y proporciona el sustrato para la presión de hinchamiento dentro del IVD. Las NPC son la fuente principal de proteoglicanos en el IVD y, por lo tanto, desempeñan una función clave en el mantenimiento de la estructura y la función del tejido. Además, la deposición de proteoglicanos por las NPC puede ser importante para preservar

el entorno aneural del disco sano y sin dolor, ya que los estudios en laboratorio han demostrado que una matriz de proteoglicanos intacta repele el crecimiento de neuritas (Johnson, Caterson, Eisenstein, Hynds, Show y Roberts, 2002). Por el contrario, la DDD se asocia con la muerte de NPC, la disrupción y pérdida de la matriz y el crecimiento de neuritas (Loreto, Musumeci, Castorina, Loreto y Martínez, 2011) (Melrose, Roberts, Smith, Menage y Ghosh, 2002). Por lo tanto, la reparación del tejido de NP dañado puede requerir tanto el mantenimiento de la población de NPC residente como la estimulación de la síntesis de matriz. A su vez, el apoyo de las NPC puede mejorar la estructura y la función del disco y atenuar la sensación de dolor. Para examinar si el CM de MPC tiene un impacto en la función de las NPC, se establecieron bioensayos para medir los efectos del CM de MPC en la proliferación de NPC humanas y la producción en laboratorio de proteoglicanos.

Se analizaron muestras de CM de varios lotes de MPC para determinar su actividad en el ensayo de proliferación de NPC, según lo determinado por la incorporación de EdU. En la figura 2A, nueve de los diez lotes analizados estimularon un aumento significativo en la proporción de NPC en División activa en cultivo (células de EdU⁺ media=44.9± 15.7 %, rango=38.9-66.9 %, n=10 lotes de 4 donantes) en comparación con las células de control no estimuladas (12.9 %). El lote restante no tuvo un efecto significativo sobre la proliferación de NPC en comparación con el control del medio basal.

En un cultivo de alta densidad 2D, las NPC produjeron de manera constitutiva niveles bajos de proteoglicanos, identificados mediante tinción con azul alcian (figura 2B). Los CM de tres lotes diferentes de MPC mejoraron significativamente la síntesis de proteoglicanos por encima de estos niveles iniciales, como lo indica una tinción de azul Alcian más intensa en relación con las células de control no estimuladas. Para cuantificar la síntesis de proteoglicanos, se extrajo la tinción azul alcian para obtener lecturas de absorbancia. El tratamiento con CM de MPC de las NPC resultó en un aumento de aproximadamente el doble en el contenido de proteoglicanos (OD media = 0.40±0.02, rango=0.38-0.42, n=3 lotes de 1 donante) por encima del de las células de control cultivadas en medio basal (figura 2C).

En conjunto, estos datos proporcionan evidencia de que el CM de MPC contiene factor(es) con efectos anabólicos sobre las células madre neurales, medidos por los efectos sobre la proliferación y síntesis de proteoglicanos. Por lo tanto, el tratamiento con MPC puede estimular mecanismos reparadores en el disco lesionado a través de acciones paracrinas sobre las NPC.

Los factores solubles derivados de MPC estimulan la proliferación de AFC y la síntesis de colágeno

El IAF del IVD se compone principalmente de colágeno I y colágeno II fibrilares, que forman láminas lamelares que rodean el NP. Los niveles de colágeno I son altos en las capas externas y disminuyen hacia la interfaz con el NP, mientras que el contenido de colágeno II aumenta desde las capas externas y se enriquece altamente hacia el centro del tejido. Estos gradientes de colágeno proporcionan resistencia a la tracción y elasticidad al disco, lo que respalda la estructura y la función del IVD. El IAF intacto desempeña una función importante en la creación de una barrera contra el crecimiento neuronal y vascular en el tejido del disco. Por el contrario, las rupturas del AF, como las que ocurren en la DDD, conducen a un deterioro estructural y funcional del IVD y a un dolor asociado a la invasión vascular y neuronal. La matriz de colágeno del AF es mantenida por las AFC residentes. Se ha demostrado que las AFC de discos degenerativos exhiben un fenotipo deteriorado, caracterizado por la regulación negativa de genes relacionados con los componentes de la ECM y la proliferación celular (Gruber, Hoelscher y Hanley, 2010). Se ha demostrado que la población de AF en el tejido DDD contiene una mayor proporción de células senescentes y una reducción concomitante en la proporción de células proliferantes (Gruber, Ingram, Davis y Hanley, 2009). Las estrategias terapéuticas que ayudan a mantener el conjunto y la actividad de las AFC pueden conducir a beneficios a largo plazo mediante la restauración de la estructura y de la función de las AF. Para determinar si los factores derivados de MPC tienen un impacto en la función de la AFC, se establecieron bioensayos para medir los efectos del CM de MPC en la proliferación de AFC humana y la síntesis de colágeno en laboratorio.

La figura 3A muestra que las muestras de CM generadas a partir de diferentes lotes de la MPC aumentaron la proliferación de la AFC, medida por la incorporación de EdU, por encima de los niveles observados en células cultivadas solo en medio basal. En este experimento, el CM de los siete lotes analizados estimuló un aumento significativo en la proporción de células en división activa en el cultivo (células de EdU⁺ media=27.1±15.1 %, rango=7.8-53.2 %, n=10 lotes de 3 donantes) en comparación con el medio de control (3.6 %).

Además de estimular la proliferación de la AFC, el CM de MPC aumentó la síntesis de colágeno de AFC. Las AFC tratadas con el CM de MPC contenían niveles significativamente más altos de hidroxiprolina (contenido de hidroxiprolina medio=0.3±0.1 µg/ml, rango=0.2-0.5 µg/ml, n=6 lotes de las MPC de 3 donantes) en comparación con las células cultivadas en medio basal solo (0.01 µg/ml) (figura 3B). A pesar de la variabilidad observada inherente a este tipo de bioensayos, en conjunto, estos datos demuestran claramente que el CM de MPC contiene factores solubles que estimulan la actividad de la AFC.

Función de TGFβ1 en la síntesis de colágeno de la AFC

Para investigar la posible contribución de TGFβ1, se estudiaron los niveles de TGFβ1 en CM derivados de múltiples lotes de productos MPC que abarcaban cinco donantes diferentes. La supuesta función causal del TGFβ1 en la síntesis de colágeno de la AFC en laboratorio posteriormente se examinó en presencia y ausencia de un anticuerpo de anti-TGFβ1 neutralizante.

5 Los niveles de TGFβ1 en el CM de MPC se midieron mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los niveles de TGFβ1 en el CM de MPC variaron de 1083.1 a 4202.8 pg/ml (media=2981.6±1054.3 pg/ml, n=15 lotes generados a partir de 5 donantes diferentes) (figura 4).

Los datos confirmaron que las MPC secretan de manera reproducible niveles robustos de TGFβ1 en su CM. Como se muestra en la figura 5A, tres lotes diferentes de AFC demostraron una clara síntesis de colágeno dependiente de la dosis de TGFβ1, estabilizándose entre 1-3 ng/ml de TGFβ1. En presencia de un anticuerpo de anti-TGFβ1 neutralizante, la síntesis de colágeno por las AFC en respuesta a 1 ng/ml de TGFβ1 se redujo a niveles marginalmente superiores a los obtenidos en ausencia del TGFβ1. Estos datos validan la respuesta lineal a la dosis de la población de AFC objetivo al TGFβ1 y la potencia del anticuerpo de anti-TGFβ1 neutralizante.

15 Para examinar si el TGFβ1 derivado de la MPC tiene un efecto causal en la producción de colágeno de AFC, las muestras de CM de MPC se trataron previamente con un anticuerpo de anti-TGFβ1 neutralizante, antes de añadirlas a los cultivos del AF. En la Figura 5B, panel izquierdo, el CM de 7 lotes de MPC estimuló cada uno un aumento estadísticamente significativo en el contenido de hidroxiprolina en las AFC en comparación con el control del medio basal. La neutralización de la actividad del TGFβ1 resultó en reducciones significativas en el contenido de hidroxiprolina en 5 de 7 lotes. Se observaron tendencias hacia una disminución de la síntesis de colágeno en los dos lotes restantes, que también contenían los niveles más bajos de actividad en este ensayo. Se probaron muestras de CM en diferentes lotes de AFC de diferentes donantes (Figura 5B, paneles central y derecho) y se observó un patrón similar de resultados en cada experimento. Se demostró una inhibición completa de la síntesis de colágeno en presencia de un anticuerpo de anti-TGFβ1 neutralizante (en comparación con el nivel equivalente de anticuerpo de control) en varios lotes de CM, lo que demuestra que en estos casos específicos, el TGFβ1 es el único factor causal en la promoción de la síntesis de colágeno.

Conclusiones de los experimentos de prueba de concepto

Los datos demuestran que el CM de MPC contiene factores solubles que estimulan la proliferación de NPC y AFC y la producción de matriz. Se detectó un TGFβ1, que ha demostrado tener efectos anabólicos sobre las células del disco, en el CM de múltiples lotes de MPC. Además, se demostró que el TGFβ1 es un efector clave de la síntesis de colágeno en células tratadas con el CM de MPC. Los datos sugieren que el TGFβ1 derivado de MPC estimula la síntesis de colágeno de la AFC y, por lo tanto, puede contribuir a la reparación del AF y al beneficio terapéutico a largo plazo en el contexto de la DDD. Por lo tanto, la detección de los niveles de TGFβ1 en el CM de MPC representa una posible medida sustituta de la potencia de la MPC para la reparación del disco.

Los datos también demuestran el establecimiento de ensayos cuantitativos para medir la bioactividad conducida por el TGFβ1, en concreto el ensayo de incorporación de EdU como medida de la proliferación de la NPC y la AFC y el ensayo de hidroxiprolina como medida de la síntesis de colágeno de AFC. El ensayo de hidroxiprolina se realizó utilizando diferentes lotes de AFC y los hallazgos respaldan la reproducibilidad de las acciones promotoras de la síntesis de colágeno del CM de MPC sobre las AFC y la contribución del TGFβ1 a este efecto, independientemente del donante de células objetivo. Se han realizado esfuerzos similares para comparar el rendimiento de diferentes lotes de NP y AFC en la evaluación del ensayo de incorporación de EdU. Se observó cierta variabilidad en los niveles de TGFβ1 entre los lotes de productos de MPC (rango en los lotes analizados = 1083.1-4202.8 pg/ml). Es importante destacar que se demostró que este rango de niveles de TGFβ1 tiene una actividad medible, que fue estadísticamente significativa por encima del control inicial, en los ensayos de síntesis de colágeno de la AFC utilizando un TGFβ1 humano recombinante (rhTGFβ1). En conjunto, estos datos respaldan el uso de este bioensayo para medir la bioactividad del TGFβ1 en el CM de MPC.

Ejemplo 3 Comparabilidad de AFC fetales y AFC de adultos

Previamente se desarrolló un bioensayo para medir los efectos del CM de MPC en la síntesis de colágeno de AFC. El ensayo se desarrolló utilizando AFC fetales, debido a su disponibilidad comercial. Este factor representa un beneficio de suministro importante en los esfuerzos de desarrollo de ensayos de potencia. Por el contrario, las AFC de adultos actualmente no están disponibles comercialmente. Los presentes inventores buscaron verificar que las AFC fetales son una alternativa adecuada a las AFC de adultos en el bioensayo de síntesis de colágeno. Por lo tanto, compararon los efectos del rhTGFβ1 y el CM de MPC en cultivos de micromasa de AFC fetales y AFC de adultos.

De manera similar a las células fetales, las AFC de adultos demostraron una respuesta dependiente de la dosis al rhTGFβ1 (0.1-3 ng/ml) (figura 6 y tabla 2). En comparación con las células fetales, los niveles de punto inicial de colágeno fueron más altos en cultivos de AFC de adultos, y la magnitud de la respuesta a niveles bajos de

TGFβ1 (100 pg/ml) también fue mayor (figura 6 y tabla 2). La producción en respuesta a 500 pg/ml fue similar entre las AFC fetales y las AFC de adultos. Si bien la curva dosis-respuesta a 1-3 pg/ml de TGFβ1 comenzó a estabilizarse en los cultivos de las AFC de adultos, la curva permaneció lineal para las AFC fetales.

5 El tratamiento de AFC de adultos con el CM de MPC estimuló aumentos robustos y significativos en la producción de colágeno en AFC de adultos (figura 7 y tabla 3).

