

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 454 021

10.01)
10.01)

(12)	Т3			
 (96) Fecha de presentación y núme (97) Fecha y número de publicación 	ero de la solicitud europea: n de la concesión europea:	03.10.2006 25.12.2013	E 06825367 (3) EP 1941031	

54 Título: Células madre de tipo embrionario aisladas de sangre de cordón umbilical humano

③ Prioridad:	73 Titular/es:
05.10.2005 US 724328 P	THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 09.04.2014 	352 Administration Building 506 South Wright Street Urbana, IL 61801, US; ZHAO, YONG (33.3%) y MAZZONE, THEODORE (33.3%)
	ZHAO, YONG y MAZZONE, THEODORE (74) Agente/Representante: DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 454 021 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre de tipo embrionario aisladas de sangre de cordón umbilical humano

Antecedentes de la invención:

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general a células madre de tipo embrionario aisladas de sangre de cordón umbilical humano, denominadas en la presente memoria células madre de sangre de cordón (CB-SC "del inglés Cord Blood-Stem Cells"), que muestran las características de las células madre embrionarias y las células hematopoyéticas. Estas células tienen capacidad de proliferación y son capaces de diferenciarse a múltiples tipos de células. Además, las CB-SC muestran una baja inmunogenicidad y regulación inmunitaria. En la presente invención, estas células son para su uso en terapias basadas en células madre para el tratamiento de enfermedades tales
- 10 estas celulas son para su uso en teraplas basadas en celulas madre para el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson, la diabetes, la lesión de la médula espinal, las enfermedades cardiovasculares por esclerosis múltiple (EM), el accidente cerebrovascular y los defectos de nacimiento.

Antecedentes de la invención

La creciente prevalencia de enfermedades humanas crónicas, p. ej., las enfermedades cardiovasculares, la diabetes 15 y las enfermedades degenerativas neuronales, representan un desafío para encontrar terapias más eficaces. La terapia basada en células madre, incluyendo células madre embrionarias y adultas, proporciona una herramienta de tratamiento racional para la medicina regenerativa y tiene el potencial de revolucionar la terapéutica moderna [A. Vats, R. C. Bielby, N. S. Tolley, R. Nerem, J. M. Polak, Stem cells, Lancet 366 (2005) 592-602; M. A. Hussain, N. D. Theise, Stem-cell therapy for diabetes mellitus, Lancet 364 (2004) 203-205; C. M. Rice, N.J. Scolding, Adult stem cells-reprogramming neurological repair? Lancet 364 (2004) 193-199; L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, 20 Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708]. Debido a su alto potencial de autorrenovación y capacidad de diferenciación pluripotente, las células madre embrionarias (ES) se han convertido en un área de investigación muy activa [A. Vats, R. C. Bielby, N. S. Tolley, R. Nerem, J.M. Polak, Stem cells, Lancet 366 (2005) 592-602; L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708; K. H. Wilan, C.T. Scott, S. Herrera, Chasing a cellular fountain of 25 youth, Nat Biotechnol. 23 (2005) 807-815]. Las preocupaciones éticas, sin embargo, han limitado su disponibilidad y utilidad práctica [C. Dennis, Check E, 'Ethical' routes to stem cells highlight political divide, Nature 437 (2005) 1076-1077; M. Evans, Ethical sourcing of human embryonic stem cells--rational solutions? Nat Rev Mol Cell Biol. 6 (2005) 663-667]. Dejando de lado estas preocupaciones éticas, la utilización de la fertilización in vitro (FIV) y la 30 transferencia nuclear alterada (TNA) para generar células ES se hace problemática por la complejidad de las tecnologías requeridas [M. Evans, Ethical sourcing of human embryonic stem cells--rational solutions? Nat Rev Mol Cell Biol. 6 (2005) 663-667; D. A. Melton, G. Q. Daley, C. G. Jennings, Altered nuclear transfer in stem-cell research a flawed proposal, N Engl J Med. 351 (2004) 2791-2792].

- Recientemente, se ha utilizado la sangre del cordón umbilical humano como una fuente de células madre para
 repoblar el sistema hematopoyético y otros órganos [J. Bonde, D. A. Hess, J. A. Nolta, Recent advances in hematopoietic stem cell biology, Curr Opin Hematol. 11 (2004) 392-398; K. K. Ballen, New trends in umbilical cord blood transplantation, Blood 105 (2005) 3786-3792; D. A. Peterson, Umbilical cord blood cells and brain stroke injury: bringing in fresh blood to address an old problem, J Clin Invest. 114 (2004) 312-314; V. Silani, L. Cova, M. Corbo, A. Ciammola, E. Polli, Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis, Lancet 364 (2004) 200-202]. La sangre del cordón proporciona una fuente abundante para la generación de células madre, incluyendo células madre
- W. Kim, I. H. Yang, C. Ahn, H. Han, H. Kim, In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, Biochem Biophys Res Commun. 321 (2004) 102-108; G. Kogler, S. Sensken, J. A. Jerey, T.
- 45 Trapp, M. Muschen, N. Feldhahn, S. Liedtke, R. V. Sorg, J. Fischer, C. Rosenbaum, S. Greschat, A. Knipper, J. Bender, O. Degistirici, J. Gao, A. I: Caplan, E. J. Colletti, G. Almeida-Porada, H. W. Muller, E. Zanjani, P. Wernet, A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential, J Exp Med. 200 (2004) 123-135] and monocyte-derived stem cells [Y. Zhao, T. Mazzone, Human umbilical cord blood-derived f-macrophages retain pluripotentiality after thrombopoietin expansion, Exp Cell Res. 310 (2005) 311-318]. Se ha
- 50 informado de células madre que expresan marcadores moleculares de ES en la sangre del cordón después de la eliminación de las células hematopoyéticas (incluyendo la supresión de todas las células positivas para el antígeno común leucocitario CD45) [C. P. McGuckin, N. Forraz, M. O. Baradez, S. Navran, J. Zhao, R. Urban, R. Tilton, L. Denner, Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood, Cell Prolif. 38 (2005) 245-55]. Sin embargo, la escasez de esta población de células descrita anteriormente [C. P. McGuckin, N.
- 55 Forraz, M. O. Baradez, S. Navran, J. Zhao, R. Urban, R. Tilton, L. Denner, Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood, Cell Prolif. 38 (2005) 245-55] en la sangre del cordón restringe significativamente su aplicación práctica.

También se han descrito varias otras células madre de tipo embrionario derivadas de fuentes de adultos en lugar de fuentes embrionarias. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Número 7.045.148, las Solicitudes de Patente de

los Estados Unidos Números de serie 2005/0148034, 2005/0118715, 2004/0028660, 2003/0235909, 2002/0160510, 2003/0180269 y la Solicitud de Patente Internacional Número WO 03/068937 describen células madre embrionarias extraídas de la placenta o de la sangre del cordón umbilical. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 2006/0078993 describe células madre de tipo embrionario derivadas de la membrana amniótica de cordón

5 umbilical. Las células madre descritas en estas patentes o solicitudes de patentes son de origen mesenquimal que no expresan el marcador CD45 (CD45). En otro ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número de Serie 2006/0147426 describe células madre derivadas de la médula ósea humana.

La presente invención se refiere a un tipo de células madre aisladas de sangre del cordón umbilical humano, denominadas en la presente memoria células madre de sangre del cordón umbilical (CB-SC). Estas células madre
 son de origen hematopoyético (y no mesenquimales) como se indica por la alta expresión del marcador CD45 (CD45⁺). Estas células pueden aislarse y expandirse utilizando una tecnología sencilla. Las CB-SC comparten propiedades con las células ES y las células hematopoyéticas humanas, incluyendo la baja inmunogenicidad, la capacidad para proliferar y la capacidad de diferenciarse a múltiples tipos de células.

Estos y otros aspectos y atributos de la presente invención se comentarán con referencia a los siguientes dibujos y la memoria descriptiva adjunta.

Breve resumen de la invención

15

La presente invención proporciona células madre de tipo embrionario aisladas, composiciones y métodos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

- La presente invención describe células madre de tipo embrionario aisladas de sangre de cordón umbilical humano, denominadas en la presente memoria CB-SC, para su uso en terapia basada en células madre, que se caracterizan por: (a) mostrar características de células madre embrionarias que comprenden una susceptibilidad a la proliferación y la capacidad para diferenciarse a diversos tipos de células, (b) mostrar características de las células hematopoyéticas que comprenden la expresión de CD45; (c) fenotípicamente distintas de los linfocitos, macrófagos y monocitos por ser negativas para los marcadores CD3, CD20, CD11b/Mac-1 y CD14; (d) fenotípicamente distintas
- 25 de las células madre hematopoyéticas por ser negativas para el marcador CD34, (e) mostrar baja inmunogenicidad mediante la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) asociada con una baja inmunogenicidad, y (f) mostrar regulación inmunitaria por medio de la inhibición de la proliferación de linfocitos estimulada por mitógeno, para su uso en la terapia basada en células madre. Estas células madre de tipo embrionario son susceptibles de proliferación y son capaces de diferenciarse a diversos tipos de células.
- 30 En una realización preferida, las características de las células madre embrionarias incluyen tener fenotipos positivos para los marcadores de células madre Oct-4 y Nanog. En una realización adicional, la baja inmunogenicidad de estas células madre se caracteriza por que las células madre no son capaces de estimular la proliferación de linfocitos en una reacción linfocítica mixta alogénica. En una realización adicional, las células madre muestran una regulación inmunitaria por medio de la inhibición de la proliferación de linfocitos estimulada por mitógenos y la regulación de subgrupos de células T (Células T CD4⁺, Células T CD8⁺, y células T reguladoras CD4⁺CD25⁺).

Las células madre de tipo embrionario son capaces de diferenciarse a una variedad de células, que incluyen células de tipo endotelial, células de tipo neuronal, células productoras de insulina, oligodendrocitos, y megacariocitos.

La presente invención describe adicionalmente una composición para su uso en la terapia basada en células madre que comprende las células madre de tipo embrionario aisladas descritas. Las células madre de tipo embrionario se 40 pueden utilizar para el tratamiento de la hiperglucemia en un sujeto mamífero diabético mediante la administración de las células al sujeto.

La presente invención también describe un método para el aislamiento de células madre de tipo embrionario. El método comprende: (a) proporcionar una muestra de sangre del cordón umbilical humano, (b) eliminar los glóbulos rojos de la muestra para obtener células mononucleares; (c) cultivar las células mononucleares en un medio de cultivo en un recipiente de cultivo no tratado para el cultivo de tejido, y (d) obtener una población de células que está adherida al recipiente de cultivo. La población de células adherida se puede desprender del recipiente de cultivo mediante, por ejemplo, incubación en disolución de hidrocloruro de lidocaína en donde el hidrocloruro de lidocaína es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5%. Opcionalmente, las células adheridas se pueden desprender mediante incubación adicional de las células con disolución de EDTA o disolución de EDTA que contiene tripsina (tripsina/EDTA) en donde el EDTA es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,5 mM, y la tripsina es de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,25%. Además, el cultivo celular no requiere un alimentador celular.

Breve descripción de los dibujos:

La FIG. 1 muestra los resultados de la caracterización de CB-SC para los marcadores de células embrionarias y hematopoyéticas. (A) Cuantificación de células adheridas por pocillo durante más de 12 días; (B) Las células adheridas durante la noche se tiñeron con anticuerpos para el antígeno común leucocitario CD45 y otros marcadores de células hematopoyéticas, junto con tinción DAPI; (C) Expresión de marcadores de células ES en CB-SC el día 15; (D) Expresión de marcadores de células hematopoyéticas neces de células hematopoyéticas en CB-SC el día 15;

55

45

La FIG. 2 es el resultado de los análisis de flujo de marcadores de células embrionarias y hematopoyéticas en CB-SC (A) y factores de transcripción (B);

La Fig. 3 es la evaluación de la inmunogenicidad de las CB-SC. (A) Examen de los marcadores inmunológicos asociados sobre CB-SC. Se obtuvieron resultados de la inmunotinción a partir de cuatro preparaciones de sangre de cordón y produjeron resultados similares. La IgG de conejo normal sirvió como control negativo para el anticuerpo policlonal de HLA-ABC; el anticuerpo IgG de ratón de isotipo coincidente sirvió como control negativo para otros anticuerpos monoclonales. Barra de escala, 47 μm. (B) Reacción mixta de linfocitos (MLR). Las CB-SC se cultivaron simultáneamente con linfocitos alogénicos de sangre periférica humana durante 6 días a diferentes proporciones. El número de células representa la media (± DT) de tres experimentos;

- 10 La FIG. 4 es la regulación de las CB-SC sobre la molécula CD69 expresada por células T CD4⁺ y CD8⁺ clasificadas. Las células T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) clasificadas se cultivaron simultáneamente con CB-SC en presencia de IL-2 (500 U/ml) y PHA (10 μg/ml) durante 5 días. La expresión de CD69 se analizó mediante análisis de flujo. Los datos representan la media (± DT) de tres experimentos;
- La FIG. 5 muestra los efectos inhibidores de CB-SC sobre las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ clasificadas. Las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ se clasificaron a partir de sangre periférica alogénica y se cultivaron simultáneamente con CB-SC durante 5 días, en presencia de interleuquina (IL-2) 500 U/ml. Para la clasificación celular, las células se sometieron a inmunotinción doble con anti-CD4 humano de ratón conjugado con FITC y anti-CD25 humano de ratón conjugado con aloficocianina (APC). Las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ se presentaron en un sistema Transwell como control y se evaluó la acción del contacto célula-célula sobre la inhibición. Los datos representan uno de al menos tres experimentos con los resultados similares;

