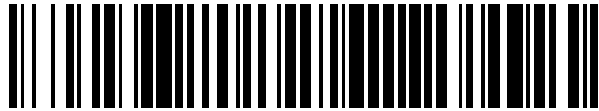


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 267**

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 10183053 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2399990**

54 Título: **Células derivadas de cordón umbilical post-parto para su uso en el tratamiento de enfermedad del corazón y el sistema circulatorio**

30 Prioridad:

27.06.2003 US 483264 P

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

05.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 550 267 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 derivadas de cordón umbilical post-parto para su uso en el tratamiento de enfermedad del corazón y el sistema circulatorio

Descripción

5

CAMPO DE LA INVENCION

10

La invención se refiere a células derivadas del postparto que tienen el potencial de dividir y de diferenciar a lo largo del linaje mesenquimal, hacia fenotipos cardiomiogénicos, angiogénicos y vasculogénicos. La invención también se refiere a métodos para el uso de dichas células derivadas del postparto en el tratamiento terapéutico de enfermedades del corazón y el sistema circulatorio.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Generalmente se reconoce que las células que comprenden la musculatura celular en mamíferos son post-mitóticas. Esto lleva a dificultades en músculos del corazón lesionados o enfermos, que son incapaces en gran medida de reparar células dañadas que se vuelven necróticas. Después de dicho daño, la eficiencia y producción de la musculatura del corazón disminuyen, colocando estrés adicional en el corazón, llevando a daño u necrosis adicionales, y en último lugar a fallo cardíaco.

20

La espiral descendente de un corazón sano a un corazón deteriorado puede ser resultado de una variedad de condiciones incluyendo lesión física, enfermedad del corazón, incluyendo enfermedad del corazón congénita e infecciones del corazón o el tejido circulatorio. Las enfermedades del corazón y el sistema circulatorio son a menudo en último término fatales, particularmente las condiciones que resultan en fallo cardíaco, por ejemplo, cardiomiopatías. Actualmente no hay cura para la mayoría de dichas condiciones y muchos pacientes requieren, por ejemplo, dispositivos de asistencia ventricular y eventualmente trasplantes de corazón

25

Actualmente, hay interés en usar o células madre, que pueden dividirse o diferenciarse, o células musculares de otras fuentes, incluyendo células lisas y de los músculos esqueléticos, para ayudar al corazón a repararse o revertir el daño del tejido, restaurar la función, o al menos parar el ciclo de daños que lleva a pérdida adicional del tejido del corazón sano. Además muchas enfermedades y lesiones circulatorias implican daño crónico o agudo a, o necrosis de, tejidos circulatorios, y las células de las que dichos tejidos están comprendidas. Las terapias basadas en células y derivadas de células son de interés para estas condiciones.

30

35

Hay por lo tanto una necesidad en la técnica para terapias basadas en células o derivadas de células que puedan ayudar en la curación de tejidos cardíacos o circulatorios, o que puedan resultar en la reparación o reemplazo de dicho daño en un paciente.

RESUMEN DE LA INVENCION

40

La invención proporciona una población homogénea de células humanas derivadas de tejido del cordón umbilical, para el uso en el tratamiento de una enfermedad del corazón o sistema circulatorio, en el que dicha población de células se puede obtener aislando cordón umbilical humano tejido libre de sangre en presencia de metaloproteasa, proteasa neutra y actividades enzimáticas mucolíticas, y en el que dicha población de células es capaz de auto-renovarse y expandirse en el cultivo, tiene el potencial para diferenciarse en células u otros fenotipos y en el que la población de células:

45

- a) produce cada uno de CD 10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como se detectan por citometría de flujo; y
- b) no produce ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR,DP,DQ, como se detectan por citometría de flujo.

50

55

La divulgación, en uno de sus aspectos está dirigida de manera general a células derivadas del post-parto aisladas que están derivadas de tejido post-parto que está sustancialmente libre de sangre y que son capaces de auto-renovarse y expandirse en cultivo y que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo del linaje mesenquimal, hacia fenotipos cardiomiogénicos, angiogénicos y vasculogénicos, y adicionalmente hacia células como cardiomiocitos, células endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células del músculo liso (por ejemplo células musculares lisas vasculares), así como células de los sistemas excitatorio y conductor, y progenitores o parientes más antiguos de las anteriores. La divulgación, en otros aspectos, está dirigida a poblaciones de células que comprenden dichas células, y composiciones de células terapéuticas, así como métodos para usar las poblaciones de células para el tratamiento terapéutico de daño o enfermedad cardíaca o circulatoria.

60

65

En un primer aspecto, la divulgación proporciona células derivadas del post-parto aisladas que comprenden células que requieren L-valina derivadas del tejido post-parto sustancialmente libre de sangre. Las células son

capaces de auto-renovarse y expandirse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos; por ejemplo cardiomiocitos, o sus progenitores. Las células son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno desde alrededor del 5% a alrededor del 20% y comprenden al menos una de las siguientes características:

- 5 potencial de por lo menos alrededor de 40 duplicaciones en el cultivo;
 unión y expansión en un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en el que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina, o fibronectina;
- 10 producción de al menos un factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa;
 producción de al menos uno de CD 10, CD 13, 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, CD 117, CD141, CD 178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR,DP,DQ, detectadas por citometría de flujo;
- 15 expresión de al menos uno de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimioquinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanomas, alfa); ligando 6 de quimioquinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimioquinas motivo (C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3;
- 20 expresión de al menos uno de lectina de tipo C (dependiente del calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro de la superfamilia 2 (inducida por activación); Tumor de Wilms 1; familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2; y renina; receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina); Homo sapiens, clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parciales; proteína quinasa C, zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; reguladas hacia abajo en el cáncer de ovario 1; ARNm Homo sapiens; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113);
- 25 expresión, que con relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de cresta ilíaca, está reducida para al menos uno de: homeobox 2 de estatura corta; proteína 2 de shock cardiaco de 27kDa; ligando 12 de quimioquinas (motivo C-X-C (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox 2 de mesénquima (homeobox específico de la detención del crecimiento); homólogo 1 del homeobox de sine oculis (Drosophila); alfa B, cristalina; activador asociado enredado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de enlace del plasminógeno); homología src tres (SH3) y dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativo; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción enanismo-relacionado 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de C-endopeptidasa de pro-colágeno; homólogo rizado 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesículas sinápticas; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 tipo receptor de citoquinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de enlace con PDZ (TAZ); homólogo 2 de homeobox de sine oculis (Drosophila); proteína KIAA1034;
- 40 respuesta de crecimiento temprana 3; homeobox menos distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia aldoceto reductasa 1; miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens; clon de ADNc EUROIIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZp564B222 del clon DKFZp564B222); proteína de la membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina); proteína de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1; tipo proteína 3 de interacción de 19kDa BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de enlace con AE; polipéptido VIIa de la subunidad de citocromo c oxidasa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de enlace con el factor de crecimiento tipo insulina 1, 36kDa;
- 50 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; y
 falta de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, 1309, MDC, y VEGF, detectadas por ELISA.

- 55 La célula derivada del postparto de la invención es una célula derivada del 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 identificadoras de cualquiera de: tipo de célula PLA 071003 (P8) (ATCC N° de Acceso PTA-6074); tipo de célula PLA 071003 (P11) (ATCC N° de Acceso PTA-6075); tipo de célula PLA 071003 (P16) (ATCC N° de Acceso PTA-6079); tipo de célula UMB 022803 (P7) (ATCC N° de Acceso PTA-6067) o tipo de célula UMB 022803 (P17) (ATCC N° de Acceso PTA-6068).

- 60 Las células derivadas del postparto se aíslan preferiblemente en presencia de una o más actividades enzimáticas como actividad de metaloproteasa, actividad de proteasa neutra y actividad enzimática mucolítica. Las células preferiblemente comprenden un cariotipo normal, que se mantiene a medida que se pasan las células.

65

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, detectadas por citometría de flujo.

5 La invención proporciona poblaciones de células que comprenden las células de la invención como se han descrito anteriormente. En ciertas realizaciones las poblaciones se incuban en presencia de uno o más factores que estimulan la diferenciación de células madre a lo largo de una vía o linaje cardiogénico. En otras realizaciones, las células se incuban en presencia de compuestos que tienden a estimular la diferenciación a lo largo de vías angiogénicas, hemangiogénicas, y vasculogénicas, o hacia células más comprometidas como cardiomiocitos, células endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células del músculo liso (por ejemplo células musculares lisas vasculares), así como células de los sistemas excitatorio y conductivo, y progenitores de cualquiera de las anteriores, por ejemplo, mioblastos, cardiomioblastos, hemangioblastos, angioblastos y similares, o sus progenitores. Las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical humanas pueden proporcionarse terapéuticamente a un paciente, por ejemplo con enfermedad cardíaca o circulatoria, como una cardiomiopatía, o con lesión cardíaca, como infarto de miocardio, o con cualquier daño o enfermedad del corazón o del sistema circulatorio. En realizaciones actualmente preferidas, la población comprende alrededor del 50% de células derivadas del postparto, mientras que en otras realizaciones preferidas la población es una población sustancialmente homogénea de células derivadas del postparto.

20 La invención proporciona en otro de sus aspectos composiciones de células terapéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y células derivadas del postparto de la invención derivadas de tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libres de sangre. Las células son capaces de auto-renovarse y expandirse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos; por ejemplo fenotipos de músculos lisos o esqueléticos. En realizaciones preferidas, las células pueden diferenciarse a lo largo de vías que llevan a fenotipos de cardiomiocitos, células del endotelio, miocardio, epicardio, endotelio vascular, así como células de músculo liso (por ejemplo células de músculo liso vascular) y células de los sistemas excitatorio y conductivo (por ejemplo células de Purkinje) y progenitores de las anteriores. Las células son capaces de crecer en una atmósfera que contiene oxígeno desde alrededor del 5% a al menos alrededor del 20%. Las células también requieren L-valina para el crecimiento; tienen el potencial de por lo menos al menos 40 duplicaciones en el cultivo; se unen y expanden en un recipiente de cultivo recubierto o sin recubrir, en donde el recipiente de cultivo de tejido recubierto se recubre con gelatina, laminina o fibronectina; producen factor tisular, vimentina y alfa actina del músculo liso; 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, detectadas por citometría de flujo.

35 Las composiciones de células terapéuticas proporcionadas pueden proporcionarse terapéuticamente en un paciente con una cardiomiopatía, u otra enfermedad del corazón, o una lesión cardíaca, o cualquier enfermedad del sistema circulatorio que, por ejemplo, implique lesión celular o necrosis del tejido/celular. En ciertas realizaciones de la divulgación las composiciones de células terapéuticas comprenden células inducidas para diferenciarse a lo largo de una vía o linaje cardiogénico, angiogénico, hemangiogénico o vasculogénico. Las composiciones de células terapéuticas pueden comprender células o en algunas realizaciones de la productos celulares que estimulan las células madre adultas presentes de manera natural en el corazón, sangre, vasos sanguíneos o similares para dividir o diferenciar, o ambas. Preferiblemente las composiciones de células terapéuticas pueden al menos sobrevivir, crecer, estimular el crecimiento, estimular la angiogénesis o vasculogénesis, pero en ciertos casos incluso células no viables como las células senescentes serán terapéuticas, y en algunas realizaciones, incluso las células muertas, o fracciones de las mismas proporcionarán mejoras terapéuticas para un paciente.

50 Las composiciones de células terapéuticas se proporcionan, por ejemplo, por inyección. En ciertas realizaciones preferidas, las composiciones de células terapéuticas se proporcionan por inyección intracardiaca. En otras realizaciones, se colocan adyacentes a un aspecto interior o exterior de los músculos cardíacos directamente, o en una matriz como un complejo célula-matriz. Las composiciones de células terapéuticas proporcionadas en forma de un complejo matriz-célula comprenden matrices que incluyen, por ejemplo, supercóntigos biocompatibles, entramados, estructuras de autoensamblaje y similares, ya sean bioabsorbibles o no, líquidas o sólidas. Muchas de dichas matrices son conocidas por los expertos en la técnica de ingeniería de tejidos, curación de heridas y similares. Las composiciones terapéuticas pueden comprender también compuestos o productos farmacéuticos biológicos adicionales que pueden mejorar el valor terapéutico al paciente, y las composiciones pueden también comprender una o más células o tipos de células adicionales.

Las composiciones de células terapéuticas, en ciertas realizaciones también comprenden células que:

60 expresan al menos uno de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimioquinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimioquinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimioquinas motivo (C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3;

65 expresan al menos uno de lectina de tipo C (dependiente del calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro de la superfamilia 2 (inducida por activación); Tumor de Wilms 1; familia de aldehído

deshidrogenasa 1, miembro A2; y renina; receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina); Homo sapiens, clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parciales; proteína quinasa C, zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; reguladas hacia abajo en el cáncer de ovario 1; ARNm Homo sapiens; y ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113); y

5 tienen expresión reducida, con relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta iliaca, para al menos uno de: homeobox 2 de estatura corta; proteína 2 de shock cardiaco de 27kDa; ligando 12 de quimioquinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox 2 de mesénquima

10 (homeobox específico de la detención del crecimiento); homólogo 1 del homeobox de sine oculis (Drosophila); alfa B, cristalina; activador asociado enredado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de enlace del plasminógeno); homología src tres (SH3) y dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativo; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción enanismo-relacionado 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa;

15 potenciador de C-endopeptidasa de pro-colágeno; homólogo rizado 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesículas sinápticas; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 tipo receptor de citoquinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de enlace con PDZ (TAZ); homólogo 2 de homeobox de sine oculis (Drosophila); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprana 3; homeobox menos distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia aldo-

20 ceto reductasa 1; miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZp564B222 del clon DKFZp564B222); proteína de la membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina); proteína de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1; tipo proteína 3 de interacción de 19kDa BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de enlace con AE; polipéptido Villa de la subunidad de citocromo c oxidasa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de

25 tumorigenicidad 1; proteína de enlace con el factor de crecimiento tipo insulina 1, 36kDa;

30

En otra realización de estos aspectos, la invención proporciona las células de la invención para su uso en métodos para tratar un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o sistema circulatorio, en las que los

35 métodos comprenden administrar una composición derivada de tejido umbilical humano terapéutica a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o del sistema circulatorio; y evaluar al paciente para mejoras, por ejemplo en la función cardiaca. En ciertas realizaciones preferidas la enfermedad es una cardiomiopatía, ya sea idiopática o con una causa conocida, y ya sea de naturaleza isquémica o no isquémica.

La medición de la mejora incluye cualquier medio conocido en la técnica, pero las mejoras preferidas

40 incluyen mejoras en las mediciones hemodinámicas incluyendo, pero no limitado a, producción cardiaca del pecho (CO), índice cardiaco (CI), presiones en cuña arteriales pulmonares (PAWP) e índice cardiaco (CI), % de acortamiento fraccional (%FS), fracción de eyección (EF), fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF); diámetro diastólico final ventricular izquierdo (LVEDD), diámetro sistólico final ventricular izquierdo (LVESD), contractilidad (por ejemplo dP/dt), bucles presión-volumen, mediciones del trabajo cardiaco, así como un aumento en el funcionamiento auricular o ventricular; un aumento en la eficiencia de bombeo, una disminución en la tasa de

45 pérdida de la eficiencia de bombeo, una disminución en la pérdida de funcionamiento hemodinámico; y una disminución en las complicaciones asociadas con cardiomiopatías.

En algunas realizaciones actualmente preferidas, el método comprende inducir las células derivadas del

50 postparto terapéuticas para diferenciarse a lo largo de vía cardiogénica, angiogénica, hemangiogénica o vasculogénica o hacia células o progenitores de células como cardiomiocitos, células endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células del músculo liso (por ejemplo células musculares lisas vasculares), así como células de los sistemas excitatorio y conductivo, como se divulga en la presente. De acuerdo con la divulgación, se contemplan la células que se diferencian hacia mioblastos,

55 cardiomioblastos, angioblastos, hemangioblastos, y similares para su uso en la presente.

La administración es preferiblemente por trasplante, injerto, implante, inyección, fusión administración por

60 catéter o proporcionado como un complejo matriz-célula in vivo, o cualquier otro medio conocido en la técnica para administrar terapia celular. Para muchas aplicaciones, las células pueden ser simplemente inyectadas, por ejemplo por vía intravenosa, y las células se localizarán o dirigirán de acuerdo con su cometido en la dirección de un fenotipo asociado con un tejido particular. Por ejemplo, las células diferenciadas en un linaje cardiomiogénico pueden dirigirse al músculo cardiaco cuando se inyectan por vía intravenosa en cualquier parte del cuerpo.

La invención también proporciona en otro aspecto, las células de la invención para su uso en métodos para

65 tratar a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o sistema circulatorio, en el que el método comprende

5 administrar una composición de células derivadas del postparto terapéutica a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o sistema circulatorio; y evaluar al paciente para mejoras en la función cardíaca, en la que la administración es con una población de otro tipo de células. A veces se prefiere la administración de co-cultivos, poblaciones mixtas u otras poblaciones no clonales. Otros tipos de células que se pueden co-administrar son mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, angioblastos, hemangioblastos o progenitores de mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, angioblastos, hemangioblastos, o cardiomiocitos. Otras células angiogénicas, hemangiogénicas, y vasculogénicas, o células más comprometidas de dichos linajes también son adecuados para la co-administración.

10 También se proporcionan en la presente células de la invención para su uso en métodos para tratar a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o el sistema circulatorio, en el que los métodos comprenden administrar una composición de células derivadas de cordón umbilical humano terapéutica a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o el sistema circulatorio; y evaluar al paciente para mejoras del estado enfermo o lesionado, en el que la composición de células terapéutica se administra como un complejo matriz-célula. En ciertas realizaciones, la matriz es un supercántigo, preferiblemente bioabsorbible, que comprende además de la propia matriz, al menos células derivadas del postparto.

20 También se proporcionan en la presente Los co-cultivos que comprenden las células o cultivos de la invención con otras células mamíferas. Preferiblemente estos co-cultivos comprenden otra línea celular mamífera cuyo crecimiento o potencial terapéutico, por ejemplo, se mejora por la presencia de células derivadas de cordón umbilical. Se prefieren particularmente líneas celulares humanas. Dichos co-cultivos son útiles para la aplicación terapéutica in vitro o in vivo.

25 También se proporcionan en la presente composiciones terapéuticas que comprenden células derivadas del cordón umbilical humano y otro agente, factor o agente bioactivo terapéutico, como un compuesto farmacéutico. Dichos agentes bioactivos incluyen, pero no están limitados a IGF, LIF, PDGF, EGF, FGF así como agentes antitrombogénicos, antiapoptóticos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, y antioxidantes. Dichas composiciones terapéuticas pueden además comprender uno o más tipos de células adicionales además de las PPDCs y el componente bioactivo.

30 Además de lo anterior, se divulgan las composiciones derivadas de las células. Se divulgan en la presente lisados de células, fracciones celulares solubles y fracciones celulares de membrana enriquecida. También son útiles y se divulgan en la presente matrices extracelulares derivadas de las células, por ejemplo, fracciones que comprenden membranas basales.

35 Las composiciones de la divulgación también incluyen medios de cultivo acondicionados como se proporciona en la presente. Dichos medios se han usado primero para cultivar las células o cultivos de la invención, que durante el crecimiento secretan uno o más productos útiles en el medio. Los medios acondicionados de estas células nuevas sin útiles para muchos propósitos, incluyendo por ejemplo, soportar el crecimiento de otras células mamíferas con necesidad de factores de crecimiento o factores tróficos secretados en el medio por las células y cultivos de la invención y promover, por ejemplo, la angiogénesis.

40 También se proporcionan y se describen en la presente kits. Varios kits preferidos son aquellos que proporcionan los componentes requeridos para la práctica de los varios aspectos de la invención, por ejemplo se divulgan en la presente kits para el crecimiento y mantenimiento de las células, kits para el aislamiento de las células, kits para co-cultivar las células, kits para utilizar las células y cultivos in vitro y se proporcionan en la presente kits para utilizar las células y cultivos in vivo como se enuncia en las reivindicaciones. También se describen kits para la preparación de fracciones celulares derivadas de células que incluyen, por ejemplo, lisados de células, fracciones solubles y de membrana enriquecida, y fracciones extracelulares.

50 Estos y otras aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

DESCRIPCION DETALLADA

55 *Definiciones*

Varios términos usados a lo largo de la especificación y las reivindicaciones se definen como se indica a continuación.

