

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 070**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 10184593 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2322599**

54 Título: **Células posparto derivadas de tejido del cordón umbilical y métodos de preparación y uso de las mismas para la reparación y regeneración de tejido blando**

30 Prioridad:

**27.06.2003 US 483264 P**

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

**30.07.2015**

73 Titular/es:

**DEPUY SYNTHES PRODUCTS, LLC (100.0%)  
325 Paramount Drive  
Raynham, MA 02767, US**

72 Inventor/es:

**KIHM, ANTHONY, J.;  
SEYDA, AGNIESZKA;  
HARMON, ALEXANDER, M.;  
HARRIS, IAN ROSS;  
MESSINA, DARIN, J.;  
MISTRY, SANJAY;  
YI, CHIN-FENG y  
GOSIEWSKA, ANNA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 542 070 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).

**Células posparto derivadas de tejido del cordón umbilical y métodos de preparación y uso de las mismas para la reparación y regeneración de tejido blando**

**DESCRIPCIÓN**

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

10 La presente invención se refiere al campo de la biología de células de mamífero y cultivo celular. En particular, la invención se refiere a células cultivadas derivadas de tejido posparto que tienen el potencial de sostener células de y/o diferenciarse en células de un linaje de tejido blando, y métodos de preparación y uso de aquellas células derivadas de tejido posparto. La invención también se refiere a métodos para el uso de tales células derivadas del posparto en la regeneración y reparación de tejido blando, y en terapias basadas en células para afecciones de tejido blando.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

20 Las lesiones al tejido blando, por ejemplo, tejido vascular, de la piel o musculoesquelético, son bastante comunes. Un ejemplo de una lesión al tejido blando bastante común es el daño al suelo pélvico. Éstas es una afección médica posiblemente grave que puede producirse durante el parto o de complicaciones del mismo que pueden conducir a daño a la fascia vesicovaginal. Una lesión tal puede producir un cistocele, que es una hernia de la vejiga. Afecciones médicas similares incluyen rectoceles (una hernia del recto), enteroceles (una protrusión del intestino a través de la bolsa rectovaginal o vesicovaginal) y enterocistoceles (una hernia doble en la que tanto la vejiga como el intestino sobresalen).

25 La manifestación básica de una hernia es una protrusión de un órgano en un defecto dentro de la fascia. Los enfoques quirúrgicos hacia la reparación de la hernia se han centrado en reducir la presencia del contenido herniario en la cavidad peritoneal y generar un cierre firme del defecto fascial tanto usando materiales protésicos, alógenos como autólogos. Se han usado varias técnicas para producir este cierre, que incluye el movimiento de tejidos autólogos y el uso de productos de malla sintéticos. Los inconvenientes a estos productos y procedimientos actuales incluyen reaparición de la hernia tras el debilitamiento del cierre.

30 En otro ejemplo más, los ligamentos y tendones son estructuras viscoelásticas que median en el movimiento y estabilidad normal de las articulaciones y se someten a desgarrar y fragilidad con la edad o lesión. Estas estructuras son estructuras colagenosas complejas relativamente estáticas con enlaces funcionales al hueso, músculo, menisco y otros tendones y ligamentos próximos.

35 Las afecciones del tejido blando incluyen adicionalmente, por ejemplo, afecciones de la piel (por ejemplo, revisión de cicatrices o el tratamiento de heridas traumáticas, quemaduras graves, úlceras de la piel (por ejemplo, úlceras de decúbito (presión), úlceras venosas y úlceras diabéticas) y heridas quirúrgicas tales como aquellas asociadas a la extirpación de cánceres de piel); afección vascular (por ejemplo, enfermedad vascular tal como enfermedad arterial periférica, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad de la carótida y enfermedad venosa; lesión vascular; desarrollo vascular inapropiado); afecciones que afectan las cuerdas vocales; afecciones cosméticas (por ejemplo, aquellas que implican reparación, aumento, o embellecimiento); enfermedades musculares (por ejemplo, miopatías congénitas; miastenia grave; enfermedades musculares inflamatorias, neurogénicas y miogénicas; y distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofias musculares congénitas, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss); afecciones de tejidos conjuntivos tales como tendones y ligamentos, que incluyen, pero no se limitan a, un ligamento periodontal y ligamento cruzado anterior; y afecciones de órganos y/o fascia (por ejemplo, la vejiga, intestino, suelo pélvico).

40 Los enfoques quirúrgicos para corregir los defectos de tejido blando en el cuerpo generalmente implican la implantación de estructuras hechas de materiales inertes biocompatibles que intentan reemplazar o sustituir la función defectuosa. La implantación de materiales no biodegradables produce estructuras permanentes que permanecen en el cuerpo como un objeto extraño. Se sugieren implantes que están hechos de materiales resorbibles para su uso como sustituciones temporales en las que el objetivo es permitir que el proceso de curación reemplace del material resorbido. Sin embargo, estos enfoques se han cumplido con éxito limitado para la corrección a largo plazo de estructuras en el cuerpo.

45 Así, novedosas pautas terapéuticas para afecciones relacionadas con el tejido blando son de gran significancia clínica.

50 **RESUMEN DE LA INVENCION**

65 La invención proporciona una población homogénea aislada de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano, para su uso en inducir angiogénesis, en la que dicha población de células es obtenible por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano libre de sangre con una metaloproteasa de matriz, proteasa neutra

y enzima mucolítica, y en la que dicha población de células es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, y en la que la población de células:

- 5 a) produce cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, HLA-A, B, C y PDGFr-alfa, como se detecta por citometría de flujo; y  
 b) no produce ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

10 La invención también proporciona una población homogénea aislada de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano, para su uso en producir una red vascular *in vivo*, en la que dicha población de células es obtenible por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano libre de sangre con una metaloproteasa de matriz, proteasa neutra y enzima mucolítica, y en la que dicha población de células es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, y en la que la población de células:

- 15 a) produce cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, HLA-A, B, C y PDGFr-alfa, como se detecta por citometría de flujo; y  
 b) no produce ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

20 La divulgación se refiere generalmente a células derivadas del posparto que se derivan de tejido posparto que está sustancialmente libre de sangre y que es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y que tiene el potencial de diferenciarse en o proporcionar soporte trófico a una célula de un linaje mesodérmico o ectodérmico, por ejemplo, un fenotipo de célula de tejido blando.

25 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona células derivadas de tejido posparto humano sustancialmente libre de sangre, que es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, que tiene la capacidad de diferenciarse en o proporcionar soporte trófico a células de un fenotipo de tejido blando o de diferenciarse en células de un fenotipo de tejido blando; que requiere L-valina para el crecimiento; capaz de crecer en aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 % de oxígeno; y adicionalmente que tiene al menos una de las siguientes características:

- 30 producción de al menos uno de GCP-2, factor de tejido, vimentina y alfa-actina de músculo liso; falta de producción de al menos uno de falta de producción de al menos uno de NOGO-A, GRO-alfa o receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, como se detecta por citometría de flujo;
- 35 producción de al menos uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; falta de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD 178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo;
- 40 la expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es elevada para al menos uno de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa, o la expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es elevada para al menos uno del miembro A2 de la superfamilia de lectina tipo C, tumor 1 de Wilms, miembro A2 de la familia de la
- 45 aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, proteína cinasa C zeta, clon IMAGEN:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en cáncer de ovario 1 y el clon DKFZp547K1113;
- 50 la expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es reducida para al menos uno de: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima; homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular; cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular; proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldeto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 de tipo beta (con dominios de repetición de tipo EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético);
- 55 proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de membrana asociada a la vesícula; proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de

interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, 36 kDa;

5 secreción de al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES y TIMP1;

falta de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, I309, MDC y VEGF, como se detecta por ELISA; y

la capacidad de someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo.

10 La célula derivada del posparto de la invención es una célula derivada de tejido del cordón umbilical. En otras realizaciones de la divulgación, es una célula derivada de la placenta. En realizaciones específicas, la célula tiene todas las características de identificación de una cualquiera de: tipo de célula PLA 071003 (P8) (nº de acceso de ATCC PTA-6074); tipo de célula PLA 071003 (P11) (nº de acceso de ATCC PTA-6075); tipo de célula PLA 071003 (P16) (nº de acceso de ATCC PTA-6079); tipo de célula UMB 022803 (P7) (nº de acceso de ATCC PTA-6067); o tipo de célula UMB 022803 (P17) (nº de acceso de ATCC PTA-6068). Las células derivadas del posparto de la invención son células humanas. Las células pueden proporcionar soporte trófico a células de un fenotipo de tejido blando, por ejemplo, aquel de fascia, epitelio, endotelio, piel, vasculatura, músculos, tendones y ligamentos. Las propias células pueden ser inducidas para diferenciarse en un fenotipo de tejido blando.

20 Se proporcionan poblaciones de PPDC por la invención. En algunas realizaciones, una población de células derivadas del posparto se mezcla con otra población de células. Las poblaciones de células de la invención son sustancialmente homogéneas. La población de células homogéneas de la invención comprende células derivadas de tejido del cordón umbilical. La población de células homogéneas de la divulgación puede comprender células derivadas de la placenta. Las poblaciones de células homogéneas derivadas de la placenta pueden ser de linaje neonatal o maternal. La homogeneidad de una población de células puede lograrse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo), separación con perlas, o por expansión clónica.

30 Algunas realizaciones de la invención proporcionan una matriz para implantación en un paciente sembrada con una población de células derivadas del posparto de la invención. La población puede ser sustancialmente homogénea o heterogénea. Por ejemplo, la matriz también puede inocularse con células de otro tipo de células deseadas, por ejemplo, pero no a modo de limitación, células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, melanocitos, fibroblastos dérmicos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria iliaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando. La matriz puede contener o pre-tratarse con uno o más factores bioactivos que incluyen, por ejemplo, fármacos, agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos y factores de crecimiento. Las matrices sembradas o pre-tratadas pueden introducirse en el cuerpo de un paciente de algún modo conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, implantación, inyección, unión quirúrgica, trasplante con otro tejido, inyección y similares. Las matrices de la invención pueden configurarse a la forma y/o tamaño de un tejido u órgano *in vivo*. Los andamiajes de la invención pueden ser planos o tubulares o pueden comprender secciones de los mismos. Los andamiajes de la invención pueden ser de múltiples capas.

También se engloban dentro del alcance de la divulgación matriz extracelular (ECM) de PPDC, fracciones de células (por ejemplo, fracciones de células solubles) de PPDC y medio acondicionado con PPDC. Las matrices de la invención pueden comprender o pre-tratarse con uno cualquiera de los siguientes productos de PPDC.

50 En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones de PPDC de la invención y uno o más factores bioactivos, por ejemplo, pero no se limitan a, factores de crecimiento, agentes antiapoptóticos, agentes antiinflamatorios y/o factores inductores de la diferenciación. Las composiciones pueden comprender además uno o varios de otros tipos de células, por ejemplo, células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, melanocitos, fibroblastos dérmicos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria iliaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando.

60 Composiciones farmacéuticas de las células derivadas del posparto están incluidas dentro del alcance de la invención, y composiciones farmacéuticas de la matriz extracelular así producida, lisados celulares y medio acondicionado con PPDC están incluidos dentro del alcance de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas incluyen preferentemente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones de la divulgación se proporcionan métodos de regeneración de tejido blando en un paciente en necesidad del mismo trasplantando células o matrices de la invención en un paciente.

Adicionalmente se proporcionan por la divulgación métodos para tratar una afección de tejido blando en un paciente administrando una o más células derivadas del posparto, poblaciones de PPDC, ECM, matriz, lisados celulares, medio acondicionado, o composiciones. El tratamiento de una afección de tejido blando según la divulgación incluye, pero no se limita a, reparación de tejido, reconstrucción de tejido, abultamiento de tejido, tratamiento cosmético, tratamiento terapéutico, aumento de tejido y sellado de tejido. Pueden usarse PPDC, tanto diferenciadas o indiferenciadas como una combinación de las mismas, la matriz extracelular así producida, lisados celulares de las mismas, matrices, medio acondicionado y composiciones en el tratamiento de, por ejemplo, pero no a modo de limitación, una hernia, daño al suelo pélvico, una quemadura, cáncer, lesión traumática, cicatrices, úlceras de la piel (por ejemplo, úlceras de decúbito (presión), úlceras venosas y úlceras diabéticas), heridas quirúrgicas tales como aquellas asociadas a la extirpación de cánceres de piel; enfermedad vascular tal como enfermedad arterial periférica, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad de la carótida y enfermedad venosa; enfermedad muscular (por ejemplo, miopatías congénitas; miastenia grave; enfermedades musculares inflamatorias, neurogénicas y miogénicas; y distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofias musculares congénitas, distrofia muscular orofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss); y sustitución y reparación de tejidos conjuntivos tales como tendones y ligamentos (por ejemplo, ligamento cruzado anterior, manguito de los rotadores, ligamento periodontal).

La divulgación proporciona además métodos para proporcionar soporte trófico a una célula de tejido blando exponiendo una célula de tejido blando a una célula derivada del posparto de la invención o un producto de PPDC (por ejemplo, medio acondicionado, lisado celular, matriz extracelular). Ejemplos de células de tejido blando para las que las PPDC pueden proporcionar soporte trófico según la invención incluyen un citoblasto, un miocito, un mioblasto, un queratinocito, un melanocito, un fibroblasto dérmico, una célula de la médula ósea, un adipocito, una célula epitelial, una célula del estroma y una célula endotelial (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria iliaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)). La exposición de la célula de tejido blando a la PPDC puede estimular la angiogénesis. La invención incluye adicionalmente las PPDC de la invención para su uso en métodos de inducir angiogénesis exponiendo una célula de tejido blando a una PPDC o producto de PPDC. Ejemplos de células de tejido blando que forman redes endoteliales según los métodos usados en la invención incluyen células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria iliaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)). El método de proporcionar soporte trófico o estimular la angiogénesis puede efectuarse *in vitro* o *in vivo*.

La invención también incluye las células de la invención para su uso en el tratamiento de un paciente en necesidad de factores angiogénicos administrando a un paciente una población de PPDC de la invención o un medio acondicionado, lisado celular o matriz extracelular de la divulgación.

También se proporcionan por la invención células de la invención para su uso en producir una red vascular *in vivo*. En algunas realizaciones, los métodos de producción de una red vascular implican exponer una población de células de tejido blando a una población de células PPDC. La población de células de tejido blando contiene preferentemente al menos una célula de tejido blando de una célula endotelial aórtica, célula endotelial de la arteria coronaria, célula endotelial de la arteria pulmonar, célula endotelial de la arteria iliaca, célula endotelial microvascular, célula endotelial de la arteria umbilical y célula endotelial de la vena umbilical. La divulgación contempla que el método de producción de una red vascular pueda realizarse alternativamente *in vitro*. La divulgación también engloba las redes vasculares producidas por los métodos de la invención. También se desvelan métodos para tratar una afección tal como una afección de tejido blando en un paciente administrando las redes vasculares. En algunas realizaciones, la afección de tejido blando es una afección vascular, tal como una enfermedad vascular o lesión o desarrollo vascular inapropiado. En algunos aspectos de la divulgación, la red vascular se administra por trasplante al paciente.

Adicionalmente se proporcionan por la invención kits de PPDC o kits de PPDC y productos de PPDC. Los kits de la invención incluyen preferentemente al menos un componente de una matriz, un agente hidratante, un sustrato en cultivo celular, un factor bioactivo, un segundo tipo de célula, un agente inductor de la diferenciación, medios de cultivo celular e instrucciones, por ejemplo, para el cultivo de las células o administración de las células y/o productos de célula.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la descripción detallada y ejemplos que siguen.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Definiciones

5 Diversos términos usados en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones se definen como se expone a continuación.

10 Los *citoblastos* son células indiferenciadas definidas por su capacidad al nivel de célula única para tanto auto-renovarse como diferenciarse para producir células de progenie, que incluyen progenitores de auto-renovación, progenitores de no auto-renovación y células terminalmente diferenciadas. Los citoblastos también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), además de para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales tras el trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos, de los tejidos tras la inyección en blastocistos.

15 Los citoblastos se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) *totipotentes* - capaces de dar lugar a todas los tipos de células embrionarias y extraembrionarias; (2) *pluripotentes* - capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) *multipotentes* - capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, los citoblastos hematopoyéticos (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes limitados a células de la sangre, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) *oligopotentes* - capaces de dar lugar a un subconjunto más limitado de linajes celulares que los citoblastos multipotentes; y (5) *unipotentes* - capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, citoblastos espermatozóicos).

20 Los citoblastos también se clasifican basándose en la fuente de la que pueden obtenerse. Un *citoblasto adulto* es generalmente una célula indiferenciada multipotente encontrada en tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. El citoblasto adulto puede renovarse a sí mismo y, bajo circunstancias normales, diferenciarse para dar los tipos de células especializadas del tejido del que se originó, y posiblemente otros tipos de tejido. Un *citoblasto embrionario* es una célula pluripotente de la masa de células interna de un embrión en la etapa de blastocisto. Un *citoblasto fetal* es uno que se origina a partir de tejidos o membranas fetales. Un *citoblasto posparto* es una célula multipotente o pluripotente que se origina sustancialmente a partir de tejido extraembrionario disponible después del parto, concretamente, la placenta y el cordón umbilical. Se ha encontrado que estas células poseen rasgos característicos de citoblastos pluripotentes, que incluyen la rápida proliferación y las posibilidades de diferenciación en muchos linajes celulares. Los citoblastos posparto pueden derivarse de la sangre (por ejemplo, ya que son aquellos obtenidos de sangre del cordón umbilical) o no derivarse de la sangre (por ejemplo, como se obtienen de los tejidos no de sangre del cordón umbilical y la placenta).

35 El *tejido embrionario* normalmente se define como tejido que se origina a partir del embrión (que en seres humanos se refiere al periodo desde la fecundación hasta aproximadamente seis semanas de desarrollo). *Tejido fetal* se refiere a tejido que se origina a partir del feto, que en seres humanos se refiere al periodo desde aproximadamente seis semanas de desarrollo hasta el parto. El *tejido extraembrionario* es tejido asociado a, pero que no se origina a partir del, embrión o feto. Los tejidos extraembrionarios incluyen membranas extraembrionarias (corión, amnios, saco vitelino y alantoides), cordón umbilical y placenta (que ella misma se forma a partir del corión y la decidua basal materna).

45 La *diferenciación* es el proceso por el que una célula sin especializar (“no comprometida”) o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula *diferenciada* o *inducida por diferenciación* es una que ha aceptado una posición más especializada (“comprometida”) dentro del linaje de una célula. El término *comprometida*, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en el que, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula específico o subconjunto de tipos de células, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciado. La *des-diferenciación* se refiere al proceso por el que una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en el presente documento, el *linaje* de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procedió y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula pone a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un *marcador específico de linaje* se refiere a una característica específicamente asociada al fenotipo de células de un linaje de interés y puede usarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida en el linaje de interés.

60 En un amplio sentido, una célula *progenitora* es una célula que tiene la capacidad para crear progenie que está más diferenciada que ella misma y todavía retiene la capacidad para reforzar el conjunto de progenitores. Por esa definición, los propios citoblastos también son células progenitoras, ya que son los precursores más inmediatos a las células terminalmente diferenciadas. Cuando se refiere a las células de la presente invención, como se describe en mayor detalle más adelante, puede usarse esta amplia definición de *célula progenitora*. En un sentido más estrecho, una célula progenitora se define frecuentemente como una célula que es el producto intermedio en la vía de

diferenciación, es decir, se produce a partir de un citoblasto y es el producto intermedio en la producción de un tipo de células maduras o subconjunto de tipos de células. Este tipo de célula progenitora generalmente no es capaz de auto-renovarse. Por consiguiente, si este tipo de célula se cita en el presente documento, se denominará una *célula progenitora no de auto-renovación* o un *progenitor intermedio* o *célula precursora*.

Como se usa en el presente documento, la expresión *se diferencia en un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico* se refiere a una célula que se compromete a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico específico, respectivamente. Ejemplos de células que se diferencian en un linaje mesodérmico o dan lugar a células mesodérmicas específicas incluyen, pero no se limitan a, células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, endoteliales, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas, o del estroma. Ejemplos de células que se diferencian en linaje ectodérmico incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células neurogénicas y células neurogliaogénicas. Ejemplos de células que se diferencian en linaje endodérmico incluyen, pero no se limitan a, células pleurigénicas y hepatogénicas, células que dan lugar al revestimiento del intestino, y células que dan lugar a células pancreogénicas y viscerogénicas.

Los subconjuntos de *células derivadas del posparto* o *células posparto (PPDC)* se denominan *células derivadas de la placenta (PDC)* de la divulgación o *células derivadas de tejido del cordón umbilical (UDC)* de la invención. Las PPDC de la invención son células derivadas de tejido del cordón umbilical. Además, las células pueden describirse como que son células madre o progenitoras, siendo el último término usado en el sentido amplio. El término *derivadas* se usa para indicar que las células han sido obtenidas de su fuente biológica y cultivadas o manipuladas de otro modo *in vitro* (por ejemplo, cultivadas en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de células derivadas del posparto y las características únicas de las células derivadas del posparto de la presente invención se describen en detalle más adelante.

Se usan diversos términos para describir células en cultivo. Cultivo celular se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo condición controlada ("en cultivo"). Un cultivo celular primario es un cultivo de células, tejidos u órganos tomado directamente de organismos y antes del primer subcultivo. Las células se expanden en cultivo cuando se ponen en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular, produciendo una mayor población de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular se mide algunas veces por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número. Esto se denomina tiempo de duplicación.

Una *línea celular* es una población de células formadas por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se denomina un *pase*. Cuando las células se subcultivan, se denomina que se han *sometido a pases*. Una población específica de células, o una línea celular, se denomina algunas veces o caracteriza por el número de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a diez pases puede denominarse un cultivo *P10*. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo tras el aislamiento de las células del tejido, se designa *P0*. Tras el primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (*P1* o *pase 1*). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (*P2* o *pase 2*), etc. Se entenderá por aquellos expertos en la materia que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el periodo de pases; por tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo entre pases depende de muchos factores, que incluyen, pero no se limitan a, la densidad de siembra, sustrato, medio y tiempo entre pases.

Un *medio acondicionado* es un medio en el que se ha cultivado una célula específica o población de células, y luego se retira. Mientras que las células se cultivan en el medio, secretan factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado.

Generalmente, un *factor trófico* se define como una sustancia que promueve la supervivencia, crecimiento, proliferación, maduración, diferenciación y/o mantenimiento de una célula, o estimula la elevada actividad de una célula. *El soporte trófico* se usa en el presente documento para referirse a la capacidad para promover la supervivencia, crecimiento, proliferación, maduración, diferenciación y/o mantenimiento de una célula, o para estimular la elevada actividad de una célula.

Cuando se refiere a células de vertebrado cultivadas, el término *senescencia* (también *senescencia replicativa* o *senescencia celular*) se refiere a una propiedad atribuible a cultivos celulares finitos; concretamente, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de la población (algunas veces denominado *límite de Hayflick*). Aunque la senescencia celular se describió por primera vez usando células de tipo fibroblasto, la mayoría de los tipos de células humanas normales que pueden cultivarse satisfactoriamente en cultivo experimentan senescencia celular. La vida *in vitro* de diferentes tipos de células varía, pero la máxima vida normalmente es inferior a 100 duplicaciones de la población (esto es el número de duplicaciones para que todas las células en el cultivo se vuelvan senescentes y así hagan que el cultivo sea incapaz de dividirse). La senescencia no depende del tiempo

5 cronológico, sino que se mide por el número de divisiones de las células, o duplicaciones de la población, que el cultivo ha experimentado. Así, las células hechas quiescentes eliminando factores de crecimiento esenciales pueden reanudar el crecimiento y división cuando los factores de crecimiento se re-introducen, y a partir de aquí llevar a cabo el mismo número de duplicaciones como células equivalentes cultivadas continuamente. Similarmente, cuando  
10 las células se congelan en nitrógeno líquido después de diversos números de duplicaciones de la población y luego se descongelan y se cultivan, experimentan sustancialmente el mismo número de duplicaciones que las células mantenidas sin congelar en cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; son en realidad resistentes a la muerte celular programada (apoptosis), y se han mantenido en su estado no divisor durante nada menos que tres años. Estas células están mucho más vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. Todavía no se ha encontrado que el estado no divisor de las células senescentes sea reversible por cualquier agente biológico, químico o viral.

15 Como se usa en el presente documento, el término *medio de crecimiento* se refiere a un medio de cultivo suficiente para la expansión de células derivadas del posparto. El medio de cultivo del medio de crecimiento contiene preferentemente medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM). Más preferentemente, el medio de crecimiento contiene glucosa. El medio de crecimiento contiene preferentemente DMEM-baja glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio de crecimiento contiene preferentemente aproximadamente 15 % (v/v) de suero (por ejemplo, suero bovino fetal, suero bovino definido). El medio de crecimiento contiene preferentemente al menos un agente antibiótico y/o agente antimicótico (por ejemplo, penicilina, estreptomycin, anfotericina B, gentamicina, nistatina; preferentemente 50 unidades/mililitro de penicilina G de sodio y 50 microgramos/mililitro de sulfato de estreptomycin). El medio de crecimiento contiene preferentemente 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). Lo más preferentemente, el medio de crecimiento contiene DMEM-baja glucosa, suero, 2-mercaptoetanol y un agente antibiótico.

25 Como se usa en el presente documento, condiciones de crecimiento estándar se refieren a condiciones atmosféricas estándar que comprenden aproximadamente 5 % de CO<sub>2</sub>, una temperatura de aproximadamente 35-39 °C, más preferentemente 37 °C, y una humedad relativa de aproximadamente el 100 %.

30 El término *aislado* se refiere a una célula, componente celular o una molécula que se ha sacado de su entorno nativo.

El término *aproximadamente* se refiere a una aproximación de un valor establecido dentro de un intervalo de ±10 %.

35 *Tejido blando*, como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a estructuras extraesqueléticas encontradas en todo el cuerpo e incluye, pero no se limita a, tejido de cartílago, tejido de menisco, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido de disco intervertebral, tejido periodontal, tejido de piel, tejido vascular, tejido de músculo, tejido de fascia, tejido del periostio, tejido ocular, tejido pericárdico, tejido de pulmón, tejido sinovial, tejido nervioso, tejido de riñón, médula ósea, tejido urogenital, tejido intestinal, tejido de hígado, tejido de páncreas, tejido del bazo, tejido adiposo, y combinaciones de los mismos.

40 *Afección de tejido blando (o lesión o enfermedad)* es un término incluyente que engloba afecciones, trastornos o enfermedades agudas y crónicas de tejido blando. Por ejemplo, el término engloba afecciones producidas por enfermedad o traumatismo o fallo del tejido para desarrollarse normalmente. Ejemplos de afecciones de tejido blando incluyen, pero no se limitan a, hernias, daño al suelo pélvico, desgarramiento o rotura de un tendón o ligamento, heridas de la piel (por ejemplo, cicatrices, heridas traumáticas, quemaduras graves, úlceras de la piel (por ejemplo, úlceras de decúbito (presión), úlceras venosas y úlceras diabéticas) y heridas quirúrgicas tales como aquellas asociadas a la extirpación de cánceres de piel); afección vascular (por ejemplo, enfermedad vascular tal como enfermedad arterial periférica, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad de la carótida y enfermedad venosa; lesión vascular, desarrollo vascular inapropiado); y enfermedades musculares (por ejemplo, miopatías congénitas; miastenia grave; enfermedades musculares inflamatorias, neurogénicas y miogénicas; y distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofias musculares congénitas, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss).

55 El término *tratar (o tratamiento de) una afección de tejido blando* se refiere a mejorar los efectos de, o retrasar, detener o invertir el progreso de, o retrasar o prevenir la aparición de, una afección de tejido blando como se define en el presente documento e incluye reparación de tejido blando, reconstrucción, abultamiento, tratamiento cosmético, tratamiento terapéutico, aumento de tejido y sellado de tejido.

60 El término *cantidad eficaz* se refiere a una concentración de un reactivo o composición farmacéutica, tal como un factor de crecimiento, agente de diferenciación, factor trófico, población de células u otro agente, que es eficaz para producir un resultado previsto, que incluye crecimiento y/o diferenciación celular *in vitro* o *in vivo*, o tratamiento de una afección de tejido blando como se describe en el presente documento. Con respecto a factores de crecimiento, una cantidad eficaz puede oscilar de aproximadamente 1 nanogramo/mililitro a aproximadamente 1 microgramo/mililitro. Con respecto a PPDC como se administran a un paciente *in vivo*, una cantidad eficaz puede oscilar de tan solo varios cientos o menos a nada menos que varios millones o más. En realizaciones específicas,

una cantidad eficaz puede oscilar de  $10^3$ - $10^{11}$ . Se apreciará que el número de células que va a administrarse variará dependiendo de los detalles del trastorno que va a tratarse, que incluyen, pero no se limitan a, tamaño o volumen total/área superficial que va a tratarse, además de la proximidad del sitio de administración a la localización de la región que va a tratarse, entre otros factores conocidos para el biólogo medicinal.

5 Los términos *periodo eficaz* (o *tiempo*) y *condiciones eficaces* se refieren a un periodo de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos *in vitro*), necesarias o preferidas para un agente o composición farmacéutica para lograr su resultado previsto.

10 El término *paciente* o *sujeto* se refiere a animales, que incluyen mamíferos, preferentemente seres humanos, que se tratan con las composiciones farmacéuticas o según los métodos descritos en el presente documento.

15 El término *vehículo farmacéuticamente aceptable* (o *medio*), que puede usarse indistintamente con el término *vehículo biológicamente compatible* o *medio*, se refiere a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otra complicación proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable. Como se describe en mayor detalle en el presente documento, vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la presente invención incluyen líquidos, materiales semi-sólidos (por ejemplo, geles) y sólidos (por ejemplo, andamiajes de células). Como se usa en el presente documento, el término *biodegradable* describe la capacidad de un material para romperse (por ejemplo, degradarse, erosionarse, disolverse) *in vivo*. El término incluye la degradación *in vivo* con o sin eliminación (por ejemplo, por resorción) del cuerpo. Los materiales semi-sólidos y sólidos pueden diseñarse para resistir a la degradación dentro del cuerpo (*no biodegradables*) o pueden diseñarse para degradarse dentro del cuerpo (*biodegradables*, *bioerosionables*). Un material biodegradable puede ser adicionalmente *bioresorbible* o *bioabsorbible*, es decir, puede disolverse y absorberse en fluidos corporales (los implantes solubles en agua son un ejemplo), o degradarse y por último lugar eliminarse del cuerpo, tanto por conversión en otros materiales como rotura y eliminación mediante las vías naturales.

25 Se usan varios términos en el presente documento con respecto a la terapia de sustitución de células. Los términos *transferencia autóloga*, *trasplante autólogo*, *autoinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de las células también es el receptor de la terapia de sustitución de células. Los términos *transferencia alógena*, *trasplante alógeno*, *aloinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de las células es de la misma especie que el receptor de la terapia de sustitución de células, pero no es el mismo individuo. Una transferencia de células en la que las células del donante se corresponden histocompatiblemente con un receptor se denomina algunas veces una *transferencia singénica*. Los términos *transferencia xenógena*, *trasplante xenógeno*, *xenoinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de las células es de una especie diferente a la del receptor de la terapia de sustitución de células.

30 El término *matriz*, como se usa en el presente documento, se refiere a un soporte para las PPDC de la invención, por ejemplo, un andamiaje (por ejemplo, VICRYL, PCL/PGA o RAD16) o medio de soporte (por ejemplo, hidrogel, proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA))).

Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento:

45 *ANG2* (o *Ang2*) para angiopoyetina 2;  
*APC* para células presentadoras de antígeno;  
*BDNF* para factor neurotrófico derivado del cerebro;  
*bFGF* para factor de crecimiento de fibroblastos básico;  
*bid* (*BID*) para "bis in die" (dos veces por día);  
50 *BSP* para sialoproteína ósea;  
*CK18* para citoqueratina 18;  
*ligando 3* de *CXC* para ligando 3 del receptor de quimiocinas;  
*DAPI* para 4',6-diamidino-2-fenilindol-2HCl;  
*DMEM* para medio esencial mínimo de Dulbecco;  
55 *DMEM:lg* (o *DMEM:Lg*, *DMEM:LG*) para DMEM con baja glucosa;  
*EDTA* para ácido etilendiaminetetraacético;  
*EGF* (o *E*) para factor de crecimiento epidérmico;  
*EPO* para eritropoyetina;  
*FACS* para citometría de flujo activada por fluorescencia;  
60 *FBS* para suero bovino fetal;  
*FGF* (o *F*) para factor de crecimiento de fibroblastos;  
*GCP-2* para proteína-2 quimiotáctica de granulocitos;  
*GDF-5* para el factor 5 de crecimiento y diferenciación;  
*GFAP* para proteína ácida fibrilar de la glía;  
65 *HB-EGF* para factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina;  
*HCAEC* para células endoteliales de la arteria coronaria humanas;

*HGF* para factor de crecimiento de hepatocitos;  
*hMSC* para citoblastos mesenquimatosos humanos;  
*HNF-1 alfa* para factor de transcripción específico de hepatocitos;  
*HUVEC* para células endoteliales de la vena umbilical humanas;  
 5 *I309* para una quimiocina y el ligando para el receptor CCR8 y es responsable de la quimioatracción de linfocitos T tipo TH2;  
*IGF* para factor de crecimiento similar a la insulina;  
*IL-6* para interleucina-6;  
*IL-8* para interleucina 8;  
 10 *K19* para queratina 19;  
*K8* para queratina 8;  
*KGF* para factor de crecimiento de queratinocitos;  
*MCP-1* para proteína 1 quimiotáctica de monocitos;  
*MDC* para quimiocina derivada de macrófagos;  
 15 *MIP1alfa* para proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos;  
*MIP1beta* para proteína 1 beta inflamatoria de macrófagos;  
*MMP* para metaloproteasa de matriz (MMP);  
*MSC* para citoblastos mesenquimatosos;  
*NHDF* para fibroblastos dérmicos humanos normales;  
 20 *NPE* para medios de expansión de progenitores neurales;  
*OxLDLR* para receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas;  
*PBMC* para célula mononuclear de sangre periférica;  
*PBS* para solución salina tamponada con fosfato;  
*PDC* para célula derivada de la placenta;  
 25 *PDGFbb* para factor de crecimiento derivado de plaquetas;  
*PDGFr-alfa* para receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas;  
*PD-L2* para ligando 2 de muerte programada;  
*PE* para ficoeritrina;  
*PO* para "per os" (por la boca);  
 30 *PPDC* para célula derivada del posparto;  
*Rantes* (o *RANTES*) para expresada y secretada por linfocitos T normales regulados tras la activación;  
*rb* para conejo;  
*rh* para humano recombinante;  
*SC* para subcutáneamente;  
 35 *SCID* para inmunodeficiencia combinada grave;  
*SDF-1alfa* para factor 1 alfa derivado del estroma;  
*SHH* para erizo sónico;  
*SMA* para actina de músculo liso;  
*SOP* para procedimiento de operación estándar;  
 40 *TARC* para quimiocina del timo y regulada por la activación;  
*TCP* para plástico de cultivo de tejido;  
*TGFbeta2* para factor de crecimiento transformante beta2;  
*TGFbeta-3* para factor de crecimiento transformante beta-3;  
*TIMP1* para tejido inhibidor de la metaloproteinasas de matriz 1;  
 45 *TPO* para trombopoyetina;  
*TuJ1* para tubulina BIII;  
*UDC* para célula derivada del cordón umbilical;  
*VEGF* para factor de crecimiento endotelial vascular;  
*vWF* para factor de von Willebrand; y  
 50 *alfaFP* para alfa-fetoproteína.

**Descripción**

En un aspecto, la invención proporciona células derivadas del posparto (PPDC) derivadas de tejido posparto libre de sangre para su uso como se cita en las reivindicaciones. Las PPDC de la divulgación pueden derivarse de placenta de un mamífero que incluye, pero no se limitan a, ser humano. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo. Las células derivadas del posparto tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. La invención proporciona células que se derivan de tejido del cordón umbilical, a diferencia de sangre del cordón umbilical. La divulgación proporciona, en uno de sus varios aspectos, células que se derivan de tejido placentario.

Las células se han caracterizado en cuanto a varias de sus propiedades celulares, genéticas, inmunológicas y bioquímicas. Por ejemplo, las células se han caracterizado por su crecimiento por sus marcadores de la superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad para producir ciertos factores tróficos bioquímicos y por sus propiedades inmunológicas.

**Derivación y expansión de células derivadas del posparto (PPDC)**

Según los métodos descritos en el presente documento, se recuperan una placenta y cordón umbilical de mamífero tras o poco después de la terminación de tanto un embarazo a término como prematuro, por ejemplo, después de la expulsión después del parto. Puede obtenerse tejido posparto de cualquier embarazo completado, a término o menos de a término, tanto si se expulsa vaginalmente, como mediante otros medios, por ejemplo, cesárea. El tejido posparto puede transportarse del sitio del parto hasta un laboratorio en un recipiente estéril tal como un matraz, vaso de precipitados, placa de cultivo o bolsa. El recipiente puede tener una disolución o medio, que incluye, pero no se limita a, una solución salina, tal como, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier disolución usada para el transporte de órganos usados para trasplante, tal como disolución de la Universidad de Wisconsin o disolución perfluoroquímica. Pueden añadirse uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos, tales como, pero no se limitan a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, al medio o tampón. El tejido posparto puede aclararse con una disolución anticoagulante tal como disolución que contiene heparina. Es preferible mantener el tejido a aproximadamente 4-10 °C antes de la extracción de PPDC. Es incluso más preferible que el tejido no se congele antes de la extracción de PPDC.

El aislamiento de PPDC se produce preferentemente en un entorno aséptico. La sangre y los residuos se eliminan preferentemente del tejido posparto antes del aislamiento de las PPDC. Por ejemplo, el tejido posparto puede lavarse con disolución de tampón, tal como, pero no se limita a, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado también puede comprender uno o más agentes antimicóticos y/o antibióticos, tales como, pero no se limitan a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos de células presentes en el tejido posparto se fraccionan en subpoblaciones de las que pueden aislarse PPDC. Esto puede llevarse a cabo usando técnicas para la separación de células que incluyen, pero no se limitan a, tratamiento enzimático para disociar tejido posparto en sus células componentes, seguido de clonación y selección de tipos de células específicas, por ejemplo, pero no se limitan a, selección basada en marcadores morfológicos y/o bioquímicos; crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad diferencial de células en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación en contracorriente); separación a gravedad unidad; distribución en contracorriente; electroforesis; y citometría de flujo, por ejemplo, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS).

En una realización preferida, el tejido posparto que comprende una placenta completa o un fragmento o sección de la misma se divide por fuerza mecánica (troceando o fuerzas de cizallamiento), digestión enzimática con enzimas proteolíticas individuales o combinatorias, tales como una metaloproteasa de matriz y/o proteasa neutra, por ejemplo, colagenasa, tripsina, dispasa, LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN), hialuronidasa y/o pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Por ejemplo, el componente celular del tejido posparto puede dividirse por métodos usando disociación mediada por colagenasa. Los métodos enzimáticos de digestión emplean preferentemente una combinación de enzimas, tales como una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra. La metaloproteasa de matriz es preferentemente una colagenasa. La proteasa neutra es preferentemente termolisina o dispasa, y lo más preferentemente es dispasa. Más preferentemente, la digestión enzimática de tejido posparto usa una combinación de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica para la digestión del ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa e hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) e hialuronidasa. La colagenasa puede ser tipo 1, 2, 3 ó 4. Otras enzimas conocidas en la técnica para el aislamiento de células incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina o elastasa, que pueden usarse tanto solas como en combinación con otras enzimas tales como metaloproteasas de matriz, enzimas mucolíticas y proteasas neutras. Se usan serina proteasas preferentemente consecutivamente siguiendo el uso de otras enzimas. La temperatura y periodo de tiempo que los tejidos o células están en contacto con las serina proteasas es particularmente importante. Las serina proteasas pueden inhibirse por alfa 2 microglobulina en suero y, por tanto, el medio usado para la digestión es normalmente sin suero. Comúnmente se usan EDTA y DNAsa en procedimientos de digestión con enzimas para aumentar la eficiencia de la recuperación de células. El grado de dilución de la digestión puede también afectar enormemente el rendimiento de las células ya que las células pueden atraparse dentro del digesto viscoso. Las series Blendzyme (Roche) de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) de combinaciones de enzimas son muy útiles y pueden usarse en los presentes métodos. Otras fuentes de enzimas son conocidas, y el experto también puede obtener tales enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto también está bien equipado para evaluar nuevas enzimas, o adicionales, o combinaciones de enzimas para su utilidad en aislar las células de la invención. Tratamientos con enzimas preferidos duran 0,5, 1, 1,5 ó 2 horas o más. En realizaciones más preferidas, el tejido se incuba a 37 °C durante el tratamiento con enzimas de la etapa de desintegración.

El tejido posparto que comprende el cordón umbilical y la placenta puede usarse sin separación. Alternativamente, el cordón umbilical puede separarse de la placenta mediante cualquier medio conocido en la técnica. En algunas realizaciones de la invención, el tejido posparto se separa en dos o más secciones, tales como cordón umbilical y

placenta. En algunas realizaciones de la invención, el tejido placentario se separa en dos o más secciones, consistiendo cada sección en predominantemente de tanto aspecto neonatal, neonatal y materno como materno. Entonces, las secciones separadas se disocian por disociación mecánica y/o enzimática según los métodos descritos en el presente documento. Pueden identificarse células de linaje neonatal o materno mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, por análisis del cariotipo o hibridación *in situ* para el cromosoma Y. También puede usarse análisis del cariotipo para identificar células de cariotipo normal.

Pueden usarse células aisladas o tejido posparto del que crecen las PPDC para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células se transfieren a recipientes de cultivo de tejido estériles tanto sin recubrir como recubiertos de matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno, gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA)). Las PPDC se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sostener el crecimiento de las células tales como, pero no se limitan a, DMEM (alta o baja glucosa), medio basal de Eagle, medio Ham F10 (F10), medio Ham F12 (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE. El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferentemente aproximadamente 2-15 % (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferentemente aproximadamente 0,001 % (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, que incluyen L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, tanto solos como en combinación. El medio de cultivo comprende preferentemente medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa, suero, BME, un agente antimicótico y un agente antibiótico).

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. En una realización preferida, las células se cultivan a aproximadamente el 0 a aproximadamente el 5 por ciento en volumen de CO<sub>2</sub> en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan a aproximadamente el 2 a aproximadamente el 25 por ciento de O<sub>2</sub> en aire, preferentemente aproximadamente el 5 a aproximadamente el 20 por ciento de O<sub>2</sub> en aire. Las células se cultivan preferentemente a aproximadamente 25 a aproximadamente 40 °C, más preferentemente aproximadamente 35 °C a aproximadamente 39 °C, y más preferentemente se cultivan a 37 °C. Las células se cultivan preferentemente en una estufa de incubación. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Las PPDC se cultivan preferentemente bajo estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína). "Estrés oxidativo bajo", como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de sin daño por radicales o daño por radicales mínimo a las células cultivadas.

Los métodos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación de medios y técnicas de cultivo celular son muy conocidos en la técnica y se describen en una variedad de fuentes, que incluyen Doyle y col., (eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho and Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston.

El medio de cultivo se cambia según sea necesario, por ejemplo, aspirando cuidadosamente el medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y reponiendo con medio fresco. La incubación continúa hasta que se acumulan un número suficiente o densidad de células en la placa. Pueden eliminarse las secciones explantadas originales de tejido y tripsinarse las células restantes usando técnicas convencionales o usando un raspador de células. Después de la tripsinación, las células se recogen, se mudan a medio fresco y se incuban como antes. En algunas realizaciones, el medio se cambia al menos una vez aproximadamente 24 horas después de la tripsinación para eliminar cualquier célula flotante. Se considera que las células que quedan en cultivo son PPDC.

Después de cultivar las células aisladas o fragmentos de tejido durante un periodo de tiempo suficiente, las PPDC habrán crecido, tanto como resultado de la migración del tejido posparto como división celular, o ambos. En algunas realizaciones de la invención, las PPDC se someten a pases, o se mudan a un recipiente de cultivo separado que contiene medio fresco del mismo tipo o un tipo diferente al usado inicialmente, en el que la población de células puede expandirse mitóticamente. Las PPDC se someten a pases preferentemente a aproximadamente el 100 % de confluencia, más preferentemente aproximadamente el 70 a aproximadamente el 85 % de confluencia. El límite inferior de confluencia para el pase es entendido por un experto en la materia. Las células derivadas de la placenta de la invención pueden utilizarse desde el primer subcultivo (pase 0) hasta la senescencia. El número preferible de pases es aquel que da un número de células suficiente para una aplicación dada. En ciertas realizaciones, las células se someten a pases 2 a 25 veces, preferentemente 4 a 20 veces, más preferentemente 8 a 15 veces, más preferentemente 10 ó 11 veces, y lo más preferentemente 11 veces. La clonación y/o subclonación pueden realizarse para confirmar que se ha aislado una población clónica de células.

Las células de la invención pueden criopreservarse y/o guardarse antes de uso.

**Caracterización de PPDC**

Las PPDC pueden caracterizarse, por ejemplo, por las características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo de duplicación, pases hasta la senescencia), análisis del cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis de FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítopes que incluyen, pero no se limitan a, vimentina, desmina, alfa-actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand, CD34, GROalfa, GCP-2, receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas y NOGO-A), pauta de expresión génica (por ejemplo, matrices GeneChip; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteínas (por ejemplo, por ensayo de coagulación del plasma o análisis de medio acondicionado con PPDC, por ejemplo, por enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA)), análisis de anticuerpos (por ejemplo, ELISA; tinción de anticuerpos para marcadores de la superficie celular que incluyen, pero no se limitan a, CD10, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD80, CD86, CD90, CD117, CD141, CD178, receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr-alfa), antígenos de clase I de HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C), antígenos de clase II de HLA (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR), B7-H2 y PD-L2), reacción de linfocitos mixtos (por ejemplo, como medida de la estimulación de PBMC alógenas), y/u otros métodos conocidos en la técnica.

Las PPDC pueden someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo. La duplicación de poblaciones puede calcularse como  $[\ln(\text{célula final}/\text{célula inicial})/\ln 2]$ . El tiempo de duplicación puede calcularse como (tiempo en cultivo (h)/ duplicación de la población).

Las PPDC indiferenciadas se producen preferentemente a partir de al menos uno de NOGO-A, GCP-2, factor de tejido, vimentina y alfa-actina de músculo liso; se prefieren más las células que producen cada uno de GCP-2, factor de tejido, vimentina y alfa-actina de músculo liso. En algunas realizaciones, dos, tres, cuatro o cinco de estos factores se producen por las PPDC.

En algunas realizaciones, las PPDC carecen de producción de al menos uno de NOGO-A, GRO-alfa, o receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, como se detecta por citometría de flujo. En algunas realizaciones, las PPDC carecen de producción de al menos dos o tres de estos factores.

Las PPDC de la divulgación pueden comprender al menos un marcador de la superficie celular de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C. Las PPDC producen preferentemente cada uno de estos marcadores de superficie. Las PPDC de la divulgación pueden caracterizarse por su falta de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ, como se detecta por citometría de flujo. Las PPDC carecen preferentemente de la producción de cada uno de estos marcadores de superficie. En algunas realizaciones, las PPDC presentan expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es elevada para al menos uno de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa; o al menos uno del miembro A2 de la superfamilia de lectina tipo C, tumor 1 de Wilms, miembro A2 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, proteína cinasa C zeta, clon IMAGEN:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en cáncer de ovario 1 y el clon DKFZp547K1113. PPDC preferidas expresan, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, elevados niveles de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa; o elevados niveles del miembro A2 de la superfamilia de lectina tipo C, tumor 1 de Wilms, miembro A2 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, proteína cinasa C zeta, clon IMAGEN:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en cáncer de ovario 1 y el clon DKFZp547K1113. En PPDC en las que la expresión, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es elevada para al menos uno de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa, preferentemente no están presentes elevados niveles relativos de al menos uno del miembro A2 de la superfamilia de lectina tipo C, tumor 1 de Wilms, miembro A2 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, proteína cinasa C zeta, clon IMAGEN:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en cáncer de ovario 1 y el clon DKFZp547K1113. En PPDC en las que la expresión, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es elevada para al menos uno del miembro A2 de la superfamilia de lectina tipo C, tumor 1 de Wilms, miembro A2 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, proteína cinasa C zeta, clon IMAGEN:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en cáncer de ovario 1 y el clon DKFZp547K1113, preferentemente no están presentes elevados niveles relativos de al menos uno de interleucina 8;

reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa.

5 Las PPDC pueden tener expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es reducida para al menos uno de: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima; homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular; cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular; proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 de tipo beta (con dominios de repetición de tipo EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de membrana asociada a la vesícula; proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, 36 kDa; el experto apreciará que la expresión de una amplia variedad de genes se caracteriza convenientemente sobre una matriz de genes, por ejemplo, sobre una GENECHIP de Affymetrix.

30 Las PPDC pueden secretar una variedad de factores bioquímicamente activos, tales como factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas y similares. Células preferidas de la divulgación secretan al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES y TIMP1. Las PPDC de la divulgación pueden caracterizarse por su falta de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, I309, MDC y VEGF, como se detecta por ELISA. Estas y otras características están disponibles para identificar y caracterizar las células, y distinguir las células de la invención de otras conocidas en la técnica.

40 En realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más de las características anteriores. Son más preferidas aquellas células que comprenden, tres, cuatro o cinco o más de las características. Todavía más preferidas son aquellas células derivadas del posparto que comprenden seis, siete u ocho o más de las características. Todavía más preferidas actualmente son aquellas células que comprenden las nueve características reivindicadas.

También se prefieren actualmente células que producen al menos dos de GCP-2, NOGO-A, factor de tejido, vimentina y alfa-actina de músculo liso. Son más preferidas aquellas células que producen tres, cuatro o cinco de estas proteínas.

45 El experto apreciará que los marcadores celulares están sujetos a variar algo bajo condiciones de crecimiento ampliamente diferentes, y que las generalmente descritas en el presente documento son caracterizaciones en medio de crecimiento, o variaciones de las mismas. Las células derivadas del posparto que se producen de al menos una, dos, tres o cuatro de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C son células preferidas de la divulgación. Son más preferidas aquellas células que producen cinco, seis o siete de estos marcadores de la superficie celular. Todavía son más preferidas las células derivadas del posparto que pueden producir ocho, nueve o diez de las anteriores proteínas de marcador de la superficie celular.

55 Las PPDC que carecen de producción de al menos una, dos, tres, o cuatro de las proteínas CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo, son células preferidas de la divulgación. Se prefieren las PPDC que carecen de producción de al menos cinco, seis, siete u ocho o más de estos marcadores. Son más preferidas las células que carecen de producción de al menos nueve o diez de los marcadores de la superficie celular. Son más altamente preferidas aquellas células que carecen de producción de once, doce o trece de las anteriores proteínas de identificación.

60 Las células de la invención producen cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, y no producen ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.

65 Se prefiere que las células derivadas del posparto presenten expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es elevada

para al menos uno de al menos uno, dos, o tres de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); y proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa; o al menos uno, dos, o tres del miembro A2 de la superfamilia de lectina tipo C, tumor 1 de Wilms, miembro A2 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, proteína cinasa C zeta, clon IMAGEN:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en cáncer de ovario 1 y el clon DKFZp547K1113. Son más preferidas aquellas células que presentan elevada expresión relativa de cuatro o cinco, y todavía son más preferidas las células capaces de elevada expresión relativa de seis, siete u ocho de los genes anteriores de los conjuntos de genes respectivos. Lo más preferentemente, las células presentan expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, es elevada para una combinación de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimiocinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocinas (motivo C-X-C); proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa o una combinación del miembro A2 de la superfamilia de lectina tipo C, tumor 1 de Wilms, miembro A2 de la familia de la aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, proteína cinasa C zeta, clon IMAGEN:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en cáncer de ovario 1 y el clon DKFZp547K1113.

Para algunas realizaciones, se prefieren células, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, tienen expresión reducida para al menos uno de los genes correspondientes a: homeocaja 2 de baja estatura; proteína 2 de 27 kDa de choque térmico; ligando 12 de quimiocinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima; homólogo 1 de la homeocaja del seno ocular; cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; dominio de homología tres con src (SH3) y rico en cisteína; gen 1 de translocalización de linfocitos B, antiproliferativo; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con runt; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína 5 de la homeocaja de iroquois; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de las vesículas sinápticas; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la homeocaja del seno ocular; proteína KIAA1034; respuesta 3 de crecimiento precoz; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, 1 de tipo beta (con dominios de repetición de tipo EGF); clon de ADNc EUROIIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína 5 de membrana asociada a la vesícula; proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF; tipo 3 de proteína de 19 kDa de interacción BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, 36 kDa. Son más preferidas células que tienen, con respecto a fibroblastos humanos, citoblastos mesenquimatosos, o células de la médula ósea de las crestas ilíacas, expresión reducida de al menos 5, 10, 15 ó 20 genes correspondientes a aquellos enumerados anteriormente. Actualmente son más preferidas células con expresión reducida de al menos 25, 30 ó 35 de los genes correspondientes a las secuencias enumeradas. También son más preferidas aquellas células derivadas del posparto que tienen expresión que es reducida, con respecto a aquella de un fibroblasto humano, un citoblasto mesenquimatoso, o una célula de la médula ósea de las crestas ilíacas, de genes correspondientes a 35 o más, 40 o más, o incluso todas las secuencias enumeradas.

La secreción de ciertos factores de crecimiento y otras proteínas celulares puede hacer las células de la invención particularmente útiles.

Aunque la secreción de tales factores es útil, las PPDC también pueden caracterizarse por su falta de secreción de factores en el medio.

Ejemplos de células derivadas de la placenta de la divulgación se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se asignaron los números de acceso ATCC del siguiente modo: (1) la designación de cepa PLA 071003 (P8) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó el n° de acceso PTA-6074; (2) la designación de cepa PLA 071003 (P11) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó el n° de acceso PTA-6075; y (3) la designación de cepa PLA 071003 (P16) se depositó el 16 de junio de 2004 y se le asignó el n° de acceso PTA-6079.

Ejemplos de células derivadas de tejido del cordón umbilical de la invención se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) el 10 de junio de 2004, y se les asignaron los números de acceso de ATCC del siguiente modo: (1) a la designación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el n° de acceso PTA-6067; y (2) a la designación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el n° de acceso PTA-6068.

Las PPDC pueden aislarse. La invención también proporciona composiciones de PPDC, que incluyen poblaciones de PPDC. La población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente solo PPDC (preferentemente al menos aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más PPDC). La población de células homogénea de la invención comprende células derivadas de tejido del cordón umbilical. La población de células homogénea de la divulgación puede comprender células derivadas de la placenta. Las poblaciones de células homogéneas derivadas de tejido del cordón umbilical pueden estar libres de células de linaje materno. Las poblaciones de células homogéneas derivadas de la placenta pueden ser de linaje neonatal o materno. La homogeneidad de una población de células puede lograrse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo), separación con perlas o por expansión clónica.

Los métodos de la divulgación incluyen adicionalmente métodos para producir una población de células derivadas del posparto expandiendo una célula de la invención en cultivo. Las células derivadas del posparto de la invención se expanden preferentemente en presencia de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % de oxígeno. Las células derivadas del posparto de la invención se expanden preferentemente en medio de cultivo tal como, pero no se limita a, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), RPMI1640, CELL-GRO FREE, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), medio Ham F10, medio Ham F12, DMEM/F12, medio de Dulbecco modificado por Iscove o medio basal de Eagle. El medio de cultivo contiene preferentemente baja o alta glucosa, aproximadamente 2 %-15 % (v/v) de suero, beta-mercaptoetanol y un agente antibiótico. El medio de cultivo puede contener al menos uno de factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular y factor de crecimiento epidérmico. Las células de la invención pueden cultivarse sobre una superficie sin recubrir o recubierta. Las superficies para el crecimiento de las células pueden recubrirse, por ejemplo, con gelatina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), fibronectina, laminina, ornitina, vitronectina o proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL). En algunas realizaciones, una población de células derivadas del posparto se mezcla con otra población de células.

Las células de la invención pueden ser inducidas para diferenciarse en un linaje ectodérmico, endodérmico o mesodérmico. Por ejemplo, las PPDC pueden ser inducidas para diferenciarse en un linaje dado sometiendo a condiciones de cultivo celular inductoras de diferenciación. En el presente documento también se proporcionan poblaciones de células incubadas en presencia de uno o más factores, o en condiciones, que estimulan la diferenciación de citoblasto a lo largo de una vía deseada (por ejemplo, muscular, endotelial, epitelial). Tales factores se conocen en la técnica y el experto apreciará que la determinación de condiciones adecuadas para la diferenciación puede llevarse a cabo con experimentación rutinaria. La optimización de tales condiciones puede llevarse a cabo por diseño experimental estadístico y análisis, por ejemplo, la metodología de la superficie de respuesta permite la optimización simultánea de múltiples variables, por ejemplo, en un cultivo biológico. Actualmente, los factores preferidos incluyen, pero no se limitan a, factores, tales como factores de crecimiento o tróficos, agentes desmetilantes, co-cultivo con linaje de células de tejido blando o cultivo en medio acondicionado con linaje de célula de tejido blando, además de otras condiciones conocidas en la técnica para estimular la diferenciación de citoblastos a lo largo de estas vías

Los métodos para caracterizar células diferenciadas que se desarrollan a partir de las PPDC de la invención incluyen, pero no se limitan a, métodos histológicos, morfológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos, o usando marcadores de la superficie celular, o genética o molecularmente, o identificando factores secretados por la célula diferenciada, y por las cualidades inductivas de las PPDC diferenciadas.

## **Métodos de uso de las PPDC o componentes o productos de las mismas**

### ***Ingeniería genética de las PPDC***

Las células de la invención pueden manipularse usando cualquiera de una variedad de vectores que incluyen, pero no se limitan a, vectores virales integrantes, por ejemplo, vector de retrovirus o vectores virales adeno-asociados; vectores replicantes no integrantes, por ejemplo, vectores del virus del papiloma, vectores de SV40, vectores adenovirales; o vectores virales defectuosos en la replicación. Otros métodos de introducción de ADN en células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o por inyección directa de ADN.

Las células huésped se transforman o transfectan preferentemente con ADN controlado por o en asociación operativa con, uno o más elementos de control de la expresión apropiados tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador de selección.

Tras la introducción del ADN extraño, puede dejarse que las células manipuladas crezcan en medios enriquecidos y luego se cambian a medios selectivos. El marcador de selección en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y se cultiven para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares.

Este método puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan el producto génico.

Puede usarse cualquier promotor para conducir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, promotores virales incluyen, pero no se limitan a, un promotor/potenciador del CMV, SV 40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o promotor del gen elastina. Preferentemente, los elementos de control usados para controlar la expresión del gen de interés deben permitir la expresión regulada del gen de manera que el producto se sintetice solo cuando se necesite *in vivo*. Si se desea expresión transitoria, se usan promotores constitutivos preferentemente en un vector no integrante y/o defectuoso en la replicación. Alternativamente, podrían usarse promotores inducibles para conducir la expresión del gen insertado cuando fuera necesario.

Promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados a metalotioneína y proteínas de choque térmico.

Un ejemplo de una región de control transcripcional que presenta especificidad de tejido que se ha descrito y podría usarse es la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina, que es activo en músculo esquelético (Shani, 1985, Nature 314:283).

Las células de la invención pueden manipularse genéticamente para "inactivar" o "silenciar" la expresión de factores que promueven la inflamación o rechazo en el sitio de implante. Técnicas moduladoras negativas para la reducción de los niveles de expresión génica diana o niveles de actividad del producto génico diana se tratan más adelante. "Modulación negativa", como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción en el nivel y/o actividad del producto génico diana con respecto al nivel y/o actividad del producto génico diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo puede reducirse o inactivarse usando varias técnicas que incluyen, por ejemplo, inhibición de la expresión inactivando el gen completamente (comúnmente llamado "inactivación") usando la técnica de recombinación homóloga. Normalmente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' con respecto a esa región) se interrumpe por un marcador de selección positiva, por ejemplo, neo, previniendo la producción de ARNm normal del gen diana y produciendo la inactivación del gen. Un gen también puede inactivarse creando una delección en parte de un gen o deleccionando el gen entero. Usando una construcción con dos regiones de homología con el gen diana que están muy separadas en el genoma, pueden deleccionarse las secuencias que intervienen en las dos regiones (Mombaerts y col., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084).

También pueden usarse ARN interferente pequeño antisentido, ADNzimas y moléculas de ribozimas que inhiben la expresión del gen diana según la invención para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, se ha mostrado que las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de complejos del gen de histocompatibilidad mayor (HLA) son las más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Todavía además, pueden utilizarse moléculas de hélice triple en la reducción del nivel de actividad del gen diana.

Estas técnicas se describen en detalle por L.G. Davis y col. (eds), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn.

Usando cualquiera de las técnicas anteriores, por ejemplo, la expresión de IL-1 puede inactivarse o silenciarse en las células de la invención para reducir la producción de mediadores inflamatorios por las células de la invención. Asimismo, la expresión de moléculas de clase II del MHC puede inactivarse o silenciarse con el fin de reducir el riesgo de rechazo del tejido implantado.

Una vez las células de la invención se han manipulado genéticamente, pueden implantarse directamente en el paciente para permitir el tratamiento de una afección de tejido blando o para producir un producto génico antiinflamatorio tal como, por ejemplo, péptidos o polipéptidos correspondientes al idiotipo de anticuerpos neutralizantes para GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, u otras citocinas inflamatorias.

Alternativamente, las células genéticamente manipuladas pueden usarse para producir nuevo tejido *in vitro*, que entonces se implanta en el sujeto, como se describe en el presente documento.

### **Secreción de factores tróficos**

La secreción de factores de crecimiento por las PPDC puede proporcionar soporte trófico para un segundo tipo de célula *in vitro* o *in vivo*. Las PPDC de la divulgación pueden secretar, por ejemplo, al menos uno de proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), interleucina-6 (IL6), interleucina 8 (IL-8), GCP-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), tromboxetina (TPO), proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP1a), RANTES e inhibidor de tejido de metaloproteína 1 de matriz (TIMP1), que pueden aumentarse mediante una variedad de técnicas, que incluyen cultivo *ex vivo* de las células en medio químicamente definido.