Tabla 2: Respuesta de las células AFC fetales y de adultos a la estimulación con TGFβ1

rh TGFβ1 (pg/ml)	AFC fetales - Lote 5945			AFC fetales - Lote 4755			AFC fetales - Lote 4729			Todas las AFC		
	Hidroxirolina promedio (µg/10 ⁵ células)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg/10 ⁵ células)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg/10 ⁵ células)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg/10 ⁵ células)	SD	N
0	0.069	0.052	9	0.034	0.022	8	0.038	0.011	9	0.047	0.019	9
100	0.100	0.033	9	0.080	0.035	9	0.072	0.014	9	0.084	0.015	9
500	0.453	0.075	9	0.466	0.113	9	0.327	0.165	9	0.415	0.077	9
1000	0.714	0.134	9	0.725	0.265	9	0.852	0.155	9	0.767	0.082	9
3000	1.187	0.205	9	0.979	0.205	9	1.121	0.058	9	1.096	0.106	9
rh TGFβ1 (pg/ml)	AFC de adultos - Donante 1			AFC de adultos - Donante 2			AFC de adultos - Donante 3			Todas las aAFC		
	Hidroxirolina promedio (µg/10 ⁵ células)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg/10 ⁵ células)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg/10 ⁵ células)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg/10 ⁵ células)	SD	N
0	0.245	0.101	6	0.105	0.022	9	0.185	0.043	9	0.179	0.070	9
100	0.523	0.163	6	0.359	0.068	9	0.524	0.127	9	0.469	0.095	9
500	1.365	0.237	7	1.196	0.294	9	1.247	0.163	8	1.270	0.086	9
1000	1.633	0.292	9	1.555	0.197	9	1.481	0.168	9	1.560	0.112	9
3000	1.861	0.362	9	1.810	0.168	9	1.638	0.164	9	1.803	0.145	9

Tabla 3: Muestras de medio acondicionado generadas de lotes de la MPC analizadas en AFC de adultos

Lote arbitrario No.	TGFβ1 (pg/ml)	AFC de adultos															
		Donante 1				Donante 2				Donante 3				Todas las aAFC			
		Hidroxirolina promedio (µg)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg)	SD	N	Hidroxirolina promedio (µg)	SD	N	
GMP-4	3064.53	1.253	0.188	5.000	0.779	0.138	5.000	1.141	0.157	6.000	1.063	0.253	18.00				
GMP-5	3191.16	1.405	0.276	6.000	1.322	0.144	6.000	1.102	0.030	3.000	1.311	0.219	15.00				
GMP-6	3601.95	1.783	0.218	6.000	1.636	0.089	3.000	1.393	0.231	3.000	1.649	0.246	12.00				
GMP-7	2569.11	1.046	0.101	6.000	1.399	0.218	6.000	1.308	0.179	6.000	1.251	0.224	18.00				
GMP-8	3178.29	1.429	0.077	6.000	1.334	0.180	3.000	1.160	0.325	5.000	1.313	0.234	14.00				
GMP-9	3480.65	1.371	0.216	6.000	1.552	0.211	8.000	1.552	0.291	4.000	1.496	0.335	18.00				
GMP-11	3089.14	1.394	0.385	5.000	1.450	0.205	6.000	1.317	0.164	6.000	1.387	0.249	17.00				
GMP-12	3620.36	1.452	0.191	6.000	1.340	0.201	5.000	1.276	0.209	6.000	1.357	0.203	17.00				
GMP-13	3537.31	1.404	0.119	6.000	1.416	0.237	6.000	1.470	0.246	6.000	1.434	0.204	20.00				
GMP-14	1979.12	1.404	0.230	6.000	1.370	0.153	6.000	1.254	0.025	6.000	1.343	0.164	18.00				
GMP-15	2119.66	1.240	0.275	6.000	1.405	0.218	6.000	1.445	0.156	6.000	1.360	0.227	18.00				
GMP-16	2963.90	1.323	0.354	5.000	1.255	0.383	4.000	1.341	0.174	3.000	1.305	0.307	12.00				
GMP-17	3770.39	1.746	0.263	6.000	1.365	0.193	6.000	1.316	0.133	6.000	1.476	0.274	18.00				
GMP-18	3942.00	1.417	0.402	6.000	1.231	0.285	6.000	1.286	0.133	6.000	1.311	0.288	18.00				
Media todo el lote	3151.97	1.405			1.347			1.311			1.361						
SD todo el lote	489.65	0.186			0.195724344			0.127			0.134						
CV todos los lotes	0.1480	0.1324			0.1453			0.0988			0.0981						
Min.	1979.12	1.05			0.78			1.10			1.06						
Max.	3770.39	1.78			1.64			1.55			1.65						

En conjunto, estos datos demuestran que la estimulación de cultivos de micromasa de AFC fetales y de adultos con TGFβ1 aumenta la producción de colágeno de manera dependiente de la dosis. El tratamiento de AFC de adultos con el CM de MPC resultó en aumentos robustos en el contenido de hidroxiprolina, similares a los efectos observados previamente en las AFC fetales. En conjunto, estos datos indican que las AFC fetales representan una alternativa adecuada a las AFC de adultos para evaluar los efectos del CM de MPC en la producción de colágeno en este tipo de célula.

Ejemplo 4 Desarrollo de un ensayo de potencia de TGFβ1 para un producto de MPC para DDD

Se utilizaron modelos en laboratorio para examinar una serie de posibles mecanismos paracrinos por los cuales las MPC pueden tener efectos beneficiosos en la DDD (ejemplo 2). Entre ellos, la estimulación de la producción de colágeno por las AFC puede representar un paso importante hacia un beneficio terapéutico a largo plazo.

El aumento de la producción de colágeno de AFC puede provocar la reparación de la integridad estructural del disco e inhibir el crecimiento vascular y neuronal y, a su vez, mejorar la función biomecánica del disco y reducir el dolor.

5 Para examinar los efectos de los factores solubles derivados de MPC en la producción de colágeno de AFC, los presentes inventores desarrollaron un ensayo cuantitativo para medir los niveles de hidroxiprolina (un componente principal del colágeno) en cultivos de micromasa de AFC (ejemplo 2). El ensayo se estableció utilizando 3 lotes diferentes de AFC fetales y rhTGFβ1. Los presentes inventores demostraron que el rhTGFβ1 (en un rango de concentración de 100-3000 pg/ml) estimula, de forma dependiente de la dosis, la producción de colágeno en las AFC (figura 5A). Los presentes inventores también demostraron que el CM de MPC estimula la producción de colágeno en este bioensayo. Los efectos estimulantes del colágeno del CM de MPC fueron atribuibles, al menos en parte, a la actividad de TGFβ1, ya que un anticuerpo anti-TGFβ1 neutralizante anuló estos efectos (figura 5B). Es importante destacar que los efectos estimulantes del colágeno tanto del rhTGFβ1 como del CM de MPC fueron reproducibles en múltiples lotes de AFC que representaban a diferentes donantes, lo que indica que estos efectos eran independientes del donante de AFC. Los presentes inventores también confirmaron que las AFC fetales disponibles comercialmente son una alternativa adecuada a las AFC de adultos en este bioensayo (ejemplo 3). En conjunto, estos datos proporcionan dos elementos clave para el desarrollo de ensayos de potencia: en primer lugar, los datos proporcionan una prueba de concepto de que las MPC pueden estimular la producción de colágeno por las AFC a través de mecanismos paracrinos y que el TGFβ1 desempeña una función clave en este contexto. En segundo lugar, los datos respaldan la utilidad del ensayo de síntesis de colágeno de AFC para medir la bioactividad del CM de MPC. Por lo tanto, dados los niveles robustos de TGFβ1 encontrados en el CM de MPC y la función causal del TGFβ1 en los efectos del CM de MPC en la producción de colágeno de AFC, los datos también sugieren que el TGFβ1 es un marcador sustituto candidato racional de la bioactividad de MPC que es relevante en la DDD.

25 Se empleó un método basado en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar el TGFβ1 en el CM de MPC como ensayo de potencia para la MPC para la DDD.

Se midieron los niveles de TGFβ1 en el CM de MPC cultivadas en dos medios basales diferentes utilizando un ELISA disponible comercialmente. Los datos muestran una marcada diferencia en los niveles de TGFβ1 en el CM en función de la formulación del medio (figura 8). Estas muestras se produjeron en experimentos para determinar el medio basal óptimo para la generación de CM para la evaluación de la producción de TGFβ1 de la MPC y bioactividad en laboratorio. Se seleccionó CBM suplementado solo con 0.5 % de BSA (figura 8, barras oscuras) para su uso en estos experimentos y refleja un medio que equilibra el apoyo a la función de la MPC y la compatibilidad con la aplicación posterior en bioensayos funcionales basados en IVD. Por extensión, estos datos también demuestran que la prueba de ELISA del TGFβ1 puede utilizarse para detectar cambios en los procesos de fabricación que pueden afectar negativamente la síntesis de TGFβ1 por la MPC.

35 El CM de MPC estimula la producción de colágeno por parte de las AFC humanas y contiene niveles robustos de TGFβ1

La figura 7 y la tabla 4 muestran los efectos del CM de MPC sobre la producción de colágeno en 3 lotes independientes de AFC fetales. Los datos demuestran que cada lote de AFC respondió de manera dependiente de la dosis al rhTGFβ1 (100-3000 pg/ml), que se incluyó en los experimentos para confirmar la idoneidad del sistema. Los CM de los lotes GMP 1-18 se analizaron en el lote 4729 de AFC (figura 7A). Cuando había alícuotas disponibles, también se analizaron muestras de CM en los lotes 5945 y 4755 de AFC (figura 7B y figura 7C). Cada lote de MPC estimuló un aumento estadísticamente significativo en la producción de colágeno sobre los controles no estimulados en el lote 4729 de AFC (figura 7A). Este efecto se reprodujo en los lotes 5945 y 4755 de AFC (figura 7B y figura 7C). La figura 7D muestra las respuestas promedio de todos los lotes de AFC a cada muestra del CM de MPC.

La actividad estimulante del colágeno del CM de MPC se asoció con la presencia de niveles robustos de TGFβ1 en cada muestra (figura 9 y tabla 4). En condiciones de cultivo estandarizadas, los niveles totales de TGFβ1 en los sobrenadantes de MPC variaron de 1979.12-4202.82 pg/ml, con una media de 3303.16±569.56 pg/ml.

Establecimiento de un efecto umbral mínimo del CM de MPC en el bioensayo de síntesis de colágeno de AFC

50 Con el fin de establecer una especificación de liberación preliminar para las MPC basadas en la secreción de TGFβ1, los presentes inventores primero buscaron identificar un efecto umbral mínimo del CM de MPC en el bioensayo de síntesis de colágeno de AFC. Los presentes inventores razonaron que este umbral sería una función tanto de las características del tipo de muestra (CM) como del bioensayo en sí. Como se muestra en la figura 7 y la figura 9, las muestras del CM de MPC de los lotes analizados contienen un rango de niveles de TGFβ1 (1979.12-4202.82 pg/ml), todos los cuales resultaron en aumentos significativos en la síntesis de colágeno por encima del control de punto inicial no estimulado. Además, los presentes inventores observaron que, aunque el nivel promedio de TGFβ1 en muestras del CM de MPC fue de 3303.16±569.56 pg/ml, el efecto del CM de MPC sobre la producción de colágeno fue menor que el provocado por el rhTGFβ1 solo a 3000 pg/ml, lo que es coherente con la hipótesis de que el CM de MPC puede contener factores que inhiben las

acciones de TGF β 1 en este ensayo. Por lo tanto, para establecer el nivel de bioactividad en el CM de MPC que reflejaría una actividad subpotente en este bioensayo, los presentes inventores generaron el CM a partir de lotes de MPC en los que se redujo el TGF β 1 utilizando tecnología de ARNpi.