60 Las *células madre* son células no diferenciadas definidas por la capacidad de un sola célula de tanto auto-renovarse, como de diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitores auto-renovables, progenitores no renovables, y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad de diferenciarse in vitro en células funcionales de varios linajes celulares a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante, y de contribuir sustancialmente a la mayoría, sino a todos, de los tejidos después de la

inyección en blastocistos.

Las células madre se clasifican de acuerdo a su potencial de desarrollo como : (1) totipotentes; (2) pluripotentes; (3) multipotentes; (4) oligopotentes; y (5) unipotentes. Las células totipotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extramembronarias. Las células pluripotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias. Las células multipotentes incluyen aquellas capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (auto-renovables), progenitores oligopotentes restringidos por células de la sangre, y todos los tipos y elementos de células (por ejemplo plaquetas) que son componentes normales de la sangre). Las células que son oligopotentes pueden dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes de células que las células madre multipotentes; y las células que son unipotentes son capaces de dar lugar a un único linaje de células (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

Las células madre también se categorizan en base de la fuente de la que se pueden obtener. Una célula madre adulta es generalmente una célula no diferenciada multipotente encontrada en el tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre adulta puede renovarse a sí misma. Bajo circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir los tipos de células especializados del tejido del que se originó, y posiblemente otros tipos de tejido. Una célula madre embrionaria es una célula pluripotente de la masa celular interna de un embrión en etapa de blastocito. Una célula madre fetal es una que se origina de tejidos o membranas fetales. Una célula madre postparto es una célula multipotente o pluripotente que se origina sustancialmente de tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, concretamente, la placenta y el cordón umbilical. Se ha descubierto que estas células poseen rasgos característicos de células madre pluripotentes, incluyendo proliferación rápida y el potencial para diferenciarse en muchos linajes celulares. Las células madre post-parto, pueden ser derivadas de sangre (por ejemplo como las obtenidas de sangre del cordón umbilical) o no derivadas de sangre (por ejemplo, como las obtenidas de tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y la placenta).

El tejido embrionario se define típicamente como el tejido que se origina del embrión (que en humanos se refiere al periodo de fertilización a alrededor de seis semanas de desarrollo). El tejido fetal se refiere al tejido que se origina del feto, que en humanos se refiere al periodo de alrededor de seis semanas de desarrollo al parto. El tejido extraembrionario es tejido asociado con, pero no originado de, el embrión o el feto. Los tejidos extraembrionarios incluyen membranas extraembrionarias (corion, amnios, saco vitelino y alantoides), cordón umbilical y placenta (que se forma ella misma del corion y decidua maternal basal).

La diferenciación es el proceso por el que una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere los rasgos de una célula especializada, como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula diferenciada es una que ha adquirido 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 procedido en la vía de diferenciación a un punto donde, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula específica o subconjunto de tipos de célula y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciado. La diferenciación se refiere al proceso por el cual la célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en la presente, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir de que células viene y a que células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

En un sentido amplio, una célula progenitora es una célula que tiene la capacidad de crear progenie que está más diferenciada que ella misma, y retiene todavía la capacidad de reponer el grupo de progenitores. Por esa definición, las mismas células madre son también células progenitoras, ya que son los precursores más inmediatos para células terminalmente diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, como se describe con más detalle a continuación, puede usarse esta definición amplia de célula progenitora. En un sentido más estricto, una célula progenitora se define a menudo como una célula que es intermedia en la vía de diferenciación, es decir, surge de una célula madre y es intermedia en la producción de un tipo de célula maduro o subconjunto de tipos de células. Este tipo de célula progenitora no es generalmente capaz de auto-renovarse. Por lo tanto, si se hace referencia a este tipo de célula en la presente, se hará referencia como una célula progenitora no-renovable o como un progenitor intermedio o célula precursora.

Como se usa en la presente, la frase se diferencia en un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico se refiere a una célula que se vuelve comprometida para un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico específico, respectivamente. Ejemplos de células que se diferencian en un linaje mesodérmico o da lugar a células mesodérmicas específicas incluyen, pero no están limitadas a, células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, hemangiogénicas, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas o estromales. Ejemplos de células que se diferencian en linaje ectodérmico incluyen, pero no están limitadas a células epidérmicas, células neurogénicas, y células neurogliaogénicas. Ejemplos

de células que se diferencian en el linaje endodérmico incluyen, pero no están limitadas a, células pleuigénicas, células hepatogénicas, células que dan lugar al revestimiento del intestino, y células que dan lugar a células pancreogénicas y esplanogénicas.

5 Las células de la presente invención son generalmente denominadas como células derivadas de tejido del
cordón umbilical o (UDCs). También pueden ser algunas veces denominadas de forma más general en la presente
como células derivadas del postparto o células postparto (PPDCs). El término derivada se usa para indicar que las
células han sido obtenidas de su fuente biológica y cultivadas o manipuladas de otra manera in vitro (por ejemplo,
10 cultivadas en un Medio de Cultivo para expandir la población y/o producir una línea celular). Las manipulaciones in
vitro de células madre umbilicales y los rasgos únicos de las células derivadas del tejido del cordón umbilical de la
presente invención se describen en detalle a continuación.

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

Una línea celular es una población de células formada por uno o más subcultivos de un cultivo celular
primario. Cada ronda de subcultivo se denomina como un pase. Cuando las células se subcultivan, se hace
referencia a ellas como que han sido pasadas. Una población específica de células, o una línea celular, se denomina
o se caracteriza por el número de veces que ha sido pasada. Por ejemplo, una población de células cultivadas que
25 ha sido pasada diez veces puede denominarse como un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo
después del aislamiento de las células del tejido, se designa P0. Después del 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), y así. Se entenderá por los expertos en la técnica que puede haber muchas
duplicaciones de población durante el periodo de pase; por lo tanto el número de duplicaciones de la población de un
30 cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de
población) durante el periodo entre el pase depende de muchos factores, incluyendo pero no limitado a densidad del
sembrado, sustrato, medio, condiciones de crecimiento y el tiempo entre el pase.

35 Un medio acondicionado es un medio en el que una célula específica o células se han cultivado, y después
retirado. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar
soporte trófico a otras células. Dichos factores tróficos incluyen, pero no están limitados a, hormonas, citoquinas,
matriz extracelular /ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares
es el medio acondicionado.

40 Generalmente, un factor trófico se define como una sustancia que promueve la supervivencia, crecimiento,
proliferación y/o maduración de una célula, o estimula el aumento de actividad de una célula.

45 Cuando se hace referencia a células vertebradas cultivadas, el término senectud (también senectud
replicativa o senectud celular) se refiere a una propiedad atribuible a cultivos celulares finitos; concretamente a su
incapacidad de crecer más allá de un número finito de duplicaciones de población (algunas veces denominado límite
de Haoflick). Aunque la senectud celular se describió primero usando células tipo fibroblastos, tipos de células
humanas más normales que se pueden cultivar en el cultivo experimentan senectud celular. La esperanza de vida in
vitro de diferentes tipos de células varía, pero la esperanza de vida máxima es típicamente menor de 100
50 duplicaciones de población (este es el número de duplicaciones para todas las células en el cultivo para volverse
senescentes y por lo tanto volver al cultivo incapaz de dividirse). La senectud no depende del tiempo cronológico,
sino que se mide por el número de divisiones celulares, o duplicaciones de población, que ha experimentado el
cultivo. Por lo tanto, las células hechas quiescentes eliminado los factores de crecimiento esenciales son capaces de
reanudar el crecimiento y la división cuando se re-introducen los factores de crecimiento, y después de eso llevar a
cabo el mismo número de duplicaciones que las células equivalentes cultivadas continuamente. De manera similar,
55 cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de varios números de duplicaciones de población y
después se descongelan y cultivan, experimentan sustancialmente el mismo número de duplicaciones que las
células mantenidas sin congelar en el cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; son
realmente resistentes a la muerte celular programada (apoptosis) y se han mantenido en su estado de no división
tanto como tres años. Estas células están muy vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. No se ha
60 descubierto todavía que el estado de no división de las células senescentes sea reversible por cualquier agente
biológico, químico o vírico.

65 Como se usa en la presente, el término Medio de Crecimiento se refiere generalmente a un medio
suficiente para el cultivo de células derivadas del tejido del cordón umbilical. En particular, un medio actualmente
preferido para el cultivo de células de la invención comprende el Medio Esencial Modificado de Dulbecco (también

abreviado en la presente como DMEM). Se prefiere particularmente el DMEM-glucosa baja (también DMEM-LG en la presente) (Invitrogen, Carlsbad, CA).. El DMEM-glucosa baja se suplementa preferiblemente con suero, más preferiblemente suero bovino fetal o suero humano. Típicamente, se añade un 15% (v/v) de suero bovino fetal (por ejemplo suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan UT), junto con antibióticos/antimicóticos ((preferiblemente 100 Unidades/mililitro de penicilina, 100 miligramos/mililitro de estreptomina, y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)),, y un 0,001% (V/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). En algunos casos se usan diferentes medios de crecimiento, o se proporcionan suplementos diferentes, y estos están indicados normalmente en el texto como suplementos al Medio de Crecimiento. En ciertos medios definidos químicamente las células se pueden cultivar sin nada de suero presente. En dichos casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que pueden añadirse al medio para soportar y sustentar a las células. Los factores actualmente preferidos para ser añadidos para el crecimiento en medios libres de suero incluyen uno o más de bFGF, EGF, IGF-I y PDGF. En realizaciones más preferidas se añaden dos, tres o los cuatro factores a los medios libres de suero o químicamente definidos. En otras realizaciones, se añade LIF al medio libre de suero para soportar o mejorar el crecimiento de las células.

También en relación con la presente invención, el término condiciones de crecimientos estándar, como se usa en la presente se refiere al cultivo de células a 37° C, en una atmósfera estándar que comprende un 5% de CO₂. La humedad relativa se mantiene a alrededor del 100%. Mientras que las condiciones anteriores son útiles para el cultivo, se debe entender que dichas condiciones son capaces de variarse por el experto en la técnica que apreciará las opciones disponibles en la técnica para cultivar células.

En la presente se usan las siguientes abreviaciones:

ANG2 (o Ang2) para angiopoyetina 2;
 APC para células presentadoras de antígeno;
 BDNF para el factor neurotrófico derivado del cerebro;
 bFGF para el factor de crecimiento de fibroblastos básico;
 bid (BID) para "bis in die" (dos veces al día);
 BSP para sialoproteína ósea;
 C:D para la colagenasa y tratamiento de dispasa
 C:D:H para la colagenasa, dispasa y el tratamiento de hialuronidasa
 CK18 para citoqueratina 18;
 CXC ligando 3 para el ligando del receptor de quimioquinas 3;
 DAPI para 4'-6-diamidino-2-fenilindol-2-HCl
 DMEM para el medio esencial mínimo de Dulbecco;
 DMEM.lg (o DMEM:Lg, DMEM:LG) para DMEM con bajo nivel de glucosa;
 EDTA para el ácido etilendiaminotetraacético;
 EGF para el factor de crecimiento epidérmico;
 FACS para la clasificación de células activadas por fluorescencia;
 FBS para el suero bovino fetal;
 GCP-2 para la proteína quimiotáctica de granulocitos 2;
 GCP-2 para la proteína quimiotáctica de granulocitos 2;
 GFAP para la proteína ácida glial fibrilar;
 HB-EGF para el factor de crecimiento epidérmico de enlace a heparina;
 HCAEC para las células endoteliales de arteria coronaria Humanas;
 HGF para el factor de crecimiento de hepatocitos;
 hMSC para las células madre mesenquimales humanas;
 HNF-1alfa para el factor de transcripción específico de hepatocitos;
 HUVEC para las células endoteliales de la vena umbilical humana;
 I309 para una quimioquina y el ligando para el receptor de CCR8, responsable de la quimioatracción de las células T tipo TH2. El I309 enlaza con células endoteliales, estimula la quimiotaxis y la invasión de estas células, y mejora la diferenciación HUVEC en estructuras tipo capilares en un ensayo Matrigel in vitro. Además, el I309 es un inductor de la angiogénesis in vivo en tanto córnea de conejo como en el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM).
 IL-6 para interleucina-6;
 IL-8 para interleucina-8;
 K19 para queratina 19;
 K8 para queratina 8;
 KGF para el factor de crecimiento de queratinocitos;
 MCP-1 para la proteína quimiotáctica de monocitos 1;
 MDC para quimiocina derivada de macrófagos;
 MIP1alfa para la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa;
 MIP1beta para la proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta;
 MSC para las células madre mesenquimales;
 NDRI para el National Disease Research Interchange en Philadelphia, PA

- 5 NHDF para fibroblastos dérmicos Humanos normales;
- NPE para medios de expansión Neurales de Progenitores;
- PBMC para células mononucleares de sangre periférica;
- PBS para solución salina tamponada con fosfato;
- 5 PDGFbb para el factor de crecimiento derivado de plaquetas;
- PDGFr/alfa para el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas;
- PD-L2 para el ligando de muerte programada 2;
- PO (o po) para "per os" (por la boca);
- 10 PPDC para células derivadas del posparto;
- Rantes (o RANTES) para células T normales, reguladas en la activación expresadas y secretadas;
- rhGDF-5 para el factor de crecimiento y diferenciación humano recombinante 5;
- SC por vía subcutánea;
- SDF-1alfa para factor derivado de estromal 1 alfa;
- SHH para el erizo sonic;
- 15 SOP para el procedimiento operativo estándar;
- TARC quimioquinas reguladas por activación y el timo;
- TCP para el plástico de cultivo de tejidos;
- TGFbeta2 para el factor de crecimiento transformante beta 2;
- 20 TGFbeta-3 para el factor de crecimiento transformante beta-3;
- TIMP1 para el inhibidor de tejido de metaloproteinasas de matriz 1;
- TPO para trombopoyetina;
- TuJ1 para BIII tubulina;
- UDC para células derivadas del tejido del cordón umbilical;
- 25 VEGF para el factor de crecimiento endotelial vascular;
- vWF para el factor de von Willebrand;
- alphaFP de alfa-fetoproteína;

Descripción

30 Como se ha resumido anteriormente, la divulgación, en uno de sus aspectos está dirigida de forma general a células derivadas del cordón umbilical humano aisladas que se derivan de tejido postparto que está sustancialmente libre de sangre y que son capaces de auto-renovarse y expandirse en cultivo y que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo del linaje mesenquimal, hacia fenotipos cardiomiogénicos, angiogénicos y vasculogénicos, y además hacia células como cardiomiocitos, células endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células del músculo liso (por ejemplo células del músculo liso vascular), así como a células de los sistemas excitatorio y conductivo y progenitores de los anteriores. Otros aspectos proporcionan poblaciones que comprenden dichas células, composiciones celulares terapéuticas y métodos para usar las composiciones celulares terapéuticas para el tratamiento de pacientes con lesión o enfermedad del corazón o el sistema circulatorio. Las células derivadas del postparto han sido caracterizadas por sus propiedades de crecimiento en cultivo, por sus marcadores de superficie celulares, por su expresión génica, por su capacidad de producir ciertos factores tróficos bioquímicos y por sus propiedades inmunológicas.

45 La invención proporciona una población homogénea de células humanas derivadas de tejido del cordón umbilical, para el uso en el tratamiento de una enfermedad del corazón o el sistema circulatorio, en el que dicha población de células se puede obtener aislando del tejido del cordón umbilical humano libre de sangre en presencia de metaloproteasa, proteasa neutra y actividades de enzimas mucolíticos, y en el que dicha población de células es capaz de auto-renovarse y expandirse en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse en células u otros fenotipos y en el que la población de células:

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

55 En un primer aspecto, la divulgación proporciona células derivadas del postparto aisladas que comprenden células que requieren L-valina derivadas de tejido postparto mamífero sustancialmente libre de sangre. Las células son capaces de auto-renovarse y expandirse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos; por ejemplo cardiomiocitos o sus progenitores. Las células de la invención pueden aislarse de tejido del cordón umbilical postparto de cualquier mamífero de interés por las técnicas proporcionadas en la presente. Las células de la invención son células humanas. Las células pueden cultivarse bajo un amplio intervalo de condiciones, incluyendo una amplia variedad de medios de cultivo y condiciones ambientales. Las células pueden cultivarse al menos de desde alrededor de 35° C a alrededor de 39° C y posiblemente un intervalo más amplio dependiendo de otras condiciones. Las células pueden cultivarse en medios definidos químicamente, o en medio con suero mamífero añadido, por ejemplo suero bovino fetal. Las células también toleran la criopreservación en varias etapas. Las

células pueden mantenerse congeladas, o depositadas a temperaturas preferiblemente por debajo de -80° C durante periodos largos. También se prefieren temperaturas por debajo de -90° C y pueden alcanzarse por congeladores eléctricos especializados. También se prefieren temperaturas de -180° C e inferiores y pueden alcanzarse en nitrógeno en fase líquida o de vapor. Los tejidos también pueden depositarse antes del aislamiento de las células. Preferiblemente dichos tejidos se depositan una pocas horas o menos después de la finalización del embarazo.

Las células son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno de desde alrededor del 5% a al menos alrededor del 20% y comprenden al menos una de las siguientes características: las células tienen el potencial para al menos alrededor de 40 duplicaciones en cultivo; las células son preferiblemente adherentes, por lo tanto se prefiere la unión y expansión en un recipiente de cultivo de tejido recubierto o sin recubrir, en el que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, polilisina, vitronectina, o fibronectina. Aunque las células son preferiblemente adherentes y aisladas como tales, las células se han cultivado en una forma esférica en algunas realizaciones.

Muchas poblaciones de células están presentes en el tejido postparto, pero las células de la divulgación preferiblemente producen de al menos uno del factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa; las más preferidas son las células que producen cada uno del factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa; también se prefiere la producción de al menos uno de CD 10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C. Las células de la divulgación también están caracterizadas en 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, detectadas por citometría de flujo; las células más preferibles carecen de la producción de todos estos marcadores de superficie. También se prefieren las células que expresan al menos uno de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimioquinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanomas, alfa); ligando 6 de quimioquinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimioquinas motivo (C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3. Las células, en otras realizaciones, también expresan preferiblemente uno o más de lectina de tipo C (dependiente del calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro de la superfamilia 2 (inducida por activación); Tumor de Wilms 1; familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2; y renina; receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina); Homo sapiens, clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parciales; proteína quinasa C, zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; reguladas hacia abajo en el cáncer de ovario 1; ARNm Homo sapiens y ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113). Las células preferidas también tienen la expresión, con relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de cresta ilíaca, está reducida para al menos uno de: homeobox 2 de estatura corta; proteína 2 de shock cardiaco de 27kDa; ligando 12 de quimioquinas (motivo C-X-C (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox 2 de mesénquima (homeobox específico de la detención del crecimiento); homólogo 1 del homeobox de sine oculis (Drosophila); alfa B, cristalina; activador asociado enredado de morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de enlace del plasminógeno); homología src tres (SH3) y dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativo; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción enanismo-relacionado 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de C-endopeptidasa de pro-colágeno; homólogo rizado 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesículas sinápticas; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 tipo receptor de citoquinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de enlace con PDZ (TAZ); homólogo 2 de homeobox de sine oculis (Drosophila); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprana 3; homeobox menos distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia aldo-ceto reductasa 1; miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZp564B222 del clon DKFZp564B222); proteína de la membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina); proteína de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1; tipo proteína 3 de interacción de 19kDa BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de enlace con AE; polipéptido VIIa de la subunidad de citocromo c oxidasa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de enlace con el factor de crecimiento tipo insulina 1, 36kDa. El experto en la técnica apreciará que la expresión de una amplia variedad de genes se caracteriza convenientemente en matrices de oligonucleótidos, por ejemplo en un Affymetrix GENECHIP.

Las células secretan una variedad de factores bioquímicamente activos, como factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas y similares. 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.

En realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más de las características anteriores. Las más preferidas son esas células que comprenden tres, cuatro o cinco o más de las características. Todavía más preferidas son las células postparto aisladas que comprenden seis, siete u ocho o más de las características. Todavía más preferidas actualmente son las células que comprenden las nueve características reivindicadas.

También se prefieren actualmente las células que producen al menos dos de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa. Se prefieren más las células que producen las tres de las proteínas factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa.