La FIG. 6 muestra el resultado del análisis de flujo de la producción de IL-10 intracelular. Los linfocitos alogénicos se cultivaron simultáneamente con CB-SC a una razón 1:10 de CB-SC:linfocitos, en presencia o ausencia de mitógeno PHA. Después de cultivo simultáneo durante 5-6 días, las células se permeabilizaron y se evaluaron para determinar el nivel intracitoplásmico de IL-10 por citometría de flujo. El anticuerpo IgG1k de ratón de isotipo coincidente sirvió como control negativo. Los datos representan uno de al menos tres experimentos con los resultados similares;

25

La FIG. 7 muestra los efectos inhibidores de CB-SC sobre la proliferación de linfocitos estimulada por PHA. A, Formación de agregados celulares mediante microscopio de contraste de fase. Los linfocitos estimulados con PHA formaron agregados celulares más grandes (panel central); Las CB-SC (células adheridas) cultivadas simultáneamente con linfocitos estimulados con PHA formaron agregados celulares más pequeños (marcado con un

- 30 círculo de color rojo). Ampliación original, ×50. *B*, Cuantificación del número de linfocitos. Los linfocitos alogénicos se cultivaron simultáneamente con CB-SC durante 5-6 días a una razón 1:10 de CB-SC:linfocitos, en presencia o ausencia de mitógeno PHA. *C*, Las CB-SC se cultivaron simultáneamente con linfocitos alogénicos a diferentes razones en presencia o ausencia de 500 U/ml de IL-2. Los datos representan la media (± DT) de cuatro experimentos;
- 35 La FIG. 8 muestra el resultado del examen de la producción de NO y la expresión de iNOS. *A*, Inmunocitoquímica para la expresión de iNOS en las CB-SC tratadas con PHA. La IgG de conejo normal (inserto, parte superior izquierda) sirvió como control negativo para el anticuerpo policlonal anti-iNOS de conejo. Las imágenes representan CB-SC estimuladas con PHA desde 10 µg/ml. Los resultados de inmunotinción se obtuvieron a partir de tres preparaciones de sangre de cordón y produjeron los resultados similares. Barra de escala, 47 µm. *B*, Análisis para la producción de NO. Las CB-SC fueron tratadas con PHA a diferentes dosis durante 3-5 días. Los sobrenadantes se recogieron para el examen de NO utilizando la reacción de Griess. Los resultados representan la media (± DT) de tres experimentos:

La FIG. 9 muestra los efectos de bloqueo del inhibidor de iNOS L-NNA sobre la proliferación de linfocitos inhibida por el cultivo simultáneo con CB-SC. Los linfocitos estimulados con PHA se cultivaron simultáneamente con CB-SC en presencia o ausencia del inhibidor de iNOS L-NNA (200 µM/día durante 3 días). Después del cultivo simultáneo durante 4 días, los linfocitos se recogieron para recuento celular. El número de células representa la media (± DT) de tres experimentos;

La FIG. 10 muestra la diferenciación de CB-SC en células de tipo endotelial. Las CB-SC se trataron con 50 ng/ml de VEGF durante 10-14 días y a continuación se prepararon para la inmunotinción. Las células no tratadas sirvieron como control. (A) Las CB-SC tratadas o no tratadas con VEGF se tiñeron con los marcadores de células endoteliales Flt-1, Flk-1, factor de von Willebrand (vWF), y CD146 (*panel izquierdo*); también se evaluaron con los marcadores de células hematopoyéticas CD45 y CD117 (*panel derecho*). Barra de escala, 60 µm. (B) La imagen de contraste de fases mostró la formación de la estructura en forma de cadena de células en CB-SC tratadas con VEGF. Las células no tratadas sirvieron como control. Barra de escala, 50 µm. (C) Las células de la estructura en forma de cadena se

55 tiñeron doblemente con la lipoproteína de baja densidad acetilada (Ac-LDL) y CD146 y a continuación se superpusieron. La imagen superpuesta mostró solapamiento de la tinción CD146 y Ac-LDL. Las células se fotografiaron con una Cámara Digital de 5 MHz MicroMAX utilizando un microscopio de Fluorescencia Zeiss Axiovert 100TV. Barra de escala, 50 µm. Las imágenes son representativas de cinco experimentos;

La FIG. 11 muestra la diferenciación de las CB-SC a células de tipo neuronal. Las CB-SC se trataron con NGF de 200 ng/ml durante 10-14 días y a continuación se prepararon para la inmunotinción. Las células no tratadas sirvieron como control. (A) Las células no tratadas con NGF se tiñeron con marcadores neuronales. Barra de escala, 57 µm. (B) y (C) mostraron las células tratadas con NGF. (B) La IgG de ratón sirvió como control negativo para la proteína

- 5 1b asociada a microtúbulos (MAP-1b) y la sinaptofisina (Synap); la IgG de conejo sirvió como control negativo para el ácido γ-aminobutírico (GABA) y la glutamato descarboxilasa_{65/67} (GAD). Barra de escala, 57 μm. (C) Expresión de marcadores específicos de células neuronales en las células tratadas con NGF. La barra de escala es de 37 μm. Las imágenes son representativas de tres experimentos;
- La FIG. 12 muestra que las CB-SC se diferenciaban a células productoras de insulina funcionales después del trasplante en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). (A) El examen cinético mostró la disminución de los niveles de glucosa en sangre después del trasplante (Txp). *N*=7 para los ratones trasplantados con CB-SC; *n*= 8 para los ratones diabéticos no trasplantados. Los niveles de glucosa se midieron a partir de sangre completa de la vena de la cola utilizando un detector de glucosa Accuchek. (B) Ensayo de tolerancia de la glucosa intraperitoneal (IPGTT) después de 7 días desde el trasplante. *N*=3 para ratones a los que se habían trasplantado
- 15 CB-SC; *n=4* para los ratones diabéticos no trasplantados, y *n=3* para los ratones no diabéticos. (C) Detección de péptido C humano en el suero de ratones trasplantados. Se recogieron muestras de sangre durante 20 minutos antes y después de IPGTT. *N=3* para cada grupo. El péptido C humano se examinó mediante el uso de un kit de análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas con péptido C humano ultrasensible (ELISA). Los datos representan la media (± DT). El asterisco (*) representa el valor *p* < 0,05;</p>
- 20 La FIG. 13 muestra la expresión de nestina en CB-SC. Inmunotinción de CB-SC con el anticuerpo monoclonal contra nestina humana. La IgG1k de isotipo coincidente sirvió como control negativo;

La FIG. 14 es el resultado de la transferencia Western para factores de transcripción incluyendo PDX-1, NeuroD, y Nkx6.1, junto con las prohormona convertasas PC-1 y PC-2. La β-actina sirvió como control interno;

- La FIG. 15 muestra el resultado de inmunotinción para el receptor de GLP-1 en CB-SC. Las células se cultivaron en portaobjetos con cámara Lab Teck-II de 8 pocillos en medio de cultivo regular y se utilizaron para la inmunotinción con anticuerpo policional anti-receptor de GLP-1 humano de conejo. La IgG de conejo normal sirvió como control para la inmunotinción. Barra de escala, 20 µm. Las células se fotografiaron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510;
- La FIG. 16 muestra la diferenciación de CB-SC a oligodendrocitos. Las CB-SC se trataron con NGF de 200 ng/ml durante 10-14 días. Expresión de marcadores específicos de oligodendrocitos sobre CB-PSC tratadas con NGF, incluyendo la proteína básica de mielina (MBP) (67-74), Sulfatido 04 y galactocerebrósido (Galc). Ampliación original: x400;

La FIG. 17 muestra la diferenciación de CB-SC a megacariocitos. Las CB-SC se trataron con TPO de 10 ng/ml durante 10-14 días. La inmunotinción mostró expresión de marcadores específicos de megacariocitos CD41b sobre CB-SC diferenciadas. La tinción DAPI mostró poliploidía nuclear (flecha gris) y una célula indiferenciada con tamaño regular del nucleo (flecha de color blanco). Ampliación original: x400; y

La FIG. 18 muestra la expresión de SDF-1 en los islotes diabéticos (A) y su receptor CXCR4 en CB-SC (B). Los datos representan uno de tres experimentos con los resultados similares. Barra de escala, 36 µm.

Descripción detallada de la invención

- 40 Aunque esta invención es susceptible de realización en muchas formas diferentes, se muestran en los dibujos, y se describirán en la presente memoria en detalle, realizaciones específicas de la misma con la comprensión de que los ejemplos son una ilustración de los principios de la invención y no se pretende que limiten la invención a las realizaciones específicas ilustradas.
- Las células madre de tipo embrionario aisladas para su uso en terapia basada en células madre según la presente invención se aíslan a partir de sangre de cordón umbilical humano. Estas células madre, denominadas en la presente memoria células madre de sangre del cordón (CB-SC), representan una población celular única que muestra características de las células tanto embrionarias como hematopoyéticas. Las CB-SC se caracterizan como se define en las reivindicaciones adjuntas.
- La presente invención describe un método para aislar las células madre embrionarias como se define en las reivindicaciones adjuntas. La población de células adheridas se puede desprender del recipiente de cultivo mediante, por ejemplo, incubación en disolución de hidrocloruro de lidocaína en donde el hidrocloruro de lidocaína es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5%. Opcionalmente, las células adheridas se pueden desprender mediante incubación adicional de las células con más disolución de EDTA o disolución de EDTA que contiene tripsina (tripsina/EDTA) en donde el EDTA es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2,5 mM, y la tripsina
- 55 es de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,25%. Además, el cultivo celular no requiere un alimentador celular. Lo que significa "recipiente de cultivo no tratado para el cultivo de tejidos" que se utiliza en la presente memoria es que el recipiente de cultivo no ha sido tratado con plasma de gas de vacío antes del cultivo celular. Los

ejemplos de los recipientes de cultivo adecuados incluyen, pero no se limitan a, portaobjetos de vidrio con cámara y placas Petri.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula madre embrionaria" se refiere a una célula madre que deriva de la masa celular interna de un blastocisto (por ejemplo, un embrión humano de 4 a 7 días de edad) y que es pluripotente. El término "célula madre de tipo embrionario" se refiere a una célula madre que *no* está derivada de la masa celular interna de un blastocisto.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "pluripotencial", "pluripotencial para la diferenciación" o "pluripotente" se refiere a que la célula es positiva para uno o más de los marcadores pluripotentes tales como, pero no limitados a Oct-4 y Nanog y la célula tiene el potencial de diferenciarse a cualquiera de los subgrupos de aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de los mamíferos después de los estímulos apropiados, tales como los factores de crecimiento apropiados.

Aislamiento de las células madre de sangre de cordón a partir de sangre del cordón umbilical humano

5

10

15

La sangre del cordón umbilical ha proporcionado una importante fuente de células madre para la investigación puesto que tiene ventajas únicas en comparación con otras fuentes de células madre: no hay preocupación ética, no hay riesgo para los donantes y existe bajo riesgo de la enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD) [K. K. Ballen, New trends in umbilical cord blood transplantation, Blood 105 (2005) 3786-3792; P. R. Sanberg, A. E. Willing, S. Garbuzova-Davis, S. Saporta, G. Liu, C.D. Sanberg, P. C. Bickford, S. K. Klasko, N. El-Badri, Umbilical cord blood derived stem cells and brain repair, Ann N Y Acad Sci. 1049 (2005) 67-83; D. A. Peterson, Umbilical cord blood cells

and brain stroke injury: bringing in fresh blood to address an old problem, J Clin Invest. 114 (2004) 312-314]. La
 presente invención implica células madre de tipo embrionario aisladas de la sangre del cordón embrionario. Se denominan en la presente memoria células madre de sangre de cordón (CB-SC). Según se utilizan en la presente memoria, los términos "sangre de cordón umbilical" y "sangre del cordón" son intercambiables.

Las CB-SC representan la población adherida de células obtenidas a partir de cultivo de las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical después de la eliminación de los glóbulos rojos. Estas células se generan utilizando un medio de cultivo celular muy alcalino con un bajo porcentaje de suero (p. ej., suero bovino fetal al 7%), y sin alimentadores celulares. Esto está en contraste con las células ES generadas utilizando alimentadores celulares. El requisito de alimentadores celulares para tales células plantea problemas potenciales de contaminación [M. Richards, C. Y. Fong, W. K. Chan, P. C. Wong, A. Bongso, Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 20 (2002) 933-936]. Un método