Caracterización de CM a partir de las MPC con inactivación de TGF β 1

- 5 Los presentes inventores verificaron el TGF β 1 inactivado midiendo los niveles de TGF β 1 en el CM de MPC mediante ELISA. La figura 10A y la tabla 5 muestran los niveles de TGF β 1 en el CM de cada lote de MPC transfectado con oligonucleótido de control codificado o ARNpi de TGF β 1. La transfección de MPC con 500 pmol de ARNpi resultó en reducciones de aproximadamente el 90 % en los niveles de TGF β 1 en comparación con los controles codificados, sin efecto directo sobre la viabilidad (datos no mostrados).
- 10 Habiendo confirmado el TGF β 1 inactivo, las muestras de CM de MPC fueron analizadas en el ensayo de hidroxiprolina de AFC. La figura 10B y la tabla 5 muestran que el CM de las MPC transfectadas con ARNpi codificado estimuló un nivel similar de producción de colágeno en la AFC que el nivel promedio estimulado por todos los lotes de MPC probados. Por el contrario, la síntesis de colágeno de AFC en respuesta a la inactivación de TGF β 1 en el CM de MPC se redujo significativamente en comparación con la AFC estimulada con el CM de MPC a partir de controles de ARNpi codificados. Sin embargo, el efecto del CM de MPC con inactivación de TGF β 1 se mantuvo significativamente por encima de los controles de punto de inicio, lo que sugiere una actividad residual del TGF β 1 y/o la presencia de otros factores contribuyentes.
- 15

En resumen, los datos muestran que las MPC inactivadas secretaron un promedio de 204.81 \pm 52.07 pg/ml de TGF β 1, lo que resultó en la producción de 0.17 \pm 0.06 μ g de hidroxiprolina en las AFC (figura 10 y tabla 5). Este nivel de hidroxiprolina representa el efecto mínimo observado del CM de MPC en el bioensayo de la AFC. Los presentes inventores consideran este nivel de efecto mínimo para definir el umbral entre células subpotentes y potentes basándose en el conjunto de datos actualmente disponibles. Con el fin de aumentar la rigurosidad de los criterios de aceptación de células potentes, el nivel de efecto mínimo se estableció 1 SD por encima del nivel umbral de 0.17 μ g a 0.23 μ g de hidroxiprolina.

20

Tabla 4. Muestras de CM generadas de lotes de MPC analizados en AFC fetales

Muestra/ Lote No.	AFC fetales												
	Lote 5945			Lote 4755			Lote 4729			Todas las AFC			
	TGFβ1 (pg/ml)	Hidroxi prolina promedio (µg)	SD	N	Hidroxi prolina promedio (µg)	SD	N	Hidroxi prolina promedio (µg)	SD	N	Hidroxi prolina promedio (µg)	SD	N
GMP-1	4189.92	NT	NT	NT	0.350	0.075	3	NT	NT	NT	0.350	0.075	3
GMP-2	4202.82	0.223	0.114	2	0.433	0.150	3	NT	NT	NT	0.381	0.140	5
GMP-3	2886.46	NT	NT	NT	0.292	0.040	3	NT	NT	NT	0.292	0.048	3
GMP-4	3084.53	0.386	0.126	9	0.440	0.065	6	0.265	0.030	8	0.358	0.117	23
GMP-5	3181.16	0.390	0.186	10	0.359	0.064	6	0.279	0.034	6	0.351	0.125	22
GMP-6	3601.95	0.500	0.186	11	0.277	0.167	6	0.297	0.217	6	0.389	0.223	23
GMP-7	2569.11	0.300	0.097	9	0.390	0.035	6	0.296	0.061	6	0.325	0.063	21
GMP-8	3173.29	0.410	0.079	6	0.408	0.073	6	0.411	0.108	6	0.410	0.083	18
GMP-9	3480.66	0.473	0.059	6	0.481	0.068	6	0.390	0.109	6	0.448	0.087	18
GMP-10	4050.11	0.237	0.095	3	0.228	0.059	3	NT	NT	NT	0.233	0.071	6
GMP-11	3059.14	0.423	0.073	6	0.393	0.062	6	0.414	0.114	6	0.410	0.082	18
GMP-12	3620.38	0.479	0.099	6	0.441	0.084	6	0.406	0.027	6	0.442	0.078	18
GMP-13	3537.31	0.427	0.024	6	0.483	0.074	6	0.403	0.055	7	0.436	0.062	19
GMP-14	1979.12	0.367	0.022	6	0.326	0.089	6	0.329	0.081	6	0.341	0.069	18
GMP-15	3119.66	0.434	0.134	6	0.416	0.079	6	0.407	0.032	6	0.419	0.087	18
GMP-16	2963.90	0.514	0.156	6	0.463	0.036	6	0.329	0.095	6	0.435	0.129	18
GMP-17	3770.39	0.697	0.135	6	0.422	0.038	6	0.420	0.120	6	0.513	0.167	18
GMP-18	2942.00	0.524	0.118	6	0.443	0.034	6	0.274	0.038	6	0.414	0.128	18
Media todo el lote	3303.16	0.426			0.391			0.351			0.386		
SD todo el lote	569.56	0.106			0.073			0.061			0.065		
CV todos los lotes	0.172	0.248			0.185			0.173			0.169		
Min.	1979.123	0.223			0.228			0.265			0.233		
Max.	4202.824	0.697			0.483			0.420			0.513		

NT= no probado

GMP 4-6. Se sembraron dos viales de células replicadas de forma independiente para generar el CM. Los datos representan el promedio de las rep.

Tabla 5: Muestras de CM generados de MPC con TGFβ1 inactivado

Muestra/ Lote No.	Condición	TGF-β1 Pg/ml	SD	% Silenciado frente a Codificado	ACF fetales – Lote 4729 Hidroxi prolina promedio (µg/10 ⁶ células)	SD
Medio basal		0			0.047	0.019
Todas las MPC		3303.160	569.557		0.351	0.061
GMP-11	Codificado	2057.455	11.39	-	0.416	0.118
	siTGFβ1	143.843	4.43	92.9	0.153	0.013
GMP-12	Codificado	2272.886	9.71	-	0.283	0.042
	siTGFβ1	236.551	3.33	89.6	0.102	0.025
GMP-13	Codificado	2258.294	58.23	-	0.516	0.206
	siTGFβ1	180.610	0.90	92.0	0.214	0.192
GMP-6	Codificado	2894.451	87.15	-	0.533	0.239
	siTGFβ1	258.034	15.53	91.1	0.222	0.142
Promedio de todos los codificados		2368.272	367.60	-	0.44	0.11
Promedio de todos los siTGFβ1		204.810	52.07	91.4	0.17	0.06

Establecimiento de una memoria descriptiva preliminar de liberación de las MPC basada en la secreción de TGFβ1

- 5 Utilizando los datos de nuestros experimentos con la MPC no manipulada y la MPC con inactivación de TGFβ1, realizamos análisis estadísticos para examinar la relación entre los niveles de TGFβ1 y la producción en laboratorio de colágeno de AFC y para identificar el nivel umbral de TGFβ1 requerido para la liberación del producto clínico de MPC para la DDD.

Relación entre los niveles de TGFβ1 del CM de MPC y la actividad en el bioensayo de síntesis de colágeno de AFC

- 10 Primero se determinó si existía una relación entre los niveles de TGFβ1 presentes en el CM de MPC y el efecto del CM de MPC en la producción de colágeno por la AFC en laboratorio. Los datos de las MPC no manipulados y las MPC inactivadas se combinaron para un total de 26 muestras. En este conjunto de datos, los niveles de TGFβ1 variaron de 143.8-4202.8 pg/ml y los niveles de colágeno variaron de 0.10 a 0.53 µg (tabla 4 y tabla 5).
15 Mediante la correlación de Pearson, hubo una relación estadísticamente significativa entre los niveles de TGFβ1 y la producción de colágeno (r=0.65, p<0.001). Se realizó un análisis de regresión para determinar la línea de mejor ajuste entre los niveles de TGFβ1 y la producción de colágeno (p<0.001, véase la figura 11).

Utilizando el nivel de efecto mínimo del CM de MPC en el bioensayo de síntesis de colágeno de AFC establecido anteriormente, este modelo de regresión lineal predice que se requieren 405 pg/ml de TGFβ1 para estimular 0.23 µg de producción de colágeno en el bioensayo de AFC.

- 20 Evaluación de la sensibilidad y especificidad del modelo

Se examinó la sensibilidad y especificidad del modelo. Estableciendo el umbral en 405 pg/ml, se realizó un análisis de contingencia. Se encontró que la sensibilidad era del 100 %, es decir, 22/22 de las muestras que se predijo que serían positivas (estimando ≥ 0.23 µg de hidroxiprolina en el bioensayo de AFC) fueron de hecho verdaderamente positivas. Los presentes inventores encontraron que la especificidad era del 100 %, es decir,

4/4 de las muestras que se predijo que estaban por debajo del umbral (estimulación <0.23 µg de hidroxiprolina) fueron de hecho verdaderamente negativas. No hubo muestras falsas positivas ni falsas negativas.

Los datos presentados aquí respaldan el uso de TGFβ1 como un marcador sustituto del potencial de las MPC para estimular la producción de colágeno por las AFC en laboratorio. Utilizando un bioensayo de síntesis de colágeno de AFC, se demostró que las muestras de CM generadas a partir de 18 lotes de producto de MPC estimulan la producción de colágeno por AFC en laboratorio, y contienen niveles robustos de TGFβ1, medidos mediante ELISA. Este efecto se atenuó en CM a partir de MPC con TGFβ1 inactivado, lo que demuestra una función causal para el TGFβ1 en este contexto, en consonancia con datos presentados previamente de estudios de anticuerpos neutralizantes. Combinando datos de MPC no manipulados y las MPC con inactivación de TGFβ1, se definió un nivel umbral de TGFβ1 en CM de MPC necesario para la bioactividad en el bioensayo de síntesis de colágeno de AFC. Los análisis estadísticos de los datos experimentales llevaron a la identificación de 405 pg/ml como el nivel mínimo de TGFβ1 necesario para estimular un aumento significativo en la producción de colágeno de AFC en laboratorio. Por lo tanto, 405 pg/ml de TGFβ1 representa la memoria descriptiva de liberación preliminar para las MPC de la DDD. En conjunto, estos datos muestran que la detección basada en ELISA de TGFβ1 en el CM de MPC proporciona una medida razonable del potencial de las MPC para estimular los procesos de reparación endógenos en el disco humano.

Ejemplo 5 Optimización del ensayo de potencia de TGFβ1

El ensayo de potencia de TGFβ1 mide los niveles de TGFβ1 liberados por el producto de MPC recuperado del cultivo. Hay 2 partes en el ensayo: (1) Generación del CM de MPC a partir del producto de MPC recuperado del cultivo, y (2) Detección de los niveles de TGFβ1 en CM utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas disponible comercialmente (ELISA, R&D Systems Human TGFβ1 Quantikine ELISA).

Evaluación del impacto de la densidad de siembra celular, el tiempo de cultivo y la variabilidad entre operadores en los niveles de TGFβ1 en el CM de MPC.

En este estudio se utilizaron los lotes 345938 y 2011cc063 de MPC. Los productos de MPC se descongelaron, se lavaron, se contaron y se sembraron en placas de 6 pocillos a 25,000 o 50,000 células viables/cm² en αMEM suplementado con 10 % de suero de feto de bovino (FBS). Al día siguiente, después de lavar las células con PBS, el medio se reemplazó con CBM+0.5 % de BSA. El CM se recogió a las 24, 48, 68, 70, 72, 74, 76 y 120 h después del cambio de medio de CBM. Cada punto de tiempo se recogió por triplicado y cada muestra de CM se analizó para determinar el contenido de TGFβ1 por duplicado mediante ELISA. Para determinar la variabilidad entre operadores, se descongeló un solo vial de cada lote de células y se dividió en 2 alícuotas, y el experimento, desde el recuento de células hasta la recolección de CM, fue realizado por dos operadores en paralelo.

La figura 12 muestra la secreción de TGFβ1 por 2 lotes de MPC en función de la densidad de siembra celular inicial, el tiempo y el operador. La figura 12A muestra datos de células sembradas a 25,000 células viables/cm². En ambos lotes, 345938 y 2011cc063, los niveles de TGFβ1 aumentaron con el tiempo (24-120 h), aunque los niveles se mantuvieron estables entre 68 y 76 h. Hubo una variabilidad significativa entre analistas en los niveles de TGFβ1 determinados en las muestras de CM del lote 345938 en cada punto temporal examinado. La variabilidad entre analistas de los resultados del lote 2011cc063 fue menos marcada. Los datos de células sembradas a 50,000 células viables/cm² se muestran en la figura 12B. Los niveles de TGFβ1 obtenidos a partir de células sembradas a 50,000 células viables/cm² fueron más altos que los niveles observados cuando las células se sembraron a 25,000 células/cm². Sin embargo, de manera similar a las muestras de CM de células sembradas a menor densidad, los niveles de TGFβ1 en CM de células sembradas a 50,000 células viables/cm² aumentaron con el tiempo y se mantuvieron estables dentro del período de 68 a 76 horas. Los resultados obtenidos por cada analista para cada lote fueron comparables cuando las células se sembraron a 50,000 células viables/cm².

Estos datos sugieren que sembrar células a 50,000 células viables/cm² Produce datos más consistentes entre analistas en comparación con la siembra de células a 25,000 células viables/cm². Los datos también indican que los niveles de TGFβ1 se mantienen estables entre 68 y 76 h, lo que indica que este período de tiempo (72±4 h después del cambio medio de CBM) representa un período de tiempo aceptable para la recolección de CM para el ensayo de potencia de TGFβ1.