5 El experto en la técnica apreciará que los marcadores celulares están sujetos a variar algo bajo condiciones de crecimiento muy diferentes, y que generalmente en el presente se describen caracterizaciones en Medio de Crecimiento, o variaciones de los mismos. Las células derivadas del postparto que producen al menos uno, dos, tres o cuatro de CD 10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C son las células preferidas de la divulgación. Se prefieren más aquellas células que producen cinco, seis o siete de estos marcadores de superficie celulares. Todavía son más preferidas las células postparto que pueden producir las ocho proteínas de marcadores de superficie celulares anteriores.

15 De manera similar, las células postparto que carecen de producción de al menos uno, dos, tres o cuatro de las proteínas CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, detectadas por citometría de flujo son actualmente las células preferidas de la divulgación. Las células que carecen de al menos cinco, seis, siete u ocho o más de estos marcadores también se prefieren. Se prefieren más las células que carecen de producción de al menos nueve o diez de los marcadores de superficie celulares. Las células más preferidas son aquellas que carecen de producción de las once proteínas de identificación anteriores.

20 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 detectadas por citometría de flujo.

25 Actualmente, se prefiere que las células derivadas del cordón umbilical humanas expresen al menos uno, dos o tres de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimioquinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanomas, alfa); ligando 6 de quimioquinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimioquinas motivo (C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3. Se prefieren más las células que expresan cuatro o cinco, y todavía se prefieren más las células capaces de expresar los seis genes anteriores.

35 En algunas realizaciones, las células preferiblemente también expresan dos, tres cuatro o más de lectina de tipo C (dependiente del calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro de la superfamilia 2 (inducida por activación); Tumor de Wilms 1; familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2; y renina; receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina); Homo sapiens, clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parciales; proteína quinasa C, zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; reguladas hacia abajo en el cáncer de ovario 1; ARNm Homo sapiens; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113). En otras realizaciones, se prefiere que las células expresen cinco, seis, siete u ocho de los anteriores. También se prefieren las células que expresan genes correspondientes a nueve, diez o incluso todas las secuencias anteriores.

40 Para algunas realizaciones, se prefieren las células que con relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de cresta iliaca, está reducida para al menos uno de: homeobox 2 de estatura corta; proteína 2 de shock cardiaco de 27kDa; ligando 12 de quimioquinas (motivo C-X-C (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra-avalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox 2 de mesénquima (homeobox específico de la detención del crecimiento); homólogo 1 del homeobox de sine oculis (Drosophila); alfa B, cristalina; activador asociado enredado de morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de enlace del plasminógeno); homología src tres (SH3) y dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativo; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción enanismo-relacionado 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de C-endopeptidasa de pro-colágeno; homólogo rizado 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesículas sinápticas; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 tipo receptor de citoquinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de enlace con PDZ (TAZ); homólogo 2 de homeobox de sine oculis (Drosophila); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprana 3; homeobox menos distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia aldo-ceto reductasa 1; miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZp564B222 del clon DKFZp564B222); proteína de la membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina); proteína de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1; tipo proteína 3 de interacción de 19kDa BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de enlace con AE; polipéptido VIIa de la subunidad de citocromo c oxidasa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de enlace con el factor de crecimiento tipo insulina 1, 36kDa. S prefieren más las células que tienen, en relación a fibroblastos, células madre

mesenquimales, o células de médula ósea de cresta ilíaca humanas, expresión reducida de al menos 5, 10, 15 ó 20 genes correspondientes a los enumerados anteriormente. Actualmente las más preferidas son las células con expresión reducida de al menos 25, 30 ó 35 de los genes correspondientes a las secuencias enumeradas. También se prefieren más aquellas células derivadas del postparto que tienen expresión que está reducida, en relación a la de un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca humana, de genes correspondientes a 35 o más, 40 o más incluso todas las secuencias enumeradas.

La secreción de ciertos factores de crecimiento y otras proteínas celulares puede hacer células de la invención particularmente útiles. Aunque la secreción de dichos factores es útil, las células también pueden caracterizarse por su falta de secreción de factores en el medio. Las células derivadas del postparto se aíslan preferiblemente en presencia de una más actividades enzimáticas. Se conocen en la técnica una amplia gama de enzimas digestivos para el uso en el aislamiento celular del tejido, incluyendo enzimas que varían de los considerados débilmente digestivos (por ejemplo desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) a fuertemente digestivos (por ejemplo papaína y tripsina). Por ejemplo, se sabe que las colagenasas son útiles para aislar varias células de tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN monocatenario y pueden minimizar la aglutinación celular durante el aislamiento. Los enzimas pueden usarse solos o en combinación. Las serina proteasas se usan preferiblemente en una secuencia después del uso de otros enzimas ya que pueden degradar a los otros enzimas que se están usando. La temperatura y tiempo de contacto con serina proteasas debe monitorizarse. Las serina proteasas pueden inhibirse con alfa 2 microglobulina en suero y por lo tanto el medio usado para la digestión es preferiblemente libre de suero. El EDTA y la DNasa se usan comúnmente y pueden mejorar los rendimientos o eficiencias. Los métodos preferidos implican tratamiento enzimático con por ejemplo colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa e hialuronidasa, y se proporcionan dichos métodos en los que en ciertas realizaciones preferidas, se usa una mezcla de colagenasa y la proteasa dispasa neutra en el paso de disociación. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serina proteasas (como tripsina, quimotripsina o elastasa) y desoxirribonucleasas. Más preferidas son las actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Actualmente se prefieren las células que se aíslan en presencia de una o más actividades de colagenasa, hialuronidasa y dispasa. Se prefieren más las células aisladas en presencia de colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de proteasa, dispasa y termolisina. Se prefieren más aún las células aisladas con actividades enzimáticas de colagenasa y dispasa. También se prefieren las células aisladas en presencia de actividad de hialuronidasa, además de actividad de colagenasa y dispasa. El experto en la técnica apreciará que muchos de dichos tratamientos enzimáticos se conocen en la técnica para aislar células de varias fuentes de tejidos. También son útiles para el aislamiento de ciertas células de la invención preparaciones enzimáticas comerciales como mezclas de enzimas, por ejemplo, LIBERASE Blendzymes disponible de Roche Diagnostics. El experto en la técnica apreciará que los métodos para optimizar el uso de enzimas usando el aislamiento, y la información en dichos procedimientos de optimización está disponible de los fabricantes de enzimas comerciales. Se prefieren los métodos que pueden resultar en poblaciones homogéneas o poblaciones casi homogéneas de células.

Las células también comprenden preferiblemente un cariotipo normal, que se mantiene a medida que se pasan las células. El cariotipado es particularmente útil para identificar y distinguir células neonatales de maternas derivadas de la placenta. Los métodos para el cariotipado están disponibles y con conocidos por los expertos en la técnica.

Entre las células que se prefieren actualmente para el uso con la invención en varios de sus aspectos son las células posparto que tienen las características descritas anteriormente y más particularmente aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con los pasajes, y durante la criopreservación y la posterior descongelación y uso, y además en las que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, en las que las células producen las proteínas inmunológicamente detectables que corresponden con los marcadores enumerados, y que además de lo anterior no producen proteínas que corresponden con ninguno de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, detectadas por citometría de flujo.

Ciertas células del estado de la técnica que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de líneas que llevan a varios fenotipos son inestables y por lo tanto pueden diferenciarse espontáneamente. Actualmente se prefieren para el uso con la invención las células que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo a lo largo de líneas cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas o vasculogénicas. Las células preferidas cuando se cultivan en un Medio de Crecimiento son sustancialmente estables respecto a los marcadores celulares producidos en su superficie, y respecto al patrón de expresión de varios genes, por ejemplo como se determina usando matrices de oligonucleótidos, como un Affymetrix GENECHIP. Las células permanecen sustancialmente constantes en sus características bioquímicas, genéticas e inmunológicas, por ejemplo sus marcadores de superficie, sobre pase y a través de múltiples duplicaciones de población.

En otro de sus varios aspectos, la invención proporciona poblaciones de células que comprenden las células descritas anteriormente. Las poblaciones de células son útiles en relación a los métodos de la invención, así como en relación con la fabricación de las composiciones de células terapéuticas y lisados de células en cantidades

más grandes que las que las células aisladas pueden proporcionar.

Las poblaciones preferidas comprende de alrededor de un 1% de células derivadas del postparto a alrededor de un 10% de células del postparto. Las poblaciones más preferidas comprenden al menos alrededor del 10% de células derivadas del postparto. Las poblaciones más preferidas comprenden al menos alrededor del 35% de células derivadas del postparto. También, algunas poblaciones preferidas comprenden alrededor del 50% de células derivadas del postparto. Dichas poblaciones pueden ser útiles para el cocultivo u otros cultivos en los que las células son igualmente populosas y se dividen a la misma tasa, o donde la población se ajusta a alrededor del 50% de cada cultivo después de la expansión de los cultivos en cocultivo o de manera separada. Para algunas aplicaciones se prefieren más poblaciones que comprenden al menos alrededor del 65% de células derivadas del postparto. Las poblaciones que comprenden al menos un 90% de células derivadas del postparto son muy preferidas para ciertos aspectos de la invención. Las poblaciones más preferidas comprenden sustancialmente sólo células derivadas del postparto.

Las poblaciones pueden comprender una línea celular clonal de células derivadas del postparto. Dichas poblaciones son particularmente útiles en que se aísla un clon celular con una altamente deseable funcionalidad. Tanto los clones neonatales como los maternos son útiles y se proporcionan en la presente. Los métodos para aislar líneas celulares clonales a partir de células cultivadas se conocen en la técnica.

La divulgación también describe lisados celulares, fracciones celulares solubles y fracciones celulares de membrana enriquecida preparadas a partir de poblaciones de las células del postparto. Dichos lisados y fracciones tienen muchas utilidades. El uso de lisados celulares, y más particularmente fracciones celulares solubles, in vivo permite que el medio intracelular beneficioso se use en un paciente alogénico sin estimular los linfocitos alogénicos, o generar otras respuestas inmunológicas adversas, o activar el rechazo. Los métodos para lisar células son bien conocidos en la técnica e incluyen varios medios de disrupción mecánica, disrupción enzimática o disrupción química, o combinaciones de las mismas. Dichos lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su Medio de Crecimiento y por lo tanto que contienen factores de crecimiento y similares, o pueden prepararse a partir de células lavadas libres de medio en, por ejemplo, PBS u otra solución. Para hacer lisados a partir de células directamente en el medio de crecimiento se prefiere que las células se cultiven en suero de especies en las que se van a usar los lisados, en algunas realizaciones, se pueden preferir las células lavadas. Las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones mayores que las de la densidad de la población original si se prefiere. Los lisados celulares preparados a partir de poblaciones de células derivadas del postparto pueden usarse como es, concentradas adicionalmente, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secas, enriquecidas, parcialmente purificadas, combinadas con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica, o combinadas con otros compuestos como productos biológicos, por ejemplo composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares pueden usarse in vitro o in vivo, solos o, por ejemplo, con células vivas singénicas o autólogas. Los lisados 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. Preferiblemente, los lisados no son inmunogénicos, y más preferiblemente se toleran inmunológicamente en una población amplia de recipientes singénicos o autólogos sin consecuencias o reacción inmunológicamente adversas. Los lisados celulares de la divulgación son útiles de células en cualquier etapa o edad que se haya cultivado bajo condiciones para el crecimiento y la expansión, por ejemplo en Medio de Crecimiento. Incluso las células senescentes son útiles para la preparación del lisado y pueden proporcionar ciertos factores que son biológicamente útiles. Las células no viables o incluso las muertas o asesinadas tienen utilidad para preparar lisados y fracciones celulares. También son útiles los lisados de células que han sido expuestas a factores que tienden a inducirlos a lo largo de una vía mesenquimal, particularmente hacia líneas cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas y vasculogénicas. Los lisados celulares de células diferenciadas, o células más comprometidas que las PPDCs son también deseables. Por ejemplo, los lisados de células con características de cardiomioblastos, cardiomiocitos, angioblastos, hemangioblastos y similares o sus progenitores son también útiles y se contemplan para su uso en la presente.

También se proporcionan en la presente poblaciones de células incubadas en presencia de uno o más factores que estimulan la diferenciación de células madre a lo largo de una vía cardiomiogénica, angiogénica, hemangiogénica o vasculogénica. Dichos factores se conocen en la técnica y el experto en la técnica apreciará que la determinación de las condiciones adecuadas para la diferenciación pueden alcanzarse con experimentación rutinaria. La optimización de dichas condiciones puede alcanzarse por diseño y análisis experimental estadístico, por ejemplo, la metodología de respuesta de superficie permite la optimización simultánea de múltiples variables, por ejemplo condiciones de cultivo biológicas. Los factores actualmente preferidos incluyen, pero no están limitados a factores como factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas, productos celulares, agentes de desmetilación y otros estímulos que se conocen ahora o se determinan más tarde para estimular la diferenciación, por ejemplo de células madre a lo largo de vías o linajes cardiomiogénicos, angiogénicos, hemangiogénicos y vasculogénicos. Actualmente se prefieren para inducir o estimular la diferenciación a lo largo de una vía cardiomiogénica, angiogénica, hemangiogénica y vasculogénica las células incubadas en presencia de factores que comprenden al menos uno de un agente de desmetilación, un miembro de las familias de factores BMP, FGF, TAK, GATA, Csx, NK, MEF2, ET-1, y Wnt, Erizo, Csx/Nkx-2.5 y factores anti-Wnt. Se sabe que la metilación del ADN silencia ciertos genes, evitando su

expresión, la desmetilación puede permitir la expresión de dichos genes, incluyendo algunos requeridos para la diferenciación. Los agentes de desmetilación preferidos incluyen inhibidores de las metiltransferasas del ADN o inhibidores de la histona desacetilasa, o inhibidores de un complejo represor.

5 Los agentes de desmetilación actualmente preferidos comprenden al menos uno de 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, DMSO, cloruro de queleritrina, ácido retinoico o sales del mismo, ácido 2-amino-4-(etiltilio)butírico, procaïnamiada, y procaína. La inclusión de dichos factores tiende a inducir a las células a diferenciarse a lo largo de las líneas mesenquimales, hacia una vía cardiomiogénica como se determina, por ejemplo, por la expresión de al menos uno de cardiomiocina, miosina esquelética o GATA4; o por la adquisición de un ritmo de latidos, espontáneo o inducido de otra manera; o por la capacidad de integrarse al menos parcialmente en el músculo cardíaco de un paciente sin inducir arritmias.

15 En las realizaciones preferidas de la presente divulgación, las células inducidas con uno o más factores como se han identificado anteriormente pueden volverse células cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas o vasculogénicas, o progenitores o parientes primitivos de las mismas. Preferiblemente al menos algunas de las células pueden integrarse al menos parcialmente en el corazón o árbol vascular del paciente, incluyendo pero no limitado a músculo cardíaco, vasculares y otras estructuras del corazón, vasos sanguíneos, y similares. Se prefieren más las células diferenciadas que adquieren dos o más de los indicios de células cardiomiogénicas o sus progenitores, y son capaces de integrarse completamente en el corazón o vasculatura de un paciente. Se prefieren más las células que cuando se colocan en el paciente, no resultan en un aumento de arritmias, defectos cardíacos, defectos de vasos sanguíneos u otras anomalías relacionadas con el sistema circulatorio o salud del paciente. También se prefieren las células que pueden estimular a las células madre presentes de forma natural en el músculo cardíaco, vasos sanguíneos, sangre y similares del paciente para que se diferencien en, por ejemplo cardiomiocitos, o al menos a lo largo de líneas cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas o vasculogénicas. Igualmente preferidas son las PPDCs que pueden soportar las células madre presentes de forma natural en el músculo cardíaco, sangre, torrente sanguíneo y similares del paciente para que crezcan y se expandan y estén disponibles para la diferenciación posterior.

30 Las poblaciones pueden proporcionarse terapéuticamente a un paciente, por ejemplo con una enfermedad del corazón o el sistema circulatorio. Ejemplos comunes, que no se pretende que limiten la invención, incluyen fallo cardíaco debido a aterosclerosis, cardiomiopatía, o lesión cardíaca, como de infarto de miocardio o de herida (aguda o crónica) del corazón. En las realizaciones actualmente preferidas, la población comprende alrededor de un 50% de células derivadas del postparto, mientras que en otras realizaciones preferidas la población es sustancialmente una población homogénea de células derivadas del postparto. En otras realizaciones la población comprende al menos un 1, 10, 20, 25, 30, 33, 40, 60, 66, 70, 75, 80 ó 90% de células derivadas del postparto.

40 También se proporcionan en la presentes co-cultivos que comprenden las células o cultivos de la invención con otras células mamíferas. Preferiblemente estos co-cultivos comprenden otra línea celular mamífera cuyo crecimiento o potencial terapéuticos, por ejemplo, se mejora por la presencia de las células derivadas del tejido del cordón umbilical. Se prefieren particularmente las líneas celulares humanas. Dichos co-cultivos son útiles para la aplicación terapéutica in vitro o in vivo.

45 También se proporcionan en la presente composiciones terapéuticas que comprenden una células derivada del postparto y otros agente, factor o agente bioactivo terapéutico, como un compuesto terapéutico. Dichos agentes bioactivos incluyen, pero no están limitados a, IGF, LIF, PDGF, EGF, FGF así como agentes antitrombogénicos, antiapoptóticos, agentes anti-inflamatorios, agentes inmunosupresores o agentes inmunomoduladores, y antioxidantes. Dichas composiciones terapéuticas pueden comprender adicionalmente uno o más tipos de células adicionales además de las PPDCs y el componente bioactivo.

50 Por lo tanto, en conjunción con las células terapéuticas, pueden ser útiles y se pueden administrar otras moléculas biológicamente activas, como agentes antitrombogénicos, agentes anti-apoptóticos, y agentes anti-inflamatorios en secuencia con, o co-administrados con las células, individualmente o en combinaciones de dos o más de dichos compuestos o agentes. Por ejemplo los agentes anti-apoptóticos pueden ser útiles para minimizar la muerte celular programada. Dichos agentes incluyen pero no están limitados a EPO, derivados y análogos de EPO, y sus sales TPO, IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y los inhibidores de caspasas. Los agentes anti-inflamatorios incluyen, pero no están limitados a Inhibidores de la P38 MAP quinasa, estatinas, inhibidores de IL-6 y IL-1, Pemirolast, Tranilast, Remicade, Sirolimus, compuestos anti-inflamatorios no esteroideos, por ejemplo, Tepoxalin, tolmetina, y Suprofen.

60 Otros factores o agentes terapéuticos bioactivos que pueden coadministrarse con las células terapéuticas de la invención incluyen, por ejemplo, factores antitrombogénicos, agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, y antioxidantes. Ejemplos de agentes inmunosupresores e inmunomoduladores incluyen inhibidores de la calcineurina, por ejemplo ciclosporina, Tacrolimus, inhibidores de mTOR como Sirolimus o Everolimus; anti-proliferativos como azatioprina y micofenolato mofetil; corticosteroides por ejemplo prednisolona o hidrocortisona; anticuerpos como anticuerpos receptores anti-IL-2Ra monoclonales, Basiliximab, Daclizumab;

anticuerpos anti-células T policlonales como globulina anti-timocitos (ATG), globulina antilinfocítica (ALG), y el anticuerpo anti células-T monoclonal OKT3. Los compuestos antitrombogénicos que se proporcionan terapéuticamente en conjunción con las células de la invención incluyen, por ejemplo heparina, derivados de heparina, uroquinasa, y PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona); compuestos de antitrombina, antagonistas de los receptores plaquetarios, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos receptores anti-plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de la prostaglandina, e inhibidores de plaquetas. Los antioxidantes con bien conocidos en la técnica por supuesto y cualquier antioxidante farmacéuticamente aceptable puede administrarse en conjunción con las células de la invención incluyendo probucol; vitaminas A, C, y E, coenzima Q-10, glutatión, L cisteína, N-acetilcisteína, o derivados de antioxidantes, análogos o sales de los anteriores.

Además de lo anterior, se describen en la presente composiciones derivadas de las células. Se describen en la presente lisados celulares, fracciones celulares y fracciones celulares de membrana enriquecida, como se ha descrito anteriormente con detalle. También son útiles y se describen en la presente matrices extracelulares derivadas de las células, por ejemplo que comprenden membranas basales. Los lisados celulares, fracciones celulares solubles, fracciones celulares de membrana enriquecida y matrices extracelulares derivadas de las células se pueden todas administrar a pacientes como sea apropiado, en algunas realizaciones de la divulgación o coadministrarse con las células de la invención, con o sin células o tipos de células adicionales.