Como se demuestra por el Ejemplo 14 en el presente documento, las PPDC tienen la capacidad de soportar la supervivencia, crecimiento y diferenciación de otros tipos de células en co-cultivo. Por consiguiente, en otra realización, las PPDC se co-cultivan *in vitro* para proporcionar soporte trófico al otro tipo de célula deseado, que incluye, pero no se limita a, células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio

nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria ilíaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando, y mezclas de las mismas. Para el co-cultivo, puede ser deseable que las PPDC y las otras células deseadas se co-cultiven en condiciones en las que los dos tipos de células estén en contacto. Esto puede lograrse, por ejemplo, sembrando las células como una población de células heterogéneas en medio de cultivo o sobre un sustrato de cultivo adecuado. Alternativamente, las PPDC pueden cultivarse primero hasta confluencia y emplearse como sustrato para el segundo tipo de células deseadas en cultivo. En esta última realización, las células pueden separarse adicionalmente físicamente, por ejemplo, por una membrana o dispositivo similar, de forma que el otro tipo de célula pueda eliminarse y usarse por separado tras el periodo de co-cultivo. En otras realizaciones, las otras células deseadas se cultivan en contacto con el medio acondicionado, matriz extracelular y/o lisado celular de las PPDC. El uso de las PPDC en co-cultivo para promover la expansión y diferenciación de otros tipos de células puede encontrar aplicabilidad en investigación y en áreas clínicas/terapéuticas. Por ejemplo, la divulgación contempla que el co-cultivo de PPDC pueda utilizarse para facilitar el crecimiento y la diferenciación de células de un fenotipo dado en cultivo, por ejemplo, células de un fenotipo de tejido blando, para, por ejemplo, fines de investigación básica o para su uso en ensayos de cribado de fármacos. También puede utilizarse co-cultivo de PPDC para la expansión *ex vivo* de células de un fenotipo de tejido blando para la posterior administración para fines terapéuticos. Por ejemplo, pueden recogerse células de un individuo, expandirse *ex vivo* en co-cultivo con las PPDC, luego devolverse a ese individuo (transferencia autóloga) u otro individuo (transferencia singénica o alógena). En estas realizaciones, se apreciará que, tras la expansión *ex vivo*, la población de células que comprende las PPDC podría administrarse a un paciente en necesidad de tratamiento, por ejemplo, de una afección de tejido blando como se describe en el presente documento. Alternativamente, en situaciones en las que la transferencia autóloga es apropiada o deseable, las poblaciones de células co-cultivadas pueden separarse físicamente en cultivo, permitiendo la eliminación de las células autólogas para administración al paciente.

En algunas realizaciones, las PPDC inducen la angiogénesis en co-cultivo con células tales como, pero no se limitan a, células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria ilíaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando. Por ejemplo, factores angiogénicos, que incluyen pero no se limitan a, EPO, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, KGF, HGF, FGF, VEGF y HBEGF, son liberados por las PPDC. Los métodos de inducción de la angiogénesis exponiendo una célula de tejido blando a una PPDC o producto de PPDC pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*. Ejemplos de células de tejido blando que forman redes endoteliales según los métodos de la invención incluyen células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria ilíaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+). Si el método se realiza *in vivo*, las PPDC o productos de PPDC o composiciones pueden administrarse a un paciente como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una población de PPDC o composición puede administrarse a un paciente para proporcionar factores angiogénicos necesarios.

Las poblaciones de PPDC o composiciones de la invención, o el medio acondicionado, lisado celular o matriz extracelular de la divulgación, pueden usarse para producir una red vascular, como se demuestra en el Ejemplo 14. Los métodos de producción de una red vascular implican exponer una población de células de tejido blando a una población de células PPDC, lisado celular, matriz extracelular o medio acondicionado. La población de células de tejido blando contiene preferentemente al menos una célula de tejido blando de una célula endotelial aórtica, célula endotelial de la arteria coronaria, célula endotelial de la arteria pulmonar, célula endotelial de la arteria ilíaca, célula endotelial microvascular, célula endotelial de la arteria umbilical y célula endotelial de la vena umbilical. La invención proporciona las células de la invención para su uso en producir una red vascular *in vivo*. La divulgación también describe un método de producción de una red vascular que puede realizarse *in vitro*. Las redes vasculares así producidas pueden administrarse a un paciente como pauta terapéutica. En algunas realizaciones preferidas, las redes vasculares se administran como tratamiento de una afección de tejido blando, por ejemplo, pero no a modo de limitación, una afección vascular, tal como una enfermedad vascular o lesión o desarrollo vascular inapropiado. En algunos aspectos de la invención, la red vascular se administra por trasplante al paciente. En realizaciones preferidas, la vasculatura dañada o enferma se elimina antes del trasplante de la red vascular de la invención.

#### **Medio acondicionado de PPDC**

Otra realización de la divulgación caracteriza el uso de las PPDC para la producción de medio acondicionado, tanto a partir de PPDC indiferenciadas como de PPDC incubadas en condiciones que estimulan la diferenciación en un linaje dado. Tales medios acondicionados se contemplan para su uso en el cultivo de células *in vitro* o *ex vivo*, por

ejemplo, células madre o progenitoras de tejido blando, o células de un fenotipo de tejido blando, que incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria ilíaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando, y mezclas de las mismas, o *in vivo* para soportar células trasplantadas que comprenden poblaciones homogéneas o heterogéneas de las PPDC, y/o células de un fenotipo de tejido blando, células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria ilíaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando, y mezclas de las mismas, por ejemplo.

### Aplicaciones terapéuticas de las PPDC

Las PPDC de la invención pueden usarse para tratar pacientes que tienen una afección de tejido blando, por ejemplo, pero no se limitan a, pacientes que requieren la reparación o sustitución de tejido blando resultante de enfermedad o traumatismo o fallo del tejido para desarrollarse normalmente, o para proporcionar una función cosmética, tal como para aumentar los rasgos del cuerpo. Aplicaciones terapéuticas de las PPDC de la invención incluyen, pero no se limitan a, tratamiento de hernias, daño al suelo pélvico, desgarro o rotura de un tendón o ligamento, reparación y regeneración de la piel (por ejemplo, revisión de cicatrices o el tratamiento de heridas traumáticas, quemaduras graves, úlceras de la piel (por ejemplo, úlceras de decúbito (presión), úlceras venosas y úlceras diabéticas) y heridas quirúrgicas tales como aquellas asociadas a la extirpación de cánceres de piel; tratamiento de afecciones vasculares (por ejemplo, enfermedad vascular tal como enfermedad arterial periférica, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad de la carótida y enfermedad venosa; lesión vascular; desarrollo vascular inapropiado); y enfermedades musculares (por ejemplo, miopatías congénitas; miastenia grave; enfermedades musculares inflamatorias, neurogénicas y miogénicas; y distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofias musculares congénitas, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss).

Las células de la invención pueden administrarse solas o como mezclas con otras células. Las células pueden administrarse a modo de una matriz (por ejemplo, un andamiaje tridimensional). Las células pueden administrarse con vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Si las PPDC van a administrarse con otras células, las PPDC pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente con las otras células. Si las células van a administrarse secuencialmente con otro tipos de células, las PPDC pueden administrarse antes o después de las células de un segundo fenotipo. Células que pueden administrarse conjuntamente con las PPDC incluyen células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria ilíaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando.

Las PPDC pueden administrarse con otros fármacos o moléculas biológicas beneficiosos (factores de crecimiento, factores tróficos). Si las PPDC se administran con otros agentes, pueden administrarse juntos en una única composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultáneamente o secuencialmente con el otro factor bioactivo (tanto antes como después de la administración de los otros agentes). Factores bioactivos que pueden co-administrarse incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimético de EPO, TPO, IGF-I y IGF-II, HGF, inhibidores de la caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMETIN, SUPROFEN)); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, urocinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de los receptores de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptores de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de la prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por

ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), además de anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden co-administrarse con factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.827.735.

- 5 En algunas realizaciones, las PPDC se administran como células indiferenciadas, es decir, como cultivadas en medio de crecimiento.

10 Las células de la invención pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, administrarse (por ejemplo, a modo de un catéter o jeringa), o administrarse de otro modo directa o indirectamente al sitio en necesidad de reparación o aumento. Las células pueden administrarse a modo de una matriz (por ejemplo, un andamiaje tridimensional). Las células pueden administrarse con vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Vías de administración de las células de la invención o composiciones o componentes (por ejemplo, ECM, lisado celular, medio acondicionado) de las mismas incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, subcutánea, oral y nasal. Vías preferibles de administración *in vivo* incluyen trasplante, implantación, inyección, administración mediante un catéter, o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar terapia de células.

20 Cuando las células se administran en dispositivos semi-sólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en una localización precisa en el cuerpo normalmente es un medio adecuado de administración. Sin embargo, pueden administrarse composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas, a una localización más general (por ejemplo, mediante un área difusamente afectada, por ejemplo), de la que migran a una localización particular, por ejemplo, respondiendo a señales químicas.

25 Otras realizaciones de la divulgación engloban métodos de tratamiento administrando composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares de PPDC (por ejemplo, lisados celulares o componentes de los mismos) o productos (por ejemplo, matriz extracelular, factores tróficos y otros biológicos producidos naturalmente por las PPDC o mediante modificación genética, medio acondicionado de cultivo de PPDC). De nuevo, estos métodos pueden comprender además administrar otros factores bioactivos, tales como agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de EPO, TPO, IGF-I y IGF-II, HGF, inhibidores de la caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMETIN, SUPROFEN); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, urocinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de los receptores de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptores de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de la prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), anestésicos locales y factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.827.735.

45 Formas y pautas de dosificación para administrar las PPDC o cualquiera de las otras composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento se desarrollan según la buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición del paciente individual, por ejemplo, naturaleza y grado de la afección que está tratándose, edad, sexo, peso corporal y afección médica general, y otros factores conocidos para los médicos. Así, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica que va a administrarse a un paciente se determina por estas consideraciones como se conoce en la técnica.

50 En algunas realizaciones de la invención, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir un paciente antes del inicio de la terapia de células con las PPDC. Además, se ha mostrado que las PPDC no estimulan PBMC alógenas en una reacción de linfocitos mixtos. Por consiguiente, en algunos casos puede tolerarse el trasplante con PPDC alógenas, o incluso xenógenas.

60 Sin embargo, en otros casos puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente un paciente antes de iniciar la terapia de células. Esto puede llevarse a cabo mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede llevarse a cabo administrando las células en un dispositivo encapsulado. Las PPDC pueden encapsularse en una cápsula que es permeable a nutrientes y al oxígeno requerido por la célula y factores terapéuticos que la célula está, aunque impermeable a factores humorales inmunitarios y células. Preferentemente, el encapsulante es hipoadérgico, está fácilmente y establemente situado en un tejido diana y proporciona protección añadida a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria a las células trasplantadas se conocen en la técnica. Como alternativa, las PPDC pueden estar genéticamente modificadas para reducir su inmunogenicidad.

La supervivencia de las PPDC trasplantadas en un paciente vivo puede determinarse mediante el uso de una variedad de técnicas de barrido, por ejemplo, tomografía axial computerizada (TAC o TC), imagen por resonancia magnética (IRM) o tomografía de emisión de positrones (TEP). La determinación de la supervivencia del trasplante también puede hacerse póstuma eliminando el tejido diana, y examinándolo visualmente o mediante un microscopio.

5 Alternativamente, las células pueden tratarse con tinciones que son específicas para células de un linaje específico. Las células trasplantadas también pueden identificarse por la incorporación previa de colorantes trazadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, fast blue, bisbenzamida, micropartículas férricas, o productos génicos indicadores genéticamente introducidos, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

10 La integración funcional de las PPDC trasplantadas en un sujeto puede evaluarse examinando la restauración de la función que se dañó o enfermó, por ejemplo, restauración de la función de las articulaciones, circulación sanguínea, contracción muscular, etc., o aumento de la función.

**Composiciones y composiciones farmacéuticas**

15 Las composiciones de las PPDC, que incluyen, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, están incluidas dentro del alcance de la invención, y composiciones de productos relacionados (por ejemplo, matriz extracelular, lisado celular, fracción de células solubles, medio acondicionado), que incluyen, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, están incluidas dentro del alcance de la divulgación. Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más factores bioactivos, por ejemplo, pero no se limitan a, un factor de crecimiento, un factor inductor de la diferenciación, un factor celular de supervivencia tal como inhibidor de la caspasa, un agente antiinflamatorio tal como inhibidor de cinasas p38, o un factor angiogénico tal como VEGF o bFGF. Algunos ejemplos de factores bioactivos incluyen PDGF-bb, EGF, bFGF, IGF-1 y LIF. En algunas realizaciones, las PDPC indiferenciadas o inducidas por diferenciación se cultivan en contacto con el factor bioactivo. En algunas realizaciones, las PPDC 20 indiferenciadas siguen estando indiferenciadas tras el contacto con el factor bioactivo. En otras realizaciones, el factor bioactivo induce la diferenciación de las PPDC. Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más de un factor inductor de la diferenciación, un factor celular de supervivencia tal como inhibidor de la caspasa, un agente antiinflamatorio tal como el inhibidor de cinasas p38, o un factor angiogénico tal como VEGF o bFGF.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender poblaciones homogéneas o heterogéneas de PPDC indiferenciadas o cultivos de las mismas, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Vehículos farmacéuticamente aceptables para las células de la invención incluyen sustancias de vehículo orgánicas o inorgánicas adecuadas que no reaccionan perjudicialmente con las células de la invención o composiciones o componentes de las mismas. Hasta el punto que son biocompatibles, vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina (tal como disolución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas e hidratos de carbono, tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidina. Tales preparaciones pueden esterilizarse, y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y colorante. Vehículos farmacéuticos adecuados para su uso en la presente invención se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y el documento WO 96/05309.

45 La dosificación (por ejemplo, el número de células que va a administrarse) y la frecuencia de administración de las composiciones farmacéuticas dependerán de varios factores, que incluyen, pero no se limitan a, la naturaleza de la afección que va a tratarse, el grado de los síntomas de la afección, características del paciente (por ejemplo, edad, tamaño, sexo, salud).

Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las PPDC, matriz extracelular o lisados celulares de las mismas, medio acondicionado, matrices, redes vasculares y composiciones producidas por la divulgación pueden usarse para reparar o sustituir tejido blando dañado o destruido, para aumentar tejido blando existente, para introducir tejido nuevo o alterado, para modificar prótesis artificiales, o para unir tejidos biológicos o estructuras. Por ejemplo, algunas realizaciones de la invención incluirían (i) cierres de hernias con construcciones de tejido blando de sustitución cultivado en cultivos tridimensionales; (ii) injertos de piel con construcciones de tejido blando; (iii) prótesis; 55 (iv) injertos de vasos sanguíneos; y (v) reconstrucción de tendones o ligamentos. Ejemplos de tales afecciones que pueden tratarse según los métodos de la invención incluyen anomalías congénitas tales como microsomía hemifacial, hipoplasia malar y cigomática, hipoplasia mamaria unilateral, pecho hundido, agenesia pectoral (anomalía de Poland) e incompetencia velofaríngea secundaria a reparación de la fisura palatina o fisura palatina submucosa (como un implante retrofaríngeo); defectos adquiridos (post-traumáticos, post-quirúrgicos, post-infecciosos) tales como cicatrices, atrofia subcutánea (por ejemplo, secundaria a lupus eritematoso discoide), lesiones queratósicas, hoyuelos por acné de la cara, esclerodermia lineal con atrofia subcutánea, deformidad de la nariz en silla de montar, enfermedad de Romberg y parálisis unilateral de las cuerdas vocales; defectos cosméticos tales como líneas glabellares del ceño, pliegues nasolabiales profundos, arrugas geográficas peribucales, mejillas hundidas e hipoplasia mamaria; hernias; desgarros o roturas de un tendón o ligamento; quemaduras graves, úlceras de la piel (por ejemplo, úlceras de decúbito (presión), úlceras venosas y úlceras diabéticas) y heridas quirúrgicas tales como aquellas asociadas a la extirpación de cánceres de piel; enfermedades vasculares tales como

enfermedad arterial periférica, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad de la carótida y enfermedad venosa; enfermedades musculares (por ejemplo, miopatías congénitas; miastenia grave; enfermedades musculares inflamatorias, neurogénicas y miogénicas; y distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofias musculares congénitas, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss); y sustitución y reparación de tejidos conjuntivos tales como tendones y ligamentos.

La satisfactoria reparación o sustitución de tejido dañado puede potenciarse si las células y/o tejido implantado pueden fijarse en su sitio en el sitio de reparación. El movimiento post-implantación puede hacer que las nuevas células o tejido se desplacen del sitio si no se emplea una técnica de fijación pro-activa. Pueden usarse diversos métodos para fijar las nuevas células y/o tejido en su sitio, que incluyen: parches derivados de tejidos biocompatibles, que pueden colocarse sobre el sitio; suturas biodegradables u otros cierres, por ejemplo, clavos, grapas, chinchetas, tornillos y anclajes; dispositivos de fijación no absorbibles, por ejemplo, suturas, clavos, tornillos y anclajes; adhesivos; y el uso de geometrías de ajuste por interferencia.

Las células de la invención pueden administrarse solas, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o sembrarse sobre o en una matriz como se describe en el presente documento.

### **Uso de las PPDC o productos de PPDC para trasplante**

Los métodos de tratamiento de la invención objeto implican la implantación de las PPDC, productos de PPDC, o células trans-diferenciadas en individuos en necesidad de la misma. Las células de la presente invención pueden administrarse al sitio de necesidad terapéutico o "alojarlas" en el sitio.

Las células de la presente invención pueden diferenciarse *in situ* o proporcionar soporte trófico a células endógenas. La dosificación de implantación de células apropiada en seres humanos puede determinarse a partir de la información existente referente a, por ejemplo, la actividad de las células. A partir de cultivo *in vitro* y experimentos en animales *in vivo*, puede cuantificarse la cantidad de factores producidos. Esta información también es útil en calcular una dosificación apropiada de material implantado. Adicionalmente, el paciente puede monitorizarse para determinar si puede hacerse implantación adicional o, por consiguiente, reducirse el material implantado.

Para potenciar la vascularización y supervivencia de las células trasplantadas, pueden añadirse factores angiogénicos tales como VEGF, PDGF o bFGF, tanto solos como en combinación con células endoteliales o sus progenitores, que incluyen células CD34+, CD34+/CD117+.

Pueden añadirse uno o varios de otros componentes a las células trasplantadas, que incluyen componentes seleccionados de la matriz extracelular, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos. Alternativamente, las células de la invención pueden manipularse genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento. Factores bioactivos que pueden incorporarse útilmente en la formulación de células incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de EPO, TPO, IGF-I y IGF-II, HGF, inhibidores de la caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMETIN, SUPROFEN); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, urocinasa, PPack (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de los receptores de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptores de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de la prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), además de anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden co-administrarse con factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.827.735.

### **Formulación de las PPDC para trasplante**

En una realización no limitante, una formulación que comprende las células de la invención se prepara para administración directamente al sitio en el que se desea la producción de nuevo tejido blando. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las células de la invención pueden suspenderse en una disolución de hidrogel para inyección. Ejemplos de hidrogeles adecuados para su uso en la invención incluyen péptidos de auto-ensamblaje, tales como RAD16. Alternativamente, puede dejarse que la disolución de hidrogel que contiene las células endurezca, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersadas en ella antes de la implantación. O, una vez la matriz se ha endurecido, las formaciones de células pueden cultivarse de manera que las células se expandan

mitóticamente antes de la implantación. El hidrogel es un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura tridimensional de red cristalina abierta que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Ejemplos de materiales que pueden usarse para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliacrilatos, que se reticulan iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-polipropilenglicol que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el soporte para las PPDC de la invención es biodegradable.

En algunas realizaciones de la invención, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ*, como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2002/0022676; Anseth y col., J. Control Release, 78(1-3):199-209 (2002); Wang y col., Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003).

En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en disoluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas o disoluciones alcohólicas acuosas, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes son poli(fosfacenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. También pueden usarse copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados haciendo reaccionar ácido acrílico o metacrílico y monómeros de éter vinílico o polímeros. Ejemplos de grupos ácidos son grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohol halogenado (preferentemente fluorado), grupos OH fenólico y grupos OH ácido.

Ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden hacerse reaccionar con aniones son poli(vinilaminas), poli(vinilpiridina), poli(vinilimidazol), y algunos polifosfacenos sustituidos con imino. La sal de amonio o cuaternaria de los polímeros también puede formarse a partir de los nitrógenos del esqueleto o grupos imino laterales. Ejemplos de grupos laterales básicos son grupos amino e imino.

El alginato puede reticularse iónicamente con cationes divalentes, en agua, a temperatura ambiente, para formar una matriz de hidrogel. Debido a estas condiciones suaves, el alginato ha sido el polímero más comúnmente usado para la encapsulación de células de hibridoma, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.352.883 a Lim. En el proceso de Lim, una disolución acuosa que contiene los materiales biológicos que van a encapsularse se suspende en una disolución de un polímero soluble en agua, la suspensión se forma en gotitas que se configuran en microcápsulas discretas por contacto con cationes multivalentes, entonces la superficie de las microcápsulas se reticula con poliaminoácidos para formar una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

Los polifosfacenos son polímeros con esqueletos que consisten en nitrógeno y fósforo separados por enlaces sencillos y dobles alternantes. Cada átomo de fósforo está covalentemente unido a dos cadenas laterales.

Los polifosfacenos adecuados para reticulación tienen una mayoría de grupos de cadena lateral que son ácidos y que pueden formar puentes de sales con cationes di- o trivalentes. Ejemplos de grupos laterales ácidos preferidos son grupos ácido carboxílico y grupos ácido sulfónico. Los polifosfacenos hidrolíticamente estables se forman a partir de monómeros que tienen grupos laterales ácido carboxílico que están reticulados por cationes divalentes o trivalentes tales como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Al}^{3+}$ . Pueden sintetizarse polímeros que se degradan mediante hidrólisis incorporando monómeros que tienen grupos laterales imidazol, éster de aminoácido o glicerol. Por ejemplo, puede sintetizarse un poli[bis(carboxilatofenoxi)]fosfaceno (PCPP) polianiónico, que está reticulado con cationes multivalentes disueltos en medios acuosos a temperatura ambiente o por debajo para formar matrices de hidrogel.

Los polifosfacenos biodegradables tienen al menos dos tipos diferentes de cadenas laterales, grupos laterales ácidos que pueden formar puentes de sal con cationes multivalentes y grupos laterales que se hidrolizan bajo condiciones *in vivo*, por ejemplo, grupos imidazol, ésteres de aminoácido, glicerol y glucosilo.

La hidrólisis de la cadena lateral produce la erosión del polímero. Ejemplos de cadenas laterales hidrolizantes son imidazoles y ésteres de aminoácido sin sustituir y sustituidos en los que el grupo está unido al átomo de fósforo mediante un enlace amino (los polímeros de polifosfaceno en los que ambos grupos R están unidos de este modo se conocen como poliaminofosfacenos). Para los poliimidazolfosfacenos, algunos de los grupos "R" sobre el esqueleto de polifosfaceno son anillos de imidazol, unidos a fósforo en el esqueleto mediante un átomo de nitrógeno del anillo. Otros grupos "R" pueden ser residuos orgánicos que no participan en la hidrólisis, tales como grupos metilfenoxi u otros grupos mostrados en el documento científico de Allcock, y col., Macromolecule 10:824 (1977). Se conocen en la técnica métodos de síntesis de los materiales de hidrogel, además de métodos para preparar tales hidrogeles.

También pueden incluirse otros componentes en la formulación, que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes: (1) tampones para proporcionar pH e isotonicidad apropiados; (2) lubricantes; (3) materiales viscosos para retener las células en o cerca del sitio de administración, que incluyen, por ejemplo, alginatos, agares y gomas vegetales; y (4) otros tipos de células que pueden producir un efecto deseado en el sitio de administración, tales como, por ejemplo, potenciamiento o modificación de la formación de tejido o sus características psiquicoquímicas, o como soporte para la viabilidad de las células, o inhibición de la inflamación o rechazo. Las células pueden cubrirse

por un recubrimiento para heridas apropiado para prevenir que las células abandonen el sitio. Tales recubrimientos para heridas son conocidos para aquellos expertos en la materia.

Factores bioactivos que pueden incorporarse útilmente en la formulación de células o composiciones de la invención incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de EPO, TPO, IGF-I y IGF-II, HGF, inhibidores de la caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMETIN, SUPROFEN); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, urocinas, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de los receptores de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptores de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de la prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), además de anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden co-administrarse con factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.827.735.

#### **Formulación de un parche de tejido blando**

Los cultivos o co-cultivos de las PPDC en un pocillo previamente formado permiten la fabricación de un parche de tejido blando de espesor y volumen pre-determinados. El volumen del parche de tejido resultante depende del volumen del pocillo y del número de PPDC en el pocillo. Puede prepararse tejido de volumen pre-determinado óptimo por experimentación rutinaria alterando cualquiera o ambos de los parámetros anteriormente mencionados.

La superficie de contacto de las células del pocillo puede recubrirse con una molécula que disuade la adhesión de las PPDC a la superficie de contacto de las células. Reactivos de recubrimiento preferidos incluyen reactivos basados en silicio, es decir, diclorodimetilsilano, o reactivos basados en politetrafluoroetileno, es decir, TEFLON. Los procedimientos para recubrir materiales con reactivos basados en silicio, específicamente diclorodimetilsilano, son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press. Se aprecia que otros reactivos biocompatibles que previenen la unión de células a la superficie del pocillo pueden ser útiles en la práctica de la presente invención.

Alternativamente, el pocillo puede colarse a partir de un material biocompatible plegable o moldeable que no permite por sí mismo la unión de células. Materiales preferidos que previenen tal unión de células incluyen, pero no se limitan a, agarosa, vidrio, plástico de cultivo celular sin tratar y politetrafluoroetileno, es decir, TEFLON. Están comercialmente disponibles plásticos de cultivo celular sin tratar, es decir, plásticos que no se han tratado con o preparados a partir de materiales que tienen una carga electrostática, y pueden comprarse, por ejemplo, de Falcon Labware, Becton-Dickinson, Lincoln Park, N.J. Sin embargo, los materiales anteriormente mencionados no pretenden ser limitantes. Se aprecia que cualquier otro material biocompatible plegable o moldeable que disuada inherentemente la unión de las PPDC puede ser útil en la práctica de la presente invención.

El tamaño y forma del pocillo puede determinarse por el tamaño y forma del defecto de tejido que va a repararse. El pocillo debe ser lo suficiente profundo para contener medio de cultivo que recubra el parche de tejido.

Se contempla que un parche de tejido preparado según la invención puede "recortarse" o configurarse al tamaño y/o forma preseleccionados por un cirujano que realiza la reparación quirúrgica del tejido dañado. El recorte puede realizarse con el uso de una herramienta de corte afilada, es decir, un bisturí, unas tijeras o un dispositivo artroscópico equipado con un borde de corte, usando procedimientos muy conocidos en la técnica.

El pocillo preformado puede colarse en un bloque de gel de agarosa bajo condiciones asépticas. La agarosa es un material económico, biocompatible, plegable y moldeable que puede usarse para colar pocillos preformados, rápida y fácilmente. Como se ha mencionado anteriormente, las dimensiones del pocillo pueden ser dependientes del tamaño del tapón de tejido resultante que se desea.

Puede hacerse un pocillo preformado vertiendo una disolución caliente de agarosa LT fundida (BioRad, Richmond, Calif.) en una placa de cultivo de tejido que contiene un cilindro, teniendo el cilindro las dimensiones que imitan la forma del pocillo que va a formarse. El tamaño y forma del pocillo pueden elegirse por el experto y pueden ser dependientes de la forma del defecto de tejido que va a repararse. Una vez se ha enfriado la agarosa y solidificado alrededor del cilindro, el cilindro deberá sacarse cuidadosamente con pinzas. La superficie de la placa de cultivo de tejido que se expone por la eliminación del cilindro se cubre con agarosa fundida. Esto sella el fondo del pocillo y proporciona una superficie adhesiva de células en la base del pocillo. Cuando la agarosa LT fundida recientemente añadida se enfría y solidifica, el pocillo preformado resultante es adecuado para cultivar e inducir la diferenciación de

las PPDC. Se aprecia, sin embargo, que pueden usarse métodos alternativos para preparar un pocillo preformado útil en la práctica de la invención.

Las PPDC en suspensión pueden sembrarse en y cultivarse en el pocillo preformado. Las PPDC pueden ser inducidas para diferenciarse en un fenotipo de tejido blando en cultivo en el pocillo o pueden haberse inducido para diferenciarse antes de la siembra en el pocillo. Las células pueden diluirse mediante la adición de medio de cultivo a una densidad celular de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^9$  PPDC por mililitro.

Una vez las células forman un parche cohesivo, el tapón cohesivo de las células puede sacarse del pocillo e implantarse quirúrgicamente en el defecto de tejido. Se tiene previsto que las PPDC indiferenciadas puedan diferenciarse *in situ* para así formar tejido *in vivo*.

En algunas realizaciones, las PPDC se usan para generar hojas de células. Las hojas pueden ser de múltiples capas, como se describe en Shimizu, y col., *Biomaterials*, 24(13):2309-2316 (2003).

Pueden identificarse defectos de tejido blando mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, pero no se limitan a, tomografía asistida por ordenador (barrido por TAC); exploración radiológica; o imagen por resonancia magnética (IRM). Los defectos en el tejido blando también son fácilmente identificables visualmente durante el examen artroscópico o durante cirugía abierta. El tratamiento de los defectos puede efectuarse durante un procedimiento artroscópico o quirúrgico abierto usando los métodos y composiciones desvelados en el presente documento.

Por consiguiente, una vez se ha identificado el defecto, el defecto puede tratarse por las siguientes etapas de (1) implantar quirúrgicamente en el sitio pre-determinado un parche de tejido preparado por las metodologías descritas en el presente documento, y (2) permitir que el parche de tejido se integre en el sitio pre-determinado.

El parche de tejido tiene óptimamente un tamaño y forma de manera que cuando el parche se implanta en el defecto, los bordes del tejido implantado se ponen directamente en contacto con los bordes del defecto. Además, el parche de tejido puede fijarse en su sitio durante el procedimiento quirúrgico. Esto puede efectuarse fijando quirúrgicamente el parche en el defecto con suturas biodegradables y/o aplicando un bioadhesivo a la región que comunica el parche y el defecto.

En algunos casos, el tejido dañado puede cortarse quirúrgicamente antes de la implantación del parche de tejido sintético. Un parche de tejido sintético se implanta posteriormente en el defecto por los métodos descritos anteriormente.

#### **Trasplante de PPDC usando andamiajes**

Las células de la invención o co-cultivos de las mismas pueden sembrarse sobre un andamiaje tridimensional e implantarse *in vivo*, donde las células sembradas proliferarán sobre o en la trama y formarán un tejido de sustitución *in vivo* en cooperación con las células del paciente.

El crecimiento de las PPDC o co-cultivos de las mismas sobre la trama tridimensional produce la formación de un tejido tridimensional que puede utilizarse *in vivo* como estructura correctora o suplementaria. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los andamiajes tridimensionales de la invención pueden usarse para formar estructuras tubulares, como aquellas de las vías gastrointestinales y genitourinarias, además de vasos sanguíneos; tejidos para reparación de hernia; tendones y ligamentos.

Según algunas realizaciones de la invención, las PPDC o co-cultivos de las mismas se inoculan y se cultivan sobre una trama tridimensional. La trama puede configurarse en la forma de la estructura correctora deseada. Cuando se cultivan en este sistema tridimensional, las células proliferantes maduran y se segregan adecuadamente para formar componentes de tejidos adultos análogos a homólogos encontrados naturalmente *in vivo*.