- 30 ilustrado para la obtención de las CB-SC se muestra en el Ejemplo 1 de más abajo. La población de células adheridas del cultivo de las células mononucleares en este Ejemplo representó aproximadamente 5% de las células mononucleares. Las células se pueden cultivar en un recipiente de cultivo que no esté tratado para el cultivo de tejido (es decir, no tratado con plasma de gas de vacío). Los ejemplos de tal recipiente de cultivo incluyen pero no se limitan a portaobjetos de vidrio con cámara y placas Petri. Las células no pueden ser cultivadas en una placa de
- 35 cultivo que haya sido tratada con plasma de gas de vacío. La población de células adheridas se puede desprender del recipiente de cultivo, por ejemplo, mediante incubación en disolución de hidrocloruro de lidocaína en donde el hidrocloruro de lidocaína es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5%. Opcionalmente, las células adheridas se pueden desprender mediante incubación adicional de las células con disolución de EDTA o disolución de EDTA que contiene tripsina (tripsina/EDTA) en donde el EDTA es de aproximadamente 0,5 mM a
- 40 aproximadamente 2,5 mM, y la tripsina es de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,25%. Se ha encontrado que estas células son capaces de proliferar con un tiempo de duplicación estimado de 2,8 días sobre la base de una curva de crecimiento generada a lo largo de 12 días (FIG. 1A). Utilizando las condiciones de crecimiento del Ejemplo 1, se pueden hacer pasar las CB-SC hasta un total de 7 pases a lo largo de 2 meses haciendo pasar las células cada 5 a 7 días. La proliferación disminuyó después de 3 meses en cultivo. Sin embargo,
- 45 es muy probable que una optimización adicional de las condiciones de crecimiento con factores de crecimiento pueda mejorar su potencial de proliferación a más largo plazo. Los ejemplos de estos factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), interleuquina 3, trombopoyetina (TPO), insulina, transferrina, ácido todo trans-retinoico, vitamina D, vitaminas, activinas, y diferentes concentraciones de sueros.
- 50 En comparación con otras células madre derivadas de sangre del cordón umbilical referidas [K. Bieback, S. Kern, H. Kluter, H. Eichler, Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, Stem Cells 22 (2004) 625-634; E. J. Gang, S.H. Hong, J: A. Jeong, S. H. Hwang, S. W. Kim, I. H. Yang, C. Ahn, H. Han, H. Kim, In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, Biochem Biophys Res Commun. 321 (2004) 102-108; G. Kogler, S. Sensken, J. A. Airey, T. Trapp, M. Muschen, N. Feldhahn, S.
- Liedtke, R. V. Sorg, J. Fischer, C. Rosenbaum, S. Greschat, A. Knipper, J. Bender, O. Degistirici, J. Gao, A. I. Caplan, E. J. Colletti, G. Almeida-Porada, H. W. Muller, E. Zanjani, P. Wernet, A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential, J Exp Med. 200 (2004) 123; M. Aoki, M. Yasutake, T. Murohara, Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device, Stem Cells 22 (2004) 994-1002; D. A. Ingram, L.E. Mead,
- 60 H. Tanaka, V. Meade, A. Fenoglio, K. Mortell, K. Pollok, M.J. Ferkowicz, D. Gilley, M.C. Yoder, Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood, Blood 104 (2004)

2752-2760; N. Baal, K. Reisinger, H. Jahr, R. M. Bohle, O. Liang, K. Munstedt, C. V. Rao, K. T. Preissner, M. T. Zygmunt, Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood, Thromb Haemost. 92 (2004) 767-775; M. Yu, Z. Xiao, L. Shen, L. Li, Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does

- 5 not, Br J Haematol. 124 (2004) 666-675; F. M. Cicuttini, K. Welch, A. W. Boyd, Characterization of CD34+HLA-DR-CD38+ and CD34+HLA-DR-CD38- progenitor cells from human umbilical cord blood, Growth Factors 10 (1994) 127-134], las CB-SC son differentes, mostrando las siguientes características: retención del antígeno celular hematopoyético CD45 en el cultivo a largo plazo y expresión de marcadores tanto de células ES como de células hematopoyéticas. Además, la inmunocitoquímica y el análisis de flujo demostraron que las CB-SC son negativas
- 10 para CD34 y el marcador de macrófagos CD11b/Mac-1, que es significativamente diferente de las células madre derivadas de monocitos de sangre de cordón referidas anteriormente, macrófagosf [Y. Zhao, T. Mazzone, Human umbilical cord blood-derived f-macrophages retain pluripotentiality after thrombopoietin expansion, Exp Cell Res. 310 (2005) 311-318].
- McGuckin et al. aislaron células de tipo ES SSEA-3⁺, SSEA-4⁺, y Oct-4⁺ a partir de una población de céllas no hematopoyéticas (CD45⁻) de sangre de cordón [C. P. McGuckin, N. Forraz, M. O. Baradez, S. Navran, J. Zhao, R. Urban, R. Tilton, L. Denner, Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood, Cell Prolif. 38 (2005) 245-55]. En comparación con las CB-SC, estas células crecían en agregados y no se propagaban en micromatraces. Es importante destacar que la rareza de esta célula en la sangre del cordón (aproximadamente 0,21% de células mononucleares [C. P. McGuckin, N. Forraz, M. O. Baradez, S. Navran, J. Zhao,
- 20 R. Urban, R. Tilton, L. Denner, Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood, Cell Prolif. 38 (2005) 245-55] plantea una limitación clave para la utilidad terapéutica.

Lo que se entiende por "aislada" en la presente invención es que las CB-SC se separan de otras células, tales como los glóbulos rojos y otras células mononucleares no adheridas, que se encuentran en la sangre del cordón umbilical a través de uno o más métodos de aislamiento, tales como, pero limitados a, separación mecánica o cultivo

25 selectivo. La población de CB-SC "aislada" no tiene que ser pura. Pueden estar presentes otros tipos de células. Los otros tipos de células presentes pueden ser totalmente diferentes de las CB-SC, o pueden ser transformados a partir de las CB-SC durante el cultivo celular y posterior pase de las células. En una realización preferida, la población aislada se compone de más de 50% de CB-SC. En otra realización preferida más, la población aislada se compone de más de 90% de CB-SC.

CB-SC que muestran características de las células madre embrionarias (ES)

Las CB-SC en la presente invención muestran características de las células madre embrionarias (ES). Lo que se entiende por "características de las células madre embrionarias", en la presente invención es que las células madre expresan dos factores de transcripción críticos, Oct-4 y Nanog, que están relacionados con la auto-renovación y la pluripotencialidad de las células ES [S. H. Orkin, Chipping away at the Embryonic Stem Cell Network, Cell 122 (2005) 828-830]. En una realización preferida, los marcadores característicos de las células madre embrionarias también incluyen otros marcadores tales como, pero limitados al antígeno embrionario de fase específica SSEA-3 y SSEA-4 [I. Klimanskaya, Y. Chung, L. Meisner, J. Johnson, M. D. West; R. Lanza, Human embryonic stem cells derived without feeder cells, Lancet 365 (2005) 1636-1641]. En otra realización preferida más, las "características de las células madre embrionarias" pueden incluir, adicionalmente, la expresión débil de antígenos de rechazo de tumores tales como, pero no limitados a TRA-1-60 y TRA-1-81. En una realización adicional, las "características de las células madre embrionarias" pueden no incluir adicionalmente la expresión de SSEA-1.

Los resultados de la inmunotinción (Figura 1C) mostraron una fuerte expresión de marcadores específicos de células ES por las CB-SC, incluidos los dos factores de transcripción críticos Oct-4 y Nanog (relacionados con la autorenovación y pluripotencialidad de las células ES [S. H. Orkin, Chipping away at the Embryonic Stem Cell Network, Cell 122 (2005) 828-830]), junto con el antígeno embrionario de fase específica (SSEA)-3 y SSEA-4 [I. Klimanskaya, Y. Chung, L. Meisner, J. Johnson, M. D. West, R. Lanza, Human embryonic stem cells derived without feeder cells, Lancet 365 (2005) 1636-1641]. Estas células también mostraron una expresión débil del antígeno de rechazo de tumores TRA-1-60 y TRA-1-81, y ninguna expresión de SSEA-1.

50 CB-SC que muestran características de las células hematopoyéticas

Las CB-SC en la presente invención muestran características hematopoyéticas, que en la presente memoria se definen como positivas para el antígeno común leucocitario CD45 (CD45 positivo, o CD45⁺). Otros marcadores que también indican la presentación de características de las células hematopoyéticas pueden incluir marcadores tales como, pero no limitados a, tetraspanina CD9 y receptor del factor de células madre CD117.

55 La inmunotinción de CB-SC el día 1 después del aislamiento demostró la presencia de antígenos de células hematopoyéticas, incluyendo tetraspanina CD9, antígeno común leucocitario CD45, y receptor del factor de células madre CD117 (FIG. 1B). La fuerte expresión de CD45 por CB-SC es una indicación de que estas células son de origen hematopoyético, que son diferentes de muchas otras células madre adultas que son de origen mesenquimal y son CD45 negativas (CD45⁻).

CB-SC fenotípicamente diferentes de las células madre hematopoyéticas

Las CB-SC son fenotípicamente diferentes de las células madre hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas se caracterizan por ser positivas para el marcador CD34 (CD34⁺). Los estudios de inmunotinción indicaron que las CB-SC son CD34 negativas (CD34⁻) (FIG. 1B), y, por lo tanto, son fenotípicamente diferentes de las células madre hematopoyéticas.

CB-SC fenotípicamente diferentes de linfocitos, macrófagos y monocitos

5

25

Estas células no expresan el marcador de macrófagos CD11b/Mac-1, el marcador de linfocitos T CD3, o el marcador de linfocitos B CD20 (FIG. 1B). Estos resultados indican que las CB-SC son fenotípicamente diferentes de linfocitos, macrófagos y monocitos, y las CB-SC no derivan de monocitos.

10 CB-SC que muestran una baja inmunogenicidad y regulación inmunitaria

Una gran preocupación en el uso de células madre para la terapéutica es su inmunogenicidad, que conduce al rechazo inmunológico. La inmunogenicidad celular está determinada principalmente por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que incluye la molécula de clase I del MHC (HLA-ABC) y moléculas de clase II del MHC (HLA-DR y HLA-DQ) [Drukker, G. Katz, A. Urbach, M. Schuldiner, G. Markel, J. Itskovitz-Eldor, B. Reubinoff, O.

- 15 Mandelboim, N. Benvenisty, Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci USA. 99(2002) 9864-9869]. Como se muestra en el Ejemplo 4 a continuación, la inmunotinción de dos moléculas del MHC críticas demostró que solo 5% de las células expresaba HLA-ABC, y HLA-DR fue completamente negativa (FIG. 3A). Estos niveles de expresión son similares a los niveles de expresión referidos en células ES humanas [Drukker, G. Katz, A. Urbach, M. Schuldiner, G. Markel, J. Itskovitz-Eldor, B. Reubinoff, O.
- 20 Mandelboim, N. Benvenisty, Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci USA. 99(2002) 9864-9869]. Aproximadamente 6% de las células mostró una expresión débil para CD40 y CD80; ≈ 30% de las células expresó HLA-DQ; ≈ 22% de las células expresó CD86 (Figura 3A).

La baja inmunogenicidad de CB-SC también se puede demostrar fácilmente con un análisis funcional utilizando la reacción linfocítica mixta descrita en el Ejemplo 5 de más abajo. Como se muestra en la FIG. 3B, las CB-SC no estimularon la proliferación de linfocitos en una reacción linfocítica mixta alogénica, coincidente con la baja inmunogenicidad demostrada por inmunotinción.

Sin someterse a ninguna teoría específica, la baja inmunogenicidad de las CB-SC puede contribuir a la capacidad de las CB-SC para regular los linfocitos T. Como se muestra en el Ejemplo 7 a continuación, las CB-SC, cuando se cultivan simultáneamente con linfocitos alogénicos de sangre periférica en presencia del mitógeno fitohemaglutinina.

30 (PHA) o del factor de crecimiento fisiológico interleuquina (IL)-2, disminuyen el porcentaje de células T CD8⁺ estimuladas con PHA y células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ estimuladas con IL-2, junto con la normalización de la razón CD4/CD8 y la disminución de nivel intracelular de IL-10. La molécula de CD69, un regulador negativo en los linfocitos T activados, aumentó significativamente en linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ después de cultivo simultáneo con CB-SC (FIG. 4). Además, las CB-SC inhiben significativamente la proliferación de linfocitos
 35 estimulados con IL-2 y/o PHA. Los estudios del mecanismo mostraron que el óxido nítrico (NO) mediaba parcialmente este efecto inhibidor, como se ha demostrado mediante el bloqueo con un inhibidor potente de la óxido nítrico sintasa (N-omega-nitro-L-arginina, L-NNA). El contacto célula-célula juega un papel crítico en el tratamiento

con IL-2, como se ha demostrado mediante el uso del sistema de cultivo Transwell (FIG. 5).

Las CB-SC tienen la capacidad de proliferación

40 Una de las características clave para que una célula madre sea adecuada para la terapia basada en células madre es su capacidad de proliferación. Según se utiliza en la presente memoria, el término "capacidad de proliferación" se refiere a que la célula expresa uno o más marcadores de auto-renovación tales como, pero no limitados a Nanog y la célula puede proliferar. Preferiblemente, la célula puede proliferar indefinidamente. Lo que se entiende por "proliferar" según se utiliza en la presente descripción es que la célula puede crecer y multiplicarse en número cuando se cultiva la célula. Los términos "proliferar" y "expandir" se usan indistintamente en la presente memoria.

Como se indica mediante estudios inmunotinción (FIG. 1C), las CB-SC son positivas para el factor de transcripción crítico Nanog relacionado con la auto-renovación de células ES. Se ha encontrado que estas células son capaces de proliferar con un tiempo de duplicación estimado de 2,8 días sobre la base de una curva de crecimiento generada a lo largo de 12 días (FIG. 1A). Utilizando las condiciones de crecimiento del Ejemplo 1 mostrado a continuación, las

50 CB-SC se pueden hacer pasar hasta un total de 7 pases a lo largo de 2 meses haciendo pasar las células cada 5 a 7 días. Sin embargo, es probable que una mayor optimización de las condiciones de crecimiento pueda mejorar su potencial de proliferación a más largo plazo.

Las CB-SC tienen la capacidad de diferenciarse a múltiples tipos de células

Otra característica clave para que una célula madre sea adecuada para la terapia con células madre es que tenga la capacidad de diferenciarse a diversos tipos de células. Preferiblemente, la célula madre es pluripotente. Los datos de los autores de la presente invención indican que las CB-SC, después de los estímulos apropiados, pueden

diferenciarse a una amplia variedad de tipos de células con características de tres capas embrionarias (mesodermo, ectodermo y endodermo), que incluyen células de tipo endotelial (que están derivadas del mesodermo [L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708; M. Baron, Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-

- 5 mediated signals, Differentiation 68 (2001) 175-185]), células de tipo neuronal (que están derivadas de ectodermo [L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708; L. Bally-Cuif, M. Hammerschmidt, Hammerschmidt. Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control, Curr Opin Neurobiol. 13 (2003) 16-25]), y células productoras de insulina (que están derivadas del endodermo [M. A. Hussain, N. D. Theise, Stem-cell therapy for diabetes mellitus, Lancet 364
- 10 (2004) 203-205; L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708]). Otras células a las que se pueden diferenciar las CB-SC incluyen células de tipo oligodendrocito y megacariocito. Es muy probable que las CB-SC se puedan diferenciar también a otros tipos de células.
- Como se muestra en el Ejemplo 4 a continuación (FIG. 1C), las CB-SC son positivas tanto para Oct-4 como para Nanog que son factores de transcripción críticos relacionados con la pluripotencia. Por lo tanto, es razonable especular que las CB-SC son pluripotentes.