Las composiciones de la divulgación también incluyen medios de cultivo acondicionados como se describe en la presente. Dichos medios se han usado primero para cultivar las células o cultivos de la invención, que durante el crecimiento secretan uno o más productos útiles al medio. El medio acondicionado de estas nuevas células es útil para muchos propósitos, incluyendo por ejemplo, soportar el crecimiento de otras células mamíferas con necesidad de factores de crecimiento o factores tróficos secretados al medio por las células y cultivos de la invención, y promover, por ejemplo, la angiogénesis. Los métodos para preparar y almacenar los medios acondicionados se conocen en la técnica e implican principalmente la eliminación de las células, por ejemplo por centrifugación.

La invención proporciona en otro de sus aspectos composiciones de células terapéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y células derivadas del postparto derivadas de tejido del cordón umbilical postparto libre de sangre. Las células son capaces de auto-renovarse y expandirse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse a lo largo del linaje mesenquimal, hacia fenotipos cardiomiogénicos, angiogénicos y vasculogénicos, y adicionalmente hacia células como cardiomiocitos, células endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células del músculo liso (por ejemplo células musculares lisas vasculares), así como células de los sistemas excitatorio y conductor, y progenitores de las anteriores. Las células son capaces de crecer en una atmósfera que contiene oxígeno desde alrededor del 5% a alrededor del 20%. Las células también requieren L-valina para el crecimiento; tienen el potencial de por lo menos al menos 40 duplicaciones en cultivo; se unen y expanden en un recipiente de cultivo recubierto o sin recubrir, en donde el recipiente de cultivo de tejido recubierto se recubre con gelatina, laminina o fibronectina; producen factor tisular, vimentina y alfa actina del músculo liso; 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, detectadas por citometría de flujo.

Las composiciones de células terapéuticas proporcionadas pueden proporcionarse terapéuticamente en un paciente con una enfermedad del corazón o el sistema circulatorio, como una cardiomiopatía u otra enfermedad del corazón, o una lesión cardiaca. En ciertas realizaciones, las composiciones de células terapéuticas comprenden células inducidas para diferenciarse a lo largo de una vía o linaje cardiogénico, angiogénico, hemangiogénico o vasculogénico. Las composiciones de células terapéuticas pueden comprender células que estimulan a las células madre adultas presentes en el corazón, sangre, vasos sanguíneos y similares, para dividirse o diferenciarse, o ambas.

Las composiciones de células terapéuticas se proporcionan, por ejemplo, por inyección. En ciertas realizaciones, las composiciones de células terapéuticas se proporcionan por inyección intracardiaca. En otras realizaciones, la inyección puede ser en la superficie del corazón, en un área adyacente, o incluso en un área más remota. En realizaciones preferidas, las células pueden dirigirse al área enferma o lesionada. Se prefieren particularmente las células que se pueden inyectar por vía intravenosa y localizarse apropiadamente al sitio deseado de acción, por ejemplo, cardiomiocitos o sus progenitores preferiblemente tienen la capacidad de localizarse y dirigirse al músculo cardiaco o sus estructuras.

Las composiciones de células terapéuticas también pueden proporcionarse en la forma de un complejo matriz-célula. Las matrices incluyen, supercántigos biocompatibles, entramados, estructuras de autoensamblaje y similares, ya sean bioabsorbibles o no, líquidas, geles o sólidas. Muchas de dichas matrices son conocidas en las técnicas de tratamiento celular terapéutico, reparación quirúrgica, ingeniería de tejidos y curación de heridas. Preferiblemente las matrices se pre-tratan con las células terapéuticas. Más preferiblemente las matrices son pobladas con células en asociación cercana con la matriz o sus espacios. Las células pueden adherirse a la matriz en algunas realizaciones, en otras las células se atrapan o contienen dentro de los espacios de la matriz. Las más preferidas son aquellos complejos matriz-célula donde las células se cultivan en asociación cercana con la matriz y

cuando se usan terapéuticamente, el crecimiento de las células del paciente se estimula y soporta, y la angiogénesis apropiada se estimula o soporta de manera similar. Las composiciones matriz-célula pueden introducirse en el cuerpo de paciente por cualquier modo conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a implante, inyección, unión quirúrgica, trasplante con otro tejido, inyección y similares. En algunas realizaciones, las matrices se forman in vivo, o incluso más preferiblemente in situ, por ejemplo se pueden usar de acuerdo con la invención geles polimerizables in situ. Ejemplos de dichos geles se conocen en la técnica.

En algunas realizaciones, las células de la invención, o co-cultivos de las mismas, pueden sembrarse en dichas matrices tridimensionales, como supercántigos e implantarse in vivo, donde las células sembradas pueden proliferar sobre o en la estructura o ayudar a establecer tejido de reemplazo in vivo con o sin cooperación con otras células.

El crecimiento de PPDCs o co-cultivos de las mismas en la estructura tridimensional resulta preferiblemente en la formación de un tejido tridimensional, o fundamento para el mismo, que puede utilizarse in vivo, por ejemplo para reparar tejido dañado o enfermo. Por ejemplo, los supercántigos tridimensionales pueden usarse para formar estructuras tubulares, por ejemplo para su uso en la reparación de vasos sanguíneos; o aspectos del sistema circulatorio o estructuras coronarias.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las PPDCs o co-cultivos de las mismas se inoculan, o siembran sobre una estructura o matriz tridimensional, como un supercántigo, una espuma o hidrogel. La estructura puede configurarse de varias formas como generalmente plano, generalmente cilíndrico o tubular, o puede ser completamente de forma libre como se pueda requerir o desear para la estructura correctora bajo consideración. En algunas realizaciones, las PPDCs crecen sobre la estructura tridimensional, mientras que en otras realizaciones, las células solo sobreviven, o incluso mueren, sin embargo al hacerlo estimulan o promueven el crecimiento interno de nuevo tejido, por ejemplo, y preferiblemente la vascularización. Las PPDCs pueden co-administrarse con miocitos, mioblastos, células endoteliales vasculares, fibroblastos dérmicos, queratinocitos, y otros progenitores tipo tejido blando. Cuando crecen en este sistema tridimensional, las células que proliferan maduran y secretan adecuadamente para formar componentes de tejidos adultos análogos a las contrapartidas encontradas de forma natural in vivo.

Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la matriz puede diseñarse de tal manera que la estructura de la matriz: (1) soporte las PPDCs o co-cultivos de las mismas sin degradación posterior; (2) soporte las PPDCs o co-cultivos de las mismas desde el momento de la siembra hasta que el trasplante de tejido es remodelado por el tejido huésped; (3) permite a las células sembradas unirse, proliferar y desarrollarse en una estructura de tejido que tiene suficiente integridad mecánica para soportarse a sí mismo in vitro, en cuyo punto, la matriz se degrada. Una revisión del diseño de la matriz se proporciona por Hutmacher, J. Biomat. Sci. Polym. Edn., 12(1):107-124 (2001).

Las matrices, supercántigos, espumas y sistemas de auto-ensamblaje contemplados para el uso en la presente pueden implementarse en combinación con cualquiera o más células, factores de crecimiento, fármacos u otros componentes, como agentes bioactivos que promueven la curación, o el crecimiento interno de tejido, o estimulan la vascularización o inervación de los mismos o potencian de otra manera o mejoran la producción terapéutica o la práctica de la invención, además de las células de la invención.

Las células de la invención pueden cultivarse libremente en cultivo, retirarse del cultivo e inocularse en una estructura tridimensional. La inoculación de la estructura tridimensional con una concentración de células, por ejemplo, aproximadamente 10^6 a 5×10^7 células por milímetro, resulta preferiblemente en el establecimiento del soporte tridimensional en periodos relativamente más cortos. Además en alguna aplicación puede ser preferible usar un mayor o un menor número de células dependiendo del resultado deseado.

En algunas realizaciones, es útil el recrear en cultivo el microambiente celular encontrado in vivo, de tal manera que puede variar la extensión a las que las células se cultivan antes del implante in vivo o in vitro. Las PPDCs o co-cultivos de las mismas pueden inocularse en la estructura antes o después de formar la forma deseada para el implante, por ejemplo, cuerdas, tubos, filamentos y similares. Después de la inoculación de las células en la estructura, la estructura se incuba preferiblemente en un medio de crecimiento apropiado. Durante el periodo de incubación, las células inoculadas crecerán y envolverán la estructura y pueden por ejemplo, puentear, o puentear parcialmente cualquier espacio intersticial en la misma. Es preferible, pero no requerido cultivar las células a un grado apropiado que refleje la densidad celular in vivo del tejido que está siendo reparado o regenerado. En otras realizaciones, la presencia de las PPDCs, incluso en números relativamente bajos en la estructura fomenta el crecimiento interno de otras células sanas para facilitar la curación por ejemplo de un tejido herido o necrótico.

Ejemplos de matrices, por ejemplo supercántigos que se pueden usar para aspectos de la invención incluyen esteras (tejidas, de punto, y más preferiblemente no tejidas) espumas porosas o semiporosas, péptidos de auto ensamblaje y similares. Las esteras no tejidas pueden, por ejemplo, formarse usando fibras comprendidas de polímeros naturales o sintéticos. En una realización preferida, se usan copolímeros absorbibles de ácidos glicólicos y lácticos (PGA/PLA) vendidos bajo el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ) para

5 formar una estera. Las espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL / PGA), formadas por procesos como secado por congelación o liofilización, como se trata en la Patente U.S. N° 6.355.699, también pueden servir como supercántigos. Los geles también forman matrices adecuadas, como se usan en la presente. Ejemplos incluyen geles polimerizables in situ e hidrogeles, por ejemplos
 10 compuestos de péptidos de auto-ensamblaje. Estos materiales son usados frecuentemente como soportes para el crecimiento de tejido. Las redes degradables de formación in situ son también adecuadas para el uso en la invención (ver por ejemplo, Anseth, K.S. et al., 2002, J. Controlled Release 78: 199-209; Wang, D. et al., 2003, Biomaterials 24: 3969-3980; Publicación de Patente U.S. 2002/0022676 de He et al.). Estos materiales se formulan como fluidos adecuados para la inyección, después pueden inducirse por una variedad de medios (por ejemplo cambio de la temperatura, pH, exposición a luz) para formar redes de hidrogeles degradables in situ o in vivo.

15 De acuerdo con una realización preferida, la estructura es un fieltro que puede estar compuesto de un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro usando técnicas de procesamiento textil estándar consistentes de engaste, corte, cardado y punción. En otra realización preferida las células de la invención se siembran en supercántigos de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Además, la estructura tridimensional puede ser moldeada en una forma útil como una estructura específica en el cuerpo a ser reparado, reemplazado o aumentado.

20 La estructura puede tratarse antes de la inoculación de las células de la invención para mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, las matrices de nylon podrían ser tratadas con ácido acético 0,1 molar e incubadas en polilisina, PBS, y/o colágeno para recubrir el nylon. El poliestireno podría ser tratado de manera similar usando ácido sulfúrico.

25 Además, las superficies externas de la estructura tridimensional puede modificarse para mejorar la unión o crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, como recubriendo con plasma la estructura o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatan, sulfato de queratina), una matriz celular, y/o otros materiales como, pero no limitados a, gelatina, alginatos, gomas agar, agarosa, y gomas vegetales, entre otros.

30 En algunas realizaciones, el supercántigo se comprende de o se trata con materiales que le vuelven no trombogénico. Estos tratamientos y materiales pueden también promover y sostener crecimiento endotelial, migración, y depósito de matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen pero no están limitados a materiales naturales como proteínas de la membrana basal como laminina y colágeno Tipo IV, materiales sintéticos como ePTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentadas, como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden ser tratados adicionalmente para volver al supercántigo no trombogénico. Dichos tratamientos incluyen agentes anti-trombóticos como heparina, y tratamientos que alteran la carga de superficie del material como recubrimiento de plasma.

35 Las diferentes proporciones de los varios tipos de colágenos, por ejemplo, depositados en la estructura pueden afectar al crecimiento de células específicas del tejido u otras que pueden ser después inoculadas en la estructura o que pueden crecer en la estructura in vivo. Por ejemplo, para los sistemas de cultivo de piel tridimensionales, los tipos I y III de colágeno se depositan preferiblemente en la matriz inicial. Alternativamente, la estructura puede ser inoculada con una mezcla de células que sintetizan los tipos de colágeno apropiados
 40 deseados. Así, dependiendo del tejido a ser cultivado, se puede seleccionar el tipo de colágeno apropiado a ser inoculado en la estructura o producido por las células sembradas en la misma. Por ejemplo, las cantidades relativas de fibras colágenas y elásticas presentes en la estructura pueden modularse controlando la proporción de células que producen colágeno a células que producen elastina en el inóculo inicial. Por ejemplo, como las paredes internas de las arterias son ricas en elastina, un supercántigo arterial debería contener un co-cultivo de células de músculo
 45 liso que secretan elastina.

50 La estructura tridimensional sembrada o inoculada de la invención puede usarse en una variedad de aplicaciones. Estas incluyen pero no están limitadas a trasplante o implante de o las células cultivadas obtenidas de la matriz o la misma matriz cultivada in vivo. Los supercántigos tridimensionales pueden, de acuerdo con la invención, usarse para reemplazar o aumentar el tejido existente, para introducir tejido nuevo o alterado, para modificar prótesis artificiales, o para unir juntas tejidos o estructuras biológicas. Por ejemplo, y no a modo de limitación, realizaciones específicas de la invención incluyen pero no están limitadas a, estructuras planas e implantes de tejido tridimensionales tubulares para reparación o regeneración, por ejemplo, de músculo cardíaco, sus estructuras, y las del árbol vascular completo, incluyendo por ejemplo las estructuras endovasculares del cerebro e intracráneo.

55 Las PPDCs pueden inocularse en un supercántigo plano. El supercántigo se incuba preferiblemente en medio de cultivo antes del implante. Dos o más estructuras pueden colocar una encima de la otra y suturarse juntas para generar una estructura multi-capa.

65

Por ejemplo y no a modo de limitación, la estructura tridimensional puede usarse también para construir tejidos tubulares individuales y multi-capa in vitro que pueden servir como un reemplazo para tejido tubular dañado o enfermo in vivo.

5 Un supercántigo puede cortarse en una tira (por ejemplo de forma rectangular) de la que la anchura es aproximadamente igual a la de la circunferencia interna del órgano tubular en la que se insertará finalmente. Las células pueden inocularse en el supercántigo e incubarse por flotación o suspensión en medios líquidos. En la etapa apropiada de confluencia, el supercántigo puede enrollarse en un tubo uniendo los extremos largos juntos. La juntura puede cerrarse suturando los dos extremos juntos usando fibras de un material adecuado de un diámetro apropiado.

10 De acuerdo con la invención, un supercántigo puede formarse como un tubo, inocularse con PPDCs, y suspenderse en medio en una cámara de incubación. Para evitar que las células ocluyan el lumen, uno de los extremos abiertos de la estructura tubular puede fijarse a una boquilla. El medio líquido puede forzarse a través de esta boquilla desde una cámara fuente conectada a la cámara de incubación para crear una corriente a través del interior de la estructura tubular. El otro extremo abierto puede fijarse a una abertura de salida que lleva a la cámara de recogida de la que el medio puede recircularse a través de la cámara fuente. El tubo puede desprenderse de la boquilla y la abertura de salida cuando la incubación se ha completado. Este método se describe por Ballermann, B. J., et al., Solicitud Internacional N° WO 94/25584 y la Solicitud U.S. N° de serie 08/430.768.

20 En general, dos estructuras tridimensionales pueden combinarse en un tubo de acuerdo con la invención usando los métodos siguientes.

25 Dos o más estructuras planas pueden ponerse una encima de la otra y suturarse juntas. Esta lámina de dos capas puede después ser enrollada y, como se ha descrito anteriormente, unirse juntas y asegurarse.

30 Un supercántigo tubular que va a servir como la capa interna puede inocularse con PPDCs e incubarse. Un segundo supercántigo puede cultivarse como una tira plana con anchura ligeramente más grande que la circunferencia externa de la estructura tubular. Después de que se ha obtenido el crecimiento apropiado, la estructura plana puede ser envuelta alrededor del exterior del supercántigo tubular seguido por el cierre de la juntura de los dos bordes de la estructura plana y, preferiblemente asegurando la estructura plana al tubo interno.

35 Dos o más mallas tubulares de diámetros ligeramente diferentes pueden cultivarse se manera separada. La estructura con el diámetro pequeño puede insertarse dentro de la grande y asegurarse.

40 Para cada uno de estos métodos, se pueden añadir más capas volviendo a aplicar el método al tubo de doble capa. Los supercántigos pueden combinarse en cualquier etapa del crecimiento de las PPDCs, y la incubación de los supercántigos combinados puede continuarse cuando sea conveniente.

45 El aspecto luminal del constructo tubular puede estar compuesto de o tratado con materiales que vuelven a la superficie luminal del supercántigo tubular no trombogénica. Estos tratamientos y materiales pueden también promover y sostener el crecimiento endotelial, migración y el depósito de la matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen pero no están limitados a materiales naturales como proteínas de la membrana basal como laminina y colágeno tipo IV, materiales sintéticos como ePTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentadas, como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden ser tratados adicionalmente para volver a la superficie luminal no trombogénica. Dichos tratamientos incluyen agentes anti-trombóticos como heparina, y tratamientos que alteran la carga de superficie del material como recubrimiento de plasma.

50 En conjunción con lo anterior, las células y composiciones terapéuticas de la invención, y los lisados celulares y fracciones de la divulgación pueden usarse con dispositivos implantables. Por ejemplo las células de la invención o los lisados celulares o fracciones celulares de la divulgación pueden co-administrarse con, por ejemplo stents, válvulas artificiales, dispositivos de asistencia ventricular, bobinas desmontables de Guglielmi y similares. Como los dispositivos pueden constituir la terapia dominante proporcionada a un individuo con necesidad de dicha terapia, las células y similares pueden usarse como terapia de apoyo o secundaria para asistir, estimular, o promover la curación apropiada en el área del dispositivo implantado. Las células y composiciones terapéuticas de la invención, y los lisados y fracciones celulares de la divulgación pueden usarse también para "pre-tratar" ciertos dispositivos implantables, para minimizar los problemas cuando se usan in vivo. Dichos dispositivos pretratados, incluyendo dispositivos recubiertos pueden tolerarse mejor por los pacientes que los reciben, con riesgo disminuido de infección local o sistémica, o por ejemplo, reestenosis o oclusión adicional de los vasos sanguíneos.

60 Las composiciones de células terapéuticas, en ciertas realizaciones también comprenden células que expresan al menos uno de interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimioquinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanomas, alfa); ligando 6 de quimioquinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimioquinas motivo (C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3; o que tienen expresión reducida, en relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre

65

mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, para al menos uno de: homeobox 2 de estatura corta; proteína 2 de shock cardiaco de 27kDa; ligando 12 de quimioquinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supraavalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox 2 de mesénquima (homeobox específico de la detención del crecimiento); homólogo 1 del homeobox de sine oculis (Drosophila); alfa B, cristalina; activador asociado enredado de morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de enlace del plasminógeno); homología src tres (SH3) y dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativo; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción enanismo-relacionado 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de C-endopeptidasa de pro-colágeno; homólogo rizado 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesículas sinápticas; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 tipo receptor de citoquinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripción con motivo de enlace con PDZ (TAZ); homólogo 2 de homeobox de sine oculis (Drosophila); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprana 3; homeobox menos distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia aldo-ceto reductasa 1; miembro C3 (3-alfa hidroxesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens; clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZp564B222 del clon DKFZp564B222); proteína de la membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina); proteína de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1; tipo proteína 3 de interacción de 19kDa BCL2/adenovirus E1B; proteína 1 de enlace con AE; polipéptido VIIa de la subunidad de citocromo c oxidasa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de enlace con el factor de crecimiento tipo insulina 1, 36kDa.

25 Las composiciones de células terapéuticas de la divulgación también comprenden células que secretan al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES y TIMP1; y no secretan al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, I309, MDC y VEGF, detectadas por ELISA.