Algunas realizaciones de la invención proporcionan una matriz para implantación en un paciente. En algunas realizaciones, la matriz se siembra con una población de células derivadas del posparto de la invención. Las PPDC pueden ser inducidas por diferenciación o indiferenciadas. La población de PPDC puede ser homogénea o heterogénea. La matriz también puede inocularse con células de otro tipo de células deseadas, por ejemplo, pero no a modo de limitación, células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, melanocitos, fibroblastos dérmicos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria ilíaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando. La matriz puede contener o pre-tratarse con uno o más factores bioactivos que incluyen, por ejemplo, fármacos, agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos y factores de crecimiento. En algunos aspectos de la divulgación, la matriz comprende tejido

descelularizado, tal como matriz extracelular o lisados celulares de las PPDC. En algunas realizaciones, la matriz es biodegradable. En algunas realizaciones, la matriz comprende proteínas de la membrana extracelular, por ejemplo, MATRIGEL. En algunos aspectos de la invención, la matriz comprende polímeros naturales o sintéticos. Las matrices de la invención incluyen andamiajes biocompatibles, redes cristalinas, estructuras de auto-ensamblaje y similares, tanto biodegradables como no, líquidas o sólidas. Tales matrices se conocen en las técnicas de la terapia basada en células, reparación quirúrgica, ingeniería de tejidos y cicatrización. Preferentemente, las matrices se pretratan (por ejemplo, siembran, inoculan, se ponen en contacto con) con las células de la invención. Más preferentemente, las matrices se pueblan con células en estrecha asociación a la matriz o sus espacios. En algunos aspectos de la invención, las células se adhieren a la matriz. En algunas realizaciones, las células están contenidas dentro de o forman puentes con espacios intersticiales de la matriz. Las más preferidas son aquellas matrices sembradas en las que las células están en estrecha asociación con la matriz y que, cuando se usan terapéuticamente, inducen o soportan el crecimiento hacia adentro de las células del paciente y/o angiogénesis apropiada. Las matrices sembradas o pre-tratadas pueden introducirse en el cuerpo de un paciente de algún modo conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, implantación, inyección, unión quirúrgica, trasplante con otro tejido, inyección y similares. Las matrices de la invención pueden configurarse a la forma y/o tamaño de un tejido u órgano *in vivo*. Los andamiajes de la invención pueden ser planos o tubulares o pueden comprender secciones de los mismos, como se describe en el presente documento. Los andamiajes de la invención pueden ser de múltiples capas.

Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el andamiaje puede diseñarse de forma que la estructura del andamiaje: (1) soporte las PPDC o co-cultivos de las mismas sin degradación posterior; (2) soporte las PPDC o co-cultivos de las mismas desde el momento de la siembra hasta que el trasplante de tejido se remodela por el tejido del huésped; (2) permite que las células sembradas se unan, proliferen y desarrollen en una estructura de tejido que tiene integridad mecánica suficiente para soportarse a sí misma *in vitro*, momento en el cual, el andamiaje se degrada. Una revisión del diseño de andamiajes se proporciona por Hutmacher, J. *Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 12(1):107-124 (2001).

Los andamiajes de la invención pueden implantarse en combinación con uno cualquiera o más factores de crecimiento, células, fármacos, u otros componentes descritos anteriormente que estimulan la formación de tejido blando o estimulan la vascularización o inervación del mismo o potencian o mejoran de otro modo la práctica de la invención.

Las células de la invención pueden cultivarse libremente en un recipiente de cultivo hasta sub-confluencia o confluencia, elevarse del cultivo e inocularse sobre una trama tridimensional. La inoculación de la trama tridimensional con una alta concentración de células, por ejemplo, aproximadamente  $10^6$  a  $5 \times 10^7$  células por mililitro, producirá el establecimiento del soporte tridimensional en periodos de tiempo relativamente más cortos.

En algunas realizaciones, es importante volver a crear en cultivo el microentorno celular encontrado *in vivo*, de forma que pueda variar el grado al que las células de la invención se cultivan antes de la implantación *in vivo* o uso *in vitro*. Las PPDC o co-cultivos de las mismas pueden inocularse sobre la trama antes o después de formar la forma deseada para implantación, por ejemplo, cuerdas, tubos, filamentos. Tras la inoculación de las células sobre la trama, la trama se incuba preferentemente en un medio de crecimiento apropiado. Durante el periodo de incubación, las células inoculadas crecerán y desarrollarán la trama y formarán puentes con espacios intersticiales en ellas. Es preferible, pero no requerido, cultivar las células a un grado apropiado que refleje la densidad celular *in vivo* del tejido que se repara o regenera.

Ejemplos de andamiajes que pueden usarse en la presente invención incluyen esteras no tejidas, espumas porosas o péptidos de auto-ensamblaje. Las esteras no tejidas pueden formarse, por ejemplo, usando fibras que comprenden un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), comercializado bajo el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Las espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como liofilización, o liofilizadas, como se trata en la patente de EE.UU. n° 6.355.699, también son posibles andamiajes. También pueden usarse hidrogeles tales como péptidos de auto-ensamblaje (por ejemplo, RAD16). Estos materiales se usan frecuentemente como soportes para el crecimiento de tejido. Según una realización preferida, la trama es un fieltro, que puede estar compuesto de un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros de PGA, PLA, PCL o mezclas, o ácido hialurónico. El hilo se transforma en un fieltro usando técnicas de procesamiento textil estándar que consisten en rizado, corte, cardado y agujeteado.

En otra realización preferida, las células de la invención se siembran sobre andamiajes de espuma que pueden ser estructuras de material compuesto. Además, la trama tridimensional puede moldearse en una forma útil, tal como una estructura específica en el cuerpo que va a repararse, sustituirse o aumentarse.

La trama puede tratarse antes de la inoculación de las células de la invención con el fin de potenciar la unión de células. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, podrían tratarse matrices de nailon con ácido acético 0,1 molar e incubarse en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nailon. El poliestireno podría tratarse similarmente usando ácido sulfúrico.

Además, las superficies externas de la trama tridimensional pueden modificarse para mejorar la unión o crecimiento de células y diferenciación de tejido, tal como recubriendo con plasma la trama o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glucoproteínas, glucosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, pero no se limitan a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, entre otros.

En algunas realizaciones, el andamiaje comprende o se trata con materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y sostener el crecimiento endotelial, migración y deposición de matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretano-urea segmentadas tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden tratarse adicionalmente para hacer el andamiaje no trombogénico. Tales tratamientos incluyen agentes antitrombóticos tales como heparina, y tratamientos que alteran la carga superficial del material tal como recubrimiento por plasma.

Diferentes proporciones de los diversos tipos de colágeno, por ejemplo, depositado sobre la trama, pueden afectar el crecimiento de células específicas de tejido u otras células que pueden inocularse después sobre la trama o que pueden crecer sobre la estructura *in vivo*. Por ejemplo, para sistemas de cultivo de piel tridimensionales, los tipos I y III de colágeno se depositan preferentemente en la matriz inicial. Alternativamente, la trama puede inocularse con una mezcla de células que sintetizan los tipos de colágeno apropiados deseados. Así, dependiendo del tejido que va a cultivarse, puede seleccionarse el tipo de colágeno apropiado que va a inocularse sobre la trama o producirse por las células sembradas sobre la misma. Por ejemplo, las cantidades relativas de fibras colagénicas y elásticas presentes en la trama pueden modularse controlando la relación de células productoras de colágeno con respecto a células productoras de elastina en el inóculo inicial. Por ejemplo, como las paredes internas de las arterias son ricas en elastina, un andamiaje arterial debe contener un co-cultivo de células de músculo liso que secretan elastina.

La trama tridimensional sembrada o inoculada de la invención puede usarse en una variedad de aplicaciones. Éstas incluyen, pero no se limitan a, trasplante o implantación de tanto las células cultivadas obtenidas de la matriz como la propia matriz cultivada *in vivo*. Los andamiajes tridimensionales pueden, según la invención, usarse para sustituir o aumentar el tejido existente, para introducir tejido nuevo o alterado, para modificar prótesis artificiales, o para unir juntos tejidos biológicos o estructuras. Por ejemplo, y no a modo de limitación, realizaciones específicas de la invención incluyen, pero no se limitan a, estructuras planas e implantes tridimensionales de tejido tubular para reparación o regeneración, por ejemplo, del tubo gastrointestinal, vías genitourinarias, vasos sanguíneos, músculos, ligamentos, tendones, piel, suelo pélvico, fascia y hernias.

## 1. Estructuras planas

Las PPDC pueden inocularse sobre un andamiaje plano. El andamiaje se incuba preferentemente en medio de cultivo antes de la implantación. Dos o más tramas planas pueden ponerse la una encima de la otra y suturarse juntas para generar una trama multicapa.

## 2. Estructuras tubulares

Por ejemplo y no a modo de limitación, la trama tridimensional puede usarse para construir tejidos tubulares de una sola capa y multi-capa *in vitro* que pueden servir de sustitución para tejido tubular dañado o enfermo *in vivo*.

### A. Tubos de una sola capa

Las siguientes subsecciones describen el uso de una trama sembrada para preparar tubos que pueden implantarse en el cuerpo.

#### A.1 Andamiaje plano

Puede cortarse un andamiaje en una tira (por ejemplo, forma rectangular) de la que la anchura es aproximadamente igual a la circunferencia interna del órgano tubular en el que se insertará por último lugar. Las células pueden inocularse sobre el andamiaje e incubarse flotando o suspendiendo en medios líquidos. En la etapa apropiada de confluencia, el andamiaje puede enrollarse en un tubo uniéndose juntos los bordes largos. La costura puede cerrarse suturando juntos los dos bordes usando fibras de un material adecuado de un diámetro apropiado.

#### A.2. Material de partida para andamiajes tubulares

Según la invención, puede formarse un andamiaje como tubo, inocularse con las PPDC y suspenderse en medios en una cámara de incubación. Con el fin de prevenir que las células obstruyan la luz, uno de los extremos abiertos de la trama tubular puede fijarse a una boquilla. Los medios líquidos pueden ser forzados a pasar a través de esta boquilla desde una cámara de fuente conectada a la cámara de incubación para crear una corriente a través del interior de la

trama tubular. El otro extremo abierto puede fijarse a una apertura de flujo de salida que conduce a una cámara de recogida de la que los medios pueden recircularse a través de la cámara de fuente. El tubo puede separarse de la boquilla y la abertura de flujo de salida cuando se completa la incubación. Este método se describe por Ballermann, B. J., y col., solicitud internacional nº WO 94/25584 y en la solicitud de EE.UU. nº de serie 08/430.768.

## 5 **B. Tubos de múltiples capas**

En general, pueden combinarse dos tramas tridimensionales en un tubo según la invención usando cualquiera de los siguientes métodos.

### 10 **B.1 Andamiajes planos múltiples**

Dos o más tramas planas pueden ponerse la una sobre la otra y suturarse juntas. Esta hoja de dos capas puede entonces enrollarse, y, como se ha descrito anteriormente, unirse juntas y fijarse.

### 15 **B.2 Andamiaje plano enrollado alrededor de andamiaje tubular**

Un andamiaje tubular que sirve como capa interna capa puede inocularse con las PPDC e incubarse. Puede cultivarse un segundo andamiaje como tira plana con anchura ligeramente mayor que la circunferencia externa de la trama tubular. Después de obtenerse el crecimiento apropiado, la trama plana puede enrollarse alrededor del exterior del andamiaje tubular, seguido del cierre de la costura de los dos bordes de la trama plana y, preferentemente, fijando la trama placa al tubo interno.

### 20 **B.3. Andamiajes tubulares múltiples**

Pueden cultivarse dos o más mallas tubulares de diámetros ligeramente diferentes por separado. La trama con el diámetro más pequeño puede insertarse dentro de aquella con el mayor y fijarse.

Para cada uno de estos métodos, pueden añadirse más capas volviendo a aplicar el método al tubo de doble capa. Los andamiajes pueden combinarse en cualquier etapa de crecimiento de las PPDC, y la incubación de los andamiajes combinados puede continuarse cuando sea deseable.

## 25 **C. Composición del aspecto de la luz del andamiaje tubular**

El aspecto de la luz de la construcción tubular puede comprender o tratarse con materiales que hacen la superficie de la luz del andamiaje tubular no trombogénica. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y sostener el crecimiento endotelial, migración y deposición de matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretano-urea segmentadas, tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden tratarse adicionalmente para hacer la superficie de la luz del andamiaje tubular no trombogénica. Tales tratamientos incluyen agentes antitrombóticos tales como heparina, y tratamientos que alteran la carga superficial del material tales como recubrimiento por plasma.

## 30 **D. Aplicación controlada de tensión multi-dimensional para ingeniería de tejido**

Biorreactores avanzados son esenciales para cumplir los complejos requisitos de la ingeniería *in vitro* de tejidos esqueléticos funcionales. Sistemas de biorreactor con la capacidad de aplicar tensiones mecánicas simultáneas complejas a matrices tridimensionales, por ejemplo, conjuntamente con control ambiental y fluido potenciado se proporcionan por Altman y col., J. Biomech. Eng., 124(6):742-749 (2002); publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2002/0062151. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un sistema de biorreactor tal puede usarse en el desarrollo de un tendón o ligamento de tejido manipulado, por ejemplo, ligamento cruzado anterior.

Según la presente invención, puede emplearse cualquier método adecuado para formar el cultivo tridimensional para que asuma la conformación del órgano natural o tejido que va a simularse. Por ejemplo, una trama preparada según la invención puede "recortarse" a un tamaño pre-seleccionado para reparación quirúrgica del tejido dañado. El recorte puede realizarse con el uso de una herramienta de corte afilada, es decir, un bisturí, unas tijeras o un dispositivo artroscópico equipado con un borde de corte, usando procedimientos muy conocidos en la técnica.

Las tramas tridimensionales pueden formarse para asumir una conformación que simula la forma de un órgano o tejido natural, tal como tejido blando que incluye, pero no se limita a, suelo pélvico, vejiga, fascia, piel, músculo, tendón, ligamento o vasculatura (por ejemplo, arterias, venas). Estas construcciones simulan las estructuras biológicas *in vivo* y pueden implantarse fácilmente para reparar hernias o para sustituir tejidos dañados o enfermos, que incluyen hernias, tendones, ligamentos, piel, músculo, vasos sanguíneos y componentes del tubo gastrointestinal, vías genitourinarias (por ejemplo, uretra, uréter).

En algunas realizaciones, las PPDC se siembran sobre el andamiaje en combinación (por ejemplo, como un co-cultivo o como capas de células separadas) con células de un fenotipo de tejido blando. Las células que van a co-inocularse con las PPDC dependerán del tejido que vaya a simularse. Por ejemplo, las PPDC pueden inocularse sobre el andamiaje con células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa bucal, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de la arteria coronaria, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria iliaca, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de la arteria umbilical, células endoteliales de la vena umbilical y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, células del estroma y otras células de tejido blando.

El andamiaje tridimensional de la invención puede usarse en injerto de piel. Preferentemente, el andamiaje tiene aproximadamente 0,5 a 3 milímetros de espesor y está en forma de una hoja plana. El andamiaje se siembra preferentemente con las PPDC. Las PPDC pueden co-inocularse con al menos uno de células epiteliales, fibroblastos dérmicos, melanocitos y queratinocitos. En algunas realizaciones, los queratinocitos forman una capa sobre la trama sembrada con PPDC. El andamiaje sembrado con PPDC comprende preferentemente al menos uno de colágeno, elastina, moléculas de adhesión intercelular, moléculas de adhesión a células neurales, laminina, factor de crecimiento de unión a heparina, fibronectina, proteoglicano, tenascina, E-cahedrina y fibrilina.

Como otro ejemplo, el andamiaje tridimensional puede usarse para generar tejido de músculo. El andamiaje se siembra preferentemente con las PPDC. Las PPDC pueden co-inocularse con al menos uno de miocitos y mioblastos.

La trama tridimensional puede modificarse de manera que el crecimiento de células y la producción de tejido sobre la misma o en su interior se potencie, o de manera que se reduzca el riesgo de rechazo del implante. Así, uno o más compuestos biológicamente activos, que incluyen, pero no se limitan a, agentes antiapoptóticos, antiinflamatorios, factores angiogénicos, inmunosupresores o factores de crecimiento, pueden añadirse a la trama.

**Usos terapéuticos para matriz extracelular o lisado celular derivado de las PPDC**

Como una alternativa a implantar las células de la invención, o tejido vivo producido a partir de las mismas, la divulgación describe un componente o producto de PPDC, tales como la matriz extracelular (ECM) o lisado celular producido por aquellas células para su uso en reparación, sustitución o aumento de tejido.

En algunas realizaciones, después de cultivarse las células de la invención *in vitro*, tal como, por ejemplo, usando un sistema de andamiaje tridimensional descrito en el presente documento, de forma que se haya secretado una cantidad deseada de ECM sobre la trama. Una vez la ECM se secreta sobre la trama, las células pueden eliminarse. En una realización de la divulgación, la ECM puede procesarse para uso posterior, por ejemplo, como preparación inyectable.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células se destruyen y se elimina el residuo celular (por ejemplo, membranas celulares) de la trama. Este proceso puede llevarse a cabo de varias formas diferentes. Por ejemplo, el tejido vivo puede congelarse criogénicamente en nitrógeno líquido sin un crioprotector, o el tejido puede sumergirse en agua destilada estéril de manera que las células explotan en respuesta a la presión osmótica. Una vez se han destruido las células, las membranas celulares pueden romperse y eliminarse el residuo celular mediante tratamiento con un aclarado con detergente suave, tal como EDTA, CHAPS o un detergente de ión bipolar. Una ventaja de usar un aclarado con detergente suave es que solubiliza proteínas unidas a la membrana, que son frecuentemente altamente antigénicas.

Alternativamente, el tejido puede digerirse enzimáticamente y/o extraerse con reactivos que rompen las membranas celulares. Ejemplo de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas (por ejemplo, desoxirribonucleasa y ribonucleasa). Ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alquilaril poliéter alcohol (TRITON® X-100), octilfenoxi polietoxi-etanol (Rohm and Haas Philadelphia, PA), BRIJ-35, un polietoxietanol lauril éter (Atlas Chemical Co., San Diego, CA), polisorbato 20 (TWEEN 20®), un monolaurato de sorbitano con polietoxietanol (Rohm and Haas), polietilen lauril éter (Rohm and Haas); y detergentes iónicos tales como, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o sin ramificar.

Andamiajes que comprenden la ECM pueden usarse terapéuticamente como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, la ECM puede recogerse del andamiaje. La recogida de la ECM puede llevarse a cabo en una variedad de formas, dependiendo, por ejemplo, de si el andamiaje es biodegradable o no biodegradable. Por ejemplo, si la trama es no biodegradable, la ECM puede eliminarse sometiendo la trama a sonicación, chorros de agua a alta presión, raspado mecánico o tratamiento suave con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de los anteriores.

Si la trama es biodegradable, la ECM puede recogerse, por ejemplo, dejando que la trama se degrade o disuelva en disolución. Alternativamente, si la trama biodegradable está compuesta por un material que puede él mismo inyectarse junto con la ECM, la trama y la ECM pueden procesarse en su totalidad para la posterior inyección. Alternativamente, la ECM puede eliminarse de la trama biodegradable por cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la recogida de ECM de una trama no biodegradable. Todos los procesos de recogida se diseñan preferentemente de manera que no se desnaturalice la ECM o lisado celular producido por las células de la invención.

Una vez se ha recogido la ECM, puede procesarse adicionalmente. La ECM puede homogeneizarse dando partículas finas usando técnicas muy conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, por sonicación, de manera que puedan pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes de ECM pueden reticularse, si se desea, por irradiación gamma. Preferentemente, la ECM puede irradiarse entre 0,25 y 2 mega rads para esterilizar y reticular la ECM. Es posible la reticulación química usando agentes que son tóxicos, tales como glutaraldehído, pero no generalmente preferida.

Los lisados celulares preparados a partir de las poblaciones de las células derivadas del posparto también tienen muchas utilidades. En una realización, se preparan lisados de células completas, por ejemplo, rompiendo las células sin la posterior separación de fracciones de células. En otra realización, se separa una fracción de membrana celular de una fracción soluble de las células por métodos rutinarios conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración o métodos similares. El uso de fracciones de células solubles *in vivo* permite usar el beneficioso medio intracelular en un paciente sin provocar rechazo o una respuesta adversa. Los métodos de lisado de células son muy conocidos en la técnica e incluyen diversos medios de rotura mecánica, rotura enzimática o rotura química, o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su medio de crecimiento y así contener factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células lavadas libres de medio en, por ejemplo, PBS u otra disolución. Las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones superiores a la densidad de población original, si se prefiere. Los lisados celulares preparados a partir de poblaciones de células derivadas del posparto pueden usarse como tales, concentrarse adicionalmente, por, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo, composiciones de proteína farmacéuticamente útiles. Pueden usarse lisados celulares *in vitro* o *in vivo*, solos o, por ejemplo, con células. En algunas realizaciones de la divulgación, los lisados celulares, si se introducen *in vivo*, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o remotamente para proporcionar, por ejemplo, factores de crecimiento celular necesarios a un paciente.

Las cantidades y/o relaciones de proteínas pueden ajustarse mezclando la ECM o lisado celular producido por las células de la invención con ECM o lisado celular de uno o varios de otros tipos de células. Además, sustancias biológicamente activas tales como proteínas, factores de crecimiento y/o fármacos pueden incorporarse en la ECM o preparación de lisado celular. Sustancias biológicamente activas a modo de ejemplo incluyen agentes antiinflamatorios y factores de crecimiento que promueven la curación y reparación de tejido. Las células pueden co-administrarse con la ECM o lisados celulares de la divulgación. Según la divulgación, la ECM o lisado celular de las PPDC pueden formularse para administración como se ha descrito anteriormente para las PPDC.

El proceso anteriormente descrito para preparar ECM inyectable o lisado celular se lleva a cabo preferentemente bajo condiciones estériles usando materiales estériles. Según la divulgación, la ECM procesada o lisado celular en un vehículo farmacéuticamente aceptable puede inyectarse intradérmica o subcutáneamente para aumentar el tejido o para reparar o corregir anomalías congénitas, defectos adquiridos o defectos cosméticos.

Ejemplos de tales afecciones son anomalías congénitas tales como microsomía hemifacial, hipoplasia malar y cigomática, hipoplasia mamaria unilateral, pecho hundido, agenesia pectoral (anomalía de Poland) e incompetencia velofaríngea secundaria a reparación de la fisura palatina o fisura palatina submucosa (como un implante retrofaríngeo); defectos adquiridos (post-traumáticos, post-quirúrgicos, post-infecciosos) tales como cicatrices, atrofia subcutánea (por ejemplo, secundaria a lupus eritematoso discoide), lesiones queratósicas, hoyuelos por acné de la cara, esclerodermia lineal con atrofia subcutánea, deformidad de la nariz en silla de montar, enfermedad de Romberg y parálisis unilateral de las cuerdas vocales; defectos cosméticos tales como líneas glabellares del ceño, pliegues nasolabiales profundos, arrugas geográficas peribucales, mejillas hundidas e hipoplasia mamaria; hernias; desgarros o roturas de un tendón o ligamento; quemaduras graves, úlceras de la piel (por ejemplo, úlceras de decúbito (presión), úlceras venosas y úlceras diabéticas) y heridas quirúrgicas tales como aquellas asociadas a la extirpación de cánceres de piel; enfermedades vasculares tales como enfermedad arterial periférica, aneurisma aórtico abdominal, enfermedad de la carótida y enfermedad venosa; enfermedades musculares (por ejemplo, miopatías congénitas; miastenia grave; enfermedades musculares inflamatorias, neurogénicas y miogénicas; y distrofias musculares tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia miotónica, distrofia muscular de cinturas, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofias musculares congénitas, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss); y sustitución y reparación de tejidos conjuntivos tales como tendones y ligamentos.

Según la divulgación, la ECM procesada en un vehículo farmacéuticamente aceptable también puede inyectarse en

tejidos internos, tales como los tejidos que definen los esfínteres del cuerpo para aumentar tales tejidos.

**Uso de las PPDC para el cribado *in vitro* de la eficacia o toxicidad del fármaco**

5 La divulgación contempla que las células y tejidos de la invención puedan usarse *in vitro* para cribar una amplia variedad de compuestos para eficacia y citotoxicidad de agentes farmacéuticos, factores de crecimiento/reguladores y agentes antiinflamatorios. Para este fin, las células de la invención, o cultivos de tejido descritos anteriormente, se mantienen *in vitro* y se exponen al compuesto que va a probarse. La actividad de un compuesto citotóxico puede medirse por su capacidad para dañar o destruir células en cultivo. Esto puede evaluarse fácilmente por técnicas de tinción vital. El efecto de los factores de crecimiento/reguladores puede evaluarse analizando el número de células vivas *in vitro*, por ejemplo, por cifras de células totales, y cifras de células diferenciales. Esto puede llevarse a cabo usando técnicas citológicas y/o histológicas estándar, que incluyen el uso de técnicas inmunocitoquímicas que emplean anticuerpos que definen antígenos celulares específicos del tipo. Puede evaluarse el efecto de diversos fármacos sobre las células de la invención tanto en cultivo en suspensión como en el sistema tridimensional descrito anteriormente.

La divulgación contempla que las células y tejidos de la invención puedan usarse como sistemas modelo para el estudio de afecciones de tejido blando.

20 La divulgación contempla que las células y tejidos de la invención también puedan usarse para estudiar el mecanismo de acción de citocinas, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, por ejemplo, IL-1, TNF y prostaglandinas. Además, pueden cribarse agentes citotóxicos y/o farmacéuticos para aquellos que son los más eficaces para un paciente particular. Agentes que demuestran ser eficaces *in vitro* podrían entonces usarse para tratar el paciente terapéuticamente.

25

**Uso de las PPDC para producir moléculas biológicas**

En otra realización de la divulgación, las células de la invención pueden cultivarse *in vitro* para producir productos biológicos con alto rendimiento. Por ejemplo, tales células, que tanto producen naturalmente un producto biológico particular de interés (por ejemplo, un factor de crecimiento, factor regulador u hormona peptídica) como se han manipulado genéticamente para producir un producto biológico, podrían expandirse clónicamente usando, por ejemplo, el sistema de cultivo tridimensional descrito anteriormente. Si las células secretan el producto biológico en el medio nutritivo, el producto puede aislarse fácilmente del medio agotado o acondicionado usando técnicas de separación estándar, por ejemplo, tales como precipitación diferencial de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, filtración en cromatografía en gel, electroforesis y cromatografía líquida de alta resolución. Puede usarse un "biorreactor" para aprovechar el método de flujo para alimentar, por ejemplo, un cultivo tridimensional *in vitro*.

35

Esencialmente, a medida que el medio fresco se pasa a través del cultivo tridimensional, el producto biológico se lava del cultivo y puede entonces aislarse del flujo de salida, como antes.

40

Alternativamente, un producto biológico de interés puede quedar dentro de la célula y, así, su recogida puede requerir que las células se lisen. El producto biológico puede entonces purificarse usando una cualquiera o más de las técnicas anteriormente enumeradas.

45 **Kits**

Las PPDC y componentes y productos de las mismas pueden emplearse convenientemente como parte de un kit, por ejemplo, para cultivo o implantación. Por consiguiente, la invención proporciona un kit que incluye las PPDC de la invención y componentes adicionales, tales como una matriz (por ejemplo, un andamiaje), agentes hidratantes (por ejemplo, soluciones salinas fisiológicamente compatibles, medios de cultivo celular preparados), sustratos de cultivo celular (por ejemplo, placas de cultivo, placas, viales, etc.), medios de cultivo celular (tanto en forma líquida como en polvo), compuestos antibióticos, hormonas y similares. Aunque el kit puede incluir cualquiera de tales componentes, preferentemente incluye todos los componentes necesarios para su uso previsto. Si se desea, el kit también puede incluir células (normalmente criopreservadas), que pueden sembrarse en la red cristalina como se describe en el presente documento.

55

En otro aspecto, la invención proporciona kits que utilizan las PPDC y poblaciones de PPDC en diversos métodos para el aumento, regeneración y reparación como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, que incluyen al menos las PPDC y un vehículo farmacéuticamente aceptable (líquido, semi-sólido o sólido). Los kits también pueden incluir opcionalmente un medio de administración de las células, por ejemplo, mediante inyección. Los kits pueden incluir adicionalmente instrucciones para el uso de las células. Kits preparados para el uso en hospitales de campaña, tales como para uso militar, pueden incluir suministros de procedimiento completo que incluyen andamiajes de tejido, suturas quirúrgicas y similares, si las células van a usarse conjuntamente con la reparación de lesiones agudas. Los kits para ensayos y métodos *in vitro* como se describen en el presente documento pueden contener uno o más de (1) las PPDC o componentes o productos de las PPDC, (2) reactivos para poner en práctica el método *in vitro*, (3) otras células o poblaciones de

65

células, según convenga, y (4) instrucciones para realizar el método *in vitro*.

### **Criopreservación y almacenamiento en banco de las PPDC**

5 Las PPDC de la invención pueden criopreservarse y mantenerse o almacenarse en un “banco de células”. La criopreservación de células de la invención puede llevarse a cabo según métodos conocidos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las células pueden suspenderse en un “medio de congelación” tal como, por ejemplo, medio de cultivo que comprende además 0 al 95 por ciento de FBS y 0 al 10 por ciento de sulfóxido de dimetilo (DMSO), con o sin 5 al 10 por ciento de glicerol, a una densidad, por ejemplo, de aproximadamente  $0,5$  a  $10 \times 10^6$  células por mililitro. El medio de criopreservación puede comprender agentes de criopreservación que incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa. Las células se dispensan en ampollas de vidrio o de plástico que entonces se tapan y transfieren a la cámara de congelación de un congelador de velocidad controlada. La velocidad óptima de congelación puede determinarse empíricamente. Un congelador de velocidad programable, por ejemplo, puede dar un cambio en temperatura de  $-1$  a  $-10$  °C por minuto. La temperatura de criopreservación preferida es aproximadamente  $-80$  °C a aproximadamente  $-180$  °C, más preferentemente es aproximadamente  $-90$  °C a aproximadamente  $-160$  °C, y lo más preferentemente es aproximadamente  $-125$  a aproximadamente  $-140$  °C. Las células criopreservadas se transfieren preferentemente a nitrógeno líquido antes de descongelarse para su uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez las ampollas han alcanzado aproximadamente  $-90$  °C, se transfieren a un área de almacenamiento en nitrógeno líquido. Las células criopreservadas pueden almacenarse durante un periodo de años.

Las células criopreservadas de la invención constituyen un banco de células, porciones de las cuales pueden “sacarse” descongelando y luego usarse según se necesite. La descongelación debe llevarse a cabo generalmente rápidamente, por ejemplo, transfiriendo una ampolla del nitrógeno líquido a un baño de agua a  $37$  °C. Los contenidos descongelados de la ampolla deben transferirse inmediatamente bajo condiciones estériles a un recipiente de cultivo que contiene un medio apropiado tal como DMEM acondicionado con 10 por ciento de FBS.

En otro aspecto más, la invención también proporciona el almacenamiento en banco de tejidos, células y las poblaciones de células de la invención. Como se trata anteriormente, las células se criopreservan fácilmente. La divulgación, por tanto, proporciona métodos de criopreservación de las células en un banco, en el que las células se almacenan congeladas y asociadas a una caracterización completa de las células basada en propiedades inmunológicas, bioquímicas y genéticas de las células. Las células así congeladas pueden usarse para terapia autóloga, singénica o alógena, dependiendo de los requisitos del procedimiento y las necesidades del paciente. Preferentemente, la información sobre cada muestra criopreservada se almacena en un ordenador, que puede buscarse basándose en los requisitos del cirujano, procedimiento y paciente con coincidencias adecuadas que se hacen basándose en la caracterización de las células o poblaciones. Preferentemente, las células de la invención se cultivan y expanden a la cantidad deseada de células y se preparan composiciones de células terapéuticas bien por separado o bien como co-cultivos, en presencia o ausencia de una matriz o soporte. Aunque para algunas aplicaciones puede ser preferible usar células recién preparadas, el resto puede criopreservarse y almacenarse en un banco congelando las células y entrando la información en el ordenador para asociar la entrada del ordenador con las muestras. Incluso si es necesario hacer coincidir una fuente o donante con un receptor de tales células, para fines inmunológicos, el sistema del banco facilita hacer coincidir, por ejemplo, propiedades bioquímicas o genéticas deseables de las células depositadas en banco con las necesidades terapéuticas. Tras coincidir las propiedades deseadas con una muestra almacenada en el banco, la muestra se recupera, y se prepara para uso terapéutico. Los lisados celulares o componentes preparados como se describe en el presente documento también pueden preservarse (por ejemplo, criopreservarse, liofilizarse) y almacenarse en el banco según la presente divulgación.

Los siguientes ejemplos describen varios aspectos de realizaciones de la invención en mayor detalle. Estos ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente, no para limitar, aspectos de la invención descritos en el presente documento.