Las CB-SC son adecuadas para las terapias basadas en células madre

La presente invención proporciona una composición para terapias basadas en células madre que comprenden CB-SC. También se describe un método para terapias basadas en células madre mediante el uso de CB-SC.

- 20 Las células madre embrionarias (ES) muestran dos propiedades únicas: las capacidad para proliferar y la pluripotencialidad para la diferenciación [A. Vats, R. C. Bielby, N. S. Tolley, R. Nerem, J.M. Polak, Stem cells, Lancet 366 (2005) 592-602]. Por lo tanto, la terapia basada en células madre, tiene un potencial significativo para curar enfermedades humanas importantes y comunes [M. A. Hussain, N. D. Theise, Stem-cell therapy for diabetes mellitus, Lancet 364 (2004) 203-205; C. M. Rice, N.J. Scolding, Adult stem cells--reprogramming neurological repair?
- Lancet 364 (2004) 193-199]. Sin embargo, una limitación importante para la terapia basada en células madre ha sido la identificación de una fuente adecuada de células madre. Por ejemplo, hay cuestiones éticas significativas para el uso de células ES [C. Dennis, Check E, 'Ethical' routes to stem cells highlight political divide, Nature 437 (2005) 1076-1077; M. Evans, Ethical sourcing of human embryonic stem cells--rational solutions? Nat Rev Mol Cell Biol. 6 (2005) 663-667] y las células madre adultas muestran una proliferación y una capacidad de diferenciación reducidas 30 [C. M. Rice, N.J. Scolding, Adult stem cells--reprogramming neurological repair? Lancet 364 (2004) 193-199].
 - Las CB-SC comparten las mismas características clave de las células madre embrionarias en la capacidad para proliferar y la pluripotencialidad de diferenciación. Junto con su baja inmunogenicidad, las CB-SC son adecuadas para las terapias basadas en células madre en el tratamiento de enfermedades humanas. Además, las CB-SC son fácilmente asequibles a partir de sangre del cordón umbilical, y se pueden cultivar y propagar *in vitro* para
- 35 proporcionar un suministro abundante de células para terapias basadas en células madre. Estas propiedades de las CB-SC pueden superar el problema de la disponibilidad y el suministro inadecuados asociados con las células ES y otras células madre adultas que muestran reducción de la proliferación y de la capacidad de diferenciación.

Uso de CB-SC para el tratamiento de la hiperglucemia en sujetos diabéticos

En la presente memoria se describe un método para tratar la hiperglucemia en un sujeto mamífero diabético 40 mediante la administración de CB-SC al sujeto. Las CB-SC administradas migran al páncreas del sujeto y se diferencian a células productoras de insulina funcionales *in vivo*, que a su vez producen insulina en respuesta al alto nivel de glucosa para controlar la hiperglucemia en el sujeto.

- Están aumentando la prevalencia de la diabetes y sus complicaciones a largo plazo planteando un importante reto terapéutico para los pacientes individuales y la salud pública. El déficit de células productoras de insulina es la cuestión crucial para pacientes diabéticos tanto de tipo 1 como de tipo 2. A pesar del desarrollo y la aplicación de diversas formulaciones de insulina, la insulina exógena no permite alcanzar el mismo grado de control glucémico que el proporcionado por la insulina endógena, ni previene por completo las complicaciones a largo plazo tales como la retinopatía diabética, la neuropatía, la nefropatía y diversos trastornos cardiovasculares [M. A. Hussain, N. D. Theise, Stem-cell therapy for diabetes mellitus, Lancet 364 (2004) 203-205]. Estos retos clínicos requieren el
- 50 desarrollo de tratamientos más eficaces. El trasplante de células de los islotes, un tratamiento potencial, se ha limitado por la escasez de páncreas como fuente de islotes purificados. Las células productoras de insulina derivadas de células madre, por lo tanto, proporcionan un enfoque prometedor para la terapia de reemplazo de células beta [M. A. Hussain, N. D. Theise, Stem-cell therapy for diabetes mellitus, Lancet 364 (2004) 203-205]. La acumulación de pruebas sugiere que las células productoras de insulina derivadas de células madre pueden
- normalizar la glucosa en sangre en modelos animales diabéticos [M. A. Hussain, N. D. Theise, Stem-cell therapy for diabetes mellitus, Lancet 364 (2004) 203-205]. Sin embargo, en informes anteriores estas células se obtuvieron a partir de células ES y tejidos fetales [G. K. Brolen, N. Heins, J. Edsbagge, H. Semb, Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells, Diabetes 54 (2005) 2867-2874; Y. Hori, I. C. Rulifson, B. C. Tsai, J. J. Heit, J. D. Cahoy, S. K. Kim, Growth inhibitors

promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci USA. 99 (2002) 16105-16110; H. Segev, B. Fishman, A. Ziskind, M. Shulman, J. Itskovitz-Eldor, Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters, Stem Cells 22 (2004) 265-274; S. Miyazaki, E. Yamato, J. Miyazaki, Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells,

- Diabetes 53(2004) 1030-1037; M. Zalzman, L. Anker-Kitai, S. Efrat, Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype, Diabetes 54(2005) 2568-2575; M. Zalzman, S. Gupta, R. K. Giri, I. Berkovich, B. S. Sappal, O. Karnieli, M. A. Zern, N. Fleischer, S. Efrat, Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2003)7253-7258], aumentando las preocupaciones éticas de su aplicación clínica. Las CB-SC pueden corregir la hiperglucemia en ratones diabéticos, y restaurar la euglucemia después de una sensibilización aguda a la glucosa
- (IPGTT).

Como se muestra en el Ejemplo 10 a continuación, las CB-SC inyectadas en la cavidad peritoneal de ratones con diabetes inducida por STZ tienen la capacidad de corregir la hiperglucemia en estos ratones. Adicionalmente, las pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) demostraron respuestas fisiológicas de las células CB-SC trasplantadas. La glucosa en sangre de los ratones no diabéticos normales alcanzó su punto máximo entre 5-10 min

- 15 trasplantadas. La glucosa en sangre de los ratones no diabéticos normales alcanzó su punto máximo entre 5-10 min y volvió a niveles normales 30 min después de la sensibilización con glucosa. La glucosa en sangre de los ratones diabéticos a los que se habían trasplantado las CB-SC alcanzó un máximo a los 20 minutos, seguido de un retorno al intervalo normal al cabo de 60 minutos (FIG. 10B). Sin embargo, la glucosa en sangre de los ratones diabéticos a los que no se habían trasplantado las CB-SC seguía siendo muy alta (> 500 mg/dL) (FIG. 12B).
- 20 Para corroborar que esta inversión de la hiperglucemia estaba asociada a la diferenciación de las CB-SC a células productoras de insulina, los autores de la presente invención también examinaron la producción del péptido C humano (como un indicador de la secreción de insulina humana) en los sueros de ratones diabéticos a los que se habían trasplantado las CB-SC. La producción de péptido C humano era indetectable en los sueros de ratones no diabéticos y ratones diabéticos no trasplantados, pero aumentó de forma aguda en ratones trasplantados después
- de la sensibilización con glucosa. Estos resultados, en conjunto, proporcionan la evidencia de que las CB-SC dan lugar a células productoras de insulina funcionales después del trasplante a ratones diabéticos. Esta conclusión es apoyada por un informe reciente, el cual mostró que la sangre de cordón puede contener progenitores que generan las células productoras de insulina [S. Yoshida, F. Ishikawa, N. Kawano, K. Shimoda, S. Nagafuchi, S. Shimoda, M. Yasukawa, T. Kanemaru, H. Ishibashi, L. D. Shultz, M. Harada, Human cord bloodderived cells generate insulinproducing cells in vivo, Stem Cells 23(2005) 1409-1416].

Ejemplos

Los análisis estadísticos de los datos en los siguientes ejemplos se realizaron mediante la prueba t de Student pareada para determinar la significación estadística. Los valores se expresan como media ± DT (desviación típica).

Ejemplo 1: Aislamiento de células madre de sangre de cordón (CB-SC) a partir de sangre de cordón umbilical humano y cultivo celular

Se obtuvieron muestras de sangre de cordón umbilical humano (50-100 ml/unidad) de donantes sanos (Life-Source Blood Services, Glenview, IL). Las células mononucleares se aislaron utilizando Ficoll-Hypaque (γ = 1,077, Sigma), seguido de la eliminación de los glóbulos rojos utilizando tampón Red Blood Cell Lysis (eBioscience, San Diego, CA). Las células mononucleares se sembraron en portas con cámara Lab-Tek de 8 pocillos (Fisher Scientific) a 1-2 ×

- 40 10⁵ células/ml, 0,5 ml/pocillo en medio RPMI 1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 7% (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se incubaron a 37°C, en condiciones de CO₂ al 8%. Las células a una confluencia de 70-80% se hicieron pasar cada 5-7 días por medio RPMI 1640 de nueva aportación con un suplemento de suero bovino fetal al 7% a una razón de 1:2. Para expandir las células a gran escala, las células mononucleares se sembraron inicialmente en placas Petri de 150x15 mm (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) a 1 × 10⁶ células/ml, 25
- 45 ml/placa en medio RPMI 1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 7%. Las células se hicieron pasar cada 10-14 días a una razón de 1:2. Debido a que las CB-SC se adherían fuertemente a las placas de cultivo, fueron resistentes a la rutina de tripsina-EDTA (EDTA 0,53 mM), o EDTA 5 mM para el desprendimiento. Los autores de la presente invención incubaron por lo tanto las células adheridas en hidrocloruro de lidocaína al 3,5% (Sigma) con EDTA 0,5 mM (diluido a partir de EDTA 0,5 M, pH 8,0, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) durante 5-8 minutos a
- 50 temperatura ambiente para cosechar las células para el análisis *in vitro* y el trasplante *in vivo*. Se puede utilizar tripsina/EDTA después de desprendimiento con lidocaína con el fin de facilitar el desprendimiento de las células y mantener la viabilidad celular.

La población de células adheridas obtenida mediante el cultivo de las células mononucleares de sangre del cordón umbilical cultivadas en portas con cámara Lab-Tek de 8 pocillos (aproximadamente 5% de células mononucleares) pudo proliferar. Por tanto estas células se hicieron pasar cada 5-7 días, hasta un total de 7 pases a lo largo de 2 meses. Basándose en una curva de crecimiento generada a lo largo de 12 días (FIG. 1A), se estimó que el tiempo de duplicación de las CB-SC era de 2,8 días. La capacidad de proliferación de las células disminuyó en los cultivos a largo plazo (a lo largo de 3 meses).

Ejemplo 2: Inmunoquímica

La inmunotinción se realizó como se ha descrito previamente con modificaciones mínimas [Y. Zhao, T. Mazzone, Human umbilical cord blood-derived f-macrophages retain pluripotentiality after thrombopoietin expansion, Exp Cell Res. 310 (2005) 311-318]. Las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con ImmunoPure Peroxidase Suppressor (Pierce, Rockford, IL) para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Para la inmunotinción marcada con fluorescencia, se omitió este paso. Después de la incubación con anticuerpos primarios,

- 5 inmunotinción marcada con fluorescencia, se omitió este paso. Después de la incubación con anticuerpos primarios, las células se tiñeron con el kit ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La inmunotinción se realizó utilizando los siguientes anticuerpos: los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD3, CD9, CD11b/Mac-1 (Clon ICRF44), CD20, CD34 (clon 563) humanos, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD34 (clon 563), CD45 (HI30) humanos conjugado con R-PE, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD45 (HI30), CD146 (clon P1H12) humanos conjugado
- 10 con FITC, el antígeno leucocitario humano (HLA)-DR, HLA-DQ, el anticuerpo IgG₁κ de isotipo coincidente se adquirieron de BD Pharmingen; los anticuerpos monoclonales de ratón SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Oct-4, Thy-1 (CD90), la sinaptofisina, y la tirosina hidroxilasa (TH) fueron de Chemicon International Inc. (Temecula, CA); los anticuerpos monoclonales de ratón CD11b y el anti-factor de von Willebrand humano (vWF) fueron de Sigma (Saint Louis, MO); el anticuerpo contra la proteína asociada a microtúbulos (MAP) 1B fue de
- 15 NeoMarkers. Los anti-anticuerpos policionales humanos de conejo: el anticuerpo contra Nanog y el anticuerpo contra la glutamato descarboxilasa_{65/67} fueron de Chemicon; el anticuerpo contra el ácido γ-aminobutírico (GABA) fue de Sigma; los anticuerpos contra CD117, Flt-1 (receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 1, VEGF R1), Flk-1 (VEGF R2) fueron de NeoMarkers. El anticuerpo policional anti-HLA-ABC humano de conejo fue de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos monocionales de ratón contra CD40, CD80 (B7-1), y CD86 (B7-2)
- 20 humanos fueron de eBioscience (San Diego, CA). Las células se incubaron a continuación con anticuerpos primarios, IgG₁κ de ratón (como control para anticuerpos monoclonales de ratón), e IgG de conejo normal (como control para anticuerpos policionales de conejo, Santa Cruz). Los anticuerpos anti-IgG de ratón de burro conjugados con FITC o rodamina (TRITC) AffiniPure se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove PA). El anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 568 fue de Molecular Probes (Carlsbad, CA). Después de
- 25 la tinción, los portaobjetos se montaron con Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las células se observaron y se fotografiaron utilizando una cámara Zeiss Axiocam Color con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop Histology/Digital. Las imágenes fueron adquiridas con el soporte lógico del fabricante y editados con Adobe Photoshop Elements 2.0. Cuando se evaluó el porcentaje de expresión en células de los antígenos celulares, los autores de la presente invención utilizaron la tinción con IgG de ratón o de conejo como controles para la tinción de
- 30 fondo (<1%). Los autores de la presente invención consideraron cualquier tinción celular superior a la tinción de fondo como una tinción positiva y a continuación la cuantificaron. Se evaluaron al menos 400 células a partir de cinco campos seleccionados al azar de cada porta.