Comparación de NaOH 1 N frente a 1.2 N de NaOH/0.5 M HEPES para neutralización de muestras activadas con ácido

Antes del análisis, las muestras de CM deben tratarse con ácido para activar el TGF-β1 latente para que se convierta en una proteína inmunorreactiva detectable mediante la prueba de ELISA de TGFβ1. Esto se consigue añadiendo HCl 1 N a las muestras y luego por neutralización a un pH entre 7.2 y 7.6. La etapa de neutralización se puede llevar a cabo utilizando NaOH 1.2 N/HEPES 0.5 M (según el protocolo del fabricante de ELISA de TGFβ1) o NaOH 1 N. Se determinó la comparabilidad del NaOH sin tampón y tamponado para neutralizar muestras acidificadas para la prueba de ELISA de TGFβ1. Se trataron con ácido muestras de CM

de tres lotes de MPC (345938, 2011cc063, 2011cc048). Luego, las muestras replicadas se neutralizaron a un pH de 7.2-7.4 utilizando NaOH 1 N o NaOH 1.2 N/HEPES 0.5 M. Posteriormente se determinaron los niveles de TGF-β1 en muestras duplicadas mediante ELISA.

5 Los datos se muestran en la tabla 6. Los niveles de TGFβ1 fueron similares en muestras replicadas de CM activado con ácido neutralizadas con NaOH y NaOH tamponado con HEPES (p>0.05, prueba t-Student). Por lo tanto, el NaOH sin tampón se puede sustituir por NaOH tamponado con HEPES en la preparación de muestras de CM para el ensayo de potencia de TGFβ1.

Tabla 6: Comparación de los niveles de TGFβ1 en muestras replicadas de CM activadas con ácido neutralizadas con NaOH 1N y NaOH 1.2 N/HEPES 0.5 M

Lote	Tampón de neutralización	Resultados de ensayo						TGFβ1 corregido		
		OD Media	SD	CV	TGFβ1 (pg/ml)	SD de ensayo	CV de ensayo	Corrección de activación de ácido	Corrección de dilución de ensayo	SD
345938	NaOH	0.91	0.03	3.85	610.51	20.340	3	701.422	3506.51	140.26
	NaOH/HEPES	0.74	0.01	1.83	27.634	2.064	7.1	626.82	2203.12	72.58
2011-cc-863	NaOH	0.85	0.02	3.44	22.234	39.58	4.1	595.21	2896.06	137.09
	NaOH/HEPES	0.66	0.01	1.21	323.075	21.782	6.3	592.34	2563.68	204.87
2011-cc-848	NaOH	0.69	0.04	5.73	640.426	23.333	6.8	683.02	7218.14	164.72
	NaOH/HEPES	0.57	0.04	6.24	193.861	21.811	8.4	687.76	2438.663	201.73

Resumen

15 Dos operadores independientes probaron dos densidades celulares iniciales diferentes (25,000 células viables/cm² y 50,000 células viables/cm²) para la secreción de TGFβ1 en función del tiempo. Los resultados indican que cuando las células se siembran a 50,000 células viables/cm² Hay más consistencia entre los valores obtenidos de dos operadores que cuando las celdas se siembran a una densidad menor. Es importante destacar que existe poca variabilidad en los niveles de TGFβ1 entre las muestras recogidas entre las 68 h y las 76 h. Basándose en estos datos, se recomienda que el CM de MPC se debería preparar sembrando células a una tasa de 50,000 células viables/cm² y que la recogida del CM de MPC para el ensayo de potencia de TGFβ1 debe realizarse a las 72±4 h después de la adición de CBM + 0.5 % de BSA.

20 Los datos muestran que los niveles de TGFβ1 en muestras de CM activadas con ácido neutralizadas con NaOH 1N son comparables a las muestras neutralizadas con NaOH 1.2N/HEPES 0.5M. Por lo tanto, NaOH 1N es un sustituto aceptable de NaOH 1.2N/HEPES 0.5M para la neutralización de muestras para el ELISA de TGFβ1.

Ejemplo 6: Rendimiento del ensayo de potencia de TGFβ1

El rendimiento del ELISA de TGFβ1 se evaluó mediante la evaluación de los siguientes parámetros:

- 25 1. Linealidad del ensayo: las curvas estándar se prepararon en diluyente de calibrador o CBM + 0.5 % de BSA;
- 2. Interferencia de la matriz: el rhTGFβ1 se diluyó en diluyente de calibrador o CBM + 0.5 % de BSA; y
- 3. Precisión del ensayo y linealidad de la muestra: se realizaron experimentos para examinar el pico y la recuperación y el TGFβ1 en muestras de CM diluidas en serie.

Linealidad del ensayo

30 Se evaluó la bondad de ajuste de la curva estándar. Los estándares de TGFβ1 de tres kits separados se reconstituyeron y diluyeron en el diluyente de calibrador provisto en el kit de ELISA o CBM + 0.5 % de BSA. Se prepararon diluciones seriadas de 2000 pg/ml. La curva estándar establecida por el fabricante del kit consta de 7 puntos y un punto cero. Por lo tanto, el rango establecido de la curva estándar fue de 31.2 a 2,000 pg/ml. Cada concentración estándar se analizó por duplicado. El coeficiente de correlación (R²) se determinó utilizando un ajuste de curva de regresión logística no lineal de 4 parámetros. Por lo general, una curva estándar aceptable R² es ≥0.95. Los coeficientes de correlación para las tres curvas estándar generadas utilizando diluyente de calibrador variaron de 0.991 a 1.000, mientras que R²=1.000 para las tres curvas estándar preparadas en CBM+0.5 % de BSA. Las curvas estándar se muestran en la figura 13. Para garantizar la precisión de la curva estándar, se retrocalcularon las concentraciones de TGFβ1 y se determinó el % de recuperación. En general, se encontró que el % de recuperación estaba entre el 80 % y el 120 % (tabla 7).

Tabla 7: Curvas estándar preparadas en diluyente calibrador y CBM + 0.5 de BSA

Curva estándar	Diluyente de calibrador				Curva estándar	CBM + 0.5 % de BSA			
	Muestra	TGFβ1 (pg/ml)	OD media	Recup. Cálculo (%)		Muestra	TGFβ1 (pg/ml)	OD media	Recup. Cálculo (%)
1	0	0	0.064	100.0	4	0	0.064	100.0	
	2	31.2	0.107	165.2		2	31.2	0.144	225.0
	3	62.5	0.154	239.0		3	62.5	0.192	298.8
	4	125	0.257	398.1		4	125	0.296	458.5
	5	250	0.425	649.6		5	250	0.443	682.8
	6	500	0.728	1137.5		6	500	0.751	1163.1
	7	1000	1.22	1857.3		7	1000	1.232	1882.3
	8	2000	1.874	2854.1		8	2000	1.894	2888.3
2	0	0	0.061	100.0	5	0	0.061	100.0	
	2	31.2	0.112	183.6		2	31.2	0.115	188.5
	3	62.5	0.167	275.2		3	62.5	0.171	283.6
	4	125	0.264	432.8		4	125	0.267	437.8
	5	250	0.45	737.7		5	250	0.46	754.3
	6	500	0.739	1210.8		6	500	0.77	1258.8
	7	1000	1.198	1963.4		7	1000	1.202	1972.1
	8	2000	1.858	2993.4		8	2000	1.872	3016.4
3	0	0	0.073	100.0	6	0	0.073	100.0	
	2	31.2	0.115	157.5		2	31.2	0.156	213.6
	3	62.5	0.156	213.6		3	62.5	0.209	285.7
	4	125	0.245	335.8		4	125	0.308	421.8
	5	250	0.381	521.7		5	250	0.533	728.8
	6	500	0.564	770.7		6	500	0.66	904.8
	7	1000	1.059	1450.1		7	1000	1.365	1861.6
	8	2000	1.753	2403.7		8	2000	2.103	2853.1

Interferencia de la matriz

5 Para examinar la interferencia de la matriz, se preparó el rhTGF-β1 (R&D Systems) en diluyente de calibrador o en CBM + 0.5 % de BSA a 0, 50, 250 y 1,500 pg/ml. Cada concentración se preparó por duplicado. La concentración de TGFβ1 en cada muestra se determinó mediante ELISA. La concentración media y el % de recuperación para cada muestra se presentan en la tabla 8. En el diluyente de calibrador, el % de recuperación varió entre 70.4 y 74.7 %, mientras que en CBM + 0.5 % de BSA la recuperación varió entre 94.5 y 106.1 %.

Tabla 8: Análisis de la interferencia de la matriz

Diluyente	rhTGFβ1 (pg/ml)	Repetir	Resultado de ensayo (Curva estándar en diluyente de calibrador)					% Recuperación
			OD	OD medio	TGFβ1 (pg/ml)	SD de ensayo	CV de ensayo	
Diluyente de calibrador	0	1	0.071	0.072	2.56	0.59	23.1	
		2	0.072					
	50	1	0.124	0.124	35.52	0.20	0.5	71.0
		2	0.124					
	250	1	0.292	0.304	176.02	13.07	7.9	70.4
		2	0.316					
	1500	1	1.187	1.174	1120.94	12.09	1.1	74.7
		2	1.18					
CBM	0	1	0.093	0.093	19.01	0.44	3	
		2	0.092					
	50	1	0.146	0.149	53.06	0.87	1.6	106.1
		2	0.15					
	250	1	0.362	0.374	256.14	14.48	6.1	94.5
		2	0.385					
	1500	1	1.38	1.422	1460.85	36.83	3.9	97.9
		2	1.483					

10 Además, se evaluó el efecto de la matriz comparando curvas estándar preparadas en diluyente de calibrador y CBM + 0.5 % de BSA (analizadas en paralelo en las mismas placas). Cada estándar se representó por duplicado y se realizaron dos experimentos independientes. La figura 14 muestra que las OD medias fueron ligeramente más altas cuando los estándares se prepararon en CBM en comparación con el diluyente de calibrador, lo que indica la presencia de un efecto de matriz.

15 Precisión del ensayo

ES 3 018 944 T3

Se realizaron experimentos de pico y recuperación para evaluar la precisión del ensayo. Se realizaron picos de tres concentraciones diferentes de rhTGFβ1 (50, 250 y 500 pg/ml) en el CM derivado de 3 lotes de MPC (345938, 2011cc063, 2011cc048). Cada condición se analizó por duplicado. El porcentaje de recuperación de TGFβ1 en cada concentración se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$5 \quad [\text{Concentración media medida} / \text{Concentración esperada}] \times 100$$

La concentración media medida corresponde a la concentración de TGFβ1 en la muestra de pico, determinada a partir de la curva estándar. Los resultados de los tres conjuntos de datos se muestran en la tabla 9. La recuperación de pico aceptable generalmente varía entre el 80 y el 120 %. Los valores de porcentaje de recuperación para todas las muestras oscilaron entre el 96.17 % y el 126.87 %. Se calculó la recuperación promedio de TGFβ1 en cada concentración probada: 50 pg/ml: 112.1 %, 250 pg/ml: 103.8 %, 500 pg/ml: 97.8 %.

Tabla 9: Evaluación de la precisión de ELISA

Lote	Resultados de ensayo				
	rhTGFβ1 de pico (pg/ml)	TGFβ1 (pg/ml)	SD	CV	% Recuperación
345938	0	685.98	28.50	4.2	
	50	738.78	23.66	3.2	100.3
	250	940.33	83.74	8.9	100.8
	500	1166.33	128.60	10.9	98.3
2011-cc-063	0	319.39	24.41	7.6	
	50	468.64	13.41	2.9	126.9
	250	617.35	44.09	7.1	108.4
	500	809.00	9.67	1.2	98.7
2011-cc-048	0	480.99	13.96	3.1	
	50	547.61	6.61	1.0	109.3
	250	718.54	47.51	6.6	102.5
	500	914.52	69.51	7.6	98.2

Linealidad de la muestra

15 La linealidad de la muestra se evaluó analizando muestras de CM derivadas de tres lotes diferentes de MPC (22-12-002US, 1857469, 345938) puros y diluidos 2x, 5x y 10x. Cada muestra se evaluó por duplicado. La precisión (% desviación) en cada dilución de una muestra dada se calculó como:

$$\% \text{ Desviación} = (\text{Resultado} - \text{resultado promedio de todas las diluciones}) / \text{resultado promedio de todas las diluciones} \times 100$$

20 Los resultados se resumen en la tabla 10. La desviación porcentual osciló entre -17.8 y 10.5 %. La desviación porcentual aceptable suele ser de ±20 %.

Tabla 10: Evaluación de la linealidad de la muestra.