### **EJEMPLOS**

#### **EJEMPLO 1**

##### **Derivación de células de tejidos posparto**

El objetivo de este estudio era derivar poblaciones de células de tejidos placentario y del cordón umbilical. Se obtuvieron cordón umbilical y placenta posparto tras el parto de tanto embarazo a término como prematuro. Las células se recogieron de 5 donantes separados de cordón umbilical y tejido placentario. Se probaron diferentes métodos de aislamiento de las células para su capacidad para dar células con: 1) el potencial de diferenciarse en células con diferentes fenotipos, o 2) el potencial para proporcionar factores tróficos críticos útiles para otras células y tejidos.

65

**Métodos y materiales**

**Derivación de células del cordón umbilical.** Se obtuvieron cordones umbilicales del National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA). Los tejidos se obtuvieron tras partos normales. Se realizó asépticamente el protocolo de aislamiento de las células en una campana de flujo laminar. Para eliminar sangre y residuos, el cordón umbilical se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicótico y antibiótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B) (Invitrogen Carlsbad, CA). Entonces, los tejidos se disociaron mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm<sup>2</sup> en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-baja glucosa o DMEM-alta glucosa; Invitrogen) hasta que el tejido se trituró en una fina pulpa. Los tejidos cortados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo). Entonces, el tejido se digirió en tanto medio de DMEM-baja glucosa como medio de DMEM-alta glucosa, conteniendo cada uno antimicótico y antibiótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen)) y enzimas de digestión. En algunos experimentos, se usó una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C:D;" colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 unidades/mililitro; y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro en medio de DMEM-baja glucosa). En otros experimentos se usó una mezcla de colagenasa, dispasa e hialuronidasa ("C:D:H") (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro; e hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro, en DMEM-baja glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, medio y enzimas de digestión se incubaron a 37 °C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 h.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, y el sobrenadante se aspiró. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) de suero bovino fetal (FBS; suero bovino definido; Lote n° AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramo/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramo/mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA). La suspensión de células se filtró a través de un filtro de células de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences). Se pasó un aclarado de 5 mililitros adicional que comprendía medio de crecimiento a través del tamiz. Entonces, la suspensión de células se pasó a través de un filtro de células de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences) y se cazó con un aclarado de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

El filtrado se resuspendió en medio de crecimiento (volumen total 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró, y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

Tras la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento fresco. El número de células viables se determinó usando tinción con azul de tripano. Entonces, las células se cultivaron bajo condiciones estándar.

Las células aisladas de células del cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> sobre matraces T-75 cm<sup>2</sup> recubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) de suero bovino definido (Hyclone, Logan, UT; Lote n° AND18475), 0,001 por ciento (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen)). Después de aproximadamente 2-4 días, el medio agotado se aspiró de los matraces. Las células se lavaron con PBS tres veces para eliminar residuos y células derivadas de la sangre. Entonces, las células se repusieron con medio de crecimiento y se dejó que crecieran a confluencia (aproximadamente 10 días desde el pase 0 hasta el pase 1). En pases posteriores (del pase 1 a 2, etc.), las células alcanzaron la sub-confluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pases posteriores, las células se sembraron a 5000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron en una estufa de incubación humidificada con 5 por ciento de dióxido de carbono y 20 por ciento de oxígeno a 37 °C.

**Aislamiento de células placentarias.** Se obtuvo tejido placentario del NDRI (Philadelphia, PA). Los tejidos fueron de una embarazada y se obtuvieron en el momento de un parto quirúrgico normal. Se aislaron las células placentarias como se ha descrito para el aislamiento de células del cordón umbilical.

El siguiente ejemplo se aplica al aislamiento de poblaciones separadas de células derivadas de la madre y derivadas del neonato de tejido placentario.

Se realizó el protocolo de aislamiento de células asépticamente en una campana de flujo laminar. El tejido placentario se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicótico y antibiótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramo/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramo/mililitro de anfotericina B; Invitrogen) para eliminar sangre y residuos. A continuación, el tejido placentario se diseccionó en tres secciones: línea superior (lado o aspecto neonatal), línea media (aislamiento de células mixtas de la región neonatal y materna o vellosa) y línea inferior (lado o aspecto maternal).

Las secciones separadas se lavaron individualmente varias veces en PBS con antibiótico/antimicótico para eliminar

adicionalmente sangre y residuos. Entonces, cada sección se disoció mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm<sup>2</sup> en presencia de 50 mililitros de DMEM-baja glucosa (Invitrogen) dando una pulpa fina. La pulpa se transfirió a tubos cónicos de 50 mililitros. Cada tubo contuvo aproximadamente 5 gramos de tejido. El tejido se digirió en tanto medio de DMEM-baja glucosa como DMEM-alta glucosa que contenía antimicótico y antibiótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen)) de PBS y enzimas de digestión. En algunos experimentos se usó una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C:D") que contenía colagenasa (Sigma, St Louis, MO) a 500 unidades/mililitro y dispasa (Invitrogen) a 50 unidades/mililitro en medio de DMEM-baja glucosa. En otros experimentos se usó una mezcla de colagenasa, dispasa e hialuronidasa (C:D:H) (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro; e hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro en DMEM-baja glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, medio y enzimas de digestión se incubaron durante 2 h a 37 °C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, el sobrenadante resultante se separó por aspiración. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Invitrogen), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS; suero bovino definido; Lote n° ND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), antibiótico/antimicótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen)). La suspensión de células se filtró a través de un filtro de células de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences), se cazó por un aclarado con 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento. La suspensión de células total se pasó a través de un filtro de células de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences), seguido de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento como aclarado.

El filtrado se resuspendió en medio de crecimiento (volumen total 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se resuspendió en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más. Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento fresco. Se determinó una cifra de células usando la prueba de exclusión con azul de tripano. Entonces, las células se cultivaron a condiciones estándar.

**Aislamiento de células con LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN).** Se aislaron células del cordón umbilical en medio de DMEM-baja glucosa con LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianápolis, IN) e hialuronidasa (5 unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue como se ha descrito para otras digestiones con proteasa anteriores usando una mezcla de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN)/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C:D o C:D:H. La digestión de tejido con LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) produjo el aislamiento de las poblaciones de células de tejidos posparto que se expandieron fácilmente.

**Aislamiento de células usando otras combinaciones de enzimas.** Se compararon los procedimientos para aislar células del cordón umbilical usando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión incluyeron: i) colagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla de colagenasa:dispasa (C:D); v) mezcla de colagenasa:hialuronidasa (C:H); vi) mezcla de dispasa:hialuronidasa (D:H); y vii) mezcla de colagenasa:dispasa:hialuronidasa (C:D:H). Se observaron diferencias en el aislamiento de las células utilizando estas diferentes condiciones de digestión con enzimas (Tabla 1-1).

**Aislamiento de células de sangre residual en los cordones.** Se hicieron intentos para aislar conjuntos de células del cordón umbilical por diferentes enfoques. En un caso, se cortó en rebanadas el cordón umbilical y se lavó con medio de crecimiento para desplazar los coágulos de sangre y material gelatinoso. La mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de crecimiento se recogió y se centrifugó a 150 x g. El sedimento se resuspendió y se sembró sobre matraces recubiertos de gelatina en medio de crecimiento. De estos experimentos se aisló una población de células que se expandió fácilmente.

**Aislamiento de células de sangre del cordón.** También se han aislado células de muestras de sangre del cordón obtenidas de NDRI. El protocolo de aislamiento usado aquí fue el de la solicitud de patente internacional PCT/US02/29971 por Ho y col. Se mezclaron muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre del cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) con tampón de lisis (cloruro de amonio 155 milimolar esterilizado por filtración, bicarbonato potásico 10 milimolar, EDTA 0,1 milimolar tamponado a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron a una relación de 1:20 de sangre del cordón con respecto a tampón de lisis. La suspensión de células resultante se agitó con vórtex durante 5 segundos, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 x g). El sedimento de células se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contenía 10 por ciento de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), glutamina 4 milimolar (Mediatech Herndon, VA ), 100 unidades de penicilina por 100 mililitros y 100 microgramos de estreptomina por 100 mililitros (Gibco, Carlsbad, CA). Las células resuspendidas se centrifugaron (10 minutos a 200 x g), el sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en tanto matraces T75 (Corning, NY), matraces T75 recubiertos de laminina, como matraces T175 recubiertos de fibronectina (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

**Aislamiento de células derivadas del posparto usando combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento diferentes.** Para determinar si las poblaciones de células pueden aislarse bajo diferentes condiciones y expandirse bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células se digirieron en medio de crecimiento con o sin 0,001 por ciento (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), usando la combinación de enzimas C:D:H, según los procedimientos proporcionados anteriormente. Células derivadas de la placenta así aisladas se sembraron bajo una variedad de condiciones. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina/estreptomycin. (Tabla 1-2).

**Aislamiento de células derivadas del posparto usando combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento diferentes.** En todas las condiciones, las células se unieron y se expandieron bien entre el pase 0 y 1 (Tabla 1-2). Se demostró que las células en las condiciones 5 a 8 y 13 a 16 proliferaron bien hasta 4 pases después de sembrarse, momento en el que se criopreservaron. Todas las células se almacenaron en el banco.

**Resultados**

**Aislamiento de células usando combinaciones de enzimas diferentes.** La combinación de C:D:H proporcionó el mejor rendimiento de células tras el aislamiento y generó células que se expandieron durante muchas más generaciones en cultivo que las otras condiciones (Tabla 1-1). No se obtuvo una población de células expandible usando colagenasa o hialuronidasa solas. No se hizo intento por determinar si este resultado era específico para el colágeno que se probó.

**Aislamiento de células derivadas del posparto usando combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento diferentes.** Las células se unieron y se expandieron bien entre el pase 0 y 1 bajo todas las condiciones probadas para la digestión y crecimiento de enzimas (Tabla 1-2). Las células en las condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se criopreservaron. Todas las células se almacenaron en el banco.

**Aislamiento de células de sangre residual en los cordones.** Las células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron por citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas por digestión de enzimas.

**Aislamiento de células de sangre del cordón.** Las preparaciones contuvieron glóbulos rojos y plaquetas. No se unieron células nucleadas ni se dividieron durante las primeras 3 semanas. El medio se cambió 3 semanas después de sembrarse y no se observó que se unieran ni crecieran células.

**Resumen.** Pueden aislarse poblaciones de células del cordón umbilical y tejido placentario lo más eficazmente usando la combinación de enzimas colagenasa (una metaloproteasa de matriz), dispasa (proteasa neutra) e hialuronidasa (una enzima mucolítica que rompe el ácido hialurónico). También puede usarse LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN), que es una Blendzyme. En el presente estudio también se usó Blendzyme 3 que es colagenasa (4 unidades de Wunsch/g) y termolisina (1714 unidades de caseína/g) junto con hialuronidasa para aislar células. Estas células se expanden fácilmente durante muchos pases cuando se cultivan en medio de crecimiento sobre plástico recubierto de gelatina.

Se aislaron células derivadas del posparto de sangre residual en los cordones pero no de la sangre del cordón. La presencia de células en coágulos de sangre lavados del tejido que se adhieren y crecen en las condiciones usadas puede ser debida a células que se liberaron durante el proceso de disección.

**Tabla 1-1:** Aislamiento de células de tejido del cordón umbilical usando combinaciones de enzimas variables

Encima digestiva	Células aisladas	Expansión celular
Colagenasa	X	X
Dispasa	+(>10h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa: Dispasa	++ (<3h)	++
Colagenasa: Hialuronidasa	++ (<3h)	+
Dispasa: Hialuronidasa	+(>10h)	+
Colagenasa: Dispasa: Hialuronidasa	+++ (<3h)	+++

Clave: + = bueno, ++ = muy bueno, +++ = excelente, X = sin éxito

**Tabla 1-2:** Aislamiento y expansión del cultivo de células derivadas del posparto bajo condiciones variables:

Condición	Medio	15%FBS	BME	Gelatina	20%O2	Factores de crecimiento
1	DMEM-Lg	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-Lg	Y	Y	Y	N (5%)	N
3	DMEM-Lg	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-Lg	Y	Y	N	N (5%)	N
5	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N(Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/mL)
6	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N(Laminina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/mL)
7	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N(Fibronectina)	Y	PDGF/VEGF
8	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N(Fibronectina)	N (5%)	PDGF/VEGF
9	DMEM-Lg	Y	N	Y	Y	N
10	DMEM-Lg	Y	N	Y	N (5%)	N
11	DMEM-Lg	Y	N	N	Y	N
12	DMEM-Lg	Y	N	N	N (5%)	N
13	DMEM-Lg	N (2%)	N	N(Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/mL)
14	DMEM-Lg	N (2%)	N	N(Laminina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/mL)
15	DMEM-Lg	N (2%)	N	N(Fibronectina)	Y	PDGF/VEGF
16	DMEM-Lg	N (2%)	N	N(Fibronectina)	N (5%)	PDGF/VEGF

**Referencia**

1. HO, Tony, W.; KOPEN, Gene, C.; RIGHTER, William, F.; RUTKOWSKI, J., Lynn; HERRING, W., Joseph; RAGAGLIA, Vanessa; WAGNER, Joseph WO2003025149 A2 CELL POPULATIONS WHICH CO-EXPRESS CD49C AND CD90, NEURONYX, INC. Solicitud n° PCT/LTS02/29971 US, presentada 20020920, A2 publicada 20030327, A3 publicada 20031218.

**EJEMPLO 2**

**Evaluación de medios de crecimiento para células derivadas del posparto**

Se evaluaron varios medios de cultivo celular para su capacidad para soportar el crecimiento de células derivadas de la placenta. El crecimiento de células derivadas de la placenta en oxígeno normal (20 %) y bajo (5 %) se evaluó después de 3 días usando el ensayo colorimétrico con MTS.

**Métodos y material**

Se sembraron células derivadas de la placenta en el pase 8 (P8) a  $1 \times 10^3$  células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (Cat. n° SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)). Después de 8 horas, el medio se cambió como se describe en la Tabla 2-1, y las células se incubaron en oxígeno normal (20 %, v/v) o bajo (5 %, v/v) a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Se añadió MTS al medio de cultivo (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI) durante 3 horas y la absorbancia se midió a 490 nanómetros (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

**Tabla 2-1 Medio de cultivo**

Medio de cultivo	Proveedor	Serum fetal bovino añadido % (v/v)
DMEM-baja glucosa	Gibco Carlsbad CA	0, 2, 10
DMEM-alta glucosa	Gibco	0, 2, 10
RPMI 1640	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
Células sin-gro (Sin serum, sin proteína)	Mediatech, Inc.	-
F 10 de Ham	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
MSCGM (completa con serum)	Cambrex, Waltersville, MD	0, 2, 10
Completo sin serum con albumina	Mediatech, Inc.	-
Crecimiento medio	NA	-
F12 de Ham	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
De Iscove	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
Medio basa de Eagle	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
DMEM/F12 (1:1)	Mediatech, Inc.	0, 2, 10

**Resultados**

Las curvas patrón para el ensayo de MTS establecieron una correlación lineal entre un aumento en la absorbancia y un aumento en el número de células. Los valores de absorbancia obtenidos se convirtieron en números de células estimados y se calculó el cambio (%) con respecto a la siembra inicial.

**El efecto del suero.** La adición de suero a los medios a condiciones de oxígeno normal produjo un aumento dependiente de la dosis reproducible en la absorbancia y así el número de células viables. La adición de suero a MSCGM completo produjo una disminución dependiente de la dosis en la absorbancia. En los medios sin suero añadido, las células crecieron en Cellgro, Ham F10 y DMEM.

**El efecto del oxígeno.** Pareció que el oxígeno reducido aumentó la tasa de crecimiento de células en medio de crecimiento, Ham F10 y MSCGM.

Al disminuir el orden de crecimiento, los medios que produjeron el mejor crecimiento de las células fueron medio de crecimiento >MSCGM> Iscove + 10 % de FBS = DMEM-HG + 10 % de FBS = Ham F12 +10 % de FBS = RPMI 1640 +10 % de FBS.

**Resumen.** Las células derivadas del posparto pueden cultivarse en una variedad de medios de cultivo en oxígeno normal o bajo. El crecimiento a corto plazo de las células derivadas de la placenta se determinó en 12 medios basales con 0, 2 y 10 % (v/v) de suero en 5 % o 20 % de O<sub>2</sub>. En general, las células derivadas de la placenta no crecieron en condiciones sin suero, con las excepciones de sin Ham F10 y Cellgro, que también están libres de proteína. El crecimiento en estos medios sin suero fue aproximadamente del 25-33 % del crecimiento máximo observado con medio de crecimiento que contenía 15 % de suero. Este estudio demuestra que las células derivadas de la placenta pueden cultivarse en condiciones sin suero y que el medio de crecimiento es uno de los varios medios (10 % de suero en medios Iscove, RPMI o Ham F12) que puede usarse para cultivar células derivadas de la placenta.

El medio sin suero más prometedor fue CELLGRO-FREE, un medio sin suero y proteína sin hormonas o factores de crecimiento, que se diseña para el crecimiento de células de mamífero *in vitro* (información de producto de Mediatech).

El medio sin suero completo también desarrollado para cultivo sin suero no fue tan eficaz en soportar el crecimiento de las células derivadas de la placenta. El medio sin suero completo se desarrolló por Mediatech, basándose en una mezcla 50/50 de DMEM/F12 con porcentajes más pequeños de RPMI 1640 y McCoy's 5A. Este medio también contiene oligoelementos seleccionados e hidratos de carbono de alto peso molecular, vitaminas adicionales, una fuente de proteína no animal y una pequeña cantidad de BSA (1 gramo/litro). No contiene ninguna insulina, transferrina, colesterol, o factor de crecimiento o de unión. Es bicarbonato tamponado para su uso con 5 % de CO<sub>2</sub>. Originalmente se diseñó para hibridomas y líneas celulares en suspensión, puede ser adecuado para algunas líneas celulares dependientes del anclaje.

**EJEMPLO 3****Crecimiento de células derivadas del posparto en medio que contiene D-valina**

Se ha informado que el medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma de L-valina normal puede usarse para inhibir selectivamente el crecimiento de células de tipo fibroblasto en cultivo (Hongpaisan, 2000; Sordillo *y col.*, 1988). Se evaluó el crecimiento de células derivadas del posparto en medio que contenía D-valina en ausencia de L-valina.

**Métodos y materiales**

Se sembraron células derivadas de la placenta (P3), fibroblastos (P9) y células derivadas del cordón umbilical (P5) a  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos de gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas, el medio se eliminó y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se sustituyó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (pedido especial Gibco), 15 % (v/v) de suero bovino fetal dializado (Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)).

**Resultados**

Las células derivadas de la placenta, derivadas del cordón umbilical y de fibroblasto sembradas en el medio que contenía D-valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medio de crecimiento que contiene suero dializado. Los fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando en tamaño y cambiando de forma. Todas las células murieron y con el tiempo se desprendieron de la superficie del matraz después de 4 semanas.

**Resumen.** Las células derivadas del posparto requieren L-valina para el crecimiento celular y para la viabilidad a largo plazo. La L-valina no se elimina preferentemente del medio de crecimiento para células derivadas del posparto.

## Referencias

Hongpaisan J. (2000) Inhibition of proliferation of contaminating fibroblasts by D-valine in cultures of smooth muscle cells from human myometrium. *Cell Biol Int.* 24:1-7.

Sordillo LM, Oliver SP, Akers RM. (1988) Culture of bovine mammary epithelial cells in D-valine modified medium: selective removal of contaminating fibroblasts. *Cell Biol Int Rep.* 12:355-64.

## EJEMPLO 4

### Medios de criopreservación para células derivadas del posparto

El objetivo de este estudio era determinar un medio de criopreservación adecuado para la criopreservación de células derivadas del posparto.

#### Métodos y materiales

Se lavaron células derivadas de la placenta cultivadas en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (Cat. nº SH30070.03, Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramo/mililitro de estreptomina (Gibco)), en un matraz T75 recubierto de gelatina, con solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco) y se tripsinaron usando 1 mililitro de tripsina/EDTA (Gibco). La tripsinación se detuvo añadiendo 10 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g, se retiró el sobrenadante, y el sedimento de las células se resuspendió en 1 mililitro de medio de crecimiento. Se tomó una alícuota de la suspensión de células, 60 microlitros, y se añadió a 60 microlitros de azul de tripano (Sigma). El número de células viables se estimó usando un hemocitómetro. La suspensión de células se dividió en cuatro alícuotas iguales, conteniendo cada una  $88 \times 10^4$  células cada una. La suspensión de células se centrifugó y se resuspendió en 1 mililitro de cada uno de los siguientes medios y se transfirió a crioviales (Nalgene).

- 1.) Medio de crecimiento + 10 % (v/v) de DMSO (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO)
- 2.) Medio de congelación de células con DMSO, con metilcelulosa, sin suero (C6295, Sigma, St. Louis, MO)
- 3.) Medio de congelación de células sin suero (C2639, Sigma, St. Louis, MO)
- 4.) Medio de congelación de células con glicerol (C6039, Sigma, St. Louis, MO)

Las células se enfriaron a aproximadamente 1 °C/min durante la noche en un congelador a -80 °C usando un recipiente de congelación "Mr Frosty" según las instrucciones del fabricante (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de células se transfirieron a nitrógeno líquido durante 2 días antes de descongelarlos rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Las células se añadieron a 10 mililitros de medio de crecimiento y se centrifugaron antes de estimar el número de células y la viabilidad como antes. Las células se sembraron sobre matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup> para determinar si las células se unirían y proliferarían.

#### Resultados

Se evaluó que la viabilidad inicial de las células a ser criopreservadas por tinción con azul de tripano era del 100 %.

Hubo una reducción proporcional en el número de células con viabilidad para C6295 debido a la lisis de las células. Las células viables criopreservadas en las cuatro disoluciones se unieron, se dividieron y produjeron una monocapa confluyente en el plazo de 3 días. No hubo diferencia discernible en la tasa de crecimiento estimada.

**Resumen.** La criopreservación de células es un procedimiento disponible para la preparación de un banco de células o un producto de célula. Se compararon cuatro mezclas de criopreservación para su capacidad para proteger células derivadas de la placenta humanas del daño por congelación. El medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y 10 % (v/v) de sulfóxido de dimetilo (DMSO) es el medio preferido de aquellos comparados para criopreservación de células derivadas de la placenta.

## EJEMPLO 5

### Características de crecimiento de células derivadas del posparto

Se comparó el potencial de expansión de células de células derivadas del posparto con otras poblaciones de citoblastos aislados. El arte de expansión de células hasta la senescencia se denomina límite de Hayflick (Hayflick L. The longevity of cultured human cells. *J. Am. Geriatr. Soc.* 22(1):1-12, 1974; Hayflick L. The strategy of senescence. *Gerontologist* 14(1):37-45), 1974). Las células derivadas del posparto son altamente aptas para uso terapéutico

debido a que pueden expandirse fácilmente a números de células suficientes.

### **Material y métodos**

5 **Matraces recubiertos de gelatina.** Se recubrieron matraces de plástico de cultivo de tejido añadiendo 20 mililitros de 2 % (peso/volumen) de gelatina porcina (Tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a un matraz T75 (Corning, Corning, NY) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la disolución de gelatina, se añadieron 10 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y luego se aspiraron.

10 **Comparación del potencial de expansión de células derivadas del posparto con otras poblaciones de células.** Para la comparación del potencial de expansión por crecimiento, se utilizaron las siguientes poblaciones de células: i) Citoblastos mesenquimatosos (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) Células derivadas de adiposas (patente de EE.UU. n° 6.555.374 B1; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° S2004/0058412); iii) 15 Fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); iv) Células derivadas del cordón umbilical; y v) Células derivadas de la placenta. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm<sup>2</sup> sobre matraces T75 recubiertos de gelatina en medio de crecimiento de DMEM-baja glucosa ((Invitrogen, Carlsbad, CA), con 15 % (v/v) de suero bovino definido (Hyclone, Logan, UT; Lote n° AND18475), 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). Para los pases posteriores, los cultivos celulares se trataron del siguiente modo. Después de la tripsinación, las células viables se contaron después de la tinción con azul de tripano. La suspensión de células (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). Se estimaron los números de células viables usando un hemocitómetro.

25 Tras el recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> sobre matraces T75 recubiertos de gelatina en 25 mililitros de medio de crecimiento fresco. Las células se cultivaron bajo atmósfera estándar con 5 % de dióxido de carbono a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia, se sometieron a pases; este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron la senescencia.

30 En cada pase, las células se tripsinaron y se contaron. Se calcularon el rendimiento de células viables, duplicación de la población [ $\ln(\text{célula final}/\text{célula inicial})/\ln 2$ ] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/ duplicación de la población). Para los fines de determinar la expansión óptima de células, se determinó el rendimiento de células total por pase multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el factor de expansión para cada pase (es decir, 35 factor de expansión = célula final/ célula inicial).

**Potencial de expansión de los bancos de células a baja densidad.** También se probó el potencial de expansión de las células almacenadas en el banco en el pase 10. Se usó un conjunto diferente de condiciones. Se probaron 40 fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas del cordón umbilical y células derivadas de la placenta. Estas poblaciones de células se habían almacenado en el banco en el pase 10 previamente, que se habían sembrado a 5.000 células/cm<sup>2</sup> y cultivado a confluencia en cada pase hasta ese momento. Se determinó el efecto de la densidad celular sobre las poblaciones de células tras la descongelación de las células en el pase 10. Las células se descongelaron bajo condiciones estándar, se contaron usando tinción con azul de tripano. Entonces, las células descongeladas se sembraron a 1.000 células/cm<sup>2</sup> en medio 45 de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 15 por ciento (v/v) de suero bovino definido (Hyclone, Logan, UT; Lote n° AND18475), 0,001 por ciento de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA)). Las células se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces a la semana y las células se sometieron a pases ya que alcanzaron 50 aproximadamente el 85 % de confluencia. Las células se sometieron posteriormente a pases hasta la senescencia, es decir, hasta que ya no pudieron expandirse más. Las células se tripsinaron y se contaron en cada pase. Se calcularon el rendimiento de las células, duplicación de la población ( $\ln(\text{célula final}/\text{célula inicial})/\ln 2$ ) y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población). El rendimiento de células total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de 55 expansión = célula final/célula inicial).

**Expansión de células derivadas del posparto a baja densidad a partir de la siembra de células inicial.** Se probó en otro experimento el potencial de expansión de cultivos de células derivadas del posparto recién aisladas bajo condiciones de baja siembra de células. Se aislaron células derivadas del cordón umbilical y de la placenta como se describe en el presente documento. Las células se sembraron a 1000 células/cm<sup>2</sup> y se sometieron a pases como se ha descrito anteriormente hasta la senescencia. Las células se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se sometieron a pases cuando alcanzaron aproximadamente el 85 % de confluencia. En cada pase, las células se tripsinaron y se contaron por tinción con azul de tripano. Se calcularon el rendimiento de células, duplicación de la población ( $\ln(\text{célula final}/\text{célula inicial})/\ln 2$ ) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población) para cada pase. El rendimiento de células total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase previo por el

factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = célula final/célula inicial). Las células se cultivaron sobre matraces recubiertos de gelatina y sin gelatina.

**Expansión de células derivadas de la placenta neonatales o maternas clónicas.** Puede usarse clonación con el fin de expandir una población de células neonatales o maternas satisfactoriamente a partir de tejido placentario. Tras el aislamiento de tres poblaciones de células diferentes de la placenta (aspecto neonatal, aspecto materno y región vellosa), estas poblaciones de células se expanden bajo condiciones de crecimiento estándar y a continuación se cariotipan para revelar la identidad de las poblaciones de células aisladas. Aislando las células de una madre que da a luz a un niño, es posible distinguir entre los cromosomas masculinos y femeninos realizando extensiones de metafase. Estos experimentos pueden usarse para demostrar que las células de la línea superior son de cariotipo positivo para el fenotipo neonatal, las células de la línea media son de cariotipo positivo para tanto fenotipos neonatales como maternos, y las células de la línea inferior son de cariotipo positivo para células maternas.

**Expansión de células en condiciones de cultivo de condiciones de oxígeno bajo.** Se ha demostrado que las condiciones de cultivo celular de O<sub>2</sub> bajo pueden mejorar la expansión de células en ciertas circunstancias (Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J.; McKay, Ron; Studer, Lorenz. Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. US20040005704). Con el fin de determinar si la expansión de células derivadas del posparto podría mejorarse alterando las condiciones del cultivo celular, se cultivaron cultivos de células derivadas del cordón umbilical en condiciones de oxígeno bajo. Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento sobre matraces recubiertos de gelatina. Las células se cultivaron inicialmente bajo condiciones atmosféricas estándar hasta el pase 5, momento en el que se transfirieron a condiciones de cultivo de oxígeno bajo (5 % de O<sub>2</sub>).

**Evaluación de otras condiciones de crecimiento.** En otros experimentos, células derivadas del posparto se expandieron sobre placas sin recubrir, recubiertas de colágeno, recubiertas de fibronectina, recubiertas de laminina y recubiertas de proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA)). Se ha demostrado que los cultivos se expanden bien sobre estas matrices diferentes.

### Resultados

**Comparación del potencial de expansión de células derivadas del posparto frente a otras poblaciones de citoblastos y no citoblastos.** Tanto las células derivadas del cordón umbilical como derivadas de la placenta se expandieron durante más de 40 pases generando rendimientos de células de > 1E17 células en 60 días. A diferencia, las MSC y los fibroblastos senescieron después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas de adiposas como epiloicas se expandieron durante casi 60 días, generaron rendimientos de células totales de 4,5E12 y 4,24E13, respectivamente. Así, cuando se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> bajo las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas del posparto se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células cultivados bajo las mismas condiciones (Tabla 5-1).

**Expansión del potencial de bancos de células a baja densidad.** Células derivadas del cordón umbilical, derivadas de la placenta y de fibroblasto se expandieron durante más de 10 pases generando rendimientos de células de > 1E11 células en 60 días (Tabla 5-2). Después de 60 días bajo estas condiciones, los fibroblastos se volvieron senescentes, mientras que las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical y derivadas de la placenta senescieron después de 80 días, completando > 50 y > 40 duplicaciones de la población, respectivamente.

**Expansión de células derivadas del posparto a baja densidad a partir de la siembra de células inicial.** Se sembraron células derivadas del posparto a baja densidad (1.000 células/cm<sup>2</sup>) sobre placas o matraces recubiertos de gelatina y sin recubrir. El potencial de crecimiento de estas células bajo estas condiciones fue bueno. Las células se expandieron fácilmente en un crecimiento de fase logarítmica. La tasa de expansión de células fue similar a la observada cuando las células derivadas del posparto se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> sobre matraces recubiertos de gelatina en medio de crecimiento. No se observaron diferencias en el potencial de expansión de células entre el cultivo sobre tanto matraces sin recubrir como matraces recubiertos de gelatina. Sin embargo, las células parecieron fenotípicamente mucho más pequeñas sobre los matraces recubiertos de gelatina, y se observaron más fenotipos de células más grandes sobre matraces sin recubrir.

**Expansión de células derivadas de la placenta neonatales o maternas clónicas.** Puede expandirse una población de células neonatales o maternas clónicas de células derivadas de la placenta aisladas del aspecto neonatal o el aspecto materno, respectivamente, de la placenta. Las células se diluyen sucesivamente y a continuación se siembran sobre placas recubiertas de gelatina en medio de crecimiento para expansión a 1 célula/pocillo en placas recubiertas de gelatina de 96 pocillos. A partir de esta clonación inicial, los clones expansivos se identifican, se tripsinan y se vuelven a sembrar en placas recubiertas de gelatina de 12 pocillos en medio de crecimiento y a continuación se someten posteriormente a pases en matraces T25 recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento. La subclonación se realiza para garantizar que se ha identificado una población de células clónicas. Para los experimentos de subclonación, las células se tripsinan y se vuelven a sembrar a 0,5 células/pocillo. Los subclones que crecieron bien se expanden en matraces T25 recubiertos de gelatina a 5.000 células cm<sup>2</sup>/matraz. Las células se someten a pases a 5.000 células cm<sup>2</sup>/matraz T75. Las

características de crecimiento de un clon pueden representarse para demostrar la expansión de células. El análisis del cariotipado puede confirmar que el clon es tanto neonatal como materno.