30 En otro de sus aspectos, la invención proporciona las células de la invención para su uso en métodos para tratar a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón, en el que los métodos comprenden administrar una composición celular derivada del cordón umbilical humano terapéutica a un paciente con una enfermedad o lesión del corazón o el sistema circulatorio; y evaluar al paciente para mejoras en la función cardiaca. En ciertas realizaciones preferidas la enfermedad del corazón es una cardiomiopatía, ya sea idiopática o con una causa conocida, e isquémica o no isquémica de naturaleza. Aunque los pacientes con cualquier enfermedad del corazón o circulatoria se beneficiarán de dicha terapia, los pacientes con infarto de miocardio provocado por cualquier condición pueden beneficiarse recibiendo las composiciones de células terapéuticas de la invención como se trata a continuación. En otras realizaciones preferidas, la enfermedad del corazón o el sistema circulatorio comprende una o más de angioplastia, aneurisma, angina de pecho (angina pectoris), estenosis aórtica, aortitis, arritmias, arteriosclerosis, arteritis, hipertrofia septal asimétrica (ASH), aterosclerosis, síndrome del corazón del atleta, fibrilación y aleteo auricular, endocarditis bacteriana, síndrome de Barlow (prolapso de la válvula mitral), bradicardia, enfermedad de Buerger (tromboangeítis obliterante), cardiomegalia, cardiomiopatía, carditis, enfermedad de la arteria carótida, coartación de la aorta, enfermedades congénitas cardíacas (defectos congénitos del corazón), insuficiencia cardíaca congestiva (insuficiencia cardíaca), enfermedad de la arteria coronaria, síndrome de Eisenmenger, embolia, endocarditis, eritromelalgia, fibrilación, displasia fibromuscular, bloqueo cardíaco, soplo en el corazón, hipertensión, hipotensión, calcificación arterial infantil idiopática, enfermedad de Kawasaki (síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos, enfermedad ganglionar mucocutánea, poliarteritis infantil), síndrome metabólico, angina microvascular, infarto de miocardio (ataques al corazón), miocarditis, taquicardia auricular paroxística (PAT), periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, enfermedad vascular periférica, flebitis, estenosis de la válvula pulmonar (estenosis pulmonar), enfermedad de Raynaud, estenosis de la arteria renal, hipertensión renovascular, cardiopatía reumática, defectos septales, isquemia silenciosa, síndrome X, taquicardia, Arteritis de Takayasu, tetralogía de Fallot, transposición de los vasos grandes, atresia tricúspide, tronco arterioso, enfermedad cardíaca valvular, úlceras varicosas, venas varicosas, vasculitis, defecto septal ventricular, síndrome de Wolff Parkinson-White, y defecto del cojín endocárdico.

55 En otras realizaciones preferidas, la enfermedad del corazón o el sistema circulatorio comprende una o más de fiebre reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, enfermedades del corazón reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral, estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de la válvula aórtica, enfermedades de otras estructuras endocárdicas, enfermedad isquémica del corazón (aguda y subaguda), angina de pecho, enfermedades de la circulación pulmonar (enfermedad cardíaca pulmonar aguda, embolia pulmonar, enfermedad cardíaca pulmonar crónica), enfermedad cardíaca quifosciliótica, pericarditis, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endocárdica, bloqueo auriculoventricular, arritmias cardíacas, degeneración del miocardio, enfermedades del sistema circulatorio, incluyendo enfermedad cerebrovascular, oclusión y estenosis de las arterias precerebrales, oclusión de arterias cerebrales, enfermedades de las arterias, arteriolas y capilares (aterosclerosis, aneurisma) enfermedades de venas

y vasos linfáticos, y otras enfermedades del sistema circulatorio.

La medición de la mejora en pacientes que reciben las composiciones terapéuticas proporcionadas en la presente pueden incluir cualquier medio conocido en la técnica, pero las mejoras preferidas incluyen mejoras en mediciones hemodinámicas incluyendo pero no limitadas a producción cardíaca del peso (CO), índice cardíaco (IC), presiones de la cuña de la arteria pulmonar (PAWP), e índice cardíaco (CI), % de acortamiento fraccional (% FS), fracción de eyección (FE), fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF); diámetro diastólico final ventricular izquierdo (LVEDD), diámetro sistólico final ventricular izquierdo (LVESD), contractilidad (por ejemplo, dP/dt), bucles de presión-volumen, mediciones de trabajo cardíaco, un aumento en el funcionamiento auricular o ventricular; un aumento de la eficiencia de bombeo, una disminución en la tasa de pérdida de la eficiencia de bombeo, una disminución en la pérdida del funcionamiento hemodinámico; y una disminución en complicaciones asociadas con cardiomiopatía. También se contemplan en la presente mediciones bioquímicas de las mejoras, por ejemplo la producción de ciertos productos o factores celulares. La presencia o ausencia de moléculas biológicas, por ejemplo enzimas particulares (o sus actividades), ARNms, factores de transcripción, proteínas, proteínas modificadas, lípidos, esteroides, o similares puede demostrarse que se correlaciona con mejoras en la salud cardíaca o circulatoria y el uso de estas mediciones de las mejoras también se contempla para su uso en la presente. También se contemplan en la presente como una indicación de mejora los cambios histológicos considerados beneficiosos o por ejemplo, índices de angiogénesis o vascularización mejorada.

En algunas realizaciones actualmente preferidas de la divulgación, los métodos comprenden inducir a las células derivadas del postparto terapéuticas para diferenciarse a lo largo del linaje mesenquimal, hacia fenotipos cardiomiogénicos, angiogénicos y vasculogénicos, o incluso hacia células como cardiomiocitos, células endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células del músculo liso (por ejemplo células musculares lisas vasculares), o hacia células de los sistemas excitatorio y conductor, y progenitores o parientes más antiguos de las anteriores. Dichas células se tratan anteriormente, y los métodos y factores para diferenciar las células, evaluar la inducción de células para diferenciarse, y los usos de dichas células para las composiciones terapéuticas es análogo. También las composiciones de células terapéuticas pueden integrarse en el corazón del paciente, o alternativamente pueden proporcionar soporte para el crecimiento o estimulación para diferenciarse para células madre cardíacas presentes de forma natural. Las células terapéuticas pueden coadministrarse con lisados celulares, o con otras células alogénicas, singénicas o autólogas. La supervivencia de las células administradas al administrar las composiciones de células terapéuticas no es determinante del éxito o resultados de su uso, más bien la mejora en la salud cardíaca o circulatoria es determinante de los resultados. Por lo tanto, las células no necesitan integrarse y latir con el corazón del paciente, o en vasos sanguíneos, si no que los índices de mejoras en la salud cardíaca o circulatoria en el paciente antes o después del tratamiento incluyen preferiblemente al menos uno de las mediciones objetivas de la salud cardíaca o circulatoria, y la evaluación subjetiva (incluyendo la auto-evaluación) de la condición del paciente. Un tratamiento exitoso podría por lo tanto comprender el tratamiento de un paciente con una cardiomiopatía con una composición de células terapéutica que comprende las PPDCs, en presencia o ausencia de otro tipo celular. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las PPDCs preferiblemente se integran al menos parcialmente, multiplican o sobreviven en el paciente. En otras realizaciones preferidas, el paciente experimenta beneficios de la terapia, por ejemplo de la capacidad de las PPDCs de soportar el crecimiento de otras células, incluyendo células progenitoras presentes en el corazón, del crecimiento interno del tejido o la vascularización del tejido, y de la presencia de factores celulares, quimiocinas, citocinas y similares beneficiosos, pero las células no se integran o multiplican en el paciente. En otra realización, el paciente se beneficia del tratamiento terapéutico con las PPDCs, pero las células no sobreviven durante un periodo prolongado en el paciente. En una realización, las células disminuyen gradualmente en número, viabilidad o actividad bioquímica, en otras realizaciones, la disminución en las células puede ser precedida por un periodo de actividad, por ejemplo crecimiento, división, o actividad bioquímica. En otras realizaciones, las células senescentes, no viables o incluso muertas son capaces de tener un efecto terapéutico beneficioso.

La administración es preferiblemente in vivo por trasplante, implante, inyección, fusión, administración por catéter o proporcionado como un complejo matriz-célula, o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar terapia celular.

Los pacientes con infarto de miocardio provocado por cualquier condición pueden beneficiarse recibiendo las composiciones de células terapéuticas de la invención. Dicho tratamiento se proporciona preferiblemente dentro de una ventana terapéutica razonable después del evento cardíaco. Actualmente, se prefiere que el tratamiento con las células o composiciones de la invención se inicie en el plazo de 30 días del infarto de miocardio. Se prefiere el tratamiento dentro del plazo de 1-21 días. También se contempla en la presente que los efectos beneficiosos de ciertas aplicaciones, por ejemplo por inyección intravenosa donde las células se dirigen al sitio dañado, permitirá un tratamiento mucho más rápido. Por ejemplo, se contempla actualmente que el tratamiento en relación temporal cercana con el infarto de miocardio o evento cardíaco similar puede ser beneficioso. En relaciones preferidas, el tratamiento con las composiciones de células terapéuticas está dentro del plazo de veinticuatro horas del evento cardíaco. También se prefiere el tratamiento dentro del plazo de 12, 8 o incluso cuatro horas. Más preferiblemente el tratamiento se da dentro del plazo de dos horas. Se prefiere más el tratamiento dentro del plazo de una hora desde el evento, con el tratamiento dentro del plazo de 30 minutos o incluso 15 minutos siendo el más preferido. también

5 se proporcionan en la presente kits para su uso en el tratamiento de infarto de miocardio. Los kits proporcionan la composición de células terapéutica de la invención que pueden prepararse en una forma farmacéuticamente aceptable, por ejemplo mezclándola con un portador farmacéuticamente aceptable, y un aplicador, junto con instrucciones para el uso. Idealmente el kit puede usarse en el campo, por ejemplo en una oficina de un facultativo, o por un proveedor de atención de emergencia para ser aplicado a un paciente al que se le ha diagnosticado haber tenido un infarto de miocardio o evento cardiaco similar.

10 La invención también proporciona en otro aspecto, las células de la invención para su uso en métodos para tratar a un paciente con una enfermedad del corazón o el sistema circulatorio, en el que los métodos comprenden administrar una composición de células derivadas del cordón umbilical humanas a un paciente con una enfermedad del corazón o el sistema circulatorio; y evaluar al paciente para mejoras en la función cardiaca, en el que la administración es con una población de otro tipo de células. Se prefiere la administración de co-cultivos, poblaciones mixtas u otras poblaciones no clonales. Otros tipos de células que pueden coadministrarse son mioblastos, miocitos, cardiomiocitos, cardiomioblastos, o progenitores de mioblastos, miocitos, cardiomiocitos, o cardiomioblastos.

15 También se proporcionan en la presente las células de la invención para su uso en métodos para tratar a un paciente con una enfermedad del corazón o el sistema circulatorio, en el que los métodos comprenden administrar una composición e células derivadas del cordón umbilical humanas derivadas del postparto a un paciente con una enfermedad del corazón o el sistema circulatorio; y evaluar al paciente para mejoras en la función cardiaca, en el que la composición de células terapéuticas se administra como un complejo matriz-célula. En ciertas realizaciones, la matriz es un supercóntigo, preferiblemente bioabsorbible, que comprende al menos las células derivadas del postparto.

20 También se proporcionan kits para la aplicación terapéutica de las poblaciones y cocultivos de la invención. Cuando se usan para el tratamiento de cardiomiopatías, u otro tratamiento programado, los kits incluyen una composición de células terapéutica, como o sin una matriz, y con o sin un cocultivo presente. Los kits también incluyen opcionalmente un medio para administrar las células, por ejemplo por inyección, y un portador farmacéuticamente aceptable para las células, si se requiere. Los kits incluyen instrucciones para el uso de las células. Los kits preparados para el uso en hospitales de campaña, como para uso militar pueden incluir suministros de procedimiento completo incluyendo supercóntigos de tejido, suturas quirúrgicas y similares, cuando las células se van a usar en conjunción con reparación de lesiones cardiacas agudas.

25 La invención también proporciona depósitos de tejidos, células, poblaciones y composiciones de células terapéuticas de la invención. Como se ha tratado con anterioridad las células se criopreservan fácilmente. La divulgación por lo tanto proporciona métodos para criopreservar las células en un banco, en donde las células se almacenan congeladas y asociadas con una caracterización completa de las células en base a las propiedades inmunológicas, bioquímicas y genéticas de las células. Las células así congeladas pueden usarse para terapia autóloga, singénica o alogénica, dependiendo de los requisitos del procedimiento y las necesidades del paciente. Preferiblemente, la información de cada muestra criopreservada se almacena en un ordenador en el que se puede buscar en base a los requisitos del cirujano, procedimiento y paciente con las concordancias adecuadas hechas en base a la caracterización de las células o poblaciones. Preferiblemente, las células de la invención se cultivan y expanden a la cantidad deseada de células y las composiciones de células terapéuticas se preparan o de manera separada o como cocultivos, en presencia o ausencia de una matriz o soporte. Aunque para algunas aplicaciones puede ser preferible usar células recién preparadas, el resto se puede criopreservar y depositar congelando las células e introduciendo la información en el ordenador para asociar la entrada informática con las muestras. Incluso cuando no es necesario emparejar una fuente o donante con un recipiente de dichas células, para propósitos inmunológicos, el sistema de banco hace fácil emparejar, por ejemplo, propiedades bioquímicas o genéticas deseables de las células depositadas con las necesidades terapéuticas. Una vez emparejadas las propiedades deseables con una muestra almacenada de partículas, la muestra se retira y prepara para el uso terapéutico. Los lisados celulares preparados como se describe en la presente pueden también criopreservarse y depositarse de acuerdo con la presente divulgación.

30 En otro aspecto de la invención se proporcionan kits para el crecimiento y mantenimiento, el aislamiento y el uso de células derivadas del tejido del cordón umbilical. Las células de la invención y de acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, lisados celulares, fracciones celulares solubles, fracciones de membrana y matrices pueden ser empleadas convenientemente como partes de kits, por ejemplo, para un kit para el cultivo o implante. La invención proporciona un kit que incluye los UDCs y componentes adicionales, que incluyen instrucciones para el crecimiento o mantenimiento, aislamiento o use de las células o fracciones celulares, junto con por ejemplo, material de la matriz (por ejemplo supercóntigo), agentes hidratantes (por ejemplo, soluciones salinas fisiológicamente compatibles, medios de cultivo celulares preparados), sustratos de cultivos celulares (por ejemplo platos, placas recipientes, etc. de cultivo), medios de cultivo celulares (ya sea en forma líquida o deshidratada), compuestos antibióticos, hormonas y similares. Los kits para el crecimiento pueden por ejemplo incluir todos los componentes del Medio de Crecimiento como se usan en la presente, incluyendo suero, por ejemplo suero bovino fetal. Aunque el kit puede incluir cualquiera de dichos componentes, preferiblemente incluye todos los ingredientes necesarios para su uso pretendido. Si se desea, el kit también puede incluir células (típicamente criopreservadas), que pueden

sembrarse en un entramado como se describe en la presente. Los kits para el aislamiento contendrán todo lo requerido para poner en práctica los métodos de aislamiento como se proporcionan en la presente, excepto por el tejido umbilical que deberá ser obtenido fresco o congelado de un banco de tejido en el momento del aislamiento. Se proporciona el equipamiento quirúrgico para disociar el tejido, enzimas preferidos, o elecciones de enzimas en forma estable, así como los tampones y medio, tamices celulares y similares, como se requiera o prefiera para el método como se divulga anteriormente. Las instrucciones detalladas con pasos adicionales y listados de suministradores de materiales opcionales o alternativos también se proporcionan convenientemente. También pueden incluirse células de control para la comparación de las células aisladas con, por ejemplo los cultivos de UDC depositados con el ATCC. Los kits para utilizar las células derivadas del tejido del cordón umbilical contienen preferiblemente poblaciones de las células o composición terapéuticas que comprenden las células, componentes y productos, o fracciones o medios acondicionados derivados de las células como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, incluyendo al menos UDCs y un portador farmacéuticamente aceptable (líquido, semi-sólido o sólido). Las poblaciones en algunas realizaciones son homogéneas o incluso líneas celulares clonales de UDCs. En otras realizaciones, los kits incluyen otras líneas celulares para el uso en cocultivo. Los kits de aplicación terapéuticos incluyen preferiblemente agentes bioactivos adicionales como se desee por ejemplo agente antitrombogénicos, agentes anti-inflamatorios, agentes antiapoptóticos, y compuestos inmunosupresores o inmunomoduladores. Los kits también pueden opcionalmente incluir un medio de administrar las células, por ejemplo por inyección. Los kits pueden además incluir instrucciones para el uso de las células. Los kits preparados para el uso en hospitales de campaña, como para uso militar, pueden incluir suministros de procedimiento completo incluyendo supercántigos de tejido, suturas quirúrgicas y similares, cuando las células se van a usar en conjunción con reparación de lesiones agudas. Los kits de la divulgación para ensayos y métodos in vitro como se describen en la presente pueden contener uno o más de (1) UDC o fracciones, componentes o productos de UDCs, (2) reactivos para poner en práctica el método in vitro, (3) otras células o poblaciones de células, como sea apropiado, por ejemplo para cocultivos y (4) instrucciones para realizar el método in vitro. Los kits de la divulgación para la preparación de componentes derivados de células pueden incluir tanto los componentes requeridos para el crecimiento de las células como los componentes requeridos para preparar la fracción celular de interés, junto con instrucciones para obtener la fracción deseada de las células. También se divulgan en la presente kits para la producción y recogida de medios acondicionados e incluyen células, medio, recipientes de recogida, instrucciones, estándares para realizar ensayos de las moléculas secretadas de interés y similares.

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

EJEMPLO 1

Aislamiento de Células a partir de Tejidos Postparto

Resumen

Las células postparto se han aislado de tejidos de la placenta y el cordón umbilical completos y prematuros. Una modo altamente preferido de aislar las células de estos tejidos es usando una combinación de enzimas digestivos. Se prefieren particularmente colagenasa, hialuronidasa y dispasa. Esta combinación resulta en el aislamiento de una población de células con buenos potenciales de expansión y diferenciación. Otras combinaciones de enzimas usados han producido poblaciones de células que también pueden expandirse.

Introducción

Se aislaron las poblaciones de células de tejidos de la placenta y el cordón umbilical. Los cordones umbilicales y placenta postparto se obtuvieron después de nacimientos de embarazos o completos o prematuros. Se recogieron las células de cinco donantes separados de tejido umbilical y de la placenta. Se probaron diferentes métodos de aislamiento celular para su capacidad de producir células con: 1) el potencial de diferenciarse en células con diferentes fenotipos, una característica común a las células madre, o 2) el potencial de proporcionar factores tróficos críticos para otras células y tejidos.

Métodos y Materiales

Aislamiento de células umbilicales

Los cordones umbilicales se obtuvieron de la National Disease Research Interchange (NDRI , Philadelphia, PA). Los tejidos se obtuvieron después de partos normales. El protocolo de aislamiento celular se realizo asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los desechos, se lavó el cordón en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de 10.000 Unidades de antimicótico y antibiótico por 100 mililitros de PBS (Invitrogen Carlsbad, CA). Los tejidos fueron después disociados

mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-glucosa baja o DMEM-glucosa alta; Invitrogen), hasta que el tejido se hubo desmenuzado en una pasta fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo). El tejido fue después digerido o en medio DMEM-glucosa baja o en medio DMEM-glucosa alta, conteniendo cada uno 10.000 Unidades de antimicótico o antibiótico por 100 mililitros de PBS 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 DMEM-glucosa baja). 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:-glucosa baja). 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 horas.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 20 mililitros de Medio de Crecimiento (DMEM: glucosa baja (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) de suero bovino fetal (FBS; suero bovino definido; Lot#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma), 1 mililitro por 100 mililitros de antibiótico/antimicótico (10.000 Unidades por mililitro de penicilina, 10.000 microgramos por mililitro de estreptomycin, 25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un colador células de nylon de 70 micrómetros (Nalge Nunc International, Rochester, NY). Se pasaron 5 mililitros adicionales de enjuague que comprendía Medio de Crecimiento a través del colador. La suspensión celular se pasó después a través de un colador celular de nylon de 40 micrómetros (Nalge Nunc International) y se persiguió con 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 nuevo. Este proceso se repitió dos veces más.

Una vez se hubo aspirado el sobrenadante de la centrifugación final y el pellet celular se hubo resuspendido en 5 mililitros de Medio de Crecimiento nuevo. El número de células viables se determino usando tinción con azul de tripano. Las células se cultivaron bajo condiciones estándar.