ES 3 018 944 T3

Lote	Diluciones	Repetir	Resultados de ensayo				Resultados corregidos				Resultado promedio de dilución	% desviación	
			OD	OD media	TGFβ1 (pg/ml)	SD	%CV	TGFβ1 (pg/ml)	SD	%CV			
22-12502U3	1	1	2.227	2.20	2231.94	43.04	1.9	3110.72	60.25	1.94	3784.72	17.81	
		2	2.171										
	1/2	1	1.402	1.39	1345.75	19.45	1	3788.22	26.90	0.71			1.00
		2	1.384										
	1/5	1	0.705	0.70	597.51	1.61	0.3	4182.86	8.07	0.19			10.51
		2	0.703										
	1/10	1	0.448	0.42	291.24	30.97	10.6	4077.36	309.71	7.60			7.73
		2	0.402										
1857460	1	1	1.653	1.65	1627.68	1.23	0.1	2279.03	1.72	0.03	2442.76	6.74	
		2	1.652										
	1/2	1	1.036	1.02	937.91	27.24	3	2636.13	55.48	2.11			7.46
		2	0.999										
	1/5	1	0.485	0.50	370.80	15.60	4.2	2595.57	78.01	3.01			6.21
		2	0.506										
	1/10	1	0.313	0.30	162.45	10.23	6.3	2274.30	102.21	4.49			6.93
		2	0.297										
345038	1	1	2.172	2.11	2121.75	23.59	1.1	2970.51	33.03	1.11	3505.20	13.28	
		2	2.091										
	1/2	1	1.343	1.33	1278.79	18.75	1.5	3580.61	37.50	1.05			2.12
		2	1.318										
	1/5	1	0.656	0.66	547.52	3.92	0.7	3832.81	19.60	0.51			3.31
		2	0.661										
	1/10	1	0.393	0.39	260.18	0.77	0.3	3641.43	7.68	0.21			3.85
		2	0.394										

Resumen

Los datos proporcionan soporte para la idoneidad de la prueba de ELISA de TGFβ1 para medir el TGFβ1 en CM recogido de cultivos de MPC. El valor R² de la curva estándar osciló entre 0.991- 1.000 y se encontró que la recuperación de TGFβ1 en cada concentración estándar estaba entre el 80 y el 120 %. Los experimentos realizados para examinar el efecto de la matriz indicaron una mayor recuperación de TGFβ1 en CBM + 0.5 % de BSA en comparación con el diluyente de calibrador, y un ligero desplazamiento hacia arriba y hacia la derecha en la curva estándar preparada en CBM + 0.5 % de BSA en comparación con el diluyente de calibrador. Por lo tanto, se recomienda que la curva estándar se prepare en CBM + 0.5 % de BSA.

10 Bibliografía

Adams, M. A., y Roughley, P. J. (2006). *Spine*, 31, 2151-2161.

Ausubel, F. M. (Ed.). (1987 incluidas todas las actualizaciones hasta el presente). *Current Protocols in Molecular Biology*. Nueva York: John Wiley y Sons.

Bae, W. C., y Masuda, K. (2011). *The Orthopedic Clinics of North America*, 2011, 585-601, ix.

15 Bjornsson, S. (1993). *Analytical Biochemistry*, 210, 282-291.

Brown, T. A. (Ed.). (1991). *Essential Molecular Biology: A Practical Approach* (Vol. 1 y 2). Oxford: IRL Press at Oxford University Press.

Buchsacher, G. L., y Panganiban, A. T. (1992). *Journal of Virology*, 2731-2739.

20 Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., y Yee, J. K. (1993). *Proceedings of the National Academy of Sciences E.E.U.U.*, 8033-8037.

Carter, B. J. (1992). *Current Opinion in Biotechnology*, 533-539.

Cheung, K. M., Karppinen, J., Chan, D., Ho, D. W., Song, Y. Q., Sham, P., et al. (2009). *Spine*, 34, 934-940.

Cima, L. G., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., y Langer, R. (1991). *Biotechnology Bioengineering*, 38, 145-158.

25 Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., y Strober, W. (Eds.). (1991 incluidas todas las actualizaciones hasta el presente). *Current Protocols in Immunology*. Nueva York: John Wiley y Sons.

- Crock, H. V., y Goldwasser, M. (1984). *Spine*, 9, 702-706.
- Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B., Auperin, D., Brown, B. G., Castor, M., Perez, G., et al. (1989). *Proceedings of the National Academy of Sciences E.E.U.U.*, 56, 317-321.
- Freemont, A. J. (2009). *Rheumatology*, 48, 5-10.
- 5 Glover, M., y Hames, B. D. (Eds.). (1995 y 1996). *DNA Cloning: A Practical Approach* (Vols. 1-4).
- Gronthos, S. (2003). *Journal of Cell Science*, 116(Pt 9), 1827-1835.
- Gronthos, S., y Simmons, P. J. (1995). *Blood*, 85(4), 929-940.
- Gruber, H. E., Ingram, J. A., Davis, D. E., y Hanley, E. N. (2009). *The Spine Journal : Official journal of the American Spine Society*, 9, 210-215.
- 10 Gruber, H. E., Hoelscher, G. L., y Hanley, E. N. (2010). *The Spine Journal : Official journal of the North American Spine Society*, 10, 721-727.
- Guerin, H. L., y Elliott, D. M. (2007). *Journal of Orthopaedic Research - Official publication of the Orthopaedic Research Society*, 25, 508-516.
- 15 Harlow, E., y Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hilton, R. C., y Ball, J. (1984). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 43, 302-307.
- Humzah, M. D., y Soames, R. W. (1988). *The Anatomical Record*, 220, 337-356.
- Johann, S. V., Gibbons, J. J., y O'Hara, B. (1992). *Journal of Virology*, 65, 1635-1640.
- Johnson, W. E., y Roberts, S. (2007). *Biochemical Society Transactions*, 35, 680-682.
- 20 Johnson, W. E., Caterson, B., Eisenstein, S. M., Hynds, D. L., Show, D. M., y Roberts, S. (2002). *Arthritis and Rheumatism*, 46, 2658-2664.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., y Yoo, J. U. (1998). *Experimental Cell Research*, 238, 265-272.
- Kotin, R. M. (1994). *Human Gene Therapy*, 793-801.
- 25 Le Maitre, C. L., Freemont, A. J., y Hoyland, J. A. (2005). *Arthritis Research and Therapy*, 7, R732-745.
- Le Maitre, C. L., Hoyland, J. A., y Freemont, A. J. (2007). *Arthritis Research and Therapy*, 9, R77.
- Le Maitre, C. L., Hoyland, J. A., y Freemont, A. J. (2007). *Arthritis Research and Therapy*, 9, R83.
- Le Maitre, C. L., Pockert, A., Buttle, D. J., Freemont, A. J., y Hoyland, J. A. (2007). *Biochemical Society Transactions*, 2007, 652-655.
- 30 Lebkowski, J. S., McNally, M. M., Okarma, T. B., y Lerch, L. B. (1988). *Molecular and Cellular Biology*, 3988-3996.
- Loreto, C., Musumeci, G., Castorina, A., Loreto, C., y Martinez, G. (2011). *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 193, 156-162.
- Marchand, F., y Ahmed, A. M. (1990). *Spine*, 15, 402-410.
- 35 Masuda, K. (2008). *European Spine Journal : Official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, 17 Supl. 4, 441-451.
- Melrose, J., Ghosh, P., Taylor, T., Latham, J., y Moore, R. (1997). *Journal of Spinal Disorders*, 10(1), 56-67.
- Melrose, J., Roberts, S., Smith, S., Menage, J., y Ghosh, P. (2002). *Spine*, 27, 1278-1285.
- 40 Melrose, J., Smith, S., Ghosh, P., y Taylor, T. (2001). *Cells Tissues Organs*, 168, 137-146.
- Miller, A. D. (1990). *Human Gene Therapy*, 7, 5-14.

- Miller, A. D., y Rosman, G. J. (1989). *Biotechniques*, 7, 980-990.
- Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., y Eiden, M. V. (1991). *Journal of Virology*, 65, 2220-2224.
- Murata, Y., Onda, A., Rydevik, B., Takahashi, I., y Olmarker, K. (2006). *Spine*, 31, 530-535.
- 5 Muzyczka, N. (1992). *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158, 97-129.
- O'Halloran, D. M., y Pandit, A. S. (2007). *Tissue Engineering*, 13, 1927-1954.
- Perbal, B. V. (1984). *A Practical Guide to Molecular Cloning*. Nueva York: Wiley.
- Purmessur, D., Walter, B. A., Roughley, P. J., Laudier, D. M., Hecht, A. C., y Iatridis, J. A. (2013). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433, 151-156.
- 10 Raj, P. P. (2008). *Pain Practice*, 8, 18-44.
- Risbud, M. V., y Shapiro, I. M. (2014). *Nature Reviews. Rheumatology*, 10, 44-56.
- Roberts, S., Eisenstein, S. M., Menage, J., Evans, E. H., y Ashton, I. K. (1995). *Spine*, 20, 2645-2651.
- Roberts, S., Evans, H., Trivedi, J., y Menage, J.* (2006). *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volumen*, 88 Supl. 2, 10-14.
- 15 Sambrook, J., y Green, M. R. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*. Nueva York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Scarpa, M., Cournoyer, D., Munzy, D. M., Moore, K. A., Belmont, J. W., y Caskey, C. T. (1991). *Virology*, 75, 849-852.
- Schmidt, H., Kettler, A., Heuer, F., Simon, U., Claes, L., y Wilke, H. J. (2007). *Spine*, 32, 748-755.
- 20 See, F., Seki, T., Psaltis, P. J., Sondermeijer, H. P., Gronthos, S., Zannettino, A. C., et al. (2011). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15, 2117-2129.
- Seguin, C. A., Pilliar, R. M., Roughley, P. J., y Kandel, R. A. (2005). *Spine*, 30, 1940-1948.
- Shamji, M. F., Setton, L. A., Jarvis, W., So, S., Chen, J., Jing, L., et al. (2010). *Arthritis and Rheumatism*, 62, 1974-1982.
- 25 Shelling, A. N., y Smith, M. G. (1994). *Gene Therapy*, 7, 165-169.
- Shen, B., Melrose, J., Ghosh, P., y Taylor, T. (2003). *European Spine Journal*, 12, 66-75.
- Sommerfelt, M. A., y Weiss, R. A. (1990). *Virology*, 76, 58-59.
- Urban, J. P., Smith, S., y Fairbank, J. C. (2004). *Spine*, 29, 2700-2709.
- Vacanti, C. A., Langer, R., Schloo, B., y Vacanti, J. P. (1991). *Plastic Reconstructive Surgery*, 88, 753-749.
- 30 Vacanti, J. P., Morse, M. A., y Saltzman, W. M. (1988). *Journal of Pediatric Surgery*, 23, 3-9.
- Vincent, K. A., Moore, G. K., y Haigwood, N. L. (1990). *Vaccine*, 353-359.
- Wadstrom, J., y Tengblad, A. (1993). *Journal of Medical Science*, 98, 159-167.
- Wang, J., Markova, D., Anderson, D. G., Zheng, Z., Shapiro, I. M., y Risbud, M. V. (2011). *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 39738-39749.
- 35 Watanabe, H., Yamada, Y., y Kimata, K. (1998). *Journal of Biochemistry*, 124, 687-693.
- Weigel, P. H., Fuller, G. M., y Le Boeuf, R. D. (1986). *Journal of Theoretical Biology*, 119, 219-234.
- Wilson, C., Reitz, M. S., Okayama, H., y Eiden, M. V. (1989). *Journal of Virology*, 63, 2374-2378.
- Zannettino, A. C., Buhring, H. J., Niutta, S., Watt, S. M., Benton, M. A., y Simmons, P. J. (1998). *Blood*, 92(8), 2613-2628.
- 40 Zhou, S. Z., Cooper, S., Kang, L. Y., Ruggieri, L., Heimfeld, S., Srivastava, A., et al. (1994). *The Journal of Experimental Medicine*, 179, 1867-1875.