Para el análisis de tinción doble en la diferenciación de células de tipo endotelial, las células tratadas con VEGF y no tratadas completaron primero la incorporación de la lipoproteína de baja densidad acetilada marcada con perclorato de 1,1'-diocatadecil-3,3,3',3'-tetrametilindo-carbocianina (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies Inc., Stroughton, MA), y después se fijaron con formaldehído al 4% durante 20 min a temperatura ambiente y se utilizaron para la inmunotinción con el marcador de superficie celular CD146 específico como se describió anteriormente.

Ejemplo 3: Análisis de Flujo

35

Para la tinción intracelular, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min y a continuación se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% (Sigma) durante 5-6 min a temperatura ambiente. Para la tinción de la superficie celular, se omitieron las etapas de fijación y permeabilización. Las células se incubaron con suero de caballo al 2,5% (Vector Laboratories) a temperatura ambiente para bloquear la tinción no específica. Las células se incubaron con anticuerpos primarios durante 45 min a 4°C y después se lavaron con PBS frío. Las células se tiñeron con anticuerpos secundarios conjugados con FITC durante otros 45 min a 4°C seguido de análisis de flujo. El anticuerpo IgG₁κ de ratón de isotipo coincidente o IgG de conejo normal sirvieron como controles negativos.

Después de la tinción, las células se analizaron utilizando un Beckman-Coulter Elite ESP.

Ejemplo 4: Caracterización de las CB-SC

La inmunotinción de CB-SC, el día 1 después del aislamiento demostró la presencia de antígenos celulares hematopoyéticos, incluyendo tetraspanina CD9, antígeno común leucocitario CD45, y el receptor del factor de células madre CD117 (FIG. 1B). Estas células no expresaban el marcador de macrófagos CD11b/Mac-1, el marcador de linfocitos T CD3, el marcador de linfocitos B CD20, o el marcador de células madre hematopoyéticas CD34 (FIG. 1B). Estos resultados sugieren que las CB-SC son fenotípicamente distintas de macrófagos, linfocitos y células madre hematopoyéticas CD34⁺ caracterizados previamente. Para caracterizar adicionalmente estas células, los autores de la presente invención evaluaron la expresión de marcadores embrionarios. Los resultados de transcripción críticos Oct-4 y Nanog (relacionados con la auto-renovación y la pluripotencialidad de las células ES [S. H. Orkin, Chipping away at the Embryonic Stem Cell Network, Cell 122 (2005) 828-830]), junto con el antígeno embrionario de fase específica (SSEA)-3 y SSEA-4 [I. Klimanskaya, Y. Chung, L. Meisner, J. Johnson, M. D. West,

R. Lanza, Human embryonic stem cells derived without feeder cells, Lancet 365 (2005) 1636-1641]. Estas células
 también mostraron una expresión débil del antígeno de rechazo tumoral (TRA)-1-60 y TRA-1-81, y ninguna expresión de SSEA-1 (Figura 1C). De acuerdo con los resultados de la tinción en la fase temprana (FIG. 1B), todas las células expresaron fuertemente marcadores de células hematopoyéticas, incluyendo CD9, CD45, y CD117, pero

permanecieron negativos para los antígenos de superficie CD3, CD11b/Mac-1, CD20, CD34, y CD90/Thy-1 (Figura 1D). En particular, el análisis de flujo demostró que las CB-SC mantenidas en medio FBS-RPMI 1640 al 7% retenían estos fenotipos durante más de 2 meses (FIG. 2 A y B). Los resultados anteriores se obtuvieron de 8 unidades de sangre de cordón con resultados similares, incluyendo las preparaciones frescas y congeladas en nitrógeno líquido.

5 Basándose en los estudios actuales de los autores de la presente invención, las CB-SC pueden ser generadas a partir de cada unidad de sangre del cordón. Juntos, estos datos indican que las CB-SC representan una población celular única que muestra características de las células embrionarias y hematopoyéticas.

Ejemplo 5: Fenotipos de CB-SC asociados a la inmunogenicidad

- Una gran preocupación con el uso de células madre para la terapéutica es su inmunogenicidad, lo que lleva al rechazo inmunológico. La inmunogenicidad celular está determinada principalmente por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) incluyendo la molécula de clase I del MHC (HLA-ABC) y moléculas de clase II del MHC (HLA-DR y HLA-DQ) [Drukker, G. Katz, A. Urbach, M. Schuldiner, G. Markel, J. Itskovitz-Eldor, B. Reubinoff, O. Mandelboim, N. Benvenisty, Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci USA. 99(2002) 9864-9869]. Para caracterizar más plenamente las CB-SC, los autores de la
- 15 presente invención evaluaron las CB-SC para determinar los fenotipos asociados a la inmunogenicidad incluyendo HLA-ABC, HLA-DR y HLA-DQ; junto con las moléculas coestimuladoras relacionadas con la respuesta inmunitaria CD40, CD80, CD86. La inmunotinción para dos moléculas del MHC críticas demostró que únicamente 5% de las células que expresaban HLA-ABC, y HLA-DR eran completamente negativas (FIG. 3A). Estos niveles de expresión son similares a los niveles de expresión referidos en células ES humanas [Drukker, G. Katz, A. Urbach, M.
- 20 Schuldiner, G. Markel, J. Itskovitz-Eldor, B. Reubinoff, O. Mandelboim, N. Benvenisty, Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci USA. 99(2002) 9864-9869]. Aproximadamente 6% de las células mostró una expresión débil para CD40 y CD80; ≈30% de las células expresó HLA-DQ; ≈22% de las células expresó CD86 (Figura 3A).

Ejemplo 6: Efecto de CB-SC sobre la estimulación de la proliferación de linfocitos alogénicos

- Para evaluar con más detalle su inmunogenicidad, los autores de la presente invención realizaron un análisis funcional utilizando la reacción linfocítica mixta. Las CB-SC como estimulador se sembraron en portas con cámara Lab-Tek II de 8 pocillos a 1 × 10⁵ células/ml, 0,5 ml/pocillo en medio RPMI 1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 7% y se incubaron a 37°C, condiciones de CO₂ al 8% durante la noche. Los linfocitos alogénicos como respondedores se obtuvieron de capas leucocitarias de donantes sanos (Life-Source Blood Services, Glenview, IL)
- 30 después de eliminar todas las células adheridas y a continuación se cultivaron simultáneamente con CB-SC por triplicado a Razones de CB-SC:linfocitos crecientes (1:10, 1:20, y 1:40). Los cultivos de linfocitos sin CB-SC sirvieron como controles. Después de 6 días, se recogieron y se contaron los linfocitos suspendidos. Como se muestra en la FIG. 3B, las CB-SC no estimularon la proliferación de linfocitos en una reacción linfocítica mixta alogénica, compatible con la baja inmunogenicidad demostrada por la inmunotinción.
- 35 Ejemplo 7: Regulación inmunitaria de las CB-SC sobre linfocitos T

50

Con el fin de entender mejor la relación entre los linfocitos y las CB-SC, los autores de la presente invención estudiaron la regulación inmunitaria de las CB-SC sobre los linfocitos T.

Las CB-SC se adhieren fuertemente a las placas de cultivo y muestran una morfología redondeada grande, es fácil distinguir entre CB-SC y linfocitos. Se utilizaron CB-SC en crecimiento a una confluencia de 80% para cultivo 40 simultáneo con linfocitos alogénicos. Los linfocitos alogénicos se obtuvieron de capas leucocitarias de donantes sanos (Life-Source Blood Services, Glenview, IL) después de la separación en Ficoll-Hypaque seguida de la eliminación de todas las células adheridas y a continuación se cultivaron simultáneamente con CB-SC a una razón (1:10) [Zhao, Y., H. Wang, v T. Mazzone, 2006. Identification of stem cells from human umbilical cord blood with hematopoietic 2454-2464. embryonic and characteristics. Exp Cell Res. 2006. 312: DOI: 45 10.1016/j.yexcr.2006.04.008. April 26; (Epub ahead of print)] de CB-SC.

Para la estimulación con PHA, se sembraron suspensiones de linfocitos (1 × 10⁶ células/ml) con o sin PHA (10 µg/ml, Sigma) en cultivos de células CB-SC en medio de cultivo regular. Los linfocitos estimulados con PHA sin CB-SC sirvieron como control positivo; los linfocitos cultivados solamente en medio regular sirvieron como control negativo. Los linfocitos cultivados simultáneamente con CB-SC sin estimulación con PHA sirvieron como control negativo adicional. Para la estimulación con IL-2, se utilizó IL-2 (500 U/ml, eBioscience). Al cabo de 5-6 días, los

- linfocitos suspendidos se recogieron para el recuento celular y/o el análisis de flujo. Para evaluar el efecto del contacto célula-célula en la inhibición de la proliferación de linfocitos, las CB-SC se fijaron con glutaraldehído al 2,5% durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de cinco lavados con PBS y después se utilizaron para los experimentos de cultivo simultáneo como se describió anteriormente. Las CB-SC no fijadas de
- 55 la mismas unidades de sangre de cordón sirvieron como controles. Adicionalmente, los autores de la presente invención emplearon un sistema de cultivo Transwell con un tamaño de 0,4 μm (Sigma) para plantar linfocitos.

En experimentos en los que se utilizó N^{ω}-Nitro-L-arginina (L-NNA, Sigma) para inhibir la NO sintasa, se añadió el fármaco (L-NNA 200 μ M) 1h antes de la estimulación con PHA y después se administraron 200 μ M/día durante dos

días adicionales. [Ziche, M., L. Morbidelli, E. Masini, S. Amerini, H. J. Granger, C. A. Maggi, P. Geppetti, y F. Ledda. 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. J Clin Invest. 94:2036-2044].

- El análisis de flujo se realizó como se describió anteriormente [Zhao, Y., H. Wang, y T. Mazzone. 2006. Identification
 of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. Exp Cell Res. 2006, 312: 2454-2464. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.04.008. April 26; (Epub ahead of print)]. En pocas palabras, para la tinción de IL10 intracelular, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min y a continuación se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% (Sigma) durante 5-6 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron con suero de caballo al 2,5% (Vector Laboratories) a temperatura ambiente para bloquear la tinción no específica.
- 10 Las células se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-10 humana (R & D Systems, Minneapolis, MN) durante 45 min a 4°C y después se lavaron con PBS frío. Las células se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado con FITC durante otros 45 min a 4°C, seguido de análisis de flujo. Para la tinción de la superficie celular, se omitieron las etapas de fijación y permeabilización. Las células se incubaron con anti-CD4 humano de ratón conjugado con FITC, anti-CD8 humano de ratón conjugado con PE, y anti-CD25 humano de ratón conjugado con
- conjugado con FITC, anti-CD8 humano de ratón conjugado con PE, y anti-CD25 humano de ratón conjugado con aloficocianina (APC) (eBioscience, San Diego, CA) durante 45 min a 4°C y seguido de análisis de flujo. El anticuerpo IgG₁k de ratón de isotipo coincidente (BD Pharmingen) sirvió como control negativo. Después de la tinción, las células se analizaron utilizando un Cyan ADP (DakoCytomation).

La producción de NO se determinó utilizando el reactivo de Griess [Ziche, M., L. Morbidelli, E. Masini, S. Amerini, H. J. Granger, C. A. Maggi, P. Geppetti, y F. Ledda. 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. J Clin Invest. 94:2036-2044] (sulfanilamida al 1%, dihidrocloruro de naftilendiamina al 0,1%, H3PO4 al 2,5%, Sigma) en sobrenadantes de CB-SC estimuladas con

- PHA y/o no estimuladas. Las CB-SC se sembraron a 1 × 10⁵ células/ml (0,5 ml/pocillo) en portas con cámara Lab-Tek II de 8 pocillos. Después de la adhesión durante una noche, la PHA se administró al cultivo celular a diferentes dosis: 0, 2,5, 5, 10, 20 µg/ml en 0,5 ml de medio de cultivo/pocillo. Los sobrenadantes se recogieron después de un tratamiento durante 3-5 días para el examen de la producción de NO [Ziche, M., L. Morbidelli, E. Masini, S. Amerini, H. J. Granger, C. A. Maggi, P. Geppetti, y F. Ledda. 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. J Clin Invest. 94:2036-2044]. La absorbancia se midió a 540 nm. Una disolución diluida de nitrito de sodio (NaNO2, Sigma) sirvió como curva patrón para calcular la cantidad de NO. Las células tratadas con PHA y no tratadas se utilizaron para la inmunotinción de iNOS como se describe a
- 30 continuación.