**Expansión de células en condiciones de cultivo oxígeno bajo.** Células derivadas del posparto se expandieron bien bajo condiciones de oxígeno reducido. El cultivo bajo condiciones de oxígeno bajo no parece tener un efecto significativo sobre la expansión de células para células derivadas del posparto. Las condiciones atmosféricas estándar ya han demostrado ser satisfactorias para cultivar números de células suficientes, y no se requiere cultivo a oxígeno bajo para el crecimiento de células derivadas del posparto.

**Resumen.** Productos de células comercialmente viables deben ser capaces de producirse en cantidades suficientes para proporcionar tratamiento terapéutico a pacientes en necesidad del tratamiento. Células derivadas del posparto pueden expandirse en cultivo para tales fines. Se hicieron las comparaciones del crecimiento de células derivadas del posparto en cultivo con la de otras poblaciones de células que incluyen citoblastos mesenquimatosos. Los datos mostraron que las líneas celulares derivadas del posparto como se desarrollaron en el presente documento pueden expandirse durante más de 40 duplicaciones para proporcionar números de células suficientes, por ejemplo, para bancos preclínicos. Además, estas poblaciones de células derivadas del posparto pueden expandirse bien a baja o alta densidad. Este estudio ha demostrado que los citoblastos mesenquimatosos, a diferencia, no pueden expandirse para obtener grandes cantidades de células.

Las actuales condiciones de expansión de células de células derivadas del posparto aisladas en crecimiento a densidades de aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento sobre matraces recubiertos de gelatina o sin recubrir, bajo oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar grandes números de células en el pase 11. Además, los datos sugieren que las células pueden expandirse fácilmente usando condiciones de cultivo de menor densidad (por ejemplo 1.000 células/cm<sup>2</sup>). La expansión de células derivadas del posparto en condiciones de oxígeno bajo también facilitan la expansión de células, aunque hasta ahora no se había observado mejora incremental en el potencial de expansión de células si se utilizaban estas condiciones para el crecimiento. Presentemente, se prefiere el cultivo de células derivadas del posparto bajo condiciones atmosféricas estándar para generar grandes conjuntos de células. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo se alteran, la expansión de células derivadas del posparto puede asimismo alterarse. Esta estrategia puede usarse para potenciar la capacidad proliferativa y diferenciativa de estas poblaciones de células.

En las condiciones utilizadas, aunque el potencial de expansión de MSC y células derivadas de adiposas es limitado, las células derivadas del posparto se expanden fácilmente a grandes números.

**Referencias**

- 1) Hayflick L. The longevity of cultured human cells. J Am Geriatr Soc. 1974 Jan;22(1):1-12.
- 2) Hayflick L. The strategy of senescence. Gerontologist. 1974 Feb;14(1):37-45.
- 3) Patente US20040058412
- 4) Patente US20040048372
- 6) Csete, Marie; (Ann Arbor, MI); Doyle, John; (South Pasadena, CA); Wold, Barbara J.; (San Marino, CA); McKay, Ron; (Bethesda, MD); Studer, Lorenz; (New York, NY). Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. US20040005704.

**Tabla 5-1:** Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células cultivadas hasta la senescencia

Tipo célula	Senescencia	Total Duplicados Poblaciones	Rendimiento celular total
MSC	24 días	8	4.72 E7
Células adipo –derivadas (Artecel, U.S. Patente No. 6,555,374)	57 días	24	4.5 E12
FIBROBLASTOS	53 días	26	2.82 E13
Células derivadas del cordón umbilical	65 días	42	6.15 E17
Células derivadas de placenta	80 días	46	2.49 E19

**Tabla 5-2:** Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células usando expansión por crecimiento de baja densidad del pase 10 hasta la senescencia

Tipo célula	Senescencia	Total Duplicados Poblaciones	Rendimiento celular total
FIBROBLASTOS (p10)	80 días	43.68	4.72 E7
Células derivadas del cordón umbilical (p10)	80 días	53.6	4.5 E12
Células derivadas de placenta (p10)	80 días	32.96	2.82 E13

**EJEMPLO 6**

**Análisis del cariotipo de PPDC**

Las líneas celulares usadas en la terapia de células son preferentemente homogéneas y están libres de cualquier tipo de célula contaminante. Las células humanas usadas en la terapia de células deben tener un número y estructura de cromosomas normal (46). Para identificar líneas celulares placentarias y del cordón umbilical derivadas del posparto que son homogéneas y están libres de células de origen de tejido no posparto, se analizaron los cariotipos de muestras de células.

**Material y métodos**

Se cultivaron PPDC de tejido posparto de un neonato masculino en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco Carlsbad, CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA)). Se seleccionó tejido posparto de un neonato masculino (X,Y) para permitir la distinción entre células derivadas de neonato y células derivadas de la madre (X,X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron a aproximadamente el 80 % de confluencia. Se llenó un matraz T25 que contenía células hasta el cuello con medio de crecimiento. Las muestras se entregaron a un laboratorio de citogenética por mensajería (el tiempo de transporte estimado de laboratorio a laboratorio es una hora). El análisis de cromosomas se realizó por el Center for Human & Molecular Genetics at the New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células contadas en la metafase, cinco se analizaron para el número de cariotipos homogéneos normales (dos). Una muestra de células se caracterizó como homogénea si se observaron dos cariotipos. Una muestra de células se caracterizó como heterogénea si se observaron más de dos cariotipos. Se contaron células en metafase adicionales y se analizaron cuando se identificó un número de cariotipos heterogéneos (cuatro).

**Resultados**

Todas las muestras de células enviadas para el análisis de cromosomas se interpretaron por el personal del laboratorio de citogenética como que presentaban un aspecto normal. Tres de las dieciséis líneas celulares analizadas presentaron un fenotipo heterogéneo (XX y XY), que indica la presencia de células derivadas de tanto orígenes neonatales como maternos (Tabla 6-1). Las células derivadas del tejido Placenta-N se aislaron del aspecto neonatal de la placenta. En el pase cero, esta línea celular apareció XY homogénea. Sin embargo, en el pase nueve, la línea celular fue heterogénea (XX/XY), que indica una presencia previamente sin detectar de células de origen materno.

Tabla 6-1. Resultados del cariotipo de las PPDC.

	Tejido	Pasaje	Conteo de Células Metafase	Análisis de Células Metafase	No. de cariotipos	ISCN cariotipo
5	Placenta	22	20	5	2	46,XX
	Umbilical	23	20	5	2	46,XX
	Umbilical	6	20	5	2	46,XY
	Placenta	2	20	5	2	46,XX
	Umbilical	3	20	5	2	46,XX
10	Placenta-N	0	20	5	2	46,XY
	Placenta-V	0	20	5	2	46,XY
	Placenta-M	0	21	5	4	46,XY[18]/46,XX[3]
	Placenta-M	4	20	5	2	46,XX
15	Placenta-N	9	25	5	4	46,XY[5]/46,XX[20]
	Placenta-N C1	1	20	5	2	46,XY
	Placenta-N C3	1	20	6	4	46,XY[2]/46,XX[18]
20	Placenta-N C4	1	20	5	2	46,XY
	Placenta-N C15	1	20	5	2	46,XY
	Placenta-N C20	1	20	5	2	46,XY
25	Placenta-N C22	1	20	5	2	46,XY
Clave: N-cara neonatal; V-región vellosidades; M-cara materna; C-Clon						

30 **Resumen.** El análisis de cromosomas identifica PPDC derivadas de la placenta y del cordón umbilical cuyos cariotipos parecen normales como se interpreta por un laboratorio citogenético clínico. El análisis del cariotipo también identifica líneas celulares libres de células maternas, como se ha determinado por cariotipo homogéneo.

### 35 EJEMPLO 7

#### Evaluación de marcadores de la superficie celular derivados del posparto humanos por citometría de flujo

Puede usarse la caracterización de proteínas de la superficie celular o “marcadores” por citometría de flujo para determinar la identidad de una línea celular. La coherencia de la expresión puede determinarse a partir de múltiples donantes, y en células expuestas a diferentes condiciones de procesamiento y de cultivo. Se caracterizaron líneas celulares derivadas del posparto aisladas de la placenta y cordón umbilical por citometría de flujo, proporcionando así un perfil para la identificación de las células de la invención.

#### 45 Material y métodos

**Medios.** Las células se cultivaron en medio de crecimiento de DMEM-baja glucosa (Gibco Carlsbad, CA), con 15 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS); (Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA).

50 **Recipientes de cultivo.** Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejido T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta que confluyeron. Las superficies de crecimiento de los matraces se recubrieron con gelatina incubando con 2 % (peso/volumen) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

55 **Tinción con anticuerpo.** Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de FBS en PBS a una concentración de células de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Según las especificaciones del fabricante, el anticuerpo para el marcador de la superficie celular de interés (Tabla 7-1) se añadió a cien microlitros de suspensión de células y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo sin unir. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

65 **Análisis de citometría de flujo.** El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

**Anticuerpos para marcadores de la superficie celular.** Se usaron los siguientes anticuerpos para los marcadores de la superficie celular.

**Tabla 7-1.** Anticuerpos para los marcadores de la superficie celular

5

Anticuerpo	Manufactura	Número de catálogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555394
CD31	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555446
CD34	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555821
CD44	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555478
CD45RA	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555489
CD73	BD Pharmingen (San Diego, CA)	550257
CD90	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555596
CD117	BD Biosciences (San Jose, CA)	340529
CD141	BD Pharmingen (San Diego, CA)	559781
PDGFr-alpha	BD Pharmingen (San Diego, CA)	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555553
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG- PE	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

10

15

20

25

30

35

**Comparación de células derivadas de la placenta y del cordón umbilical.** Se compararon células derivadas de la placenta con células derivadas del cordón umbilical en el pase 8.

40

**Comparación pase a pase.** Se analizaron las células de la placenta y del cordón umbilical en los pases 8, 15 y 20.

**Comparación donante a donante.** Para comparar diferencias entre donantes, las células derivadas de la placenta de diferentes donantes se compararon entre sí, y las células derivadas del cordón umbilical de diferentes donantes se compararon entre sí.

45

**Comparación del recubrimiento superficial.** Células derivadas de la placenta cultivadas sobre matraces recubiertos de gelatina se compararon con células derivadas de la placenta cultivadas sobre matraces sin recubrir. Las células derivadas del cordón umbilical cultivadas sobre matraces recubiertos de gelatina se compararon con células derivadas del cordón umbilical cultivadas sobre matraces sin recubrir.

50

**Comparación de enzimas de digestión.** Se compararon cuatro tratamientos usados para el aislamiento y preparación de células. Se compararon las células derivadas de tejido posparto mediante el tratamiento con 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispsa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispsa.

55

**Comparación de las capas placentarias.** Se compararon células aisladas del aspecto materno de tejido placentario con células aisladas de la región vellosa de tejido placentario y células aisladas del aspecto fetal neonatal de la placenta.

60

**Resultados**

**Células derivadas de la placenta se compararon con células derivadas del cordón umbilical.** Células derivadas de la placenta y del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo dieron positivo para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicado por los elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicado por valores de fluorescencia comparables al control de IgG. Se

65

consideraron variaciones en los valores de fluorescencia de curvas positivas. La media (es decir, CD13) y el intervalo (es decir, CD90) de las curvas positivas mostraron alguna variación, pero las curvas parecieron normales, confirmando una población homogénea. Ambas curvas presentaron individualmente valores superiores al control de IgG.

5 **Comparación pase a pase de células derivadas de la placenta.** Células derivadas de la placenta en los pases 8, 15 y 20 analizadas por citometría de flujo dieron todas positivo para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se refleja en el elevado valor de fluorescencia con respecto al control de IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, que tiene valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

15 **Comparación pase a pase de células derivadas del cordón umbilical.** Células derivadas del cordón umbilical en el pase 8, 15 y 20 analizadas por citometría de flujo expresaron todas CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicado por la elevada fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicado por valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

20 **Comparación donante a donante de células derivadas de la placenta.** Células derivadas de la placenta aisladas de donantes separados analizadas por citometría de flujo expresaron cada una CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ como se indica por el valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

25 **Comparación donante a donante de células derivadas del cordón umbilical.** Células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes separados analizadas por citometría de flujo dieron cada una positivo para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejado en los elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

30 **El efecto del recubrimiento superficial con gelatina sobre células derivadas de la placenta.** Células derivadas de la placenta expandidas sobre tanto matraces recubiertos de gelatina como sin recubrir analizadas por citometría de flujo expresaron todas CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejado en los elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicado por valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

35 **El efecto del recubrimiento superficial con gelatina sobre células derivadas del cordón umbilical.** Células derivadas del cordón umbilical expandidas sobre gelatina y matraces sin recubrir analizadas por citometría de flujo fueron todas positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

40 **Evaluación del efecto del procedimiento de digestión con enzimas usado para la preparación y aislamiento de las células sobre el perfil del marcador de la superficie celular.** Células derivadas de la placenta aisladas usando diversas enzimas de digestión analizadas por citometría de flujo expresaron todas CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se indica por los elevados valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ como se indica por valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

45 **Comparación de la capa placentaria.** Células derivadas de las capas materna, vellosa y neonatal de la placenta, respectivamente, analizadas por citometría de flujo dieron positivo para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se indica por el elevado valor de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ como se indica por valores de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

50 **Resumen.** El análisis de células posparto derivadas de la placenta y del cordón umbilical por citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Las células posparto derivadas de la placenta y del cordón umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-A, B, C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad fue coherente entre variaciones en variables que incluyen el donante, pase, recubrimiento de la superficie del recipiente de cultivo, enzimas de digestión y capa placentaria. Se observó alguna variación en las medias e intervalo de la curva del histograma del valor de fluorescencia individual, pero todas las curvas positivas bajo todas las condiciones probadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia superiores al control de IgG, confirmando así que las células comprenden una población homogénea que tiene expresión positiva de los marcadores.

**EJEMPLO 8****Análisis de células derivadas de tejido posparto por matrices GeneChip® de Affymetrix**

5 Se usaron matrices GeneChip® de Affymetrix para comparar perfiles de expresión génica de células derivadas del cordón umbilical y de la placenta con fibroblastos, citoblastos mesenquimatosos humanos y otra línea celular derivada de médula ósea humana. Este análisis proporciona una caracterización de las células derivadas del posparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

10 **Materiales y métodos****Aislamiento y cultivo de células**

15 *Células derivadas de tejido posparto.* Se obtuvieron cordones umbilicales y placenta humanos del National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA) de partos a término completos normales con el consentimiento de la paciente. Se recibieron los tejidos y las células se aislaron como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en medio de crecimiento (medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM-baja glucosa; Invitrogen, Carlsbad, CA) con 15 % (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO)) sobre matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera estándar.

25 *Fibroblastos.* Se compraron fibroblastos dérmicos humanos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Lote número 9F0844) y se obtuvieron de ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone) y 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen). Las células se cultivaron sobre plástico estándar tratado con tejido.

30 *Citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSC).* Se compraron hMSC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Lote números 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron según las especificaciones del fabricante en medio MSCGM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico estándar cultivado con tejido a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

35 *Células de médula ósea de las crestas ilíacas humanas (ICBM).* Se recibió médula ósea de las crestas ilíacas humana de NDRI con consentimiento del paciente. La médula ósea se procesó según el método brevemente explicado por Ho, y col. (documento WO03/025149). La médula ósea se mezcló con tampón de lisis (NH<sub>4</sub>Cl 155 micromolar, KHCO<sub>3</sub> 10 micromolar y EDTA 0,1 micromolar, pH 7,2) a una relación de 1 parte de médula ósea con respecto a 20 partes de tampón de lisis. La suspensión de células se agitó con vórtex, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento de células se resuspendió en medio esencial mínimo alfa (Invitrogen) complementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal y glutamina 4 micromolar. Las células se centrifugaron de nuevo y el sedimento de células se resuspendió en medio fresco. Se contaron las células mononucleares viables usando exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico de tejido cultivado a 5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> a tanto O<sub>2</sub> atmosférico estándar como a 5 % de O<sub>2</sub>. Las células se cultivaron durante 5 días sin un cambio de medio. Se eliminó el medio y las células no adherentes después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

45 **Aislamiento de ARNm y análisis de GeneChip.** Se eliminaron cultivos de células activamente en crecimiento de los matraces con un raspador de células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en PBS fresco y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se eliminó y el sedimento de células se congeló inmediatamente y se guardó a -80 °C. Se extrajo ARNm celular y se transcribió en ADNc. Entonces, el ADNc se transcribió en ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con matrices de oligonucleótidos de Affymetrix HG-U133A (agosto de 2003) (Affymetrix, Santa Clara CA). La hibridación y la recogida de datos se realizaron según las especificaciones del fabricante.

55 **Resultados**

60 Se analizaron catorce poblaciones diferentes de células en este estudio. Las células junto con la información de los países, sustrato de cultivo y medios de cultivo se enumeran en la **Tabla 8-1**.

65

**Tabla 8-1.** Células analizadas por el estudio de micromatrices. Las líneas de células se enumeran por su código de identificación junto con el pase en el momento del análisis, sustrato de crecimiento celular y medio de crecimiento.

	Población celular	Pasaje	Sustrato	Media
5	Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
	Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
	Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
	Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
10	Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
	Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
	ICBM (070203) (5% O <sub>2</sub> )	3	Plástico	MEM 10% FBS
	ICBM (062703) (std O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM 10% FBS
	ICBM (062703) (5% O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM 10% FBS
15	hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
	hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
	hMSC (Lote 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
	hFibroblasto(9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10 % FBS
20	hFibroblasto (ATCC CRL-1501)	4	Plástico	DMEM-F12, 10 % FBS

Los datos se evaluaron por un análisis de componentes principales, que analizó los 290 genes que se expresaron diferencialmente en las células. Este análisis permite una comparación relativa de las similitudes entre las poblaciones. La **Tabla 8-2** muestra las distancias euclídeas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclídeas se basaron en la comparación de las células basándose en los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La distancia euclídea es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

**Tabla 8-2.** Distancias euclídeas para los pares de células. La distancia euclídea se calculó para los tipos de células usando los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclídea.

	Par celular	Distancia euclidiana
35	ICBM-hMSC	24.71
	Placenta-umbilical	25.52
	ICBM-Fibroblasto	36.44
	ICBM-placenta	37.09
	Fibroblasto-MSC	39.63
40	ICBM-Umbilical	40.15
	Fibroblasto-Umbilical	41.59
	MSC-Placenta	42.84
	MSC-Umbilical	46.86
45	ICBM-placenta	48.41

Las Tablas 8-3, 8-4 y 8-5 muestran la expresión de genes elevada en células derivadas de la placenta (Tabla 8-3), elevada en células derivadas del cordón umbilical (Tabla 8-4) y reducida en células derivadas del cordón umbilical y de la placenta (Tabla 8-5). La columna titulada "Conjunto de sonda ID" se refiere al código de identificación del fabricante para los conjuntos de varias sondas de oligonucleótidos localizados sobre un sitio particular sobre el chip, que se hibridan con el gen nombrado (columna "Nombre del gen"), que comprende una secuencia que puede encontrarse dentro de la base de datos NCBI (GenBank) en el número de acceso especificado (columna "Número de acceso de NCBI").

55

60

65

**Tabla 8-3.** Genes que se mostró que tenían específicamente elevada expresión en las células derivadas de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes incrementados en Células derivadas de placenta		
ID_Sombra conjunto	Nombre del Gen	Número de Adhesión NCBI
209732_at	Tipo-C (calcio dependiente, dominio reconocimiento de carbohidratos) lectina, superfamilia miembro 2 (activación inducida)	AF070642
206067_s_at	Wilms tumor 1	NM_024426
207016_s_at	Aldeida dehidrogenasa 1 familia, miembro A2	AB015228
206367_at	renin	NM_000537
210004_at	Lipoproteína oxidada de baja densidad (lectina-tipo) receptor 1	AF035776
214993_at	Homo sapiens, clon IMAGEN: 4179671,mRNA, cds parcial	AF070642
202178_at	Proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	Proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	Regulada bajo cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp547K1113 (desde clon DKFZp547K1113)	AI246730

**Tabla 8-4.** Genes que se mostró que tenían específicamente elevada expresión en células derivadas del cordón umbilical en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes incrementados en Células derivadas de cordón umbilical		
ID Sombra conjunto	Nombre del Gen	Número de Adhesión NCBI
202859_x_at	Interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	Interleucina 8	AF043337
210222_s_at	reticulon 1	BC000314
204470_at	Quimioquinas (C-X-X motif) ligando 1 (melanona actividad estimulación crecimiento)	NM_001511
206336_at	Quimioquinas (C-X-X motif) ligando 6 (proteína quimiotáctica granulocita)	NM_002993
207850_at	Quimioquinas (C-X-X motif) ligando 3	NM_002090
203485_at	reticulon 1	NM_021136
202644_s_at	Factor de necrosis tumoral, proteína 3 alfa inducida	NM_006290

**Tabla 8-5.** Genes que se mostró que tenían reducida expresión en células derivadas del cordón umbilical y de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes redicidoss en Células derivadas de cordón umbilical y de placenta		
ID Sombra conjunto	Nombre del Gen	Número de Adhesión NCBI
210135_s_at	Homeobox 2 de estatura corta	AF022654.1
205824_at	Proteína 2 golpe de calor 27kDa	NM_001541.1
209687_at	Quimioquina (C-X-X motif) ligando 12 (derivado de célula estromal factor 1)	U19495.1
203666_at	Quimioquina (C-X-X motif) ligando 12 (derivado de célula estromal factor 1)	NM_000609.1
212670_at	Elastina (supravalvular estenosis aortica, síndrome de Williams Beuren)	AA479278
213381_at	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586M2022 (desde clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	Mesenquima homeobox 2 (detención del crecimiento específica homeobox)	NM_005924.1
205817_at	sine homólogo homeobox oculis 1 (Drosophila)	NM_005982.1
209283_at	Cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador despeinada asociado de la morfogénesis 2	BF513244
213488_at	DKFZP586B2420 proteína	AL050143.1
209763_at	Similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	tetranectina (proteína de unión del plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	Gen de translocación de células B 1 antiproliferativa	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción relacionados con runt-3	AA541630

ES 2 542 070 T3

(continúa)

Genes redicidoss en Células derivadas de cordón umbilical y de placenta		
ID Sombra conjunto	Nombre del Gen	Número de Adhesión NCBI
5	219747_at	Proteína hipotética FLJ23191 NM_024574.1
	204773_at	interleucina 11 receptor, alfa NM_004512.1
10	202465_at	procolágeno C-endopeptidasa potenciador NM_002593.2
	203706_s_at	homólogo rizado 7 (Drosophila) NM_003507.1
	212736_at	Gen hipotético BC008967 BE299456
15	214587_at	colágeno, el tipo VIII, alfa 1 BE877796
	201645_at	tenascina C (hexabrachion) NM_002160.1
	210239_at	proteína homeobox irroquis 5 U90304.1
20	203903_s_at	hefaestina NM_014799.1
	205816_at	integrin, beta 8 NM_002214.1
	203069_at	vesículas sinánticas oligoproteína 2 NM_014849.1
25	213909_at	Homo sapiens cDNA FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744 AU147799
	206315_at	citoquina similar al receptor de factor de 1 NM_004750.1
30	204401_at	potasio intermedia pequeña conductancia / canal de calcio activado, subfamilia N, miembro 4 NM_002250.1
	216331_at	integrin, alpha 7 AK022548.1
35	209663_s_at	integrin, alpha 7 AF072132.1
	213125_at	DKFZP586L151 Proteína AW007573
	202133_at	transcrinacional co-activador con motivo de unión PDZ- (TAZ) AA081084
40	206511_s_at	sine homólogo homeobox oculis 2 (Drosophila) NM_016932.1
	213435_at	KIAA1034 Proteína AB028957.1
45	206115_at	respuesta de crecimiento temprano 3 NM_004430.1
	213707_s_at	Homeobox 5 sin distal NM_005221.3
	218181_s_at	Proteína hipotética FLJ20373 NM_017792.1
50	209160_at	aldo-ceto reductasa familia 1, C3 miembro (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II) AB018580.1
	213905_x_at	biglycan AA845258
	201261_x_at	biglycan BC002416.1
55	202132_at	transcrinacional co-activador con motivo de unión PDZ- (TAZ) AA081084
	214701_s_at	fibronectin 1 AJ276395.1
60	213791_at	proenkephalin NM_006211.1
	205422_s_at	intearina, como beta-1 (con repetir dominios similares a EGF) NM_004791.1
	214927_at	Homo sapiens ARNm de longitud completa cDNA clon insertar Euroimage 1968422 AL359052.1
65	206070_s_at	EphA3 AF213459.1

(continúa)

Genes redicidoss en Células derivadas de cordón umbilical y de placenta		
ID Sombra conjunto	Nombre del Gen	Número de Adhesión NCBI
212805_at	KIAA0367 Proteína	AB002365.1
219789_at	receptor del péptido natriurético C / guanilato ciclasa C (receptor de péptido C atrionatriuretic)	A1628360
219054_at	Proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	ARNm sapiens Homo; cDNA DKFZp564B222 (de clonar DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesículas 5 (myobrevin)	NM_006634.1
201843_s_at	EGF que contiene la matriz extracelular-fibulina como proteína 1	NM_004105.2
221478_at	Interacción de proteínas BCL2 / adenovirus E1B 19kDa 3-tipo	AL132665.1
201792_at	AE Unión Proteína 1	N_001129.2
204570_at	subunidad citocromo c oxidasa polipéptido VIIa 1 (músculo)	NM_001864.1
201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
202718_at	proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa	NM_000597.1

Las Tablas 8-6, 8-7,y 8-8 muestran la elevada expresión de genes en fibroblastos humanos (Tabla 8-6), células ICBM (Tabla 8-7) y MSC (Tabla 8-8).

40

45

50

55

60

65

**Tabla 8-6.** Genes que se mostró que tenían elevada expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

5	<b>Genes fibroblastos elevados</b>
	fosfatasa de especificidad dual 2
	KIAA0527 proteína
	Homo sapiens cADN: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
10	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	ankyrin 3, el nodo de Ranvier (ankyrin G)
	inhibina, beta A (activina A, activina AB polipéptido alfa)
	pirofosfatasa ectonucleotide / fosfodiesterasa 4 (función putativa)
15	KIAA1053 proteína
	proteína asociada a microtúbulos 1A
	proteína con dedos de zinc 41
	HSPC019 proteína
	Homo sapiens cADN: FLJ23564 fis, clon LNG10773
20	ARNm sapiens Homo; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	Proteína LIM (similar al enigma de proteína quinasa C de rata vinculante)
	inhibidor de la luz kappa polipéptido potenciador del gen en las células B, la proteína-quinasa asociada complejo
	proteína hipotética FLJ22004
	(clon CTG-A4) secuencia de ARNm Humana
25	EST, Moderadamente similar al factor de citoquinas similar al receptor de 2; precursor CRL2 receptor de citoquinas [Homo sapiens]
	factor de crecimiento transformante, beta 2
	MGC29643 hipotética proteína
30	antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2

**Tabla 8-7.** Genes que se mostró que tenían elevada expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

35	<b>Genes células ICBM elevadas</b>
	Proteínas cardíaca ankyrin repetidas
	MHC de clase I región ORF
	integrin, alpha 10
	proteína hipotética FLJ22362
40	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
	proteína inducida por interferón-44
	SRY (región determinante del sexo Y) -Caja 9 (displasia campomelic, autosómica reversión sexual)
	queratina proteína asociada 1-1
	hippocalcina-tipo 1
45	dentado 1 (síndrome de Alagille)
	proteoglicano 1, gránulo secretor

50

55

60

65

**Tabla 8-8.** Genes que se mostró que tenían elevada expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes células MSC elevadas</b>	
5	Interleucina 26
	maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
	subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
	v-fos FBJ osteosarcoma murino oncogén viral homólogo
10	proteína hipotética DC42
	subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
	FBJ osteosarcoma murino oncogén viral homólogo B
	WNT1 proteína vía de señalización inducible 1
	Línea celular MCF.2 secuencia de transformación derivada
15	canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
	cartílago de clase emparejado homeoprotein 1
	Homo sapiens ADNc FLJ12232 fis, MAMMA1001206 clon
	Homo sapiens ADNc FLJ34668 fis, LIVER2000775 clon
	junio B proto-oncogén
20	CLL de células B / linfoma 6 (proteína de dedo de cinc 51)
	dedo de zinc de proteínas 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

**Resumen.** El análisis GENECHIP se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células posparto derivadas del cordón umbilical y la placenta. Este análisis incluye células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y tres placentas diferentes. El estudio también incluyó dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de citoblastos mesenquimatosos y tres líneas de células de la médula ósea de las crestas ilíacas. El ARNm que se expresó por estas células se analizó por GENECHIP de Affymetrix que contenía sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

Los resultados mostraron que los 290 genes se expresan diferencialmente en estos cinco tipos diferentes de células. Estos genes incluyen diez genes que son específicamente elevados en las células derivadas de la placenta y siete genes específicamente elevados en las células derivadas del cordón umbilical. Se encontró que cincuenta y cuatro genes tenían niveles de expresión específicamente menores en placenta y cordón umbilical.

La expresión de genes seleccionados se ha confirmado por PCR en el Ejemplo 9. Estos resultados demuestran que las células derivadas del posparto tienen un perfil de expresión génica distinto, por ejemplo, en comparación con células derivadas de la médula ósea y fibroblastos.

**Referencia**

Lockhart y col., Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat. Biotechnol. 1996, 14(13):1675-1680.

**EJEMPLO 9**

**Marcadores de células en células derivadas del posparto**

Similitudes y diferencias en células derivadas de la placenta humana y el cordón umbilical humano se evaluaron comparando sus perfiles de expresión génica con aquellos de células derivadas de otras fuentes (usando una matriz GENECHIP de Affymetrix). Se identificaron seis genes “distintivos”: receptor 1 de LDL oxidadas, interleucina-8, renina, reticulon, ligando 3 del receptor de quimiocinas (ligando 3 de CXCR3) y proteína 2 quimiotáctica de granulocitos (GCP-2). Estos genes “distintivos” se expresaron a niveles relativamente altos en células derivadas del posparto.

Los presentes estudios se realizaron para verificar los datos de micromatrices y para identificar la conformidad/discordancia entre la expresión del gen y de la proteína, además de para establecer una serie de ensayos fidedignos para la detección de identificadores únicos para células derivadas de la placenta y del cordón umbilical.

**Métodos y material**

**Células.** Células derivadas de la placenta (tres aislados, que incluyen un aislado predominantemente neonatal como se identifica por análisis de cariotipado), células derivadas del cordón umbilical (cuatro aislados) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatales y adultos) se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (Cat. nº SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA) en un matraz T75 recubierto de gelatina. Se cultivaron citoblastos

mesenquimatosos (MSC) en el kit Bullet de medio de crecimiento de citoblastos mesenquimatosos (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

5 Para el experimento de secreción de IL-8, las células se descongelaron del nitrógeno líquido y se sembraron en  
matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup>, se cultivaron durante 48 horas en medio de crecimiento y  
luego se cultivaron durante 8 horas adicionales en 10 mililitros de medio de privación de suero (DMEM-baja glucosa  
10 (Gibco, Carlsbad, CA), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco,  
Carlsbad, CA) y 0,1 % (peso/volumen) de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)). Después de este  
tratamiento, se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar  
residuos celulares. Entonces, los sobrenadantes se congelaron a -80 °C para análisis de ELISA.