ES 3 018 944 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método en laboratorio para seleccionar células precursoras mesenquimales humanas (MPC) para su uso en el tratamiento que comprende:
- 5 (i) cultivar una población obtenida de MPC humanas enriquecidas para MPC STRO-1⁺ o TNAP⁺;
(ii) determinar la cantidad de TGFβ1 liberada por las MPC humanas en el medio de cultivo; y
(iii) seleccionar para su uso en el tratamiento las MPC humanas que liberan TGFβ1 en el medio de cultivo en una cantidad de al menos 2800 pg/10⁶ células.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la etapa de cultivo comprende sembrar las células en un recipiente de cultivo a una densidad de 50,000 células viables/cm².
- 10 3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la etapa de cultivo comprende cultivar las células en un medio basal condrogénico suplementado con 0.5 % de albúmina de suero de bovino.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células se cultivan durante al menos 68 a 76 horas.
- 15 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa de determinación comprende recoger una muestra del medio de cultivo en el que se cultivaron las células.
6. El método según la reivindicación 5, en donde la etapa de determinación comprende activar el TGFβ1 latente en el medio de cultivo antes de determinar la cantidad de TGFβ1 en el medio de cultivo.
7. El método según la reivindicación 6, en donde la activación del TGFβ1 latente comprende añadir un ácido a la muestra de medio de cultivo para reducir el pH del medio de cultivo.
- 20 8. El método según la reivindicación 7, en donde la etapa de determinación comprende concentrar la muestra de medio de cultivo antes de reducir el pH.
9. El método según la reivindicación 7 u 8, en donde, después de la adición del ácido, el medio de cultivo se neutraliza a un pH de 7.2 a 7.6.
- 25 10. Una población de células humanas aisladas enriquecidas para células precursoras del linaje mesenquimal (MPC) STRO-1⁺ o TNAP⁺ que liberan TGFβ1 en el medio de cultivo en una cantidad de al menos 2800 pg/10⁶ células, para su uso en el tratamiento, en donde la población de células humanas aisladas se selecciona mediante un método en laboratorio que comprende:
- 30 (i) cultivar y obtener una población de MPC humanas enriquecidas para MPC STRO-1⁺ o TNAP⁺;
(ii) determinar la cantidad de TGFβ1 liberada por las MPC humanas en el medio de cultivo; y
(iii) seleccionar para su uso en el tratamiento las MPC humanas que liberan TGFβ1 en el medio de cultivo en una cantidad de al menos 2800 pg/10⁶ células.
11. La población de células humanas aisladas para uso según la reivindicación 10, en donde el tratamiento es el tratamiento de una enfermedad del disco degenerativa.
- 35 12. La población de células humanas aisladas para uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, que comprende además un criopreservante.
13. La población de células humanas aisladas para uso según la reivindicación 12 que comprende además hialuronano.