20

Para el examen de iNOS, la inmunotinción se realizó como se ha descrito previamente con modificaciones mínimas [Zhao, Y., H. Wang, y T. Mazzone. 2006. Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. Exp Cell Res. 2006, 312: 2454-2464. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.04.008. 26 de Abril 26; (publicación electrónica antes de la impresión)]. En pocas palabras, las células tratadas con PHA y no restorem a parafermal de ide al 4% durante 20 min y despuér se paraferma con Trata X 400 de

- tratadas se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min y después se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% (Sigma) durante 5-6 min a temperatura ambiente. Después de bloquear la actividad de la peroxidasa endógena y la unión no específica, las células se incubaron con anticuerpo policional de conejo anti-óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Biomol International, Plymouth Meeting, PA). A continuación, las células se tiñeron con el kit ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La IgG de conejo normal (Santa Cruz) sirvió como control negativo. Las células se observaron y se fotografiaron utilizando una cámara Zeiss Axiocam Color con un microscopio de
- 40 células se observaron y se fotografiaron utilizando una cámara Zeiss Axiocam Color con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop HistologyDigital.

Regulación de CB-SC en linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y razón CD4/CD8

Para evaluar la regulación inmunitaria de las CB-SC en subgrupos de células T, las CB-SC se cultivaron simultáneamente inicialmente con linfocitos sin clasificar en presencia de diferentes estimuladores incluyendo IL-2 y
PHA. En comparación con los linfocitos solos, los resultados mostraron que la estimulación con PHA podría aumentar significativamente el porcentaje de células T CD8⁺ y disminuir el porcentaje de células T CD4⁺ en más de 2 veces, respectivamente (*p*< 0,05), sin cambios en las células T CD4⁻CD8⁻ (Tabla 1); la estimulación con IL-2 pudo aumentar el porcentaje de células T CD4⁻CD8⁻, pero no logró afectar a la razón CD4/CD8. Después del cultivo simultáneo con CB-SC, el porcentaje de células T CD4⁻CD8⁻ mejoró significativamente con la estimulación tanto con IL-2 como con PHA (*p*< 0,05 y *P*< 0,01, respectivamente); el porcentaje de células T CD8⁺ en la estimulación con PHA se reduio al nivel de control mediante cultivo simultáneo con CB-SC.

- PHA se redujo al nivel de control mediante cultivo simultáneo con CB-SC, la disminución del porcentaje de células T $CD4^+$ se invirtió significativamente, y por lo tanto razón CD4/CD8 fue regulada al alza significativamente (*p*<0,05) (Tabla 1).
- Los resultados anteriores sugieren que las CB-SC pueden mostrar regulación negativa sobre las células T activadas con IL-2 o PHA. Hasta la fecha, cada vez más evidencias demuestran la función de la molécula de CD69 como un importante regulador negativo en linfocitos activados [Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. Trends Immunol, 2005, 26:136-140]. Con el fin de evaluar adicionalmente los efectos de las CB-SC sobre el subgrupo de células T a nivel de células individuales, los autores de la presente invención analizaron la expresión de CD69 sobre las células T CD4⁺ y las células T CD8⁺ clasificadas
- 60 después de cultivo simultáneo con CB-SC. En comparación con el control de linfocitos, la expresión de CD69 fue regulada al alza considerablemente en células T CD4⁺ y CD8⁺ estimuladas con PHA, solo una ligera regulación al

alza en la estimulación con IL-2 (FIG. 4 A y B). Después del cultivo simultáneo con CB-SC, sin embargo el análisis de flujo demostró que la expresión de CD69 aumentó significativamente adicionalmente en células T tanto CD4⁺ (FIG. 4A) como CD8⁺ (FIG. 4B) en linfocitos activados tanto con IL-2 como con PHA (p<0,05). Esto indica que las CB-SC muestran regulación inmunitaria en subgrupos de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺.

Tabla 1. Regulación de subgrupos de linfocitos de sangre periférica humana por CB-SC.

Tratamientos	Células T CD4°CD8°Células T CD4+Células T CD8+ Razón				
	(%)	(%)	(%)	CD4/CD8	
Linfocitos	8,11 ± 3,54	65,65 ± 5,26	$22,85 \pm 4,54$	2,87 ± 0,64	
Linfocitos + IL-2	19,09 ± 3,9 7	60,13 ± 7,02	20,30 ± 2,85	$2,96\pm0,71$	
Linfocitos + IL-2 + CB-S	C 41,01±5,3 - *	43,02 ± 11,04	15,03 ± 5,80	2,92 ± 0,28	
Linfocitos + PHA	6,34 ± 1,42	18,35±5,03	75,12 ± 2,8	0,24 ± 0,08	
Linfocitos + PHA + CB-S	C 30,96 ± 9,67 +**	38,76 ± 7,94	* 27,18 ± 2,30	** 1,42 ± 0,48 [_] *	
Linfocitos + CB-SC	$34,\!13\pm15,\!25$	$45,\!22\pm3,\!64$	$20,19\pm10,9$	$2,23\pm0,94$	

5

Nota: Después de cultivar simultáneamente cinco días a una razón 1:10 de CB-SC:linfocitos en presencia o ausencia de estimuladores (500 U/ml de IL-2 o 10 µg/ml de PHA), los linfocitos suspendidos se recogieron para el análisis de flujo utilizando CyAn ADP (DakoCytomation). Los linfocitos cultivados solamente en medio de cultivo regular sirvieron como control negativo (fila superior). Los linfocitos cultivados simultáneamente con CB-SC en ausencia de PHA sirvieron como control negativo adicional (fila inferior). Las células se tiñeron doblemente con anticuerpos anti-CD4 humano de ratón conjugado con FITC y anti-CD8 humano de ratón conjugado con PE. La IgG_{1κ} de isotipo coincidiente sirvió como control negativo. Los datos representan la media (± DT) de tres experimentos. El asterisco (*) representa el valor de *P* < 0,05, ** *P* < 0,01.

Regulación de CB-SC sobre los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺

- 15 La evidencia creciente muestra que las células T reguladoras (Tregs) juegan un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune y la homeostasis [Randolph, D.A. y C. G. Fathman. 2006. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. Annu Rev Med. 57: 381-402; Choileain, N.N. y H. P. Redmond. 2006. Regulatory T-cells and autoimmunity. J Surg Res. 130:124-135; Paust, S. y H. Cantor. 2005. Regulatory T cells and autoimmune disease. Immunol Rev. 204:195-207]. Para evaluar los efectos de las CB-SC sobre las Tregs CD4⁺CD25⁺, los autores de la
- presente invención realizaron un análisis de clasificación de células utilizando las Tregs CD4⁺CD25⁺ clasificadas de sangre periférica humana. Los resultados mostraron que la IL-2 (500 U/ml) pudo estimular significativamente la proliferación de las Tregs CD4⁺CD25⁺, pero se inhibió después de cultivo simultáneo con CB-SC. Para evaluar la acción del contacto célula-célula, las CB-SC se cultivaron simultáneamente con Tregs CD4⁺CD25⁺ estimuladas con IL-2 presentadas en un sistema Transwell. Los resultados mostraron que la proliferación de Tregs CD4⁺CD25⁺ estimuladas con estimuladas con IL-2 se invirtió después de que las Tregs CD4⁺CD25⁺ se separaran de las CB-SC (FIG. 5). Esto
- estimuladas con IL-2 se invirtió después de que las Tregs CD4⁺CD25⁺ se separaran de las CB-SC (FIG. 5). Esto sugiere que el contacto célula-célula juega un papel más importante que los factores solubles en la inhibición de la proliferación de las Tregs CD4⁺CD25⁺ estimuladas con IL-2.

Regulación de CB-SC en la producción de interleuquina-10 (IL-10)

- La IL-10 juega un papel crítico en la mediación de la regulación inmunitaria en las respuestas inmunes de Th1 y Th2.
 Los monocitos y los linfocitos B son la principal fuente para la IL-10 humana [Moore, K.W., A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, y T. R. Mosmann. 1993. Interleukin-10. Annu Rev Immunol 11:165-190]. Sin embargo, la IL-10 es producida también por otros tipos de células incluyendo células T reguladoras [Hawrylowicz, C. M. y A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol. 5:271-83; Hawrylowicz, C.M. 2005. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. J Exp Med. 202: 1459-
- 35 1463; Battaglia, M., C. Gianfrani, S. Gregori, y M. G. Roncarolo. 2004. IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. Ann N Y Acad Sci. 1029: 142-153], linfocitos T CD8⁺, mastocitos, eosinófilos, y queratinocitos [Moore, K.W., A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, y T. R. Mosmann. 1993. Interleukin-10. Annu Rev Immunol 11:165-190; Hawrylowicz, C.M. y A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol. 5:271-83; Hawrylowicz, C.M. 2005. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. J
- 40 Exp Med. 202: 1459-1463; Battaglia, M., C. Gianfrani, S. Gregori, y M. G. Roncarolo. 2004. IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. Ann N Y Acad Sci. 1029: 142-153; Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, y S. Romagnani. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. J Immunol 150: 353-360]. Para evaluar la producción de IL-10, los autores de la presente invención realizaron un

análisis intracitoplásmico de IL-10 a nivel de células individuales mediante análisis de flujo. Los resultados mostraron que 12% de los linfocitos no tratados fueron positivos para IL10; la estimulación con PHA pudo mejorar significativamente la producción de IL-10 (FIG. 6). Sin embargo, el porcentaje de células positivas para IL-10 en linfocitos estimulados con PHA se redujo de 80% a 42% después de cultivo simultáneo con CB-SC (FIG. 6).

5 Efectos inhibidores de las CB-SC sobre la proliferación de linfocitos estimulados con PHA y papel del óxido nítrico

Utilizando microscopía de contraste de fase, los autores de la presente invención observaron que los linfocitos formaban numerosos agregados de células de diferente tamaño después de la estimulación con PHA en ausencia de CB-SC (FIG. 7A, panel central). Sin embargo, el número de agregados celulares se redujo significativamente en presencia de CB-SC; la mayor parte de los linfocitos fueron dispersados individualmente en el medio de cultivo y se

- 10 observaron sólo unos pocos agregados celulares de tamaño muy pequeño (FIG. 7A, panel derecho). Los autores de la presente invención cuantificaron adicionalmente el número de células en diferentes grupos. La cuantificación del número de células mostró una disminución significativa en la proliferación de linfocitos estimulada por PHA mediante CB-SC viables (FIG. 7B, p<0,01). Estos resultados sugirieron que las CB-SC podrían inhibir significativamente la proliferación de linfocitos alogénicos estimulada por PHA. Para evaluar el contacto de célula a célula en esta
- inhibición, los autores de la presente invención cultivaron simultáneamente linfocitos con CB-SC fijadas con 15 glutaraldehído al 2,5%. Los resultados mostraron que la proliferación de linfocitos todavía resultaba inhibida de manera significativa pero permanecía significativamente más alta en los cultivados simultáneamente con las CB-SC fijadas que la observada con CB-SC viables (FIG. 7B, p<0,02). Estos resultados sugieren que tanto los factores solubles como el contacto de célula a célula participaron en la inhibición de la proliferación de linfocitos estimulada 20 por PHA mediante CB-SC.
 - A continuación, los autores de la presente invención evaluaron los efectos de las CB-SC sobre el factor fisiológico de proliferación de linfocitos estimulados por IL-2. El uso de IL-2 (500 U/ml) como potente estimulador puede estimular significativamente la proliferación de linfocitos. Sin embargo, su proliferación se inhibió significativamente después de cultivo simultáneo con CB-SC en diferentes proporciones (FIG. 7C, P<0.05). Se sugiere que las CB-SC podrían inhibir la proliferación de linfocitos estimulados con PHA e IL-2.
- 25

Para encontrar qué factor soluble participa en el procedimiento anterior, los autores de la presente invención evaluaron si las CB-SC expresaban la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y producían NO en presencia de PHA. Los resultados de inmunotinción demostraron inicialmente que las CB-SC aumentaban la expresión de la iNOS después del tratamiento con PHA (FIG. 8A, panel derecho). Las CB-SC no tratadas con PHA mostraron el nivel de

- 30 fondo de la iNOS (Figura 8A, panel izquierdo). Utilizando la reacción de Griess [Y. Zhao, T. Mazzone, Human umbilical cord blood-derived f-macrophages retain pluripotentiality after thrombopoietin expansion, Exp Cell Res. 310 (2005) 311-318; Y. Hori, X. Gu, X. Xie, S. K. Kim, Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells, PLoS Med. 2 (2005) 347-356], los autores de la presente invención analizaron la producción de NO. Los resultados mostraron que las CB-SC tratadas con PHA producían NO de una forma dependiente de la dosis
- (FIG. 8B). Para confirmar que el NO mediaba los efectos inhibidores, los autores de la presente invención 35 administraron un potente inhibidor de la iNOS L-NNA [Y. Zhao, T. Mazzone, Human umbilical cord blood-derived fmacrophages retain pluripotentiality after thrombopoietin expansion, Exp Cell Res. 310 (2005) 311-318 en el cultivo simultáneo de CB-SC con linfocitos estimulados con PHA. Los resultados demostraron que el número de células aumentó a un nivel aproximadamente 4 veces mayor en presencia de L-NNA que en ausencia de L-NNA (FIG. 9, 40 p<0,05). Los datos sugieren que el NO participaba en la inhibición de las CB-SC en la proliferación de linfocitos

estimuladas con PHA y podría ser parcialmente bloqueada por la administración de inhibidor de iNOS (L-NNA).

Ejemplo 8: Diferenciación de CB-SC a células de tipo endotelial

Los autores de la presente invención utilizaron CB-SC cultivadas durante 1-2 meses para los experimentos que examinan la diferenciación celular. Para la diferenciación a células de tipo endotelial, las CB-SC se trataron con 50 45 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, R&D System, Minneapolis, MN) en medio RPMI 1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 7% y se incubaron a 37°C. CO₂ al 8%. Después de 10-14 días, las CB-SC tratadas con VEGF y no tratadas se examinaron para determinar los marcadores endoteliales asociados.