**Cultivo celular para ensayo de ELISA.** Células posparto derivadas de la placenta y el cordón umbilical, además de  
fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de crecimiento en matraces  
15 T75 recubiertos de gelatina. Las células se congelaron en el pase 11 en nitrógeno líquido. Las células se  
descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de la centrifugación a 150 x g  
durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y  
se contaron. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> que contenía 15 mililitros de medio de crecimiento a  
375.000 célula/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El  
20 medio de privación de suero se recogió al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos y se  
guardó a -20 °C.

Para estimar el número de células en cada matraz, se añadieron 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA)  
a cada matraz. Después de desprenderse las células del matraz, la actividad de la tripsina se neutralizó con 8  
25 mililitros de medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y se centrifugó  
a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó, y se añadió 1 mililitro de medio de crecimiento a cada tubo  
para resuspender las células. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

**Ensayo de ELISA.** La cantidad de IL-8 secretada por las células en medio de privación de suero se analizó usando  
30 ensayos de ELISA (R&D Systems, Mineápolis, MN). Todos los ensayos se probaron según las instrucciones  
proporcionadas por el fabricante.

**Aislamiento de ARN total.** Se extrajo ARN de células derivadas del posparto confluentes y fibroblastos o para la  
expresión de IL-8 de células tratadas como se ha descrito anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros  
de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (kit  
35 RNeasy Mini; Qiagen, Valencia, CA). El ARN se extrajo según las instrucciones del fabricante (kit RNeasy Mini;  
Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a tratamiento con DNasa (2,7 U/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se  
eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 °C. También se extrajo ARN de placenta y  
cordón umbilical humanos. Se suspendió tejido (30 miligramos) en 700 microlitros de tampón RLT que contenía  
40 beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente, y la extracción de ARN procedió según las  
especificaciones del fabricante. Se extrajo ARN con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 °C.

**Transcripción inversa.** El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros al azar con los reactivos de  
transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60  
45 minutos, y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

Los genes identificados por micromatriz de ADNc como únicamente regulados en células derivadas del posparto  
(genes distintivos - que incluyen receptor de LDL oxidadas, interleucina-8, renina y reticulon), se investigaron  
adicionalmente usando PCR en tiempo real y convencional.

**PCR en tiempo real.** Se realizó PCR sobre muestras de ADNc usando productos de expresión génica ASSAYS-ON-  
DEMAND: Se mezclaron receptor de LDL oxidadas (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515);  
ligando 3 de CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH con ADNc y la mezcla  
maestra de PCR TaqMan Universal según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA)  
usando un sistema de detección de secuencias 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems,  
55 Foster City, CA). Las condiciones de los ciclos térmicos fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante  
10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos de PCR se  
analizaron según las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario nº 2 de Applied Biosystems para el sistema  
de detección de secuencias ABI Prism 7700).

**PCR convencional.** Se realizó PCR convencional usando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems,  
Boston, MA) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. Se realizó PCR usando 2 microlitros de  
disolución de ADNc, 1 x tampón de reacción de PCR de mezcla universal TAQ polimerasa (nombre comercial  
AMPLITAQ GOLD) (Applied Biosystems, Foster City, CA) y desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. La  
amplificación se optimizó para cada conjunto de cebadores: para IL-8, ligando 3 de CXC y reticulon (94 °C durante  
65 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para renina (94 °C  
durante 15 segundos, 53 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para receptor de

LDL oxidadas y GAPDH (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores usados para la amplificación se enumeran en la Tabla 1. La concentración de cebador en la reacción de PCR final fue 1 micromolar, excepto para GAPDH que fue 0,5 micromolar. Los cebadores de GAPDH fueron los mismos que para PCR en tiempo real, excepto que la sonda TaqMan del fabricante no se añadió a la reacción de PCR final. Las muestras se ejecutaron sobre 2 % (peso/volumen) de gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes se capturaron usando una película 667 Universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara POLAROID de longitud focal (VWR International, South Plainfield, NJ).

**Tabla 9-1: Cebadores usados**

Nombre del Cebador	Cebador
Receptor de LDL oxidado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO:1) A: 5'-AGAATGGAAAAGTGGGAATAGG-3' (SEQ ID NO:2)
<b>Renin</b>	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (SEQ ID NO:3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (SEQ ID NO:4)
<b>Reticulon</b>	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO:5) A: 5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO:6)
Interleucina-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO:7) A: 5'-CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC-3' (SEQ ID NO:8)
Quimiquina (CXC) ligando 3	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:9) A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC-3' (SEQ ID NO:10)

**Inmunofluorescencia.** Se fijaron células derivadas del posparto con 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se usaron un aislado de cada una de las células derivadas del cordón umbilical y de la placenta en el pase 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y pase 11 (P11) (dos aislados de células derivadas de la placenta, dos aislados de derivadas del cordón umbilical) y fibroblastos (P11). Se realizó inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítopes: vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma - producida contra conejo; o 1:300; Chemicon, Temecula, CA - producida contra ratón), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (CD34 humana clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, los siguientes marcadores se probaron en células derivadas del posparto de pase 11: anti-GROalfa humana – PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-receptor 1 de LDL oxidadas humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGA-A humana (1:100; Santa Cruz, Biotech).

Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una disolución de bloqueo de proteína que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Cuando el epítope de interés se localizó sobre la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), Triton X-100 se omitió en todas las etapas del procedimiento con el fin de para prevenir la pérdida de epítopes. Además, en casos en los que el anticuerpo primario se produjo contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se usó 3 % (v/v) de suero de burro en lugar de suero de cabra en todo el proceso. Los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, se aplicaron entonces a los cultivos durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminaron las disoluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían de bloqueo junto con IgG de cabra anti-ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG de cabra anti-conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o IgG de burro anti-cabra - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). Entonces, los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar núcleos de células.

Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando un filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control en la que se siguió el procedimiento entero brevemente expuesto anteriormente, con la excepción de aplicación de una disolución de anticuerpo primario (no 1º control). Se capturaron imágenes representativas usando una videocámara en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras triplemente teñidas, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión cada vez. A continuación se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

**Preparación de células para análisis de FACS.** Se lavaron células adherentes en matraces en solución salina

tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de FBS en PBS a una concentración de células de  $1 \times 10^7$ /mililitro. Se suministraron alícuotas de cien microlitros a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con Perm/tampón de lavado (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadió anticuerpo a alícuotas según especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que requieren un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de 3 % de FBS. Se añadió anticuerpo secundario según la especificación del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se usaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 de LDL oxidadas (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 kappa de ratón (P-4685 y M-5284; Sigma) e IgG de burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.).

15 **Análisis de FACS.** El análisis de citometría de flujo se realizó con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

**Resultados**

Los resultados de la PCR en tiempo real para genes “distintivos” seleccionados realizados sobre ADNc de células derivadas de placentas humanas, fibroblastos adultos y neonatales, y citoblastos mesenquimatosos (MSC) indican que tanto el receptor de LDL oxidadas como la renina se expresaron a mayor nivel en las células derivadas de la placenta en comparación con otras células. Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el método de  $\Delta\Delta CT$  y se expresaron en una escala logarítmica. Los niveles de expresión de reticulon y de receptor de LDL oxidadas fueron mayores en células derivadas del cordón umbilical en comparación con otras células. No se encontró diferencia significativa en los niveles de expresión de ligando 3 de CXC y GCP-2 entre células derivadas del posparto y controles (datos no mostrados). El ligando 3 de CXC se expresó a niveles muy bajos. GCP-2 se expresó a niveles comparables a fibroblastos adultos y neonatales humanos. Los resultados de PCR en tiempo real se confirmaron por PCR convencional. La secuenciación de productos de PCR validó adicionalmente estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión del ligando 3 de CXC entre células derivadas del posparto y controles usando cebadores para el ligando 3 de CXC para PCR convencional enumerados en la Tabla 9-1.

La expresión de la citocina IL-8 en células derivadas del posparto es elevada en tanto células derivadas del posparto cultivadas en medio de crecimiento como privadas de suero. Todos los datos de PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y por secuenciación de productos de PCR.

Cuando los sobrenadantes de células cultivadas en medio sin suero se examinaron para la presencia de IL-8, las mayores cantidades se detectaron en medios derivados de células derivadas del cordón umbilical y algunos aislados de células derivadas de la placenta (Tabla 9-2). No se detectó IL-8 en medio derivado de fibroblastos dérmicos humanos.

**Tabla 9-2:** Expresión de proteínas IL-8 medida por ELISA

Tipo Célula	IL-8
Los fibroblastos humanos	ND
Placenta Aislada 1	ND
UMBC Aislada 1	2058.42±144.67
Placenta Aislada 2	ND
UMBC Aislada 2	2368.86±22.73
Placenta Aislada 3 (O <sub>2</sub> normal)	17.27±8.63
Placenta Aislada 3 (O <sub>2</sub> bajo, W/O BME)	264.92±9.88
Los resultados del ensayo ELISA para la interleucina-8 (IL-8) realizaron en placenta- y células de cordón umbilical derivadas así como fibroblastos de piel humana. Los valores se presentan aquí son células picogramos / millón, n = 2, sem.	
ND = No detectada	

También se examinaron células derivadas de la placenta para la expresión del receptor de LDL oxidadas, GCP-2 y GROalfa por análisis de FACS. Las células dieron positivo para GCP-2. No se detectaron receptor de LDL oxidadas y GRO por este método.

También se probaron células derivadas de la placenta para la expresión de proteínas seleccionadas por análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana se fijaron con 4 % de paraformaldehído y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: factor de von Willebrand,

CD34, citoqueratina 18, desmina, alfa-actina de músculo liso y vimentina. Las células dieron tinción positiva para tanto alfa-actina de músculo liso como vimentina. Este patrón se preservó hasta el pase 11. Solo algunas células (<5 %) en el pase 0 dieron tinción positiva para citoqueratina 18.

5 Células derivadas del cordón umbilical humano en el pase 0 se sondaron para la expresión de proteínas seleccionadas por análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: factor de von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, alfa-actina de músculo liso y vimentina. Las células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para alfa-actina de músculo liso y vimentina, con el patrón de tinción consistente hasta el pase 11.

10 Las células derivadas de la placenta en el pase 11 también se investigaron por inmunocitoquímica para la expresión de GROalfa y GCP-2. Las células derivadas de la placenta fueron positivas para GCP-2, pero la expresión de GROalfa no se detectó por este método.

15 La expresión de GROalfa, GCP-2, receptor 1 de LDL oxidadas y reticulon (NOGO-A) en células derivadas del cordón umbilical en el pase 11 se investigó por inmunocitoquímica. Las células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para GCP-2, pero la expresión de GRO alfa no se detectó por este método. Además, las células fueron positivas para NOGO-A.

20 **Resumen.** La concordancia entre niveles de expresión génica mediada por micromatriz y PCR (tanto en tiempo real como convencional) se ha establecido para cuatro genes: receptor 1 de LDL oxidadas, renina, reticulon e IL-8. La expresión de estos genes se reguló diferencialmente al nivel de ARNm en células derivadas del posparto, con la IL-8 también regulada diferencialmente al nivel de proteína. La presencia del receptor de LDL oxidadas no se detectó al nivel de proteína por análisis de FACS en células derivadas de la placenta. La expresión diferencial de GCP-2 y ligando 3 de CXC no se confirmó al nivel de ARNm; sin embargo, GCP-2 se detectó al nivel de proteína por análisis de FACS en las células derivadas de la placenta. Aunque este resultado no soporta datos originalmente obtenidos del experimento en micromatriz, esto puede ser debido a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

30 Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana dieron tinción positiva para tanto alfa-actina de músculo liso como vimentina. Este patrón también se observó en células en el pase 11. Estos resultados sugieren que la expresión de vimentina y de alfa-actina de músculo liso puede preservarse en células con pases, al menos en el medio de crecimiento usado aquí.

35 Células derivadas del cordón umbilical humano en el pase 0 se sondaron para la expresión de alfa-actina de músculo liso y vimentina, y dieron positivo para ambas. El patrón de tinción se preservó hasta el pase 11.

En conclusión, los datos de ARNm completo verifican al menos parcialmente los datos obtenidos de los experimentos en micromatriz.

## 40 EJEMPLO 10

### Caracterización inmunohistoquímica del fenotipo de PPDC

45 Se analizaron por inmunohistoquímica los fenotipos de células encontradas dentro de tejidos posparto humanos, concretamente cordón umbilical y placenta.

#### Materiales y métodos

50 **Preparación de tejido.** Se recogieron tejido de cordón umbilical y placentario humanos y se sumergieron fijados en 4 % (peso/volumen) de paraformaldehído durante la noche a 4 °C. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítopes (véase la Tabla 10-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, producida contra conejo; Sigma; o 1:300, producida contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (clase III de CD34 humano; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores: anti-GROalfa humana - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-receptor 1 de LDL oxidadas humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGO-A humana (1:100; Santa Cruz Biotech). Los especímenes fijados se cortaron con un bisturí y se colocaron dentro de compuesto de incorporación OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) sobre un baño de nieve carbónica que contenía etanol. Entonces, los bloques congelados se seccionaron (10 micrómetros de espesor) usando un criótomo estándar (Leica Microsystems) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio para tinción.

65

**Tabla 10-1: Resumen de anticuerpos primarios usados**

	Anticuerpo	Concentración	Vendedor
5	Vimentin	1:500	Sigma, St. Louis, MO
	Desmin (rb)	1:150	Sigma
	Desmin (m)	1:300	Chemicon, Temecula, CA
10	alpha-smooth muscle actin (SMA)	1:400	Sigma
	Cytokeratin 18 (CK18)	1:400	Sigma
	von Willebrand factor (vWF)	1:200	Sigma
	CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA
15	GROalpha-PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
	GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
	Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
20	NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

**Inmunohistoquímica.** Se realizó inmunohistoquímica similar a los estudios previos (por ejemplo, Messina, y col. (2003) *Exper. Neurol.* 184: 816-829). Se lavaron secciones de tejido con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una disolución de bloqueo de proteína que contenía PBS, 4 % (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3 % (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a antígenos intracelulares. En casos en los que el epítipo de interés se localizaría sobre la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), Triton se omitió en todas las etapas del procedimiento con el fin de prevenir la pérdida de epítipes. Además, en casos en los que el anticuerpo primario se produjo contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se usó 3 % (v/v) de suero de burro en lugar de suero de cabra en todo el procedimiento. Los anticuerpos primarios, diluidos en disolución de bloqueo, se aplicaron entonces a las secciones durante un periodo de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las disoluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de disoluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían de bloqueo junto con IgG de cabra anti-ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG de cabra anti-conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o IgG de burro anti-cabra - FITC (1:150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar núcleos de células.

Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia apropiado sobre un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representó por señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Se capturaron imágenes representativas usando una videocámara en color digital y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras triplemente teñidas, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión cada vez. A continuación se prepararon montajes en capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

**Resultados**

**Caracterización del cordón umbilical.** Los marcadores vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 se expresaron en un subconjunto de células encontrado dentro del cordón umbilical (datos no mostrados). En particular, la expresión de vWF y CD34 se limitó a los vasos sanguíneos contenidos dentro del cordón. Las células CD34+ estuvieron en la capa más interna (lado de la luz). La expresión de vimentina se encontró en toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón. SMA se limitó a la matriz y paredes externas de la arteria y vena, pero no estuvo contenida con los propios vasos. CK18 y desmina se observaron dentro de los vasos solo, estando la desmina limitada a las capas medias y externas.

**Caracterización de placenta.** Vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 se observaron todas dentro de la placenta y regionalmente específicas.

**Expresión en tejido de GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1 y NOGO-A.** Ninguno de estos marcadores se observó dentro de tejido del cordón umbilical o placentario (datos no mostrados).

**Resumen.** Vimentina, desmina, alfa-actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD34 se expresan en células dentro de cordón umbilical y placenta humanos. Basándose en los estudios de caracterización *in vitro* que muestran que solo se expresan la vimentina y la alfa-actina de músculo liso, los datos sugieren que el actual proceso de aislamiento de células posparto recolecta una subpoblación de células o que las células aisladas cambian la expresión de marcadores para expresar vimentina y alfa-actina de músculo liso.

**EJEMPLO 11:****Inmunología *in vitro* de células derivadas del posparto**

5 Se evaluaron *in vitro* líneas celulares derivadas del posparto para sus características inmunológicas en un esfuerzo por predecir la respuesta inmunológica, si la hay, que estas células provocarían tras el trasplante *in vivo*. Las líneas celulares derivadas del posparto se ensayaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas se expresan por células presentadoras de antígeno (APC) y se requieren para la estimulación directa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> sin tratamiento previo (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5th Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171). Las líneas celulares también se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5th Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171), CD 178 (Coumans y col., (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196) y PD-L2 (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5th Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171; Brown, y col. (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266). Se cree que la expresión de estas proteínas por células que residen en tejidos placentarios media en el estado inmunoprivilegiado de tejidos placentarios en el útero. Para predecir el grado al que las líneas celulares posparto derivadas de la placenta y del cordón umbilical provocan una respuesta inmunitaria *in vivo*, las líneas celulares se probaron en una reacción de linfocitos mixtos (MLR) unilateral.

**20 Materiales y métodos**

**Cultivo celular.** Se cultivaron células en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS); (Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA)) hasta que fueron confluentes en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con 2 % de gelatina (Sigma, St. Louis, MO).

**Tinción de anticuerpos.** Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de FBS en PBS a una concentración de células de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Se añadió anticuerpo (**Tabla 11-1**) a cien microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar anticuerpo sin unir. Las células se resuspendieron en quinientos microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo usando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

**35 Tabla 11-1. Anticuerpos**

Anticuerpo	Fabricante	No. de Catálogo
HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557227
CD86	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555665
B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	552502
HLA-G	Abeam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846
Mouse IgG2a	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
Mouse IgG1kappa	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

**Reacción de linfocitos mixtos.** Viales criopreservados de PPDC derivadas del cordón umbilical del pase 10 etiquetadas como la línea celular A y PPDC derivadas de la placenta del pase 11 etiquetadas como la línea celular B se enviaron sobre nieve carbónica a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción de linfocitos mixtos usando CTBR SOP no. CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios masculinos y femeninos. Se trataron PBMC alógenas estimulantes (donantes), PBMC autólogas y líneas celulares derivadas del posparto con mitomicina C. Las células estimulantes autólogas y tratadas con mitomicina C se añadieron a PBMC respondedoras (receptoras) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió [<sup>3</sup>H]timidina a cada muestra y se cultivaron durante 18 horas. Tras la recogida de las células,

se extrajo ADN radiomarcado, y la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina se midió usando un contador de centelleo.

El índice de estimulación para el donante alógeno (SIAD) se calculó como la proliferación media del receptor más el donante alógeno tratado con mitomicina C dividido entre la proliferación de referencia del receptor. El índice de estimulación de las células derivadas del posparto se calculó como la proliferación media del receptor más la línea celular derivada del posparto tratada con mitomicina C dividido entre la proliferación de referencia del receptor.

**Resultados**

**Reacción de linfocitos mixtos - Placenta.** Se cribaron siete donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un único donante alógeno que presentaría una respuesta a la proliferación robusta en una reacción de linfocitos mixtos con los otro seis donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante de control positivo alógeno. Los seis donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. El donante de control positivo alógeno y las líneas celulares derivadas de la placenta se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción de linfocitos mixtos con los seis receptores alógenos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado usando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 11-2). El índice de estimulación promedio osciló de 1,3 (placa 2) a 3 (placa 1) y los controles positivos de donante alógenos oscilaron de 46,25 (placa 2) a 279 (placa 1) (Tabla 11-3).

**Tabla 11-2.** Datos de la reacción de linfocitos mixtos - Línea celular B (Placenta)

DPM   Para ensaño de proliferación									
ID PLATO: PLATO 1									

ES 2 542 070 T3

(continua)

5	Analítico	Cultivo	Replicas			Media	SD	CV
	Número	Sistema	1	2	3			
10	IM03-7769	Proliferación de línea de base de receptor	79	119	138	112.0	30.12	26.9
15		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	241	272	175	229.3	49.54	21.6
20		MLR alogénico IM03-7768 donante (mitomicina C tratada)	23971	22352	20921	22414.7	1525.97	6.8
25		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células B)	664	559	1090	771.0	281.21	36.5
	SI ( donante)				200			
	SI (línea célula)				7			
30	IM03-7770	Proliferación de línea de base de receptor	206	134	262	200.7	64.17	32.0
35		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	1091	602	524	739.0	307.33	41.6
40		MLR alogénico IM03-7768 donante (mitomicina C tratada)	45005	43729	44071	44268.3	660.49	1.5
45		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células B)	533	2582	2376	1830.3	1128.24	61.6
	SI ( donante)				221			
	SI (línea célula)				9			
50	IM03-7771	Proliferación de línea de base de receptor	157	87	128	124.0	35.17	28.4
55		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	293	138	508	313.0	185.81	59.4
60		MLR alogénico IM03-7768 donante (mitomicina C tratada)	24497	34348	31388	30077.7	5054.53	16.8
65		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células B)	601	643	a	622.0	29.70	4.8
	SI ( donante)				243			
	SI (línea célula)				5			

ES 2 542 070 T3

(continua)

5	Análítico	Cultivo	Replicas			Media	SD	CV	
	Número	Sistema	1	2	3				
5	10 15 20	IM03-7772	Proliferación de línea de base de receptor	56	98	51	68.3	25.81	37.8
10		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	133	120	213	155.3	50.36	32.4	
15		MLR alogénico IM03-7768 donante (mitomicina C tratada)	14222	20076	22168	18822.0	4118.75	21.9	
20		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células B)	a	a	a	a	a	a	
25	SI (donante)					275			
25	SI (línea célula)					a			
30	30	IM03-7768 alogénico donante	Proliferación de línea de base de receptor	84	242	208	178.0	83.16	46.7
35			Control de la autoestimulación (mitomicin tratada células autólogas)	361	617	304	427.3	166.71	39.0
40	40	línea célula Tipo B	Proliferación de línea de base de receptor	126	124	143	131.0	10.44	8.0
45			Control de la autoestimulación (mitomicin tratada células autólogas)	822	1075	487	794.7	294.95	37.1
ID PLATO: PLATO 2									
50	Análítico número	Cultivo Sistema	Replicas			Media	SD	CV	
50			1	2	3				
55	60 65	IM03-7773	Proliferación de línea de base de receptor	908	181	330	473.0	384.02	81.2
55			Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	269	405	572	415.3	151.76	36.5
60			MLR alogénico IM03-7768 donante (mitomicina C tratada)	29151	28691	28315	28719.0	418.70	1.5
65			MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células B)	567	732	905	734.7	169.02	23.0
65	SI (donante)					61			
65	SI (línea célula)					2			

(continua)

ID PLATO: PLATO 2										
5	Analítico número	Cultivo Sistema	Replicas			Media	SD	CV		
			1	2	3					
10	IM03-7774	Proliferación de línea de base de receptor	893	1376	185	818.0	599.03	73.2		
15		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	261	381	568	403.3	154.71	38.4		
20		MLR alogénico IM03-7768 donante (mitomicina C tratada)	53101	42839	48283	48074.3	5134.18	10.7		
25		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células B)	515	789	294	532.7	247.97	46.6		
30	SI (donante)				59					
35	SI (línea célula)				1					
40	IM03-7775	Proliferación de línea de base de receptor	1272	300	544	705.3	505.69	71.7		
45		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	232	199	484	305.0	155.89	51.1		
50		MLR alogénico IM03-7768 donante (mitomicina C tratada)	23554	10523	28965	21014.0	9479.74	45.1		
55		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células B)	768	924	563	751.7	181.05	24.1		
60	SI (donante)				30					
65	SI (línea célula)				1					
70	IM03-7776	Proliferación de línea de base de receptor	1530	137	1046	904.3	707.22	78.2		
75		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	420	218	394	344.0	109.89	31.9		
80		MLR alogénico IM03-7768 donante (mitomicina C tratada)	28893	32493	34746	32044.0	2952.22	9.2		
85		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células B)	a	a	a	a	a	a		
90	SI (donante)				35					
95	SI (línea célula)				a					

**Tabla 11-3.** Índice de estimulación promedio de células de la placenta y un donante alógeno en una reacción de linfocitos mixtos con seis receptores alógenos individuales.

Índice de estimulación media		
	Recipiente	Placenta
Plato 1 (receptores 1-3)	279	3
Plato 2 (receptores 4-6)	46.25	1.3

**Reacción de linfocitos mixtos - Cordón umbilical.** Se cribaron seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un único donante alógeno que presentaría una respuesta a la proliferación robusta en una reacción de linfocitos mixtos con los otros cinco donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante de control positivo alógeno. Los cinco donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. El donante de control positivo alógeno y las líneas celulares derivadas del cordón umbilical se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción de linfocitos mixtos con los cinco receptores alógenos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado usando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 11-4). El índice de estimulación promedio osciló de 6,5 (placa 1) a 9 (placa 2) y los controles positivos de donante alógenos oscilaron de 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 11-5).

**Tabla 11-4.** Datos de la reacción de linfocitos mixtos - Línea celular A (Cordón umbilical)

DPM Para ensayo de proliferación										
ID PLATO: PLATO 1										
Analítico número	Cultivo Sistema	Replicas			Media	SD	CV			
		1	2	3						
IM04-2478	Proliferación de línea de base de receptor	1074	406	391	623.7	390.07	62.5			
	Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	672	510	1402	861.3	475.19	55.2			
	MLR alogénico IM04-2477 donante (mitomicina C tratada)	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7			
	MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células A)	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3			
SI (donante)					70					
SI (línea célula)					8					
IM04-2479	Proliferación de línea de base de receptor	530	508	527	521.7	11.93	2.3			
	Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	701	567	1111	793.0	283.43	35.7			
	MLR alogénico IM04-2477 donante (mitomicina C tratada)	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1			
	MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células A)	5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3			
SI (donante)					47					
SI (línea célula)					7					

ES 2 542 070 T3

DPM Para ensaño de proliferación								
ID PLATO: PLATO 1								
5	Analítico número	Cultivo Sistema	Replicas			Media	SD	CV
			1	2	3			
10	IM04-2480	Proliferación de línea de base de receptor	1192	854	1330	1125.3	244.90	21.8
15		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	2963	993	2197	2051.0	993.08	48.4
20		MLR alogénico IM04-2477 donante (mitomicina C tratada)	25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7
25		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células A)	2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1
	SI (donante)					23		
	SI (línea célula)					3		
30	IM04-2481	Proliferación de línea de base de receptor	695	451	555	567.0	122.44	21.6
35		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	738	1252	464	818.0	400.04	48.9
40		MLR alogénico IM04-2477 donante (mitomicina C tratada)	13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8
45		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células A)	4495	3671	4674	4280.0	534.95	12.5
	SI (donante)					31		
	SI (línea célula)					8		
ID PLATO: PLATO 2								
50	Analítico número	Cultivo Sistema	Replicas			Media	SD	CV
			1	2	3			
55	IM04-2482	Proliferación de línea de base de receptor	432	533	274	413.0	130.54	31.6
60		Control de la autoestimulación (mitomicina C tratada células autólogas)	1459	633	598	896.7	487.31	54.3
65		MLR alogénico IM04-2477 donante (mitomicina C tratada)	24286	30823	31346	28818.3	3933.82	13.7
		MLR con la línea celular (mitomicina C tratada tipo de células A)	2762	1502	6723	3662.3	2724.46	74.4
	SI (donante)					70		
	SI (línea célula)					9		

ID PLATO: PLATO 2									
Analítico número	Cultivo Sistema	Replicas			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM04-2477 alógeno donante	Proliferación de línea de base de receptor	312	419	349	360.0	54.34	15.1		
	Control de la autoestimulación (mitomicina tratada células autólogas)	567	604	374	515.0	123.50	24.0		
Línea celular tipo A	Proliferación de línea de base de receptor	5101	3735	2973	3936.3	1078.19	27.4		
	Control de la autoestimulación (mitomicina tratada células autólogas)	1924	4570	2153	2882.3	1466.04	50.9		

**Tabla 11-5.** Índice de estimulación promedio de células derivadas del cordón umbilical y un donante alógeno en una reacción de linfocitos mixtos con cinco receptores alógenos individuales.

Índice de estimulación media		
	Recipiente	Cordón Umbilical
Plato 1 (receptores 1-4)	42.75	6.5
Plato 2 (receptor 5)	70	9

**Marcadores de células presentadoras de antígeno - Placenta.** Histogramas de células derivadas de la placenta analizadas por citometría de flujo muestran expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como se indica por el valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG, que indica que líneas celulares derivadas de la placenta carecen de las moléculas de la superficie celular requeridas para estimular directamente PBMC alógenas (por ejemplo, linfocitos T CD4<sup>+</sup>).

**Marcadores inmunomoduladores - Células derivadas de la placenta.** Histogramas de células derivadas de la placenta analizadas por citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, como se indica por el elevado valor de fluorescencia con respecto al control de IgG, y expresión negativa de CD 178 y HLA-G, como se indica por el valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG (datos no mostrados).

**Marcadores de células presentadoras de antígeno - Células derivadas del cordón umbilical.** Histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo muestran expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como se indica por el valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG, que indica que líneas celulares derivadas del cordón umbilical carecen de las moléculas de la superficie celular requeridas para estimular directamente PBMC alógenas (por ejemplo, linfocitos T CD4<sup>+</sup>).

**Marcadores inmunomoduladores - Células derivadas del cordón umbilical.** Histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, como se indica por el elevado valor de fluorescencia con respecto al control de IgG, y expresión negativa de CD178 y HLA-G, como se indica por el valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

**Resumen.** En las reacciones de linfocitos mixtos realizadas con líneas celulares derivadas de la placenta, el índice de estimulación promedio osciló de 1,3 a 3, y el de los controles positivos alógenos osciló de 46,25 a 279. En las reacciones de linfocitos mixtos realizadas con líneas celulares derivadas del cordón umbilical, el índice de estimulación promedio osciló de 6,5 a 9, y el de los controles positivos alógenos osciló de 42,75 a 70. Las líneas celulares derivadas de la placenta y del cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas estimulantes HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como se mide por citometría de flujo. Líneas celulares derivadas de la placenta y del cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178 y positivas para la expresión de PD-L2, como se mide por citometría de flujo. Las PBMC de donante alógeno contienen células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DP, DR, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, permitiendo así la estimulación de PBMC alógenas (por ejemplo, linfocitos T CD4<sup>+</sup> sin tratamiento

previo). La ausencia de moléculas de la superficie de células presentadoras de antígeno sobre células derivadas de la placenta y del cordón umbilical requeridas para la estimulación directa de PBMC alógenas (por ejemplo, linfocitos T CD4<sup>+</sup> sin tratamiento previo) y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el bajo índice de estimulación presentado por estas células en una MLR en comparación con controles alógenos.

## Referencias

- Bruder SP y col. USP 6.355.239 B1 (2002)  
 Abbas, AK, Lichtman, AH Cellular and Molecular Immunology 5th Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171  
 Bouteiller P. Le y col., (2003) Placenta 24;S10-S15  
 Coumans B et al., (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196]  
 Brown, Julia y col. (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266

## EJEMPLO 12

### Secreción de factores tróficos por células derivadas del posparto

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de PPDC derivadas de la placenta y del cordón umbilical. Se seleccionaron factores que tenían actividad angiogénica (es decir, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen y col. (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) (Salcedo y col. (2000) Blood 96:34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li y col. (2003) J. Immunol. 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes y col. (2004) Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), inhibidor de tejido de metaloproteinasas 1 de matriz (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-bb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), factor 1a derivado del estroma (SDF-1a)), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng y col. (2003) Dev. Biol. 258:319-33), interleucina-6 (IL-6), proteína-2 quimiotáctica de granulocitos (GCP-2), factor de crecimiento beta2 transformante (TGFbeta2)) o actividad de quimiocinas (proteína 1a inflamatoria de macrófagos (MIP1a), proteína 1beta inflamatoria de macrófagos (MIP1b), monocito quimioatrayente-1 (MCP-1), Rantes (expresada y secretada por linfocitos T normales regulados tras la activación), I309, quimiocina del timo y regulada por la activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

### Métodos y materiales

**Cultivo celular.** PPDC derivadas de placenta y cordón umbilical, además de fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)) en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células se criopreservaron en el paso 11 y se guardaron en nitrógeno líquido. Después de descongelar las células, se añadió medio de crecimiento a las células, seguido de transferencia a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó. El sedimento de células se resuspendió en 4 mililitros de medio de crecimiento, y se contaron las células. Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en un matraz T75 que contenía 15 mililitros de medio de crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio sin suero (DMEM-baja glucosa (Gibco), 0,1 % (peso/volumen) de albúmina de suero bovino (Sigma), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)) durante 8 horas. Se recogió el medio acondicionado sin suero al final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se guardó a -0 °C. Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se desprendieron usando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de tripsina se inhibió mediante la adición de 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de medio de crecimiento. Se estimó el número de células usando un hemocitómetro.