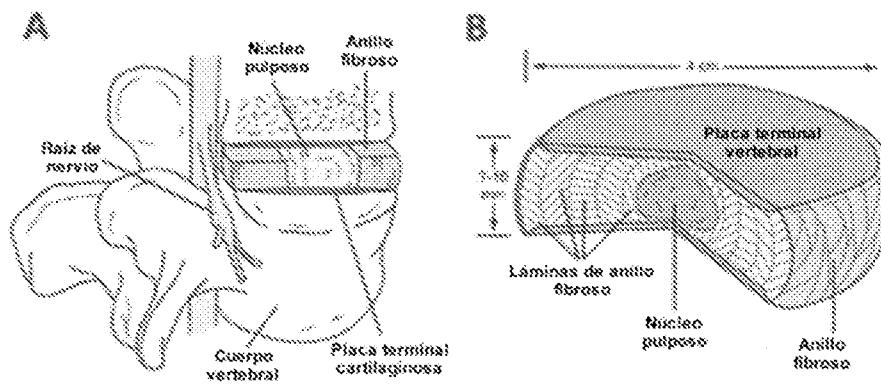


Figura 1

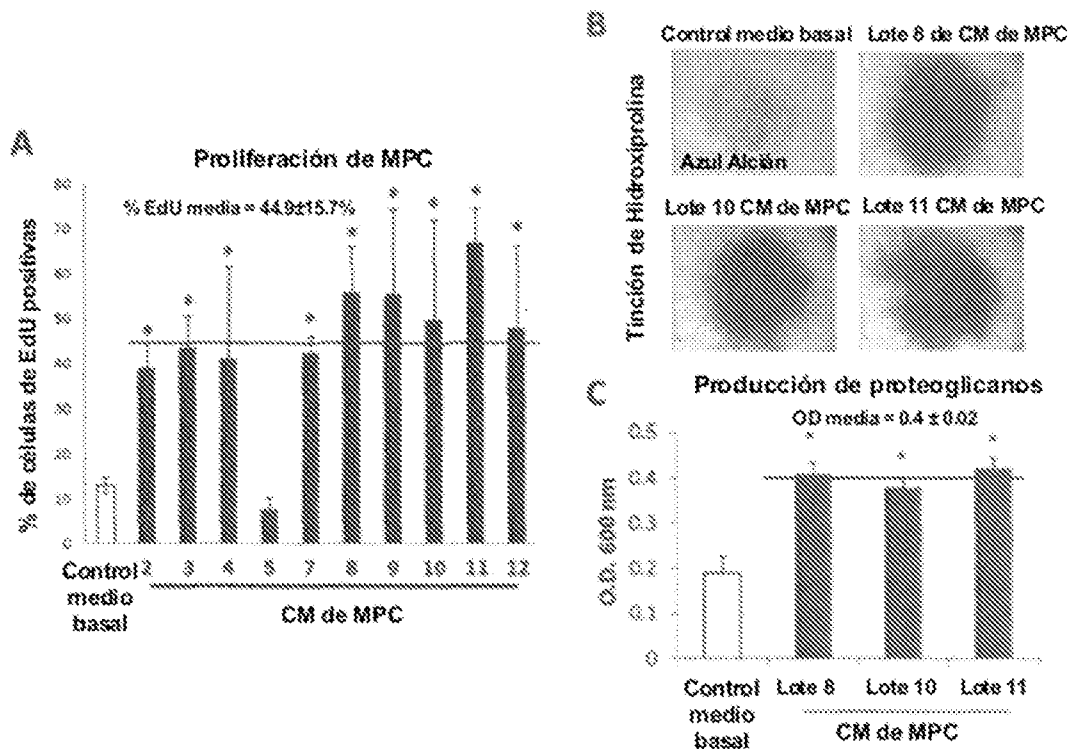


Figura 2

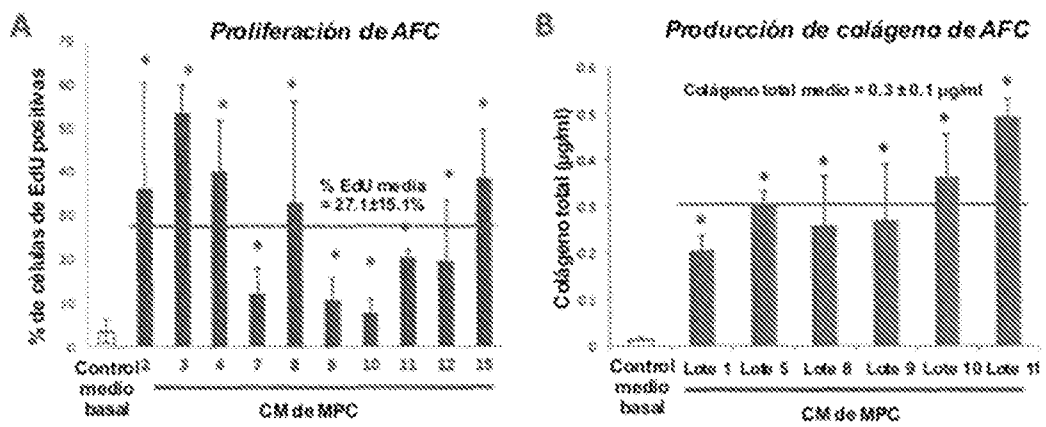


Figura 3

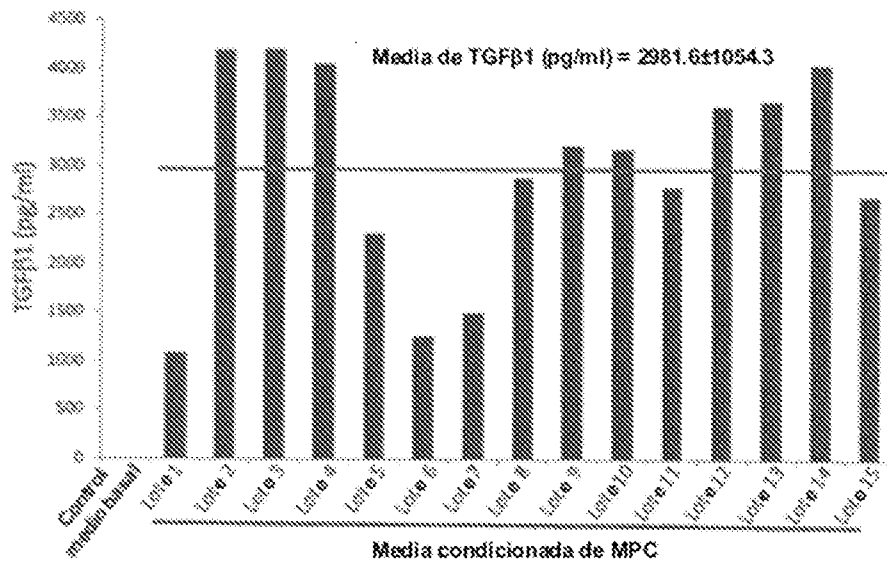


Figura 4

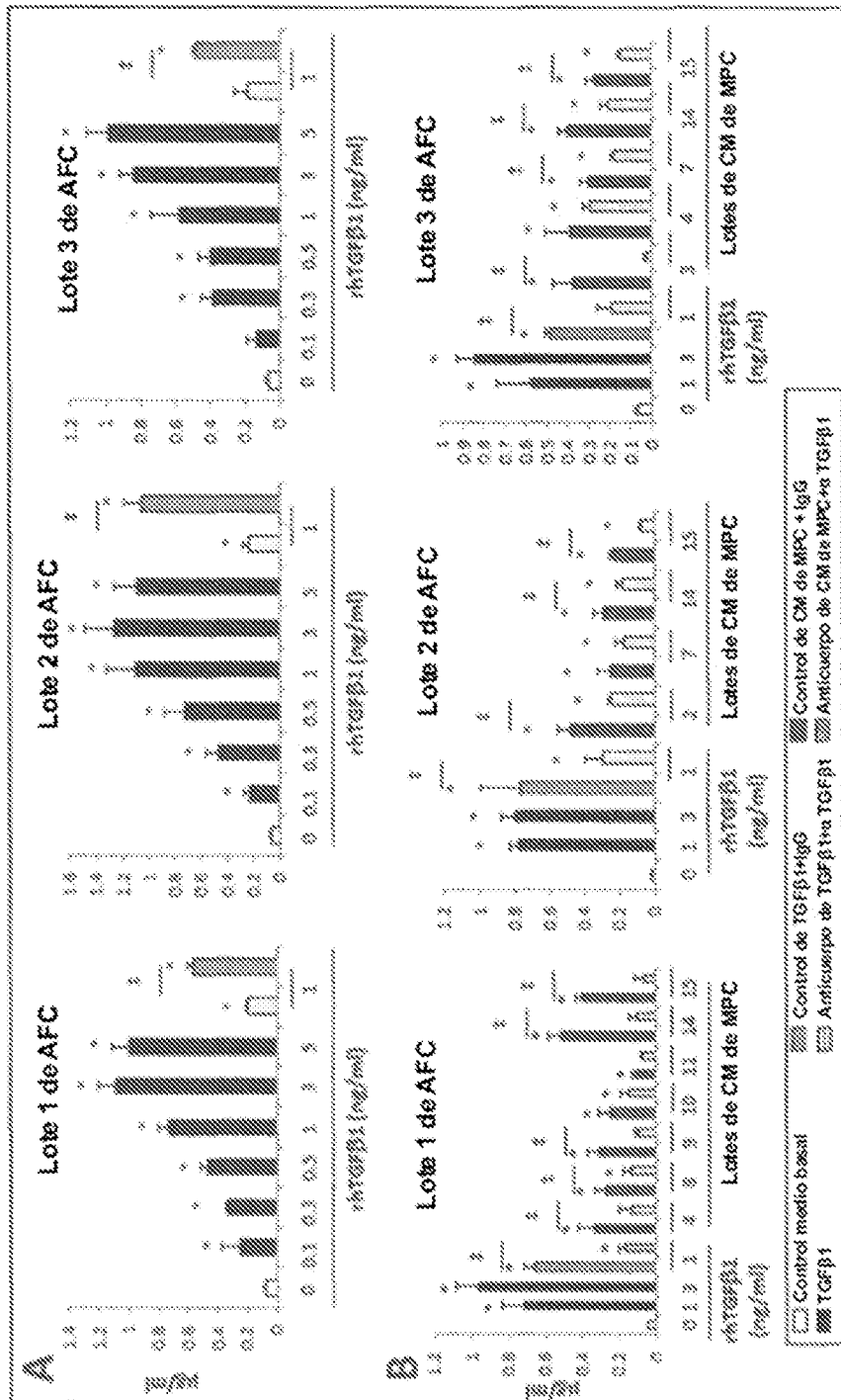


Figura 5

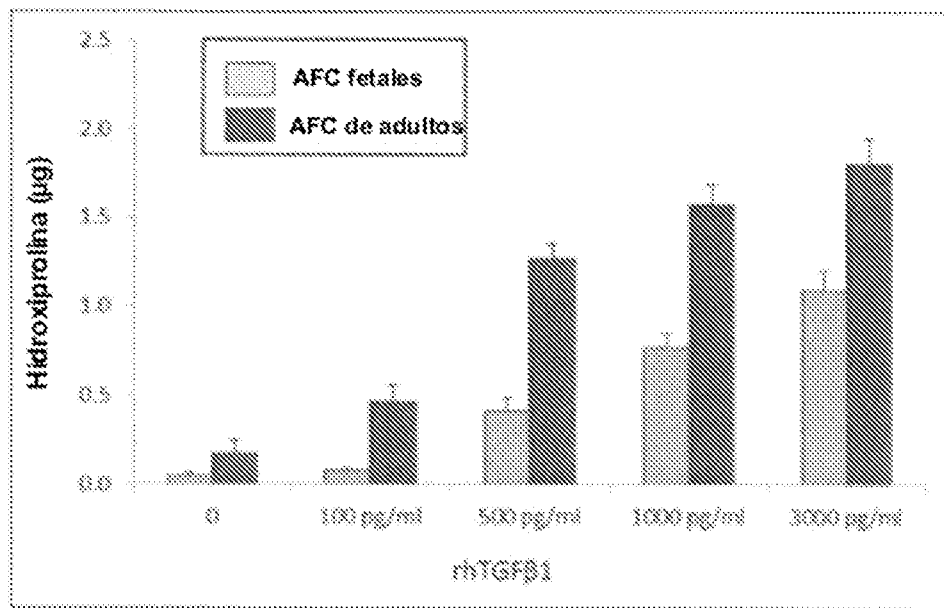


Figura 6

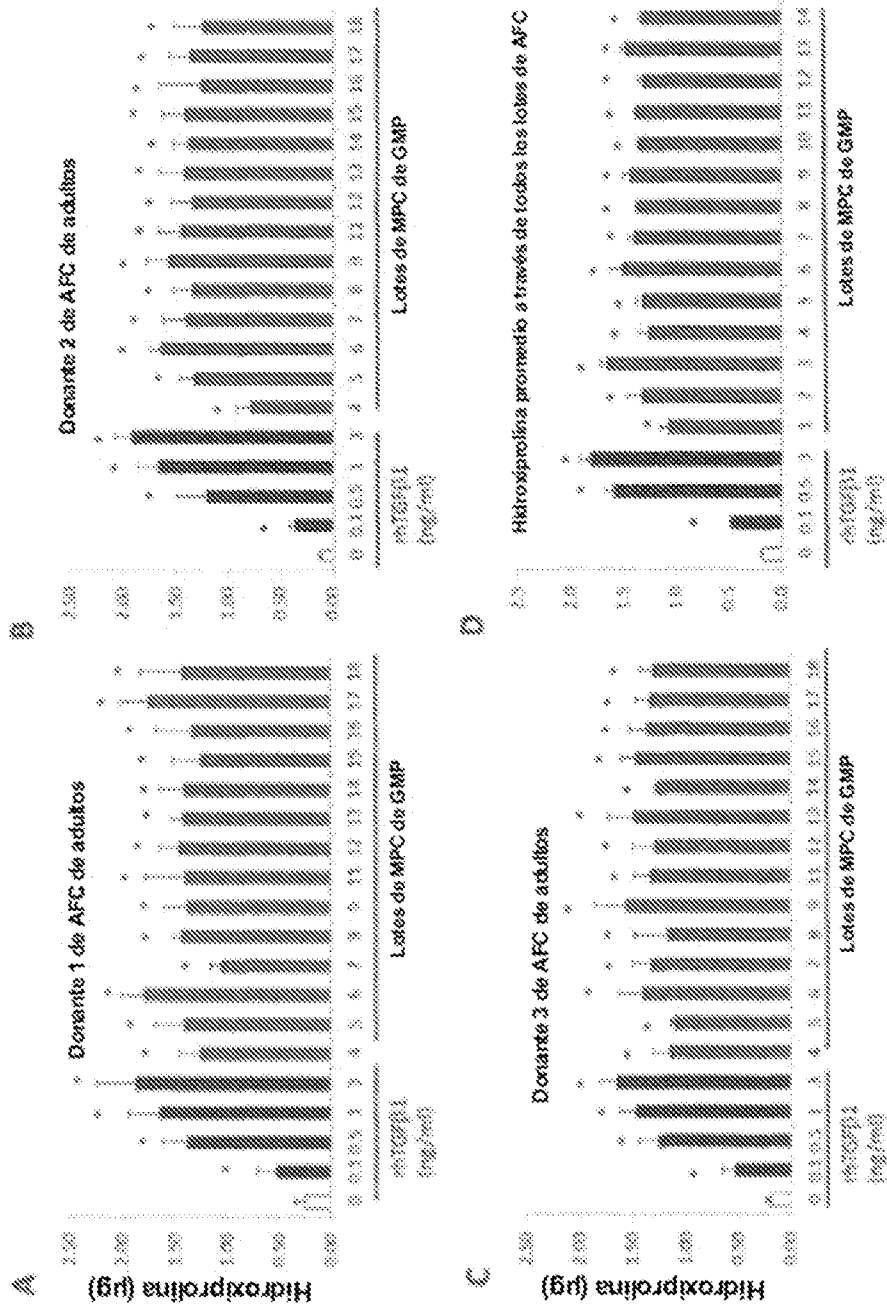


Figura 7

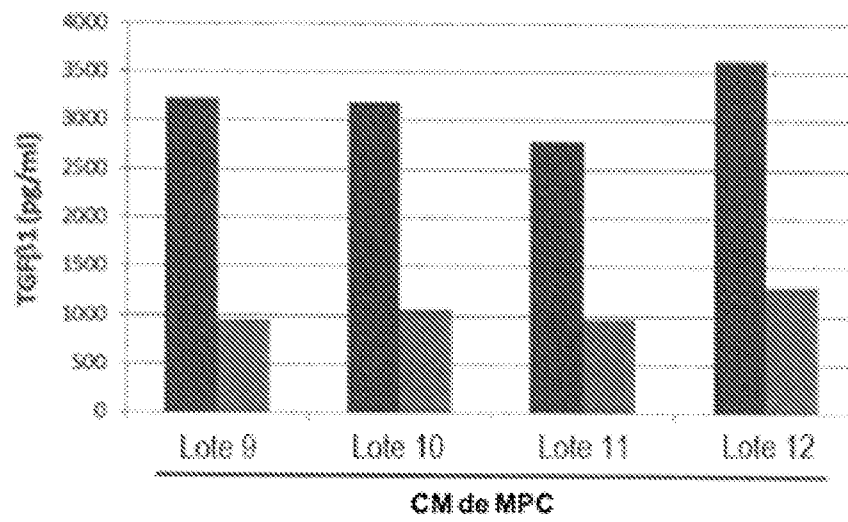


Figura 8

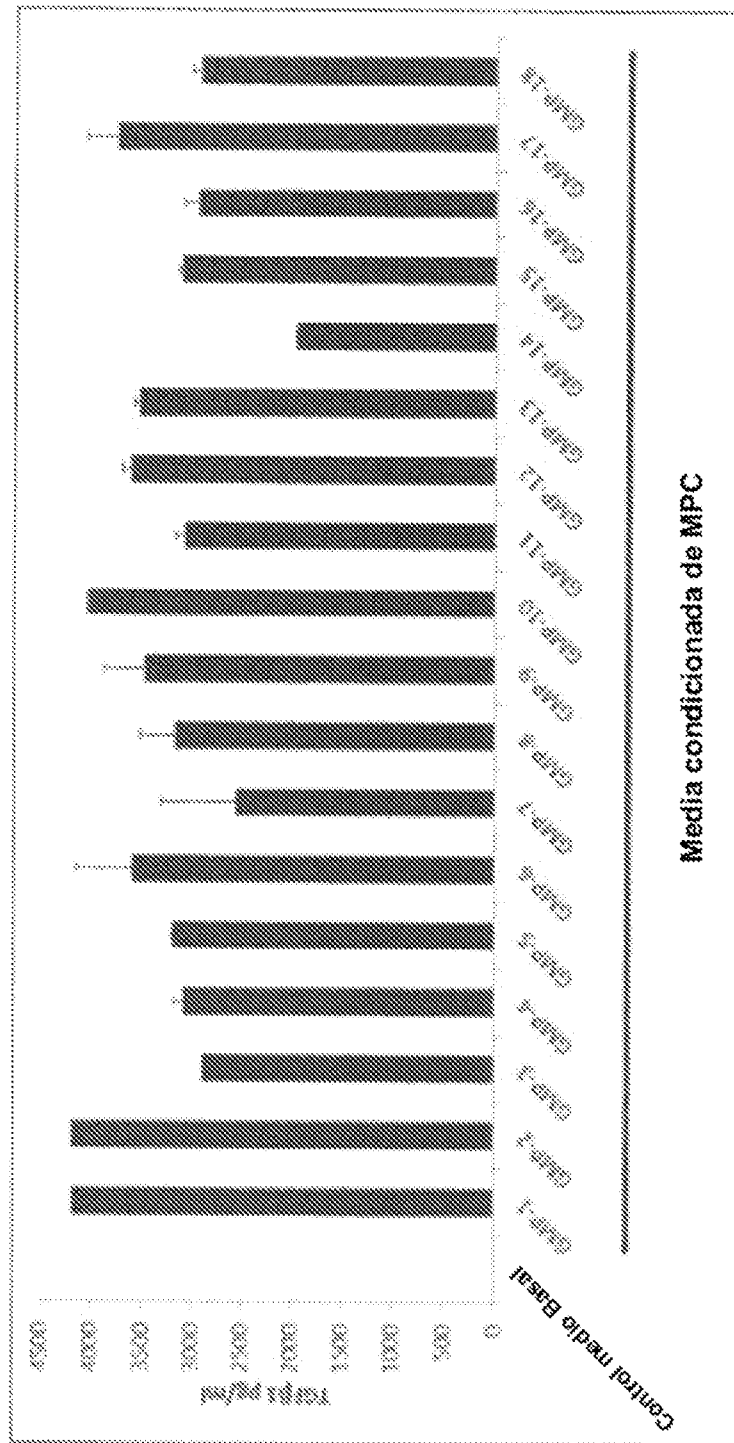


Figura 9

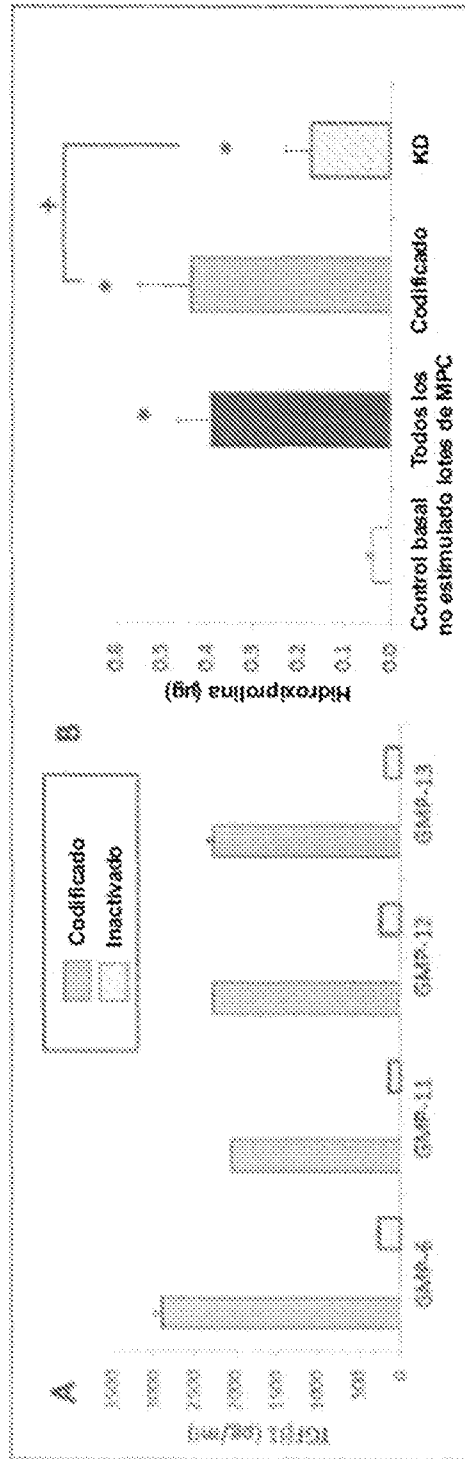


Figura 10

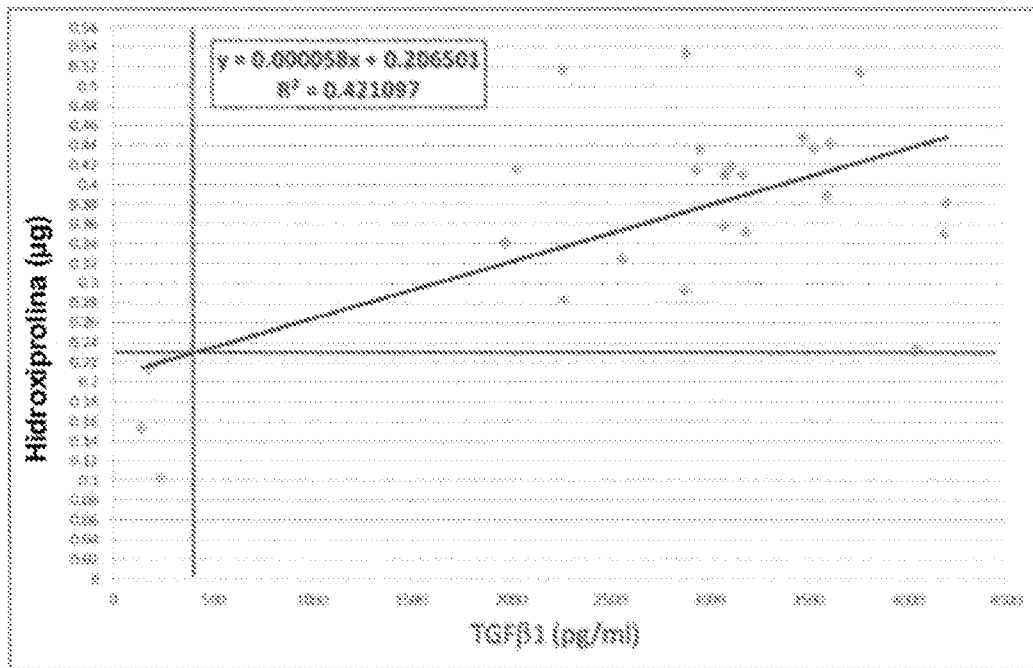


Figura 11

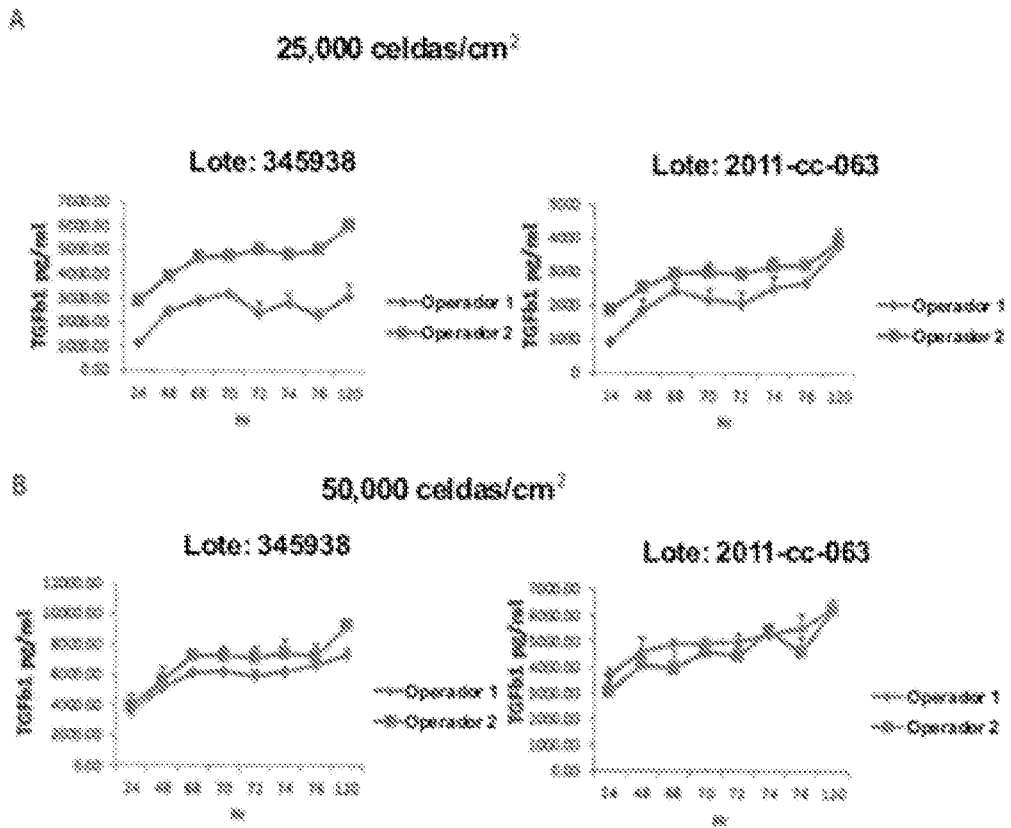