Los resultados de la inmunotinción mostraron que ≈97% de las CB-SC tratadas con VEGF expresaban marcadores de células endoteliales incluyendo Flt-1 (receptor 1 de VEGF), Flk-1 (receptor 2 de VEGF), Factor de von Willebrand (vWF), y 76% de las células eran positivas para la glicoproteína transmembrana CD146 (FIG. 10A, parte inferior del

- 50 panel izquierdo). Las CB-SC no tratadas no expresaban estos antígenos (FIG. 10A, parte superior del panel izquierdo). Los antígenos hematopoyéticos incluyendo CD45 y CD117 fueron regulados a la baja en las células tratadas con VEGF (FIG. 10A, panel derecho). El análisis funcional in vitro mostró que las CB-SC tanto tratadas con VEGF como no tratadas poseían gran capacidad para incorporar lipoproteína de baja densidad acetilada (Ac-LDL)
- (FIG. 10A). Adicionalmente, la morfología celular de las CB-SC tratadas con VEGF cambió a células de tipo 55 endotelial amplias con formación espontánea de estructuras similares a cadenas (FIG. 10B). Los autores de la presente invención caracterizaron adicionalmente estas estructuras con el marcador de células endoteliales específico CD146 y endocitosis de Ac-LDL y demostraron que eran positivas dobles (Fig. 10C).

Ejemplo 9: Diferenciación de CB-SC a células de tipo neuronal

El Ejemplo 8 demostró que las CB-SC producían células de tipo endotelial, que surgen de mesodermo embrionario [L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708; M. Baron, Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals, Differentiation 68 (2001) 175-185]. Los autores de la presente invención evaluaron a continuación

- 5 el potencial de las CB-SC para diferenciarse a células neuronales derivadas del ectodermo [L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708; L. Bally-Cuif, M. Hammerschmidt, Hammerschmidt. Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control, Curr Opin Neurobiol. 13 (2003) 16-25].
- Para la diferenciación de las células de tipo neuronal, las CB-SC a 70% de confluencia se trataron con factor de crecimiento nervioso 100 ng/ml (NGF, R&D System) en medio RPMI 1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 7% en portaobjetos con cámara Lab-Tek de 8 pocillos (Nunc, Naperville, IL) y se incubaron a 37°C, 8% de CO₂. Al cabo de 10-14 días, las CB-SC tratadas con NGF y no tratadas se examinaron con marcadores neuronales.

Después del tratamiento de las CB-SC con NGF, las CB-SC mostraron morfologías alargadas y/o ramificadas y formaron redes de tipo neuronal a través de procesos celulares alargados (FIG. 11C). La inmunotinción demostró que eran positivas para el marcador neuronal proteína asociada a los microtúbulos MAP-1B (FIG. 11C); las células

- 15 que eran positivas para el marcador neuronal proteína asociada a los microtúbulos MAP-1B (FIG. 11C); las células no tratadas fueron negativas o mostraron tinción de fondo (FIG. 11A). Para evaluar adicionalmente los fenotipos neuronales, los autores de la presente invención examinaron las células tratadas con NGF para determinar los marcadores asociados a la función neuronal [C. Andressen, S. Arnhold, M. Puschmann, W. Bloch, J. Hescheler, R. Fassler, K. Addicks, Betal integrin deficiency impairs migration and differentiation of mouse embryonic stem cell
- 20 derived neurons, Neurosci Lett. 251 (1998) 165-168]. Como se muestra en la FIG. 11C, 85% de las células fueron positivas para la sinaptofisina; 78% de las células expresó el transmisor neuronal ácido γ-aminobutírico (GABA) junto con su enzima sintetizadora crítica ácido glutámico descarboxilasa (GAD). Las células CB-SC no tratadas fueron negativas para estos marcadores (Figura 11A). Menos de 5% de las células tratadas con NGF expresaron tirosina hidroxilasa (TH) asociada a neuronas dopaminérgicas (datos no mostrados). Los antígenos hematopoyéticos
- 25 incluyendo CD9, CD45, y CD117 fueron regulados a la baja tras el tratamiento con NGF (datos no mostrados). Los resultados sugieren que las CB-SC tratadas con NGF pueden dar lugar a neuronas de tipo GABAérgico.

Ejemplo 10: Diferenciación in vivo de CB-SC a células productoras de insulina funcionales

- Los ejemplos anteriores demostraron que las CB-SC se pueden diferenciar a células de tipo endotelial derivadas del mesodermo, junto con células de tipo neuronal derivadas de ectodermo *in vitro*. Para proporcionar evidencia adicional del potencial de diferenciación de las CB-SC, los autores de la presente invención investigaron si las CB-SC pueden diferenciarse a células productoras de insulina derivadas del endodermo [M. A. Hussain, N. D. Theise, Stem-cell therapy for diabetes mellitus, Lancet 364 (2004) 203-205; L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708] *in vivo*.
- Debido a que los autores de la presente invención trasplantaron células madre humanas, se deben utilizar ratones inmunodeficientes para evitar el rechazo inmunológico. Hasta la fecha, no hay un modelo diabético de tipo 1 ideal (causado por destrucción autoinmunitaria) disponible para el trasplante de xenoinjertos. Los autores de la presente invención realizaron por lo tanto el trasplante *in vivo* de CB-SC en ratones carentes de sistema inmune Balb/c con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) y evaluaron su capacidad para corregir la hiperglucemia.
- La diabetes en ratones macho carentes de sistema inmune Balb/c se indujo con una sola inyección intraperitoneal de 220 mg/kg de peso corporal de estreptozotocina (STZ) (Sigma), recién disuelta en tampón de citrato (pH = 4,5). Los niveles de glucemia se evaluaron diariamente entre las 9 y 11 a.m. en condiciones de no ayuno. La diabetes se confirmó por la presencia de la pérdida de peso, poliuria, y los niveles de glucosa en sangre sin ayunar >350 mg/dl durante 2 días consecutivos. Los ratones diabéticos se utilizaron para el trasplante de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité de Cuidado de Animales (CCA) de la Universidad de Illinois en Chicago. En resumen, se
- 45 inyectaron CB-SC a dosis de 5 millones de células/ratón en 0,5 ml de solución salina fisiológica en la cavidad peritoneal por medio de una inyección con aguja de calibre 27, normalmente el día 3 después de la inyección de estreptozotocina. Los ratones de control fueron inyectados solo con un volumen igual de solución salina fisiológica. Los niveles de glucosa en sangre se controlaron utilizando un detector de glucosa Accuchek (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).
- 50 Siete días después del trasplante, los autores de la presente invención realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). Los ratones (ratones diabéticos a los que se habían trasplantado CB-SC, ratones diabéticos no trasplantados y ratones no diabéticos) se mantuvieron en ayunas durante la noche (12 h). Los ratones se pesaron y se les inyectó por vía intraperitoneal un bolo de glucosa (2 mg/g de peso corporal). A continuación, la sangre se extrajo de una vena de la cola a los 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, y 120 minutos de la administración de la glucosa.
- 55 Los niveles de glucosa se midieron de sangre completa de la vena de la cola como se describió anteriormente. Para medir el péptido C humano, las muestras de sangre se obtuvieron de la vena de la cola durante un periodo de tiempo de 20 minutos antes y después de las IPGTT. El nivel de péptido C de la sangre humana se detectó mediante el uso de un kit de análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para péptido C humano ultrasensible (Alpco Diagnostics, Windham, NH) siguiendo los protocolos del fabricante. Este análisis no detecta
- 60 péptido C de ratón.

Los ratones a lo que se habían trasplantado las CB-SC mostraron niveles de glucosa en sangre significativamente más bajos (Figura 12A). Adicionalmente, las pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) demostraron respuestas fisiológicas de las células CB-SC trasplantadas. La glucosa en sangre de los ratones no diabéticos normales alcanzó su punto máximo entre 5-10 min y regresó a niveles normales 30 min después de la

- 5 sensibilización con glucosa. La glucosa en sangre de los ratones diabéticos a los que se habían trasplantado las CB-SC alcanzó un máximo a los 20 minutos, seguido de un retorno al intervalo normal después de 60 minutos (FIG. 12B). Sin embargo, la glucosa en sangre de los ratones diabéticos a los que no se habían trasplantado CB-SC seguía siendo muy alta (>500 mg/dL) (FIG. 12B).
- Para corroborar que esta reversión de la hiperglucemia estaba asociada con la diferenciación de las CB-SC a células productoras de insulina, los autores de la presente invención realizaron los siguientes experimentos. Debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos entre la insulina humana y de ratón, los autores de la presente invención utilizaron un análisis que es específico para el péptido C humano (un subproducto de la producción de insulina) para evaluar la secreción de insulina humana [Y. Hori, X. Gu, X. Xie, S. K. Kim, Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells, PLoS Med. 2 (2005) 347-356; A. Hayek, G. M. Beattie, Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets, J Clin Endocrinol Metab. 82 (1997) 2471-2475; M.
- 15 transplantation of human fetal and adult pancreatic islets, J Clin Endocrinol Metab. 82 (1997) 2471-2475; M. Zalzman, S. Gupta, R. K. Giri, I. Berkovich, B. S. Sappal, O. Karnieli, M. A. Zern, N. Fleischer, S. Efrat, Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells, Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (2003) 7253-8] a partir de células CB-SC diferenciadas. Los resultados mostraron que el péptido C humano era indetectable en suero de ratón de ratones diabéticos a los que no se habían
- 20 trasplantado CB-SC y ratones no diabéticos normales, tanto antes de la IPGTT como después de la IPGTT. En contraste, el nivel de péptido C humano se incrementó significativamente después de la IPGTT, a un nivel que fue aproximadamente 2 veces mayor que antes de la IPGTT en los sueros de los ratones diabétidos a los que se habían trasplantado las CB-SC (p < 0,05) (FIG. 12C). Estos experimentos demostraron que las CB-SC se diferenciaban a células productoras de insulina funcionales en ratones diabéticos.</p>
- 25 Ejemplo 11: Evidencia in vitro de la diferenciación de CB-SC a células productoras de insulina

Las células madre derivadas de sangre de cordón (CB-SC) muestran nestina.

Hasta la fecha, la nestina como una proteína de filamentos intermedios se ha considerado el marcador de células progenitoras neuroendocrinas y las células positivas a la nestina pueden dar lugar a células productoras de insulina. La inmunotinción mostró que las CB-SC expresaban fuertemente nestina (FIG. 13).

30 Las CB-SC muestran el potencial de dar lugar a células productoras de insulina.

Para evaluar el potencial de diferenciación de las CB-SC a células productoras de insulina, los autores de la presente invención también examinaron los factores de transcripción asociados al desarrollo de células β de los islotes pacreáticos, incluyendo PDX-1, NeuroD y Nkx6.1. La transferencia Western demostró que las CB-SC expresaban fuertemente NeuroD, PDX-1 (un factor de transcripción bien conocido esencial para el desarrollo de las células beta), y Nkx6.1 (que asigna progenitores pancreáticos a células β) (FIG. 14). Las CB-SC también expresaron

35 células beta), y Nkx6.1 (que asigna progenitores pancreáticos a células β) (FIG. 14). Las CB-SC también expresaron prohormona convertasa PC1 y PC2 (FIG. 14), que por lo general son presentadas en las células β de los islotes y otros tejidos celulares asociados con la síntesis de péptidos.

Expresión del receptor del péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) en CB-SC

La exendina-4, un agonista de acción prolongada de GLP-1, puede estimular tanto la diferenciación como la proliferación de células beta. Las inmunotinciones han demostrado aproximadamente 76% del receptor del péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) expresado por CB-SC (FIG. 15). Para optimizar la diferenciación de CB-SC a células productoras de insulina y mejorar su potencial terapéutico, por lo tanto, los autores de la presente invención administraron exendina-4, combinada con alto nivel de glucosa y/o lipopolisacárido (LPS).

Diferenciación in vitro de CB-SC a células productoras de insulina.

45 En presencia de 10 ng/ml de exendina-4 + 50 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) + glucosa 25 mM, las CB-SC pudieron mejorar la producción de insulina de 95,7 ± 29 a 288,5 ± 22 pg/mg de proteína celular, y la producción de péptido C de 4,3 ± 1,04 a 11,11 ± 2,7 fmol/mg de proteína celular.

Ejemplo 12: Diferenciación de CB-SC a oligodendrocitos

- En presencia de factor de crecimiento nervioso (NGF, 200 ng/ml), los autores de la presente invención también encontraron que algunas células adquirían la morfología de tipo oligodendrocito, con procesos celulares ramificados más cortos. Los resultados de la inmunotinción demostraron que 25-29% de las células expresaban marcadores de oligodendrocitos específicos de la proteína básica de mielina (MBP) (67-74), sulfatido 04, y galactocerebrósido (Galc, un glicolípido importante en la mielina) (FIG. 16, panel derecho). Sin embargo, no se observó expresión en las células no tratadas con NGF (FIG. 16, panel izquierdo).
- 55 Ejemplo 13: Diferenciación de CB-SC a células de tipo megacariocito

Los autores de la presente invención trataron CB-SC con trombopoyetina (TPO, 10 ng/ml). Las células se analizaron para determinar los marcadores de la superficie de megacariocitos y su estado de ploidía. Los resultados mostraron que aproximadamente 70% de las células tratadas con TPO expresó el marcador específico de megacariocitos CD41b (FIG. 17). La tinción DAPI mostró que estas células positivas aparecían con poliploidía nuclear. Sin embargo, las células no tratadas no lograron expresar estos antígenos con el tamaño nuclear normal.

Ejemplo 15: Expresión del receptor de quimioquinas CXCR4 en CB-SC.