Las células aisladas de las células del cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm² sobre matraces T-75 cm² recubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en Medio de Crecimiento. Después de 2 días, el medio gastado se aspiró de los matraces. Las células se lavaron con PBS tres veces para eliminar los desechos y las células derivadas de la sangre. Las células fueron después respuestas con Medio de Crecimiento y se permitió que crecieran a confluencia (alrededor de 10 días desde el pase) al pase 1. En pases posteriores (desde el pase 1 al 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/cm². Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con un 5 por ciento de dióxido de carbono y un 20 por ciento de oxígeno a 37° C.

Aislamiento de Células de la Placenta

El tejido de la placenta se obtuvo de NDRI (Philadelphia, PA). Los tejidos eran de un embarazo y se obtuvieron en el momento de un parto quirúrgico normal. Las células de la placenta se aislaron como se describe para el aislamiento de células umbilicales.

La siguiente descripción se aplica al aislamiento de poblaciones separadas de células derivadas de la madre y células derivadas neonatales del tejido de la placenta.

El protocolo de aislamiento celular se realizó asépticamente en una campana de flujo laminar. El tejido de la placenta se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicótico y antibiótico (penicilina, 10.000 Unidades/mililitro; estreptomycin, 10.000 microgramos/mililitro; anfotericina B, 25 microgramos/mililitro; Invitrogen) para eliminar tanta sangre y desecho como sea posible. El tejido de la placenta se diseccionó después en tres secciones; aspecto neonatal, la región vellosa, el aspecto maternal.

Las secciones separadas se lavaron individualmente varias veces en PBS con antibiótico/antimicótico para eliminar sangre y desecho adicionales. De esta manera se eliminó sustancialmente toda la sangre. Cada sección fue después disociada mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de DMEM: glucosa baja (Invitrogen), a una pasta fina. La pasta se transfirió a tubos cónicos de 50 mililitros. cada tubo contenía aproximadamente 5 gramos de tejido. El tejido se digirió en medio DMEM-glucosa baja o DMEM-glucosa alta que contenía 10.000 Unidades de antimicótico y antibiótico por 100 mililitros 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 DMEM:-glucosa baja. 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:-glucosa

baja). Los tubos cónicos que contenían el tejido, medio y enzimas de digestión se incubaron durante 2 horas a 37° C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm.

5 Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 20 mililitros de Medio de Crecimiento. La suspensión celular se filtró a través de un colador células de nylon de 70 micrómetros (Nalge Nunc International, Rochester, NY) y se enjuagó con 5 mililitros de Medio de Crecimiento. La suspensión celular total se pasó a través de un colador celular de nylon de 40 micrómetros (Nalge Nunc International) y se enjuagó con 5 mililitros adicionales de Medio de Crecimiento.

10 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 pellet celular se resuspendió en 50 mililitros de Medio de Crecimiento nuevo. Este proceso se repitió dos veces más. Después de la centrifugación final, se aspiró el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 5 mililitros de Medio de Crecimiento nuevo. Se determinó un recuento celular usando la prueba de exclusión de azul de tripano. Las células se cultivaron bajo condiciones estándar.

Aislamiento Celular de LIBERASE

20 Las células se aislaron de tejidos postparto en medio DMEM-glucosa baja con LIBERASE (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; (Roche Applied Sciences, Indianapolis, 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 anteriores, con la mezcla LIBERASE/ hialuronidasa usada en lugar de la mezcla de enzimas C:D o C:D:H. LA digestión del tejido con LIBERASE resultó en el aislamiento de poblaciones de células de tejidos postparto que se expandieron rápidamente.

Aislamiento Celular usando otras combinaciones de enzimas

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

Aislamiento de células de sangre residual en los cordones

40 Se hicieron otros intentos para aislar grupos de células de cordones umbilicales por enfoques diferentes. En un caso el cordón umbilical se cortó y lavó con Medio de Crecimiento para desalojar los coágulos de sangre y el material gelatinoso. La mezcla de sangre, material gelatinoso y Medio de Crecimiento se recogió y centrifugó a 150 x g. El pellet se resuspendió y sembró sobre matraces recubiertos con gelatina en Medio de Crecimiento. Se aislaron las poblaciones de células que se expandieron fácilmente.

Aislamiento de células de la Sangre del Cordón

45 Las células también se aislaron de muestras de cordón umbilical obtenidas de NDRI. El protocolo de aislamiento usado aquí fue el de la Solicitud de Patente Internacional PCT/US02/29971 de Ho et al. Las mezclas (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre del cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) se mezclaron con tampón de lisis (cloruro de amonio 155 milimolar esterilizado por filtración, bicarbonato de potasio 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 proporción de 1:20 sangre del cordón a tampón de lisis. La suspensión celular resultante se agitó en vórtex durante 5 segundos, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó el lisado (10 minutos a 200 x g). El pellet celular se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contenía un 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 estreptomycin por 100 mililitros (Gibco, Carlsbad, CA). Se centrifugaron las células resuspendidas (10 minutos a 200 x g), se aspiró el sobrenadante, y el pellet celular se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en o matraces T75 (Coming, NY), matraces recubiertos con laminina T75 o matraces recubiertos con fibronectina T175 (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

Aislamiento de células postparto usando combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento diferentes

60 Para determinar si las poblaciones de células pueden aislarse bajo condiciones diferentes y expandirse bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células se digirieron en Medio de Crecimiento con o sin un 0,001 por ciento (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), usando la combinación de enzimas C:D:H, de acuerdo con los procedimientos proporcionados anteriormente. Las células de la placenta así aisladas se sembraron bajo una variedad de condiciones. Todas las células se cultivaron en presencia de

65

penicilina/estreptomicina. (Tabla 1-2).

Aislamiento de células postparto usando combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento diferentes

5 En todas las condiciones probadas, las células se unieron y expandieron bien alrededor del pase 0 al 1 (Tabla 1-2). Las células en las condiciones 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra en cuyo punto se criopreservaron. Todas las células se depositaron para investigación posterior.

Resultados

10 *Aislamiento celular que surge de Combinaciones de Enzimas Diferentes*

15 La combinación de enzimas C:D:H proporcionaron el mejor rendimiento celular después del aislamiento, y generó células que se expandieron durante muchas más generaciones en el cultivo que las de las otras condiciones (Tabla 1). No se obtuvo una población de células expandible usando colagenasa o hialuronidasa sola. No se intentó determinar si este resultado es específico para la colagenasa que se probó.

Aislamiento de células postparto usando combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento diferentes

20 Las células se unieron y expandieron bien alrededor del pase 0 al 1 bajo todas las condiciones probadas para la digestión enzimática y crecimiento (tabla 1-2). Las células en las condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la a siembra en cuyo punto se criopreservaron. Todas las células se depositaron para investigación posterior.

25 *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 enzimática.

30 *Aislamiento de células de Sangre del Cordón*

35 Las preparaciones contenían glóbulos rojos y plaquetas. Las células no nucleadas se unieron y dividieron durante las 3 primeras semanas. El medio se cambió 3 veces después de la siembra y no se observaron células que se unieran y crecieran.

Discusión y Conclusión

40 Las poblaciones de células pueden aislarse de tejido umbilical y de la placenta de manera más eficiente usando la combinación de enzimas colagenasa (una metaloproteasa), dispasa (una proteasa neutra) e hialuronidasa (una enzima mucolítica que descompone el ácido hialurónico. También puede usarse LIBERASE Blendzyme, que es una mezcla comercial de colagenasa y otra proteasa. En el presente estudio también se usó Blendzyme 3 que contiene colagenasa (4 unidades de Wunsch/g) y termosilina (1714 Unidades de caseína/g) junto con hialuronidasa para aislar células. Las células aisladas con estos enzimas se expanden fácilmente durante muchos pases, por ejemplo, cuando se cultivan en Medio de Crecimiento en plástico recubierto con gelatina.

45 Las células también se aislaron de la sangre residual en los cordones, pero no sangre de cordón. LA presencia de células en coágulos de sangre lavados del tejido, que se adhieren y crecen bajo las condiciones usadas, puede deberse a células que se liberan durante el proceso de disección. Otras explicaciones pueden incluir la migración de células de la matriz.

Recomendación

50 Se prefiere el uso de combinaciones de enzimas C:D:H para el aislamiento de poblaciones de células a partir de tejidos postparto. Las células aisladas usando esta combinación de enzimas se han caracterizado extensamente y tienen muchas propiedades deseables. Las células extraídas de LIBERASE y las células tratadas con otras células de combinación de enzimas proporcionan células útiles con potencial de expansión. Puede ser útil elegir un proceso o método para el aislamiento celular que ayude a minimizar el manejo y transferencia del tejido. Dichos métodos pueden incluir digestión mecánica por ejemplo con un mezclador, homogeneizador de tejido y similares.

Referencia

65 s1. 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/US02/29971 US, Presentada 20020920, A2

Publicada 20030327, A3 Publicada 20031218

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

Digestión Enzimática	Aislado de Células	Expansión Celular
Colagenasa	X	X
Dispasa	+ (> 10 h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa :Dispasa	++ (< 3 h)	++
Colagenasa:Hialuronidasa	++ (< 3 h)	+
Dispasa:Hialuronidasa	+ (> 10 h)	+
Colagenasa:Dispasa:Hialuronidasa	+++ (< 3 h)	+++
Clave: + = buena. ++ = muy buena. +++ = excelente X = sin éxito		

Tabla 1-2: Aislamiento y expansión del cultivo de células postparto bajo diferentes condiciones

Condición	Medio	15% FBS	BME	Gelatina	20% O ₂	Factores de Crecimiento
1	DMEM-L α	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-L α	Y	Y	Y	N (5%)	N
3	DMEM-L α	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-L α	Y	Y	N	N (5%)	N
5	DMEM-L α	N (2%)	Y	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/mililitro)
6	DMEM-L α	N (2%)	Y	N (Laminina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/mililitro)
7	DMEM-L α	N (2%)	Y	N (Fibrona)	Y	PDGF/VEGF
8	DMEM-L α	N (2%)	Y	N (Fibrona)	N (5%)	PDGF/VEGF
9	DMEM-L α	Y	N	Y	Y	N
10	DMEM-L α	Y	N	Y	N (5%)	N
11	DMEM-L α	Y	N	N	Y	N
12	DMEM-L α	Y	N	N	N (5%)	N
13	DMEM-L α	N (2%)	N	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/mililitro)
14	DMEM-L α	N (2%)	N	N (Laminina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/mililitro)
15	DMEM-L α	N (2%)	N	N (Fibrona)	Y	PDGF/VEGF
16	DMEM-L α	N (2%)	N	N (Fibrona)	N (5%)	PDGF/VEGF

EJEMPLO 2

Características de Crecimiento de Células Postparto

Resumen

Los productos de células comercialmente viables deben ser capaces de ser producidos en suficientes cantidades para proporcionar tratamiento terapéutico a pacientes con necesidad de tratamiento. Las células postparto pueden expandirse en cultivo para dichos propósitos. Se hicieron comparaciones del crecimiento de células postparto en cultivo con las de otras poblaciones de células incluyendo células madre mesenquimales. Los datos demuestran que las líneas celulares postparto como se desarrollan en la presente pueden expandirse durante más de 40 duplicaciones para proporcionar suficientes números de células, por ejemplo, para bancos pre-clínicos. Además, estas poblaciones de células postparto pueden expandirse bien de sembrados de baja- o alta densidad.

Este estudio ha demostrado que las células madre mesenquimales, por el contrario, no pueden expandirse para obtener grandes cantidades de células.

Introducción

5 Se comparó el potencial de expansión celular de células postparto con otras poblaciones de células madre aisladas. La técnica de la expansión celular a la senectud se refiere como 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). La senectud se define como el punto en la que la división celular para completamente, es decir, cuando la célula pierde su capacidad de proliferar y expandirse. Las células derivadas del postparto son muy adecuadas para uso terapéutico ya que pueden expandirse fácilmente a suficientes números de células.

Materiales y Métodos

15 *Matraces con recubrimiento de gelatina*

Se recubrieron matraces de plástico de cultivo de tejido añadiendo 20 mililitros de una solución de 2% (p/v) de gelatina (Tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a cada recipiente T75 (Corning, Corning, NY) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de gelatina, se añadieron 10 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y después se aspiraron.

Comparación de potencial de expansión de células postparto frente a otras poblaciones de células madre y no de células madre

25 Para la comparación del potencial de expansión de crecimiento se utilizaron las siguientes poblaciones de células: i) Células madre mesenquimales (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de tejido adiposo (US655374 B1; Solicitud de Patente U.S. US20040058412); iii) Fibroblastos de la piel dérmicos normales (cc-2509 lot # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); iv) Células derivadas de cordón umbilical; y vi) Células derivadas de la placenta. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos de gelatina en Medio de Crecimiento.

35 Para pases posteriores, los cultivos celulares se trataron de la manera siguiente: Después de la tripsinización, se contaron las células viables después de tinción con azul de tripano. Las suspensión celular (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 ml, Sigma, St. Louis MO). Se estimaron los números de células viables usando un hemocitómetro.

40 Después del recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm² sobre matraces T75 recubiertos de gelatina en 25 ml de Medio de crecimiento nuevo. Las células se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándar (5 por ciento de dióxido de carbono) a 37° C en presencia de un 20 por ciento de oxígeno y 75 por ciento de nitrógeno (v/v). El Medio de Crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron alrededor de un 85 por ciento de confluencia se pasaron; este proceso se repitió hasta que las células llegaron a la senectud.

45 En cada pase, las células se tripsinizaron y contaron. Se calcularon el rendimiento de células viables, duplicaciones de población [ln (células finales/células iniciales/ln2) y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicaciones de población). Para los propósitos de determinar la expansión celular óptima, se determinó el rendimiento celular total multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de expansión para cada pase (es decir factor de expansión = células finales/células iniciales).

Expansión del potencial de bancos celulares a baja densidad

50 También se probó el potencial de expansión de las células depositadas en el pase 10. Se usó un conjunto de condiciones diferentes. Se probaron fibroblastos de la piel dérmicos normales (cc-2509 lot # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas de cordón umbilical y células derivadas de la placenta. Estas poblaciones de células habían sido depositadas en el pase 10 anteriormente, habiendo sido cultivadas a 5.000 células/cm² en cada pase a ese punto. Se determinó el efecto de la densidad celular en las poblaciones de células después de la descongelación celular en el pase 10. Las células se descongelaron bajo condiciones estándar, se contaron usando tinción con azul de tripano. Las células descongeladas se sembraron a 1000 células/cm² en Medio de Crecimiento. 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 pasaron a medida que alcanzaban alrededor de un 85% de confluencia. Las células se pasaron posteriormente hasta la senectud, es decir, hasta que no podían expandirse más. Las células se trataron con tripsina y se contaron en cada pase. Rendimiento celular, duplicaciones de población (ln (células finales/células iniciales/ln2) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicaciones de población). El rendimiento celular total se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de expansión para cada pase (es decir factor de expansión = células finales/células iniciales).

Expansión de células postparto a baja densidad de sembrado celular inicial

5 Se probó el potencial de expansión de cultivos de células postparto recién aisladas bajo condiciones de siembra celular bajas en otro experimento. Las células del cordón umbilical y de la placenta se aislaron como se describe en la presente. Las células se sembraron a 1000 células/cm² y se pasaron como se ha descrito anteriormente hasta la senectud. Las células se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37° C. El Medio de Crecimiento se cambió dos veces a la semana. Las células se pasaron a medida que alcanzaban alrededor de un 85% de confluencia. En cada pase, las células se trataron con tripsina y se contaron por tinción con azul de tripano. Se calcularon el rendimiento celular, duplicaciones de población ($\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales}/\ln 2)$) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicaciones de población) para cada pase. El rendimiento celular total se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de expansión para cada pase (es decir factor de expansión = células finales/células iniciales). Las células se cultivaron en matraces recubiertos con gelatina y no gelatina.

15 *Expansión de Células de la Placenta Neonatales Clonales*

Se usó la clonación para expandir una población de células neonatales con éxito del tejido de la placenta. Después del aislamiento de tres poblaciones de células diferenciales de la placenta (como se describe en la presente), estas poblaciones de células se expandieron bajo condiciones de crecimiento estándar y después se cariotiparon para revelar la identidad de las poblaciones de células aisladas. Como estas células se aislaron de una madre que dio a luz un niño fue muy simple distinguir entre los cromosomas masculinos y femeninos realizando diferenciales de metafase. Estos experimentos demostraron que las células aisladas del aspecto neonatal eran principalmente de cariotipo -positivo para el fenotipo neonatal, y las células aisladas del aspecto materno eran principalmente de cariotipo positivo para las células maternas, las células aisladas de la región vellosa eran de cariotipo positivo para tanto para el fenotipo neonatal como el materno. La subclonación de las poblaciones derivadas de los aspectos neonatal y materno se requiere para asegurar que las poblaciones clonales se obtienen para tanto células neonatales como maternas.

30 *Expansión de células en condiciones de cultivo con oxígeno bajo*

Se ha demostrado que las condiciones de cultivo celular con O₂ bajo pueden mejorar la expansión celular en ciertas circunstancias (Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J.; McKay, Ron; Studer, Lorenz. Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. US20040005704). Para determinar si la expansión celular de células derivadas del postparto podría mejorarse alterando las condiciones de cultivo celular, se cultivaron cultivos de células derivadas del cordón umbilical en condiciones de oxígeno bajo. Las células se sembraron a 5000 células/cm² en Medio de Crecimiento en matraces recubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente bajo condiciones atmosféricas estándar a través del pase 5, en cuyo punto se transfirieron a condiciones de cultivo con oxígeno bajo (5% de O₂).

40 *Otras condiciones de crecimiento*

En otros experimentos las células se expandieron en placas no recubiertas, recubiertas con colágeno, recubiertas con fibronectina, recubiertas con laminina y recubiertas con Matrigel. Los cultivos han demostrado que se expanden bien en estas matrices diferentes.

45 **Resultados**

50 *Comparación del potencial de expansión de células postparto frente a otras poblaciones de células madre y células no madre*

Tanto las células derivadas del cordón umbilical como las derivadas de la placenta se expandieron por más de 40 pases generando rendimientos celulares de > 1E17 células en 60 días. Por el contrario, las MSCs y los fibroblastos entraron en la senectud después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas del tejido adiposo como las omentales se expandieron durante casi 60 días generaron rendimientos celulares totales de 4.5E12 y 4.24E13 respectivamente. Por lo tanto, cuando se siembran a 5000 células/cm² bajo las condiciones experimentadas utilizadas, las células derivadas del postparto se expandieron mucho mejor que otros tipos de células cultivadas bajo las mismas condiciones (Tabla 1).

60 *Expansión del potencial de depósitos de células a baja densidad*

Las células derivadas del cordón umbilical, derivadas de la placenta y fibroblastos se expandieron durante más de 10 pases generando rendimientos celulares de > 1E11 células en 60 días (Tabla 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 se volvieron senescentes después de 80 días, completando >50 y >40 duplicaciones de población respectivamente.

Expansión de células postparto a baja densidad a partir del sembrado celular inicial

5 Las células derivadas de la placenta se expandieron a baja densidad (1.000 células/cm²) en placas o
matraces recubiertos de gelatina o sin recubrir. EL potencial de crecimiento de estas células bajo estas condiciones
fue bueno. Las células se expandieron fácilmente en un crecimiento de fase largo. La tasa de expansión celular fue
similar al observado cuando las células derivadas de la placenta se sembraron a 5000 células/cm² en matraces
recubiertos de gelatina en Medio de Crecimiento. No se observaron diferencias en el potencial de expansión celular
10 entre cultivo en o matraces sin recubrir o matraces recubiertos de gelatina. Sin embargo, las células aparecieron
fenotípicamente más pequeñas en matraces recubiertos de gelatina y me observaron fenotipos celulares más
grandes en matraces sin recubrir.

Expansión de Células de la Placenta Materna y Neonatales Clonales

15 Se estudió la expansión de una población de células clonales de células derivadas de la placenta derivada
de los aspectos neonatales y maternos. Las poblaciones derivadas de aspectos neonatales y maternos se diluyen
seriamente y después se siembran sobre placas recubiertas de gelatina en Medio de Crecimiento para la expansión
a 1 célula/pocillo en placas recubiertas de gelatina de 96 pocillos. De esta clonación inicial, se identifican clones
expansivos, se tripsinizan y se resiembran en placas recubiertas de gelatina de 12 pocillos en Medio de Crecimiento
20 y después posteriormente se pasan a matraces recubiertos de gelatina T25 a 5.000 células/cm² en Medio de
Crecimiento. Se realiza después la subclonación para asegurarse que se ha identificado una población clonal de
células. Para los experimentos de subclonación las células se tripsinizan y resiembran a 0,5 células/pocillo. Los
subclones que crecen bien son después expandidos en matraces T25 recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm².
Las células se pasan posteriormente a 5.000 células/cm² a matraces T75. El cariotipado confirma que los clones así
25 derivados son neonatales o maternos en naturaleza.