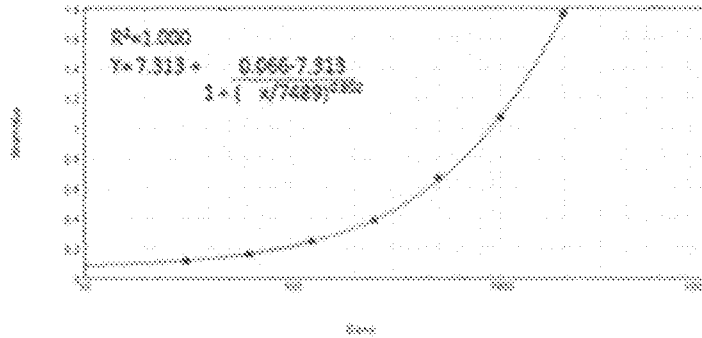


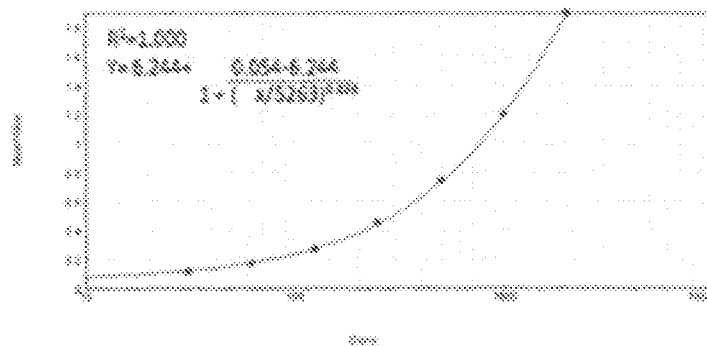
Figura 12

A

Curva estándar en diluyente de calibrador -1



Curva estándar en diluyente de calibrador -2



Curva estándar en diluyente de calibrador -3

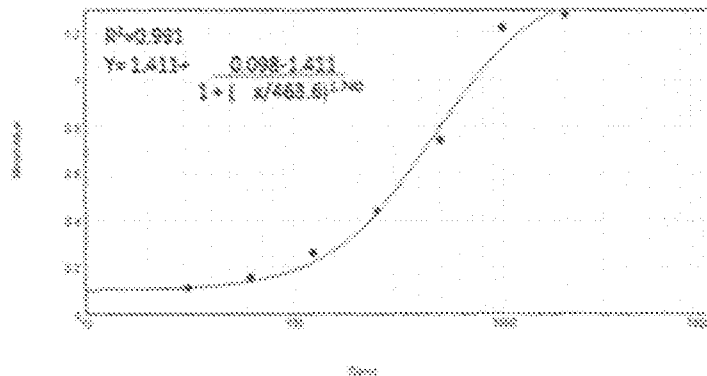
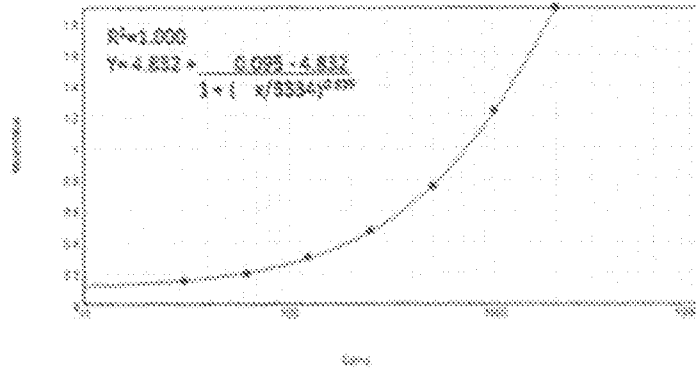


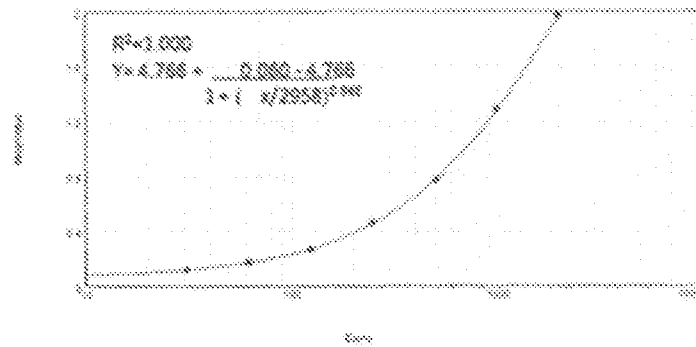
Figura 13

B

Curva estándar en CBM +0.5% BSA-1



Curva estándar en CBM +0.5% BSA-2



Curva estándar en CBM +0.5% BSA-3

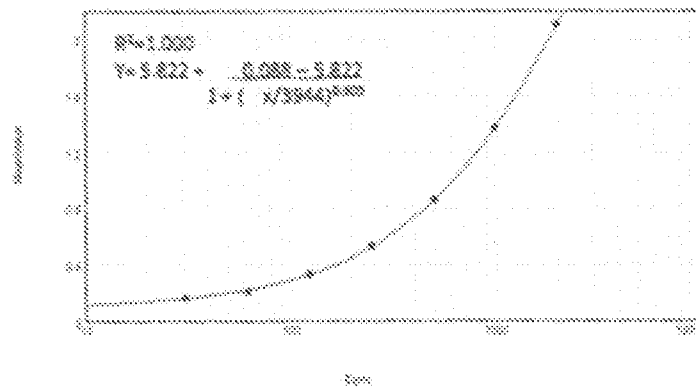


Figura 13 (continuación)

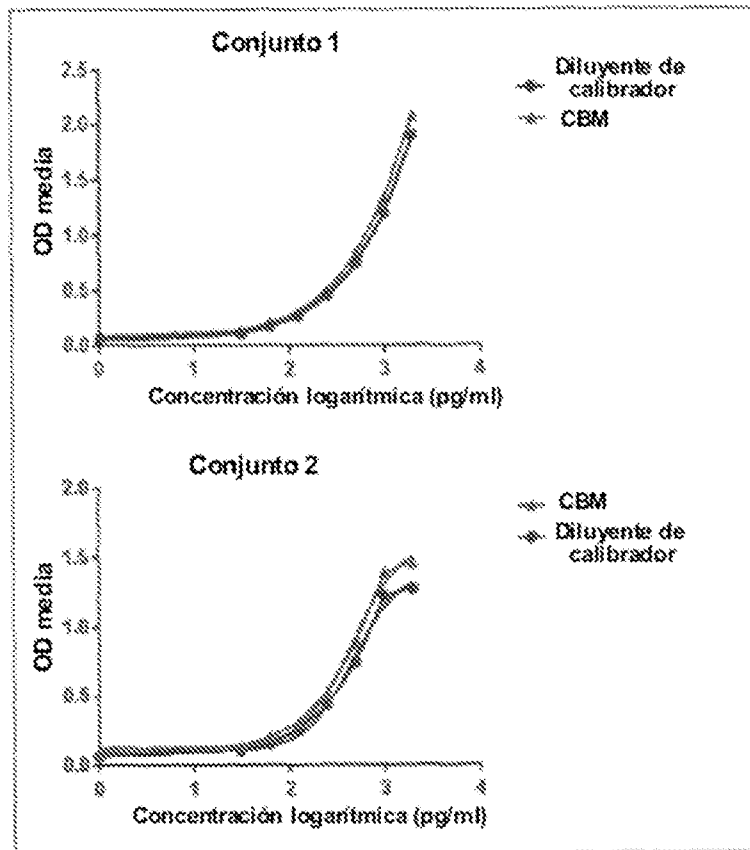


Figura 14