Recientemente, cada vez más pruebas demuestran que la quimioquina factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) y su receptor, CXCR4, juegan un papel esencial en la mediación de la migración de células madre hematopoyéticas. Para evaluar el mecanismo de la migración de las CB-SC, los autores de la presente invención realizaron un análisis de inmunotinción en los islotes pancreáticos diabéticos inducida por STZ. Los resultados mostraron que los islotes pancreáticos diabéticos mostraban SDF-1, pero carecían de expresión en los islotes pancreáticos de ratones NOD-SCID normales (FIG. 18A). Notablemente, las CB-SC expresaron el receptor de SDF-1 CXCR4 (FIG. 18B). Los datos sugieren que SDF-1/CXCR4 puede contribuir al guiado de las CB-SC a los islotes pancreáticos.

15 La práctica de la presente invención empleará e incorporará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ingeniería genética, e inmunología, que están dentro del conocimiento práctico de la técnica.

Referencias

5

20

30

40

45

- 1. 1. A. Vats, R. C. Bielby, N. S. Tolley, R. Nerem, J.M. Polak, Stem cells, Lancet 366 (2005) 592-602.
- 2. 2. M. A. Hussain, N. D. Theise, Stem-cell therapy for diabetes mellitus, Lancet 364 (2004) 203-205.
 - 3. C. M. Rice, N.J. Scolding, Adult stem cells--reprogramming neurological repair? Lancet 364 (2004) 193-199.
 - 4. 4. L. M. Hoffman, M.K. Carpenter, Characterization and culture of human embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 23 (2005) 699-708.
- 5. S. K. H. Wilan, C.T. Scott, S. Herrera, Chasing a cellular fountain of youth, Nat Biotechnol. 23 (2005) 807-815.
 - 6. C. Dennis, Check E, 'Ethical' routes to stem cells highlight political divide, Nature 437 (2005) 1076-1077.
 - 7. M. Evans, Ethical sourcing of human embryonic stem cells--rational solutions? Nat Rev Mol Cell Biol. 6 (2005) 663-667.
 - 8. D. A. Melton, G. Q. Daley, C. G. Jennings, Altered nuclear transfer in stem-cell research a flawed proposal, N Engl J Med. 351 (2004) 2791-2792.
 - 9. 9. J. Bonde, D. A. Hess, J. A. Nolta, Recent advances in hematopoietic stem cell biology, Curr Opin Hematol. 11 (2004) 392-398.
 - 10. 10. K. K. Ballen, New trends in umbilical cord blood transplantation, Blood 105 (2005) 3786-3792.
- 11. 11. P. R. Sanberg, A. E. Willing, S. Garbuzova-Davis, S. Saporta, G. Liu, C. D. Sanberg, P. C. Bickford, S. K. Klasko, N. El-Badri, Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair, Ann N Y Acad Sci. 1049 (2005) 67-83.
 - 12. 12. D. A. Peterson, Umbilical cord blood cells and brain stroke injury: bringing in fresh blood to address an old problem, J Clin Invest. 114 (2004) 312-314.
 - 13. 13. V. Silani, L. Cova, M. Corbo, A. Ciammola, E. Polli, Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis, Lancet 364 (2004) 200-202.
 - 14. 14. K. Bieback, S. Kern, H. Kluter, H. Eichler, Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, Stem Cells 22 (2004) 625-634.
 - 15. I. E. J. Gang, S.H. Hong, J. A. Jeong, S. H. Hwang, S. W. Kim, I. H. Yang, C. Ahn, H. Han, H. Kim, In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, Biochem Biophys Res Commun. 321 (2004) 102-108.

- 16. G. Kogler, S. Sensken, J. A. Airey, T. Trapp, M. Muschen, N. Feldhahn, S. Liedtke, R. V. Sorg, J. Fischer, C. Rosenbaum, S. Greschat, A. Knipper, J. Bender, O. Degistirici, J. Gao, A. I. Caplan, E. J. Colletti, G. Almeida-Porada, H. W. Muller, E. Zanjani, P. Wernet, A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential, J Exp Med. 200 (2004) 123-135.
- 17. 17. Y. Zhao, T. Mazzone, Human umbilical cord blood-derived f-macrophages retain pluripotentiality after thrombopoietin expansion, Exp Cell Res. 310 (2005) 311-318.
 - 18. C. P. McGuckin, N. Forraz, M. O. Baradez, S. Navran, J. Zhao, R. Urban, R. Tilton, L. Denner, Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood, Cell Prolif. 38 (2005) 245-55.
 - 19. 19. H. J. Rippon, A. E. Bishop, Embryonic stem cells, Cell Prolif. 37 (2004) 23-34.
 - 20. 20. I. Klimanskaya, Y. Chung, L. Meisner, J. Johnson, M. D. West, R. Lanza, Human embryonic stem cells derived without feeder cells, Lancet 365 (2005) 1636-1641.
 - 21. 21. S. H. Orkin, Chipping away at the Embryonic Stem Cell Network, Cell 122 (2005) 828-830.
 - 22. 22. Y. Zhao, D. Glesne, E. Huberman, A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells, Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 2426-2431.
 - 23. Drukker, G. Katz, A. Urbach, M. Schuldiner, G. Markel, J. Itskovitz-Eldor, B. Reubinoff, O. Mandelboim, N. Benvenisty, Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci U S A. 99(2002) 9864-9869.
 - 24. 24. M. Baron, Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehogmediated signals, Differentiation 68 (2001) 175-185.
 - 25. 25. L. Bally-Cuif, M. Hammerschmidt, Hammerschmidt. Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control, Curr Opin Neurobiol. 13 (2003) 16-25.
 - 26. C. Andressen, S. Arnhold, M. Puschmann, W. Bloch, J. Hescheler, R. Fassler, K. Addicks, Betal integrin deficiency impairs migration and differentiation of mouse embryonic stem cell derived neurons, Neurosci Lett. 251 (1998) 165-168.
 - 27. 27. Y. Hori, X. Gu, X. Xie, S. K. Kim, Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells, PLoS Med. 2 (2005) 347-356.
 - 28. A. Hayek, G. M. Beattie, Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets, J Clin Endocrinol Metab. 82 (1997) 2471-2475.
- 29. M. Zalzman, S. Gupta, R. K. Giri, I. Berkovich, B. S. Sappal, O. Karnieli, M. A. Zern, N. Fleischer, S. Efrat, Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells, Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (2003) 7253-8.
 - 30. M. Richards, C. Y. Fong, W. K. Chan, P. C. Wong, A. Bongso, Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells, Nat Biotechnol. 20 (2002) 933-936.
 - 31. 31. M. Aoki, M. Yasutake, T. Murohara, Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device, Stem Cells 22 (2004) 994-1002.
 - 32. 32. D. A. Ingram, L.E. Mead, H. Tanaka, V. Meade, A. Fenoglio, K. Mortell, K. Pollok, M.J. Ferkowicz, D. Gilley, M.C. Yoder, Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood, Blood 104 (2004) 2752-2760.
 - 33. 33. N. Baal, K. Reisinger, H. Jahr, R. M. Bohle, O. Liang, K. Munstedt, C. V. Rao, K. T. Preissner, M. T. Zygmunt, Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood, Thromb Haemost. 92 (2004) 767-775.

19

5

10

20

15

30

35

25

- 34. M. Yu, Z. Xiao, L. Shen, L. Li, Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not, Br J Haematol. 124 (2004) 666-675.
- 35. 35. F. M. Cicuttini, K. Welch, A. W. Boyd, Characterization of CD34+HLA-DR-CD38+ and CD34+HLA-DR-CD38- progenitor cells from human umbilical cord blood, Growth Factors 10 (1994) 127-134.
- 36. G. K. Brolen, N. Heins, J. Edsbagge, H. Semb, Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells, Diabetes 54 (2005) 2867-2874.
- 37. 37. Y. Hori, I. C. Rulifson, B. C. Tsai, J. J. Heit, J. D. Cahoy, S. K. Kim, Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci U S A. 99 (2002) 16105-16110.
- 38. 38. H. Segev, B. Fishman, A. Ziskind, M. Shulman, J. Itskovitz-Eldor, Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters, Stem Cells 22 (2004) 265-274.
- 39. S. Miyazaki, E. Yamato, J. Miyazaki, Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells, Diabetes 53(2004) 1030-1037.
- 40. 40. M. Zalzman, L. Anker-Kitai, S. Efrat, Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype, Diabetes 54(2005) 2568-2575.
- 41. 41. M. Zalzman, S. Gupta, R. K. Giri, I. Berkovich, B. S. Sappal, O. Karnieli, M. A. Zern, N. Fleischer, S. Efrat, Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(2003)7253-7258.
- 42. S. Yoshida, F. Ishikawa, N. Kawano, K. Shimoda, S. Nagafuchi, S. Shimoda, M. Yasukawa, T. Kanemaru, H. Ishibashi, L. D. Shultz, M. Harada, Human cord bloodderived cells generate insulin-producing cells in vivo, Stem Cells 23(2005) 1409-1416.
- 43. Zhao, Y., H. Wang, y T. Mazzone. 2006. Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. Exp Cell Res. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.04.008. April 26; (Epub ahead of print).
- 44. 44. Ziche, M., L. Morbidelli, E. Masini, S. Amerini, H. J. Granger, C. A. Maggi, P. Geppetti, y F. Ledda. 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. J Clin Invest. 94:2036-2044.
- 45. 45. 18. Walter, U. y P. Santamaria. 2005. CD8+ T cells in autoimmunity. Curr Opin Immunol. 17:624-631.
 - 46. Randolph, D.A. y C. G. Fathman. 2006. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. Annu Rev Med. 57: 381-402.
 - 47. 47. Choileain, N.N. y H. P. Redmond. 2006. Regulatory T-cells and autoimmunity. J Surg Res. 130:124-135.
 - 48. 48. Paust, S. y H. Cantor. 2005. Regulatory T cells and autoimmune disease. Immunol Rev. 204:195-207.
 - 49. 49. Moore, K.W., A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, y T. R. Mosmann. 1993. Interleukin-10. Annu Rev Immunol 11:165-190.
 - 50. 50. Hawrylowicz, C.M. y A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol. 5:271-83.
 - 51. 51. Hawrylowicz, C.M. 2005. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. J Exp Med. 202: 1459-1463.
 - 52. 52. Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, y S. Romagnani. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigenspecific proliferation and cytokine production. J Immunol 150: 353- 360.

5

10

15

20

25

30

53. 53. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. Trends Immunol. 2005, 26:136-140.

REIVINDICACIONES

1. Células madre de tipo embrionario aisladas de sangre de cordón umbilical humano caracterizadas por: (a) mostrar características de células madre embrionarias que comprenden la capacidad de proliferación y la capacidad de diferenciarse a diversos tipos de células, (b) mostrar características de las células hematopoyéticas 5 que comprenden la expresión de CD45; (c) fenotípicamente distintas de linfocitos, macrófagos y monocitos por ser negativas para los marcadores CD3, CD20, CD11b/Mac-1 y CD14; (d) fenotípicamente distintas de las células madre hematopoyéticas por ser negativas para el marcador CD34, (e) mostrar baja inmunogenicidad mediante la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) asociadas con baja inmunogenicidad, y (f) mostrar una regulación inmunitaria por inhibición de la proliferación de linfocitos estimulada por mitógenos, para su uso en la terapia basada en células madre.

10

2. Las células madre para su uso en la terapia basada en células madre de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre son positivas para Oct-4 y Nanog.

3. Las células madre para su uso en la terapia basada en células madre de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde las células madre son positivas para CD9.

15 4. Las células madre para su uso en la terapia basada en células madre de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde las células madre producen óxido nítrico (NO).

5. Las células madre para su uso en la terapia basada en células madre de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde las células madre no estimulan la proliferación de linfocitos en una reacción linfocítica mixta alogénica.

20 6. Las células madre para su uso en la terapia basada en células madre de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la regulación inmunitaria está caracterizada por efectos inhibidores de las células madre sobre la proliferación de linfocitos T y la regulación de los subgrupos de células T.

7. Las células madre para su uso en la terapia basada en células madre de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, capaces de diferenciarse a al menos un tipo de célula seleccionado del grupo de células de tipo endotelial, células de tipo neuronal, células productoras de insulina, oligodendrocitos y megacariocitos. 25

8. Las células madre para su uso en la terapia basada en células madre de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la diabetes, la lesión de la médula espinal, las enfermedades cardiovasculares por esclerosis múltiple (EM), el accidente cerebrovascular, los defectos de nacimiento o la hiperglucemia.

30 9. Una composición para su uso en la terapia basada en células madre, que comprende las células madre de tipo embrionario aisladas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

10. Un método para aislar las células madre de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende (a) proporcionar una muestra de sangre del cordón umbilical humano, (b) eliminar los glóbulos rojos de la muestra para obtener células mononucleares; (c) cultivar las células mononucleares en un medio de cultivo en un recipiente 35 de cultivo no tratado para el cultivo de tejidos; y (d) obtener una población de células que está adherida al recipiente de cultivo.

11. Un método para regular subgrupos de linfocitos en un cultivo de células T mixto, comprendiendo el método el cultivo simultáneo una población diversa de linfocitos con las células madre de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

40 12. El método de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente al menos uno de (a) aumentar el porcentaje de células CD4 CD8, (b) aumentar el porcentaje de células CD8⁺, (c) disminuir el porcentaje de células CD4⁺ o (d) disminuir razón CD4/CD8.

FIG. 1



D Marcadores células hematopoyéticas:





FIG. 2















FIG. 7





Dosis PHA (µg/ml)

FIG. 8



FIG. 9

.



FIG. 10

FIG. 11

















```
FIG. 15
```





CB-PSC no tratadas

CB-PSC tratadas



FIG. 17

CD41b/DAPI



FIG. 18

A Expresión de quimioquina SDF-1 en islotes:



B Expresión del receptor de SDF-1 CXCR4 sobre CB-SC:



Intensidad de fluorescencia