Expansión de células en condiciones de cultivo con oxígeno bajo

30 Las células se expandieron bien bajo condiciones de oxígeno reducido, sin embargo, el cultivo bajo
condiciones de oxígeno bajo no parece tener un efecto significativo en la expansión celular para las células
derivadas del postparto. Estos resultados son preliminares en el sentido de que cualquier conclusión final que se
haga en relación al efecto del oxígeno reducido debería incluir datos de experimentos en células en crecimiento en
oxígeno bajo del aislamiento inicial. Las condiciones atmosféricas estándar ya han demostrado su eficacia para
cultivar números suficientes de células, y el cultivo de oxígeno bajo es comparable con, pero no requerido para, el
35 crecimiento de células derivadas del postparto.

Discusión y Conclusiones

40 Las condiciones de expansión celular actuales para cultivar células derivadas del postparto aisladas a
densidades de alrededor de 5000 células/cm², en Medio de Crecimiento en 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
densidad más baja (por ejemplo 1000 células/cm²). LA expansión de células derivadas del postparto en condiciones
de oxígeno bajo también facilita la expansión celular, aunque no se ha observado todavía una mejora incremental en
45 el potencial de expansión celular cuando se utilizan estas condiciones para el crecimiento. Actualmente, se prefiere
el cultivo de células derivadas del postparto bajo condiciones atmosféricas estándar para generar grandes grupos de
células. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo se alteran, la expansión de células derivadas del postparto
puede igualmente alterarse. Esta estrategia puede usarse para potenciar la capacidad de proliferación y de
diferenciación de estas poblaciones de células.
50

Bajo las condiciones utilizadas, aunque el potencial de expansión de las células MSC y derivadas del tejido
adiposo es limitada, las células derivadas del postparto se expanden fácilmente a un gran número.

Recomendaciones:

55 Para optimizar la expansión y el aumento progresivo de los cultivos de células derivadas del postparto sería
útil trabajo adicional con nuevos métodos para la expansión celular, condiciones de los medios, condiciones de las
matrices extracelulares para la unión celular y la densidad celular. Sin embargo, con todos estos cambios se debería
re-determinar el potencial celular.
60

Referencias

- 65 1) Hayflick L. The longevity of cultured human cells. J Am Geriatr Soc. 1974 Enero;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 1: características de crecimiento para diferentes poblaciones de células cultivadas hasta la senectud

Tipo de Célula	Senectud	Duplicaciones de Población Totales	Rendimiento Celular Total
MSc	24 d	8	4.72 E7
Derivadas de tejido adiposo	57 d	24	4.5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2.82 E13
Umbilical	65 d	42	6.15 E17
Placenta	80 d	46	2.49 E19

Tabla 2: Características de crecimiento para poblaciones de células diferentes usando expansión de crecimiento de baja densidad del pase 10 hasta la senectud

Tipo de Célula	Senectud	Duplicaciones de Población Totales	Rendimiento Celular Total
Fibroblasto (P10)	80 d	43.68	2.59 E11
Umbilical (P10)	80 d	53.6	1.25 E14
Placenta (P10)	60 d	32.96	6.09 E12

EJEMPLO 3

Crecimiento de Células postparto en Medio que contiene D-Valina

Resumen

Los medios de cultivo que contienen D-valina en lugar de la isoforma L-valina según los informes inhiben selectivamente el crecimiento de células tipo fibroblasto en el cultivo. Para determinar si las células derivadas del postparto pueden crecer en medio que contiene D-valina, las células derivadas de la placenta y el cordón umbilical se cultivaron en medio que contenía D-valina durante 4 semanas. Las células no proliferaron y finalmente murieron. El medio que contiene D-valina no es adecuado para cultivar selectivamente células derivadas del postparto. La L-valina se requiere para la proliferación de células derivadas del postparto y la viabilidad a largo plazo.

Introducción

Se ha informado que el medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma L-valina normal puede usarse para inhibir selectivamente el crecimiento de células tipo fibroblasto en cultivo (Hongpaisan, 2000; Sordillo et al., 1988). No se conocía previamente si las células derivadas del postparto podían crecer en medio que contiene D-valina.

Métodos y Materiales

Se sembraron células derivadas de la placenta (P3), fibroblastos (P9) y células derivadas umbilicales (P5) a 5×10^3 células/cm² en matraces T75 recubiertos de gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas se eliminó el medio y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se reemplazó con un Medio de Crecimiento Modificado (DMEM con D-valina (pedio especial Gibco), 15% (v/v) de suero bovino fetal dializado (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) de betamercaptoetanol (Sigma), penicilina/estreptomina (Gibco)).

Resultados

Las células derivadas de la placenta, derivadas del cordón umbilical y fibroblastos sembradas en el medio

que contenía D-valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en Medio de Crecimiento que contenía suero dializado. Las células fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando de tamaño y cambiando de forma. Todas las células murieron y finalmente se separaron de la superficie del recipiente después de 4 semanas.

5 **Discusión y conclusión**

Las células derivadas del postparto requieren L-valina para el crecimiento celular y para mantener la viabilidad a largo plazo. La L-valina no debería por lo tanto ser retirada del Medio de Crecimiento para las células derivadas del postparto

10

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.

15

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.

20

EJEMPLO 4

Análisis del Cariotipo de PPDCs

Las líneas celulares usadas en terapia celular son preferiblemente homogéneas y están libres de cualquier tipo de células contaminante. Las células usadas en terapia celular deberían tener un número de cromosomas (46) y estructura normales. Para identificar las líneas celulares de la placenta y el cordón umbilical que son homogéneas y están libres de células de tejido de origen no postparto, se analizaron los cariotipos de las muestras de células.

25

Métodos y Materiales

Se cultivaron PPDCs de tejido postparto de un neonato masculino en Medio de Crecimiento. Se selecciono el tejido postparto de un neonato masculino (X, Y) para permitir la distinción entre células derivadas neonatales y células derivadas maternas (X,X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en Medio de Crecimiento en un recipiente T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron a un 80% de confluencia. Un recipiente T25 que contenía células se lleno hasta el cuello con Medio de Crecimiento. Las muestras se entregaron a un laboratorio de citogenética clínica por Courier (tiempo de transporte estimado de laboratorio a laboratorio es una hora). Se realizó análisis cromosómico por el Center for Human & Molecular Genetics en la New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase cuando se visualizan mejor los cromosomas. De veinte células contadas en la metafase, se analizaron cinco para el número de cariotipos homogéneo normal (dos). Una muestra celular se caracterizó como homogénea si se observaban los dos cariotipos. Una muestra celular se caracterizó como heterogénea si se observaban más de dos cariotipos. Se contaron y analizaron células de la metafase adicionales cuando se identificó un número de cariotipos heterogéneo (cuatro).

30

35

40

Resultados

Todas las muestras celulares enviadas para análisis cromosómico fueron interpretadas por el personal del laboratorio de citogenéticas como de apariencia normal. Tres de las dieciséis líneas celulares analizadas mostraron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) indicando la presencia de células derivadas de orígenes tanto neonatal como materno (Tabla 4-1). Las células derivadas del tejido Placenta-N se aislaron del aspecto neonatal de la placenta. En el pase cero, esta línea celular pareció homogénea XY. Sin embargo, en el pase nueve, la línea celular fue heterogénea (XX/XY), indicando una presencia previamente no detectada de células de origen materno.

45

50

55

60

65

Tabla 4-1. Resultados de cariotipos de PPDCs

Tejido	pase	Células de Metafase contadas	Células de Metafase analizadas	número de cariotipo	Cariotipo ISCN
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
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
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]
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
Clave: N- aspecto neonatal; V- región vellosa; M-aspecto materno; C- clon					

Resumen. El análisis cromosómico identificó PPDCs derivadas de la placenta y el cordón umbilical cuyos cariotipos parecen normales como se interpretaron por un laboratorio citogenético clínico. El análisis de cariotipos también identificó líneas celulares libres de células maternas, como se determina por cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 5

Evaluación de Marcadores de Superficie de Células Derivadas del Postparto por Citometría de Flujo

Resumen

La caracterización de la expresión de proteínas de la superficie celular, o "marcadores" por citometría de flujo de líneas celulares cultivadas etiquetadas con anticuerpos monoclonales fluorescentes permite la determinación de la identidad de una línea celular. Se caracterizaron células postparto derivadas de la placenta y del cordón umbilical por citometría de flujo para la expresión de los marcadores de superficie celular CD10, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, CD141, PDGFr-alfa, HLA-A,B,C y HLA-DR, DP,DQ. Tanto las células postparto derivadas de la placenta y del cordón umbilical son positivas para la expresión de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-A, B, C y negativas para la expresión de CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD 117, CD141 y HLADR, DP, DQ. este patrón de expresión fue consistente entre variables como donante de células, pase, recubrimiento de la superficie del recipiente de cultivo, y enzimas de digestión usados en el aislamiento. Este patrón de expresión también era consistente en células aisladas del aspecto materno, aspecto neonatal y región vellosa de la placenta.

Introducción

La caracterización de las proteínas de la superficie celular o "marcadores" por citometría de flujo puede usarse para determinar una identidad de la línea celular. La consistencia de la expresión puede determinarse a partir de donantes múltiples, y en células expuestas a diferentes condiciones de procesamiento y cultivo. Las líneas celulares postparto aisladas de la placenta y el cordón umbilical se caracterizaron (por citometría de flujo) proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

Materiales y Métodos

10 *Medios*

Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento

15 *Recipientes de Cultivo*

Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejido T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta la confluencia. Las superficies de crecimiento de los matraces se recubrieron con gelatina incubando un 2% (p/v) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

20 *Tinción de Anticuerpos*

Las células adherentes en los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, MO) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Se recogieron las células, se centrifugaron y resuspendieron en un 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se añadió el anticuerpo para el marcador de superficie celular de interés (ver a continuación) a cien microlitros de suspensión celular y la mezcla se incubó a oscuras durante 30 minutos a 4° C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no enlazado. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

30 *Análisis de Citometría de Flujo*

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

35 *Anticuerpos para Marcadores de superficie Celular*

Se usaron los siguientes anticuerpos para marcadores de superficie celular

Anticuerpo	Fabricante	Número de Catálogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD 13	BD Pharmingen	555394
CD31	BD Pharmingen	555446
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45RA	BD Pharmingen	555489
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
CD 117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
PDGFr-alfa	BD Pharmingen	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen	555553
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG-PE	Sigma	P-4685

Comparación de la Placenta y el Cordón Umbilical

Las células de la placenta se compararon con las del cordón umbilical en el pase 8

5 *Comparación pase a pase*

La placenta y el cordón umbilical se analizaron en los pases 8, 15 y 20.

10 *Comparación Donante a Donante*

Para comparar las diferencias entre donantes, se compararon entre sí células de la placenta de diferentes donantes, y se compararon entre sí cordones umbilicales de diferentes donantes.

15 *Comparación de Recubrimiento de Superficie*

Se comparó placenta cultivada en matraces con recubrimiento de gelatina con placenta cultivada en matraces sin recubrir. Se comparó cordón umbilical cultivado en matraces con recubrimiento de gelatina con cordón umbilical cultivado en matraces sin recubrir.

20 *Comparación de la Capa de la Placenta*

Se compararon células aisladas del aspecto materno del tejido de la placenta con células aisladas de la región vellosa del tejido de la placenta y células aisladas del aspecto fetal neonatal de la placenta.

25 **Resultados**

Comparación Placenta frente a Cordón umbilical

30 Las células derivadas de la placenta y del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C,, indicado por los valores aumentados de fluorescencia relativa al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicada por los valores de fluorescencia comparables al control de IgG. Se contabilizaron las variaciones den los valores de fluorescencia de las curvas positivas. La media (es decir CD13) e intervalo (es decir CD90) de las curvas positivas mostraron alguna variación, pero las curvas parecen normales, confirmando una población homogénea. Ambas curvas mostraron individualmente valores mayores que el control de IgG.

40 *Comparación Pase a Pase - Placenta*

45 Las células derivadas de la placenta en los pases 8, 15 y 20 analizadas por citometría de flujo fueron todas positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se refleja en el valor aumentado de fluorescencia relativo al control de IgG. Las células fueron todas negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ teniendo valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG. Se contabilizaron las variaciones en la detección de fluorescencia de las curvas positivas. Aunque que el intervalo (es decir CD10) de las curvas positivas varió, las curvas fueron normales, confirmando una población homogénea, y cada curva mostró individualmente valores mayores que los del control de IgG.

50 *Comparación Pase a Pase - Cordón Umbilical*

55 Las células umbilicales en los pases 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 fluorescencia aumentada en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ indicada por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG. Las variaciones en los valores de detección de fluorescencia de curvas positivas estaban todos dentro de los intervalos esperados. Aunque la media (es decir CD13) de las curvas positivas varió todas las curvas mostraron individualmente valores mayores que el control de IgG.

60 *Comparación Donante a Donante - Placenta*

65 Las 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 valores aumentados de fluorescencia relativos al control de IgG. Las células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ como se indica por el valor de fluorescencia consistente con el control de IgG. Las variaciones en la detección de fluorescencia de las curvas positivas están dentro de los intervalos esperados.

Aunque el intervalo (es decir CD44) de las curvas positivas varió, las curvas parecieron normales, confirmando una población homogénea, y ambas curvas mostraron individualmente valores mayores que el control de IgG.

5 *Comparación Donante a Donante - Cordón Umbilical*

10 Las células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes separados analizadas por citometría de flujo mostraron cada una expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejado en los valores aumentados de fluorescencia relativos al control de IgG. Estas células fueron todas negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG. Se contabilizaron las variaciones en los valores de detección de fluorescencia de las curvas positivas. Aunque la media (es decir CD10) de las curvas positivas varió, ambas curvas mostraron individualmente valores mayores que el control de IgG.

15 *El Efecto del Recubrimiento de Superficie con Gelatina en Células Derivadas de la Placenta*

20 Las células derivadas de la placenta expandidas o en matraces recubiertos de gelatina o sin recubrir analizadas por citometría de flujo expresaron todas CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejado por los valores aumentados de fluorescencia relativos al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ indicada por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG. Se anotaron las variaciones en los valores de detección de fluorescencia de las curvas positivas: aunque la media (es decir PDGFr-alfa) de las curvas positivas varió ambas curvas mostraron individualmente valores mayores que los del control de IgG.

25 *El Efecto del Recubrimiento de Superficie con Gelatina en Células Derivadas del Cordón Umbilical*

30 Las células umbilicales expandidas o en matraces recubiertos de gelatina y sin recubrir analizadas por citometría de flujo fueron todas positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con valores aumentados de fluorescencia relativos al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

35 *¿El procedimiento de digestión enzimático utilizado para la preparación y aislamiento de las células afecta al Perfil del Marcador de Superficie Celular?*

40 Las células de la placenta aisladas usando varios enzimas de digestión analizados por citometría de flujo expresaron todos CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se indica por los valores aumentados de fluorescencia relativos al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, como se indica por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG. Se anotaron las variaciones en la valor de fluorescencia medio CD13. Aunque los valores de fluorescencia media CD13 de las células tratadas con colagenasa eran menores que los de otras curvas de CD13, la curva de tratadas con colagenasa pareció normal, confirmando una población homogénea, y mostró individualmente valores mayores que el control de IgG.

45 *Comparación de Capas de la Placenta*

50 Las células aisladas de las capas materna, vellosa y neonatal de la placenta, respectivamente, analizadas por citometría de flujo mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se indica por el valor aumentado de la fluorescencia relativa al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, como se indica por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG. Se anotaron las variaciones en los valores de detección de fluorescencia de curvas positivas. Aunque la media e intervalo (es decir CD10, CD73) de las curvas positivas varió, ambas curvas parecieron normales, confirmando una población homogénea, y todas las curvas mostraron individualmente valores mayores que el control de IgG.

55 **Conclusiones**

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

EJEMPLO 6**Análisis de Células derivadas de Tejido Postparto usando Matrices de Oligonucleótidos**

Se usaron matrices de oligonucleótidos para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas del cordón umbilical y la placenta con fibroblastos, células madre mesenquimales humanas, y otra línea celular derivada de médula ósea humana. Este análisis proporcionó una caracterización de las células derivadas del postparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

Materiales y Métodos**Aislamiento y cultivo de Células**

Células derivadas de tejido postparto. Se obtuvieron cordones umbilicales y placentas humanos de la National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA) de partos a término completos normales con consentimiento del 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 en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37° C con un 5% de CO₂.

Fibroblastos. Se adquirieron fibroblastos dérmicos humanos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Número de Lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone) y penicilina/estreptomina (Invitrogen). Las células se cultivaron en plástico tratado con tejido estándar.

Células madre mesenquimales humanas (hMSC). Las hMSCs se adquirieron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Números de Lote 2F1655, 2F1656 and 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en Medio MSCGM (Cambrex). Las células se cultivaron en plástico cultivado de tejido estándar a 37° C con un 5% de CO₂.

Células de Médula Ósea de la Cresta Iliaca Humana (ICBM). La médula ósea de la cresta iliaca humana se recibió de NDRI con consentimiento del paciente. La médula se procesó de acuerdo con el método esbozado por Ho, et al. (WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (NH₄Cl 155 milimolar, KHCO₃ 10 milimolar, y EDTA 0,1 milimolar, pH 7.2) a una proporción de 1 parte de médula ósea con 20 partes de tampón de lisis. La suspensión celular se agitó en vórtex, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en Medio Esencial Mínimo-alfa (Invitrogen) suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal y glutamina 4 milimolar. Las células se centrifugaron de nuevo y el pellet celular se resuspendió en medio nuevo. Las células mononucleares viables se contaron usando exclusión de azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico de tejido cultivado a 5 x 10⁴ células/cm². Las células se incubaron a 37° C con un 5% de CO₂ a O₂ atmosférico estándar o a 5 % de O₂. Las células se cultivaron durante 5 días sin cambio de medio. El medio y las células no adherentes se retiraron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en el cultivo.

Aislamiento de ARN, y Análisis GENECHIP. Los cultivos que crecían activamente de células se retiraron de los matraces con un rascador de células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS nuevo y se centrifugaron de nuevo. Se retiró el sobrenadante y el pellet celular fue inmediatamente congelado y almacenado a -80° C. El ARNm celular se extrajo y transcribió en ADNc. El ADNc fue después transcrito en ARNc y marcado con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con matrices de oligonucleótidos Affymetrix GENECHIP HG-U133A (Affymetrix, Santa Clara CA). Las hibridaciones y recogida de datos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los análisis de datos se realizaron usando el programa informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Tusher, V.G. et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5116-5121). Las licencias para el software de análisis están disponibles de la Oficina de Licencia de Tecnología, Universidad de Stanford, y hay más información disponible en la Red Mundial en la página web del Profesor Tibshirani en el Departamento de Estadística, Universidad de Stanford (www-stat.stanford.edu/~tibshirani/).

Resultados

Se analizaron en este estudio catorce poblaciones diferentes de células. Las células junto con la información del pase, sustrato del cultivo y medio de cultivo se enumeran en la Tabla 6-1.

Tabla 6-1. Células analizadas por el estudio de micromatrices. Las líneas celulares 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	Pase	Sustrato	Medio
5	Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, β ME
	Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, β ME
	Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, β ME
	Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, β ME
10	Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, β ME
	Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, β ME
	ICBM (070203) (5% O ₂)	3	Plástico	MEM 10% FBS
	ICBM (062703) (std O ₂)	5	Plástico	MEM 10% FBS
15	ICBM (062703)(5% O ₂)	5	Plástico	MEM 10% FBS
	hMSC (Lot 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
	hMSC (Lot 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
	hMSC (Lot 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
20	hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS
	hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS

25 Los datos se evaluaron por Análisis de Componentes Principales. El análisis reveló 290 genes que se expresaron en cantidades relativas diferentes en las células probadas. Este análisis proporcionó comparaciones relativas entre las poblaciones.