**Ensayo de ELISA.** Las células se cultivaron a 37 °C en 5 % de dióxido de carbono y oxígeno atmosférico. Las PPDC derivadas de la placenta (101503) también se cultivaron en 5 % de oxígeno o beta-mercaptoetanol (BME). La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1a, GCP-2, IL-8 y TGF-beta2 producida por cada muestra de células se midió por un ensayo de ELISA (R&D Systems, Mineápolis, MN). Todos los ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son picogramo/mililitro/millón de células (n=2, sem).

**Ensayo de ELISA multiplexado SearchLight.** Se midieron quimiocinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, I309, TARC, eotaxina, MDC, IL8), BDNF y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF) usando matrices del proteoma SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices del proteoma son ELISA de sándwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Las matrices se producen aplicando en puntos un patrón de 2 x 2, 3 x 3 ó 4 x 4 de cuatro a 16 anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tras un procedimiento de ELISA de sándwich, se obtienen imágenes de la placa entera para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada mancha dentro de cada pocillo de la placa. La cantidad de señal generada en cada mancha es proporcional a la cantidad de proteína diana en el patrón

original o muestra.

**Resultados**

5 **Ensayo de ELISA.** Se secretaron MCP-1 y IL-6 por PPDC derivadas de la placenta y del cordón umbilical y fibroblastos dérmicos (Tabla 12-1). Las células derivadas del cordón umbilical secretaron al menos 10 veces mayores cantidades de MCP-1 e IL-6 que otras poblaciones de células. GCP-2 y IL-8 se expresaron altamente por PPDC derivadas del umbilical. TGF-beta2 no fue detectable. VEGF se detectó en medio de fibroblastos.

10 La cantidad de HGF, FGF y BDNF secretados de células derivadas del cordón umbilical fue notablemente superior a fibroblastos y células derivadas de la placenta (Tablas 12-2 y 12-3). Similarmente, TIMP1, TPO, HBEGF, MCP-1, TARC e IL-8 fueron mayores en células derivadas del cordón umbilical que otras poblaciones de células (Tabla 12-3). No se detectaron ANG2 o PDGF-bb.

15 **Tabla 12-1.** Resultados del ensayo de ELISA

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1a	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
20 Fibroblasto	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Placenta (042303)	60±3	41±2	ND	ND	ND	ND	ND
25 Umbilical (022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
Placenta (071003)	125±16	10±1	ND	ND	ND	ND	ND
Umbilical (071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND
30 Placenta (101503) BME	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
35 Placenta (101503) 5% O <sub>2</sub> , W/O BME	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND
Clave: ND: No detectado							

40 **Tabla 12-2.** Resultados del ensayo de ELISA multiplexado SearchLight

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
45 hFB	19306.3	ND	ND	230.5	5.0	ND	ND	27.9	1.3	ND
P1	24299.5	ND	ND	546.6	8.8	16.4	ND	ND	3.81.3	ND
U1	57718.4	ND	ND	1240.0	5.8	559.3	148.7	ND	9.3	165.7
50 P3	14176.8	ND	ND	568.7	5.2	10.2	ND	ND	1.9	33.6
U3	21850.0	ND	ND	1134.5	9.0	195.6	30.8	ND	5.4	388.6
55 Clave: HFB (fibroblastos humanos), P1 (derivados de la placenta PPDC (042303)), U1 (derivado del cordón umbilical PPDC (022803)), P3 (derivados de la placenta PPDC (071003)), U3 (cordón umbilical de origen PPDC (071003)). ND: No detectado.										

60

65

**Tabla 12-3.** Resultados del ensayo de ELISA multiplexado SearchLight

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8	
5	hFB	ND	ND	39.6	ND	ND	0.1	ND	ND	204.9
	P1	79.5	ND	228.4	4.1	ND	3.8	12.2	ND	413.5
10	U1	ND	8.0	1694.2	ND	22.4	37.6	ND	18.9	51930.1
	P3	ND	ND	102.7	ND	ND	0.4	ND	ND	63.8
	U3	ND	5.2	2018.7	41.5	11.6	21.4	ND	4.8	10515.9
15	Clave: hFB (fibroblastos humanos), P1 (derivados de la placenta PPDC (042303)), U1 (derivado del cordón umbilical PPDC (022803)), P3 (derivados de la placenta PPDC (071003)), U3 (cordón umbilical de origen PPDC (071003)). ND: No detectado.									

**Resumen.** Células del cordón umbilical secretaron cantidad significativamente mayor de factores tróficos que las células derivadas de la placenta y fibroblastos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, bFGF, MCP-1 y IL-8, desempeñan funciones importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF y IL-6, tienen funciones importantes en la regeneración neural. Bajo estas condiciones, la expresión de algunos factores se confinó a células derivadas del cordón umbilical, tales como MIP1b, Rantes, I309 y FGF.

**Referencias**

Le Belle JE, Svendsen CN.(2002) Stem cells for neurodegenerative disorders: where can we go from here? BioDrugs. 16;389-401

Rosen EM, Lamszus K, Lathera J, Polverini PJ, Rubin JS, Goldberg ID. (1997) HGF/SF in angiogenesis. Ciba Found Symp. 212;215-26.

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. Blood. 96;34-40.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. J Immunol. 170;3369-76

Hughes GC, Biswas SS, Yin B, Coleman RE, DeGrado TR, Landolfo CK, Lowe JE, Annex BH, Landolfo KP. (2004) Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF. Ann Thorac Surg. 77;812-8.

Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP (2003) Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. Dev Biol.258;319-33.

Sebire G, Emilie D, Wallon C, Hery C, Devergne O, Delfraissy JF, Galanaud P, Tardieu M. (1993) In vitro production of IL-6, IL-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha by human embryonic microglial and neural cells. J Immunol. 150;1517-23.

**EJEMPLO 13:**

**Ensayo de coagulación del plasma**

La terapia de células puede inyectarse sistémicamente para ciertas aplicaciones en las que las células pueden dirigirse al sitio de acción. Es importante que las células inyectadas no produzcan trombosis, que puede ser letal. El factor de tejido, una glucoproteína procoagulante unida a la membrana, es el iniciador de la cascada de coagulación extrínseca, que es la vía de coagulación predominante *in vivo*. El factor de tejido también desempeña una función importante en la formación de vasos embrionarios, por ejemplo, en la formación de la pared vascular primitiva (Brodsky y col. (2002) Exp. Nephrol. 10:299-306). Para determinar las posibilidades de las PPDC para iniciar la coagulación, PPDC derivadas del cordón umbilical y de la placenta se evaluaron para la expresión del factor de tejido y su capacidad para iniciar la coagulación del plasma.

**Métodos y materiales**

**Factor de tejido humano.** Se reconstituyó factor de tejido humano SIMPLASTIN (Organon Tekailca Corporation, Durham, NC), con 20 mililitros de agua destilada. La disolución madre se diluyó sucesivamente (1:2) en ocho tubos. Se descongeló plasma humano normal (George King BioMedical, Overland Park, KS) a 37 °C en un baño de agua y a continuación se guardó en hielo antes de uso. A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadieron 100 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 microlitros de Simplastin® diluido (excepto un pocillo de blanco), 30 microlitros de cloruro de calcio 0,1 molar y 100 microlitros de plasma humano normal. La placa se

colocó inmediatamente en un lector de microplacas de temperatura controlada y la absorbancia se midió a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

**Células J-82 y derivadas del posparto.** Se cultivaron células J-82 (ATCC, MD) en medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Gibco, Carlsbad, CA) que contenía 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan UT), piruvato de sodio 1 milimolar (Sigma Chemical, St. Louis, MO), L-glutamina 2 milimolar (Mediatech Herndon, VA), 1 x aminoácidos no esenciales (Mediatech Herndon, VA). Al 70 % de confluencia, las células se transfirieron a pocillos de placa de 96 pocillos a 100.000, 50.000 y 25.000 células/pocillo. Las células derivadas del posparto derivadas de placenta y cordón umbilical se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco), 15 % (v/v) de FBS, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomocina (Gibco) y 0,001 % de beta-mercaptoetanol (Sigma)) en matraces T75 recubiertos de gelatina (Corning, Corning, NY). Las células derivadas de la placenta en el pase 5 y las células derivadas del cordón umbilical en los pases 5 y 11 se transfirieron a pocillos a 50.000 células/pocillo. Se eliminó medio de cultivo de cada pocillo después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos. Las células se suspendieron en PBS sin calcio y magnesio. Las células se incubaron con anticuerpo anti-factor de tejido, las células se incubaron con 20 microgramos/mililitro de CNTO 859 (Centocor, Malvern, PA) durante 30 minutos. Se añadió cloruro de calcio (30 microlitros) a cada pocillo. La placa se sembró inmediatamente en un lector de microplacas de temperatura controlada y se midió la absorbancia a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

**Tinción de anticuerpos.** Las células se lavaron en PBS y se desprendieron del matraz con tripsina/EDTA (Gibco Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 % (v/v) de FBS en PBS a una concentración de células de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Se añadió anticuerpo a 100 microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar el anticuerpo sin unir. Las células se resuspendieron en 100 microlitros de 3 % de FBS y se añadió anticuerpo secundario según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo secundario no unido. Las células lavadas se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

**Análisis de citometría de flujo.** El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

### Resultados

El análisis de citometría de flujo reveló que tanto las células derivadas del posparto derivadas de la placenta como del cordón umbilical expresan factor de tejido. Un ensayo de coagulación de plasma demostró que el factor de tejido era activo. Ambas células derivadas de la placenta y del cordón umbilical elevaron la tasa de coagulación como se indica por el tiempo hasta la absorbancia al 50 % ( $T_{1/2}$  hasta el máx.; **Tabla 13-1**). La coagulación se observó con tanto células tempranas (P5) como tardías (P18). El  $T_{1/2}$  hasta el máx. es inversamente proporcional al número de células J82. La preincubación de células umbilicales con CNTO 859, un anticuerpo para factor de tejido, inhibió la reacción de coagulación, mostrando así que el factor de tejido era responsable de la coagulación.

**Tabla 13-1.** Se evaluó el efecto del factor de tejido humano (SIMPLASTIN), células derivadas de la placenta (Pla) y células derivadas del cordón umbilical (Umb) sobre la coagulación del plasma. El tiempo hasta la absorbancia al 50 % (T½ hasta el máx.) en la meseta en segundos se usó como unidad de medición.

5	Simplastin® Dilution	T½ hasta el máx. (segundos)
	1:2	61
	1:4	107
10	1:8	147
	1:16	174
15	1:32	266
	1:64	317
	1:128	378
20	0 (control negativo)	1188
	J-82 células	
	100,000	122
25	50,000	172
	25,000	275
30	Pla P5	
	50,000	757
35	Umb P5	
	50,000	833
40	Umb P18	
	50,000	443

45 **Resumen.** PPDC derivadas de la placenta y del cordón umbilical expresan factor de tejido, que puede inducir la coagulación. La adición de un anticuerpo a factor de tejido puede inhibir el factor de tejido. El factor de tejido normalmente se encuentra en células en una conformación que es inactiva, pero se activa por tensión mecánica o química (por ejemplo, LPS) (Sakariassen y col. (2001) *Tromb. Res.* 104:149-74; Engstad y col. (2002) *Int. Immunopharmacol.* 2:1585-97). Así, la minimización de la tensión durante el proceso de preparación de las PPDC puede prevenir la activación del factor de tejido. Además de la actividad trombogénica, el factor de tejido se ha asociado a actividad angiogénica. Así, la actividad del factor de tejido puede ser beneficiosa cuando las PPDC derivadas del cordón umbilical o de la placenta se trasplantan en tejido, pero deben inhibirse cuando las PPDC se inyectan intravenosamente.

55 **Referencias**

Doshi and Marmur, *Critical Care Med.*, 30:S241-S250 (2002)  
 Moll and Ortel, *Ann. Intern. Med.*, 127:177-185 (1997)

60 **EJEMPLO 14**

**Ensayo de formación de redes endoteliales**

65 La angiogénesis, o formación de nueva vasculatura, es necesaria para el crecimiento de tejido nuevo. La inducción de la angiogénesis es un objetivo terapéutico importante en muchas afecciones patológicas. El presente estudio

pretendió identificar la posible actividad angiogénica de las células derivadas del posparto en ensayos *in vitro*. El estudio siguió un método bien establecido de sembrar células endoteliales sobre una placa de cultivo recubierta con MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA), un extracto de la membrana basal (Nicosia y Ottinetti (1990) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26(2): 119-28). El tratar células endoteliales sobre MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) con factores angiogénicos estimulará las células para formar una red que es similar a capilares. Esto es un ensayo *in vitro* común para probar estimulantes e inhibidores de la formación de vasos sanguíneos (Ito y col. (1996) *Int. J. Cancer* 67(1):148-52). Los presentes estudios hicieron uso de un sistema de co-cultivo con las células derivadas del posparto sembradas sobre insertos de pocillos de cultivo. Estos insertos permeables permiten el intercambio pasivo de componentes del medio entre los medios de células de cultivo endoteliales y derivadas del posparto.

### **Material y métodos**

#### **Cultivo celular.**

*Células derivadas de tejido posparto.* Se recibieron cordones umbilicales y placenta humanos y las células se aislaron como se ha descrito previamente (**Ejemplo 1**). Las células se cultivaron en medio de crecimiento (medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina (Invitrogen), 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO)) sobre matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células usadas para experimentos estuvieron entre los pases 4 y 12.

Células derivadas del posparto activamente en crecimiento se tripsinaron, se contaron y se sembraron sobre insertos de cultivo de tejido de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron sobre los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento a 37 °C bajo condiciones de crecimiento estándar.

*Citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSC).* Se compraron hMSC de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Los cultivos se incubaron bajo condiciones de crecimiento estándar.

MSC activamente en crecimiento se tripsinaron y se contaron y se sembraron sobre insertos de cultivo de tejido de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron sobre los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento bajo condiciones de crecimiento estándar.

*Células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC).* Se obtuvieron HUVEC de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separados en tanto medios de células endoteliales EBM como EGM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico cultivado con tejido estándar bajo condiciones de crecimiento estándar. Las células usadas en el ensayo estuvieron entre los pases 4 y 10.

*Células endoteliales de la arteria coronaria humanas (HCAEC).* Se compraron HCAEC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Estas células también se mantuvieron en cultivos separados en tanto las formulaciones de medios EBM como EGM. Las células se cultivaron sobre plástico de tejido cultivado estándar bajo condiciones de crecimiento estándar. Las células usadas para los experimentos estuvieron entre los pases 4 y 8.

**Ensayos de formación de redes endoteliales (MATRIGEL).** Se recubrieron placas de cultivo con MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) según especificaciones del fabricante. Brevemente, se descongeló MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA) a 4 °C y se tomaron aproximadamente 250 microlitros en alícuotas y se distribuyeron uniformemente sobre cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos enfriada (Corning). Entonces, la placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos para permitir que el material solidificara. Se tripsinaron y se contaron cultivos de células endoteliales activamente en crecimiento. Las células se lavaron dos veces en medio de crecimiento con 2 % de FBS por centrifugación, resuspensión y aspiración del sobrenadante. Las células se sembraron sobre los pocillos recubiertos a 20.000 células por pocillo en aproximadamente 0,5 mililitros de medio de crecimiento con 2 % (v/v) de FBS. Entonces, las células se incubaron durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células sedimentaran.

Entonces se trataron cultivos de células endoteliales con tanto bFGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) como VEGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) para servir de control positivo para la respuesta de células endoteliales. Se añadieron insertos Transwell sembrados con células derivadas del posparto a pocillos apropiados con medio de crecimiento con 2 % de FBS en la cámara del inserto. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 24 horas. La placa de pocillos se sacó de la estufa de incubación, y se recogieron imágenes de los cultivos de células endoteliales con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

### **Resultados**

En un sistema de co-cultivo con células derivadas de la placenta o con células derivadas del cordón umbilical, HUVEC forman redes de células (datos no mostrados). Las células HUVEC forman redes de células limitadas en experimentos de co-cultivo con hMSC y con bFGF 10 nanomolar (datos no mostrados). Las células HUVEC sin ningún tratamiento mostraron muy poca o ninguna formación de redes (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las células derivadas del posparto liberan factores angiogénicos que estimulan las HUVEC.

En un sistema de co-cultivo con células derivadas de la placenta o con células derivadas del cordón umbilical, CAEC forman redes de células (datos no mostrados).

La **Tabla 14-1** muestra niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células derivadas del posparto en medio de crecimiento. Las células derivadas del posparto se sembraron sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 37 °C en oxígeno atmosférico durante 48 horas sobre los insertos y a continuación se cambiaron a 2 % de medio FBS y volvieron a 37 °C durante 24 horas. Se eliminó el medio, se congeló inmediatamente y se guardó a -80 °C, y se analizó por el ensayo de ELISA de múltiplex SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son los promedios de mediciones por duplicado. Los resultados muestran que las células derivadas del posparto no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivado de plaquetas-bb (PDGF-bb) o factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HBEGF). Las células liberan cantidades medibles de inhibidor de tejido de metaloproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

**Tabla 14-1.** Posibles factores angiogénicos liberados de células derivadas del posparto. Células derivadas del posparto se cultivaron 24 horas en medio con 2 % de FBS en oxígeno atmosférico. Se eliminó el medio y se ensayó por el ensayo de ELISA múltiplex SearchLight (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son concentraciones en el medio informados en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGFBB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	91655.3	175.5	<2.0	275.5	3.0	58.3	7.5	644.6	<1.2
Plac (P11)	1592832.4	28.1	<2.0	1273.1	193.3	5960.3	34.8	12361.1	1.7
Umb cord (P4)	81831.7	<9.8	<2.0	365.9	14.1	200.2	5.8	<4.0	<1.2
Media sola	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

Plac: placenta células derivadas; Cable de Umb: células de cordón umbilical derivados

La **Tabla 14-2** muestra niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células derivadas del posparto. Las células derivadas del posparto se sembraron sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en medio de crecimiento a 5 % de oxígeno durante 48 horas sobre los insertos y a continuación se cambiaron a 2 % de medio FBS y volvieron a incubación con 5 % de O<sub>2</sub> durante 24 horas. Se eliminó el medio, se congeló inmediatamente y se guardó a -80 °C, y se analizó por el ensayo de ELISA múltiplex SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son los promedios de mediciones por duplicado. Los resultados muestran que las células derivadas del posparto no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivado de plaquetas-bb (PDGF-bb) o factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HBEGF). Las células liberan cantidades medibles de inhibidor de tejido de metaloproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

**Tabla 14-2.** Posibles factores angiogénicos liberados de células derivadas del posparto. Células derivadas del posparto se cultivaron 24 horas en medio con 2 % de FBS en 5 % de oxígeno. Se eliminó el medio y se ensayó por el ensayo de ELISA múltiplex SearchLight (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son concentraciones en el medio informadas en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF-BB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HB-EGF (pg/ml)	
5	Plac (P4)	72972.5	253.6	<2.0	743.1	2.5	30.2	15.1	1495.1	<1.2
10	Plac (P11)	458023.1	55.1	<2.0	2562.2	114.2	2138.0	295.1	7521.3	1.8
15	Umb cord (P4)	50244.7	<9.8	<2.0	403.3	10.7	156.8	5.7	<4.0	<1.2
20	Media sola	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2
Plac: placenta células derivadas; Cable de Umb: células de cordón umbilical derivados										

25 **Resumen.** Los resultados del presente estudio muestran que las células derivadas del posparto pueden estimular tanto células endoteliales de la vena umbilical humana como de la arteria coronaria para formar redes en un ensayo *in vitro* MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA). Este efecto es similar al observado con factores angiogénicos conocidos en este sistema de ensayo. Estos resultados sugieren que las células derivadas del posparto son útiles para estimular la angiogénesis *in vivo*.

### 30 EJEMPLO 15

#### Trasplante de PPDC

35 Células derivadas del cordón umbilical y placenta posparto son útiles para terapias regenerativas. Se evaluó el tejido producido por células derivadas del posparto trasplantadas en ratones SCID con un material biodegradable. Los materiales evaluados fueron no tejido de VICRYL, 35/65 espuma de PCL/PGA e hidrogel de péptidos de auto-ensamblaje RAD 16.

#### 40 Métodos y materiales

45 **Cultivo celular.** Se cultivaron células derivadas de la placenta y células derivadas del cordón umbilical en medio de crecimiento (DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (Cat. nº SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramo/mililitro de estreptomina (Gibco)) en matraces recubiertos de gelatina.

50 **Preparación de matrices.** Se preparó un andamiaje de no tejido usando una técnica de perforación con agujas tradicional como se describe más adelante. Fibras, comprendidas de un copolímero de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA) absorbible sintético, comercializadas bajo el nombre comercial VICRYL, se obtuvieron de Ethicon, Inc. (Somerville, NJ). Las fibras fueron filamentos de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro. A continuación, las fibras se cortaron y plegaron en longitudes uniformes de 2 pulgadas para formar fibra cortada de 2 pulgadas. Entonces se preparó una matriz de no tejido perforada con agujas dispuesta en seco utilizando las fibras cortadas VICRYL. Las fibras cortadas se abrieron y se cardaron en maquinaria de no tejido estándar. La estera resultante estuvo en forma de fibras cortadas palmeadas. Las fibras cortadas palmeadas se perforaron con agujas para formar el andamiaje de no tejido perforado con agujas dispuesto se seco. El andamiaje de no tejido se aclaró en agua, seguido de otra incubación en etanol para eliminar cualquier producto químico residual o auxiliares de procesamiento usados durante el proceso de fabricación.

60 Espumas, compuestas de 35/65 de copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (35/65 de PCL/PGA), se formaron por el proceso de liofilización, como se trata en la patente de EE.UU. nº 6.355.699.

65 **Preparación de muestras.** Se sembraron un millón de células viables en 15 microlitros de medio de crecimiento sobre andamiajes de no tejido de VICRYL de 5 milímetros de diámetro, 2,25 milímetros de espesor (64,33 miligramos/centímetros cúbicos; Lote nº 3547-47-1) o espuma 35/65 de PCL/PGA de 5 milímetros de diámetro (Lote nº 3415-53). Se dejó que las células se unieran durante dos horas antes de añadir más medio de crecimiento para cubrir los andamiajes. Las células se cultivaron sobre andamiajes durante la noche. Los andamiajes sin células

también se incubaron en medio.

Se obtuvieron péptidos de auto-ensamblaje RAD16 (3D Matrix, Cambridge, MA, bajo un acuerdo de transferencia de material) como una disolución estéril al 1 % (peso/volumen) en agua, que se mezcló 1:1 con  $1 \times 10^6$  células en 10 % (peso/volumen) de sacarosa (Sigma, St Louis, MO), HEPES 10 milimolar en medio modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) inmediatamente antes de uso. La concentración final de las células en el hidrogel RAD16 fue  $1 \times 10^6$  células/100 microlitros.

#### **MATERIAL DE PRUEBA (N=4IRx)**

1. No tejido de VICRYL +  $1 \times 10^6$  células derivadas del cordón umbilical
2. Espuma 35/65 de PCL/PGA +  $1 \times 10^6$  células derivadas del cordón umbilical
3. Péptido de auto-ensamblaje RAD16 +  $1 \times 10^6$  células derivadas del cordón umbilical
4. No tejido de VICRYL +  $1 \times 10^6$  células derivadas de la placenta
5. Espuma 35/65 de PCL/PGA +  $1 \times 10^6$  células derivadas de la placenta
6. Péptido de auto-ensamblaje RAD16 +  $1 \times 10^6$  células derivadas de la placenta
7. Espuma 35/65 de PCL/PGA
8. No tejido de VICRYL

**Preparación de animales.** Los animales utilizados en este estudio se manipularon y mantuvieron según los actuales requisitos del Acta de Bienestar Animal. El cumplimiento de las leyes públicas anteriores se llevó a cabo adhiriéndose a las reglamentaciones de Bienestar Animal (9 CFR) y conforme a las actuales normas promulgadas en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7ª edición.

*Ratones (Mus Musculus)/Fox Chase SCID/Macho (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianápolis, Indiana), 5 semanas de edad.* Toda la manipulación de los ratones SCID tuvo lugar bajo una campana. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramo de KETASET (clorhidrato de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) y 10 miligramos/kilogramo de ROMPUN (xilazina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de anestesia, el lomo entero del animal desde el área cervical dorsal hasta el área lumbosacra dorsal se cortó sin pelo usando tijeras para animales eléctricas. Entonces, el área se lavó con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se pintó con una disolución de yodóforo acuosa de 1 % de yodo disponible. Se aplicó pomada oftálmica a los ojos para prevenir el secado del tejido durante el periodo anestésico.

**Técnica de implantación subcutánea.** Se hicieron cuatro incisiones en la piel, cada una de aproximadamente 1,0 cm de longitud, sobre la espalda de los ratones. Se localizaron dos sitios craneales transversalmente sobre la región torácica lateral dorsal, aproximadamente 5 mm caudal al borde inferior palpado del omóplato, con uno a la izquierda y uno a la derecha de la columna vertebral. Se colocaron otros dos transversalmente sobre el área del músculo glúteo al nivel sacro-lumbar caudal, aproximadamente 5 mm caudal a la cresta ilíaca palpada, con uno a cualquier lado de la línea media. Los implantes se colocaron aleatoriamente en estos sitios. La piel se separó del tejido conjuntivo subyacente para hacer un pequeño bolsillo y se colocó el implante (o se inyectó para RAD16) aproximadamente 1 cm caudal a la incisión. El material de prueba apropiado se implantó en el espacio subcutáneo. La incisión en la piel se cerró con grapas metálicas.

**Alojamiento del animal.** Los ratones se alojaron individualmente en jaulas Microisolator durante todo el transcurso del estudio dentro de un intervalo de temperatura de 64°F – 79°F y humedad relativa del 30 % al 70 %, y se mantuvieron en un ciclo aproximado de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. La temperatura y la humedad relativa se mantuvieron dentro de los intervalos establecidos al mayor grado posible. La dieta consistió en pienso para ratones Irradiated Pico 5058 (Purina Co.) y se alimentó agua a voluntad.

Los ratones se sacrificaron a sus intervalos designados por inhalación con dióxido de carbono. Se cortaron los sitios de implantación subcutánea con su piel cubriente y se congelaron para histología.

**Histología.** La piel cortada con implante se fijó con 10 % de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Muestras con tejido cubriente y adyacente se cortaron en dos centralmente, se procesaron en parafina y se incorporaron sobre la superficie cortada usando métodos rutinarios. Se obtuvieron secciones de tejido de cinco micrómetros por microtomo y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Poly Scientific Bay Shore, NY) usando métodos rutinarios.

#### **Resultados**

Hubo un mínimo crecimiento hacia adentro de tejido en espumas implantadas subcutáneamente en ratones SCID después de 30 días (datos no mostrados). A diferencia, hubo un amplio relleno de tejido en espumas implantadas con células derivadas de umbilical o células derivadas de la placenta (datos no mostrados).

Hubo algún tejido en crecimiento en andamiajes de no tejido VICRYL. Los andamiajes de no tejido sembrados con

células derivadas del cordón umbilical o de la placenta mostraron una elevada deposición de matriz y vasos sanguíneos maduros (datos no mostrados).

5 **Resumen.** El fin de este estudio fue determinar el tipo de tejido formado por las células derivadas de cordón  
umbilical humano o de la placenta en andamiajes en ratones inmunodeficientes. Se sembraron discos absorbibles  
sintéticos de no tejido/espuma (5,0 milímetros de diámetro x 1,0 milímetro de espesor) o hidrogel de péptidos auto-  
ensamblantes con tanto células derivadas de cordón umbilical humano como placenta y se implantaron  
subcutáneamente bilateralmente en la región espinal dorsal de ratones SCID. El presente estudio demuestra que las  
10 células derivadas del posparto pueden aumentar espectacularmente la formación de tejido de buena calidad en  
andamiajes biodegradables.

Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las realizaciones  
presentemente preferidas, se entiende que la invención no se limita a las realizaciones específicamente desveladas  
y ejemplificadas en el presente documento. Pueden hacerse numerosos cambios y modificaciones a la realización  
15 preferida de la invención, y tales cambios y modificaciones pueden hacerse sin apartarse del alcance de la invención  
como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

20 <110> ETHICON, INCORPORATED

<120> REPARACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS Y REGENERACIÓN DE UTILIZANDO LAS CÉLULAS POSPARTO  
DERIVADAS

25 <130> P055854EP

<140>  
<141>

30 <150> EP 04777286.8  
<151> 2004-06-25

<150> US 60/483,264  
<151> 2003-06-27

35 <160> 10

<170> Patent In version 3.5

40 <210> 1  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético

<400> 1  
gagaaatcca aagagcaaat gg 22

50 <210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético

<400> 2  
agaatggaaa actggaatag g 21

60 <210> 3

65

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético  
 <400> 3  
 10 tcttcgatgc ttcgattcc 20  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético  
 20 <400> 4  
 gaattctcgg aatctctgtt g 21  
 <210> 5  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético  
 30 <400> 5  
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21  
 <210> 6  
 35 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético  
 <400> 6  
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22  
 45 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético  
 <400> 7  
 55 tctgcagctc tgttgaagg 20  
 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético  
 <400> 8  
 65 ctcaaaaac ttctccaca cc 22

# ES 2 542 070 T3

<210> 9  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético

<400> 9  
10 cccacgccac gctctcc 17

<210> 10  
<211> 19  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador sintético

<400> 10  
20 tcctgcagt tgggtctcc 19

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5 1. Una población homogénea aislada de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano, para su uso en inducir angiogénesis, en la que dicha población de células es obtenible por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano libre de sangre con una metaloproteasa de matriz, proteasa neutra y enzima mucolítica, y en la que dicha población de células es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, y en la que la población de células:
- 10 a) produce cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, HLA-A, B, C y PDGFr-alfa, como se detecta por citometría de flujo; y  
b) no produce ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.
- 15 2. Una población homogénea aislada de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano, para su uso en producir una red vascular *in vivo*, en la que dicha población de células es obtenible por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano libre de sangre con una metaloproteasa de matriz, proteasa neutra y enzima mucolítica, y en la que dicha población de células es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, y en la que la población de células:
- 20 a) produce cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, HLA-A, B, C y PDGFr-alfa, como se detecta por citometría de flujo; y  
b) no produce ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por citometría de flujo.
- 25 3. La población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha población de células requiere L-valina para el crecimiento.
- 30 4. La población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha población de células se obtiene por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano con colagenasa, dispasa e hialuronidasa.
- 35 5. La población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las células se administran como mezclas con otras células.
- 40 6. La población de células para el uso de la reivindicación 5, en la que las otras células son células epiteliales, células de la médula ósea, adipocitos, queratinocitos, células endoteliales vasculares, mioblastos, miocitos, células del estroma, u otras células de tejido blando.
- 45 7. La población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las células se administran con otro fármaco o molécula biológica.
- 50 8. La población de células para el uso de la reivindicación 7, en la que las células se administran con el fármaco o molécula biológica adicional, junto en una única composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas, simultáneamente o secuencialmente.
- 55 9. La población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las células se siembran sobre un andamiaje tridimensional antes de la implantación.
- 60
- 65