30 La Tabla 6-2 muestra las distancias Euclidianas que se calcularon para la comparación de las parejas de células. Las distancias Euclidianas se basaron en la comparación de las células en base a los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La distancia Euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

35 **Tabla 6-2.** Distancias Euclidianas para Pares de Células. La distancia Euclidiana se calculó para los tipos de células usando los 290 genes que se expresaron de manera diferente entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia Euclidiana

	<i>Pareja de Células</i>	Distancia Euclidiana
40	ICBM-hMSC	24.71
	Placenta-umbilical	25.52
	ICBM-Fibroblasto	36.44
	ICBM-placenta	37.09
45	Fibroblasto-MSC	39.63
	ICBM-Umbilical	40.15
	Fibroblasto-Umbilical	41.59
	MSC-Placenta	42.84
50	MSC-Umbilical	46.86
	ICBM-placenta	48.41

55 Las Tablas 6-3, 6-4 y 6-5 muestran la expresión de genes aumentados en células derivadas de la placenta (Tabla 6-3), aumentadas en células derivadas del cordón umbilical (Tabla 6-4) y reducidas en células derivadas del cordón umbilical y la placenta (Tabla 6-5).

60

65

Tabla 6-3. Genes que han sido específicamente aumentados en expresión en células derivadas de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas

Genes Aumentados en Células Derivadas de la Placenta		
ID del Conjunto de Sondas	Nombre del Gen	Número de Entrada del NCBI
209732_at	lectina de tipo C (dependiente del calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro de la superfamilia 2 (inducida por activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor de Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina)	AF035776
214993_at	Homo sapiens, clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parciales	AF070642
202178_at	proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	reguladas hacia abajo en el cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	ARNm Homo sapiens; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 6-4. Genes que han aumentado específicamente en expresión en células derivadas del cordón umbilical en comparación con las otras líneas celulares ensayadas

Genes Aumentados en Células Derivadas del Cordón Umbilical		
ID del Conjunto de Sondas	Nombre del Gen	Número de Entrada del NCBI
202859_x_at	Interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	Interleucina 8	AF043337
210222_s_at	reticulon 1	BC000314
204470_at	ligando 1 de quimioquinas (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanomas)	NM_001511
206336_at	ligando 6 de quimioquinas (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de	NM_002993
207850_at	ligando 3 de quimioquinas motivo (C-X C-)	NM_002090
203485_at	reticulon 1	NM_021136
202644_s_at	factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3	NM_006290

Tabla 6-5. Gens que disminuyeron en expresión en células del cordón umbilical y la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas

Genes Disminuidos en Células Derivadas del Cordón Umbilical y la Placenta		
ID del Conjunto de Sondas	Nombre del Gen	Número de Entrada del NCBI
210135_s_at	homeobox 2 de estatura corta	AF022654.1
205824_at	proteína 2 de shock cardiaco de 27kDA	NM_001541.1
209687_at	ligando 12 de quimioquinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales)	U19495.1
203666_at	ligando 12 de quimioquinas (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales)	NM_000609.1
212670_at	elastina (estenosis aórtica supraavicular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	<i>ARnm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022)</i>	N91149
206201_s_at	homeobox 2 de mesénquima (homeobox específico de la detención del crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	homólogo 1 del homeobox de sine oculis (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador asociado enredado de la morfogénesis 2	BF513244
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	tetranectina (proteína de enlace del plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	homología src tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	gen de translocación de células B 1, anti-proliferativo	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción enanismo-relacionado 3	AA541630
219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
202465_at	potenciador de C-endopeptidasa de pro-colágeno	NM_002593.2
203706_s_at	homólogo rizado 7 (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
212736_at	gen hipotético BC008967	BE299456
214587_at	colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	tenascina C (hexabrachion)	NM_002160.1
210239_at	proteína homeobox iroquois 5	U90304.1
203903_s_at	hefaestina	NM_014799.1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	glicoproteína 2 de vesículas sinápticas	NM_014849.1
213909_at	<i>ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744</i>	AU147799
206315_at	factor 1 tipo receptor de citoquinas	NM_004750.1

(continuación)

Genes Disminuidos en Células Derivadas del Cordón Umbilical y la Placenta		
ID del Conjunto de Sondas	Nombre del Gen	Número de Entrada del NCBI
5 204401_at	canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N,	NM_002250.1
216331_at	integrina, alfa 7	AK022548.1
10 209663_s_at	integrina, alfa 7	AF072132.1
213125_at	proteína DKFZP586L151	AW007573
202133_at	co-activador transcripcional con motivo de enlace con PDZ (TAZ)	AA081084
15 206511_s_at	homólogo 2 de homeobox de sine oculis (Drosophila)	NM_016932.1
213435_at	proteína KIAA1034	AB028957.1
206115_at	respuesta de crecimiento temprana 3	NM_004430.1
20 213707_s_at	homeobox menos distal 5	NM_005221.3
218181_s_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
25 209160_at	familia aldo-ceto reductasa 1; miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II)	AB018580.1
213905_x_at	biglicano	AA845258
201261_x_at	biglicano	BC002416.1
30 202132_at	co-activador transcripcional con motivo de enlace con PDZ (TAZ)	AA081084
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
213791_at	proencefalina	NM_006211.1
35 205422_s_at	integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF)	NM_004791.1
214927_at	inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens: clon de ADNc EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
40 206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	proteína KIAA0367	AB002365.1
45 219789_at	receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético)	AI628360
219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	ARNm de Homo Sapiens; ADNc DKFZp564B222 del clon DKFZp564B222)	AW025579
50 204929_s_at	proteína de la membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina)	NM_006634.1
201843_s_at	proteína de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF 1	NM_004105.2
55 221478_at	tipo proteína 3 de interacción de 19kDa BCL2/adenovirus E1B	AL132665.1
201792_at	proteína 1 de enlace con AE	NM_001129.2
60 204570_at	polipéptido VIIa de la subunidad de citocromo c oxidasa 1 (músculo)	NM_001864.1
201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
65 202718_at	proteína de enlace con el factor de crecimiento tipo insulina 1, 36kDa	NM_000597.1

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

5 **Tabla 6-6.** Genes que han aumentado en expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas

Genes aumentados en fibroblastos	
	fosfatasa de especificidad dual 2
10	proteína KIAA0527
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
15	anquirina 3, nodo de Ranvier (anquirina G)
	inhibina, beta A (activina A, polipéptido alfa de activina AB)
	pirofosfatasa/fosfodiesterasa de ectonucleotidos 4 (función putativa)
20	proteína KIAA1053
	proteína asociada a microtúbulos 1A
	proteína con dedos de zinc 41
25	proteína HSPC019 protein
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23564 fis, clon LNG10773
	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
30	Proteína LIM (similar al enigma de enlace C de proteína quinasa de rata)
	inhibidor del potenciador de genes de polipéptidos ligeros kappa en células B; quinasa proteína asociada al complejo
35	proteína hipotética FLJ22004
	secuencia de ARNm Humana (clon CTG-A4)
	ESTs, Moderadamente similares al factor tipo receptor de citoquinas 2; precursor CRL2 de receptores de citoquinas [<i>Homo sapiens</i>]
40	factor de crecimiento transformante, beta 2
	proteína hipotética MGC29643
	antígeno identificado por anticuerpo monoclonal MRC OX-2
45	proteína de retinopatía ligada al cromosoma X putativa

50 **Tabla 6-7.** Genes que aumentaron en expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con otras líneas celulares ensayadas

Genes Aumentados en Células ICBM	
	<ul style="list-style-type: none"> • proteína de repetición de anquirina cardiaca • región ORF de MHC clase I • integrina, alfa 10
55	<ul style="list-style-type: none"> • proteína hipotética FLJ22362 • UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3) • proteína inducida por interferones 44 • SRY región determinante del sexo Y)-caja 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)
60	<ul style="list-style-type: none"> • proteína asociada a la queratina 1-1 • tipo hippocalcina 1 • dentado 1 (síndrome de Alagille) • proteoglicano 1, gránulo secretor

65

Tabla 6-8. Genes que aumentaron en expresión en las células MSC en comparación con otras líneas celulares ensayadas

Genes Aumentados en Células MSC	
5	<ul style="list-style-type: none"> • interleuquina 26 • maltasa-glucoamilasa (alfa-glicosidasa) • subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2 • v-fos homólogo de FBJ osteosarcoma murino viral oncogén
10	<ul style="list-style-type: none"> • proteína hipotética DC42 • subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2 • homólogo de FBJ murino osteosarcoma oncogén viral B • proteína de la vía de señalización inducible de WNT1 1 • secuencia transformadora derivada de la línea celular MCF.2
15	<ul style="list-style-type: none"> • canal de potasio, subfamilia K, miembro 15 • homeoproteína de clase emparejada con cartílago 1 • ADNc de Homo sapiens FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206 • ADNc de Homo sapiens FLJ34668 fis, clon LIVER2000775 • proto-oncogen jun B
20	<ul style="list-style-type: none"> • CLL de células B/linfoma 6 (proteína de dedo de cinc 51) • proteína de dedo de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

Resumen. El presente estudio se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células postparto derivadas del cordón umbilical y la placenta. Este análisis incluía células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y tres placentas diferentes. El estudio también incluía dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesenquimales y tres líneas de células de médula ósea de la cresta iliaca. El ARNm que se expresó por estas células se analizó en una matriz de oligonucleótidos GENECHIP que contenía sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

El análisis reveló que había presentes transcripciones para 290 genes en cantidades diferentes en estos cinco tipos celulares diferentes. Estos genes incluían diez genes que aumentaron específicamente en las células derivadas de la placenta y siete genes que aumentaron específicamente en las células derivadas del cordón umbilical. Se encontraron cincuenta y cuatro genes que tenían específicamente niveles de expresión menores en la placenta y el cordón umbilical.

La expresión de los genes seleccionados se ha confirmado por PCR (ver Ejemplo 7). Estos resultados demuestran que las células derivadas del postparto tienen un perfil de expresión génica distinto, por ejemplo, en comparación con las células derivadas de médula ósea y los fibroblastos.

EJEMPLO 7

Marcadores Celulares en Células Derivadas del Postparto

Resumen

Para examinar las células derivadas de la placenta humana y el cordón umbilical humano, se compararon sus perfiles de expresión génica con los de las células derivadas de otras fuentes usando el Affymetrix GENECHIP. A través de esta técnica se identificaron 6 genes que se expresaron altamente en las células postparto: receptor de LDL oxidada 1, interleucina-8, renina, reticulon, ligando del receptor de quimioquinas 3 (CXC ligando 3) y proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Cuatro de estos genes (receptor de LDL oxidada 1, renina, reticulon e IL-8) se regularon diferencialmente al nivel de ARNm en las células postparto. También se descubrió que el IL-8 se reguló diferencialmente al nivel de proteína.

También investigamos la expresión de la vimentina y la actina del músculo liso alfa, que se ha asociado anteriormente con las células derivadas del estroma. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana tiñeron positivo para tanto la actina del músculo liso alfa como la vimentina. Este patrón también se observó en células en el pase 11. El resultado sugiere que la expresión de la vimentina y la actina del músculo liso alfa se conserva con el pase al Medio de Crecimiento.

Las células derivadas del cordón umbilical humano en el paso 0 fueron sondadas para la expresión de las proteínas vimentina y actina del músculo liso alfa y fueron positivas para la actina del músculo liso alfa y la vimentina con la conservación del patrón de tinción potencial a través del pase 11.

Los datos de ARNm verifican al menos parcialmente los datos obtenidos de los experimentos con micromatrices.

Introducción

Se evaluaron las similitudes y diferencias en las células derivadas de la placenta humana y el cordón umbilical humano comparando su perfiles de expresión génica con los de células derivadas de otras fuentes (usando un Affymetrix GENECHIP). Se identificaron seis genes "firma": receptor de LDL oxidada 1, interleucina-8, renina, reticulon, ligando del receptor de quimioquinas 3 (CXC ligando 3) y proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes "firma" se expresaron a niveles relativamente altos en células derivadas del postparto.

Los presentes estudios se realizaron para verificar los datos de las micromatrices y determinar las correlaciones entre la expresión génica y de proteínas, así como para establecer una serie de ensayos fiables para la detección de identificadores únicos para las células derivadas de la placenta y el cordón umbilical.

Métodos y Materiales

15 Células

Las células derivadas de la placenta (tres aislados, incluyendo 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) cultivados en Medio de Crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Se cultivaron Células Madre Mesenquimales (MSCs) en el kit Bullet de Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

Para los experimentos de IL-8, las células se descongelaron de nitrógeno líquido y se colocaron en placas en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm², se cultivaron durante 48 horas en Medio de Crecimiento y después se cultivaron durante 8 horas adicionales en mililitros de medio de privación de suero [DMEM-glucosa baja (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina/estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA) y un 0,1% (p/v) 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 los desechos celulares. Los sobrenadantes se congelaron después a -80° C para análisis ELISA.

30 *Cultivo celular para ensayo ELISA*

Se cultivaron células postparto derivadas de la placenta y el cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano en Medio de Crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células se congelaron al pase 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y transfirieron a tubos de centrifuga de 15 ml. Después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 4 ml de medio de cultivo y se contaron. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² que contenía 15 ml de Medio de Crecimiento a 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambio a un medio de privación de suero durante 8 horas. Se recogió el medio de privación de suero al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos (y se almacenó 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 que las células se hubieron desprendido del matraz se neutralizó la actividad de la tripsina con 8 mililitros de Medio de Crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se retiro el sobrenadante 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.

50 *Ensayo ELISA*

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

55 *Aislamiento de ARN total*

Se extrajo ARN de células derivadas del postparto confluentes y fibroblastos o por expresión de IL-8 de células tratadas como se ha descrito con anterioridad. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). El ARN se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a tratamiento de DNasa (2,7 U/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80° C.

65 *Transcripción inversa*

También se extrajo ARN de la placenta y el cordón umbilical humanos. El tejido (30 mg) se suspendió en 700 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogenizaron mecánicamente y la extracción del ARN procedió de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ARN se extrajo con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80° C. El ARN se sometió a transcripción inversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25° C durante 10 minutos, 37° C durante 60 minutos y 95° C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20° C.

Los genes identificados por micromatriz de ADNc según lo regulado únicamente en las células postparto (genes firma - incluyendo receptor de LDL oxidada, interleucina-8, renina y reticulon), se investigaron adicionalmente usando PCR en tiempo real y convencional.

PCR en tiempo real

Se realizó PCR en muestras de ADNc usando los productos de expresión de genes Assays-on-Demand™: se mezclaron receptor de LDL oxidada (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); ligando CXC 3 (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) con ADNc y mezcla maestra de PCR Universal TaqMan de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencias 7000 con software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50° C durante 2 minutos y 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos y 60° C durante 1 minuto. Los datos del PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín del Usuario #2 de Applied Biosystems para el Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7700).

PCR convencional

El PCR convencional se realizó usando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Massachusetts, USA) para confirmar los resultados del PCR en tiempo real. EL PCR se realizó usando 2 microlitros de solución de ADNC, 1 x tampón de reacción de PCR mezcla universal 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 CXC 3, y reticulon (94° C durante 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)M para receptor de LDL oxidada 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 7-1. La concentración de cebadores en la reacción de PCR final fue de 1 µM excepto para el GAPDH que fue de 0,5 µM. Los cebadores de GAPDH fueron los mismos que para el PCR en tiempo real, excepto que la sonda TaqMan del fabricante no se añadió a la reacción de PCR final. Las muestras se ejecutaron en un 2% (p/v) de gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etilo (Sigma, St. Louis, MO).. Las imágenes se tomaron usando una película 667 Universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara Polaroid™ de longitud focal (VWR International, South Plainfield, NJ).

Tabla 7-1: Cebadores usados

Nombre del Cebador	Cebadores
Receptor de LDL oxidado	S: 5'- GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3 (SEQ ID NO:1) A: 5'-AGAATGGAAAACCTGGAATAGG -3' (SEQ ID NO:2)
Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC -3' (SEQ ID NO:3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG -3' (SEQ ID NO:4)
Reticulon	S: 5'- TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO:5) A: 5'- AGTAAACATTGAAACACAGCC-3' (SEQ ID NO:6)
Interleucina-8	S: 5'- TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO:7) A: 5'-CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC- 3' (SEQ ID NO:8)
Ligando 3 de Quimioquinas (CXC)	S: 5'- CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:9) A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC -3' (SEQ ID NO:10)

Inmunofluorescencia

Las células postparto se fijaron con un 4% (p/v) de formaldehído 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 la placenta en el pase 0 (P0) (directamente después del aislamiento= y el pase 11 (P11) (dos aislados de células derivadas de la placenta, dos aislados derivadas del cordón umbilical) y fibroblastos (P11). Se realizó inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1:500, Sigma, St. Louis,

MO), desmina (1:150; Sigma - desarrollado contra conejo, o 1: 300; Chemicon, Temecula, CA - desarrollado contra ratón.), actina de músculo liso alfa (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma), y CD34 (CD34 humano Clase III; 1:100; DakoCytomation, Carpinteria, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores en el pase 11 de las células postparto: GROalfa anti-humano - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2anti-humano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor de LDL oxidada anti-humano 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y NOGA-A anti-humano (1:100; Santa Cruz, Biotech).

Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución bloqueante de proteínas que contenía PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y un 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Cuando se localizó el epítipo de interés en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1) se omitió el Triton X-100 en todos los pasos del procedimiento para evitar la pérdida de epítipos. Además, en situaciones en las que el anticuerpo primario se desarrolló contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se usó un 3% (v/v) de suero de burro en lugar del suero de cabra todo el tiempo. Se aplicaron después anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, a los cultivos durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. Se retiraron las soluciones de anticuerpos primarios y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpos secundarios (1 hora a temperatura ambiente) que contenía bloqueante junto con IgG-TEXas Red anti ratón de cabra (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG-Alexa 488 anti conejo de cabra (1:250; Molecular Probes) o IgG-FITC anti cabra de burro (1:150, Santa Cruz Biotech). Los cultivos fueron después lavados y se aplicaron 10 µM de DAPI (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando un filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó señal de fluorescencia por encima de la tinción de control donde se siguió el procedimiento completo descrito anteriormente con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario (no 1º control). Las imágenes representativas se capturaron usando una videocámara a color digital e software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras de triple tinción, cada imagen se tomó usando sólo un filtro de emisión cada vez. Se montaron después montajes por capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA)

Preparación de células para análisis FACS

Las células adherentes en el matraz se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se despegaron con Tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, centrifugaron y re-suspendieron con 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se administraron cien microlitros de alícuotas a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadió el anticuerpo a las alícuotas según las especificaciones del fabricante y las células se incubaron a oscuras durante 30 minutos a 4º C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpos. Las células que requerían un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de 3% de FBS. El anticuerpo secundario se añadió según las especificaciones del fabricante y las células se incubaron a oscuras durante 30 minutos a 4º 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 de LDL oxidada 1 (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555.042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 kappa de ratón (P-4685 y M-5284, Sigma), IgG de Burro contra cabra (SC-3743; Santa Cruz, Biotech.).

Análisis FACS

El análisis de citometría de flujo se realizó usando con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

Resultados

Los resultados de PCR en tiempo real para genes "firma" seleccionados realizado en ADNc de células derivadas de placentas humanas, fibroblastos adultos y neonatales y Células Madre Mesenquimales (MSCs) indican que tanto el receptor de LDL oxidada como la renina se expresaron a niveles más altos en las células derivadas del placenta en comparación con otras células. Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el método $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. Los niveles de expresión de reticulon y receptor de LDL oxidada fueron más altos en células derivadas del cordón umbilical en comparación con otras células. No se encontró diferencia significativa en los nivel de expresión del ligando CXC 3 y GCP-2 entre células postparto y controles. Los resultados del 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 la expresión del ligando CXC 3 entre las células postparto y los controles usando los cebadores del ligando CXC 3 de PCR enumerados en la Tabla 7-1.

La expresión de la citoquina, IL-8 en células postparto se eleva en tanto las células derivadas del postparto cultivadas en Medio de Crecimiento como el privadas de suero . Todos los datos del PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y por productos de la secuenciación de PCR.

Quando se examinaron los sobrenadantes de células cultivadas en medio libre de suero para la presencia de IL-8, las cantidades más altas se detectaron en medios derivados de células umbilicales y algunos aislados de células de la placenta (Tabla 7-2). No se detectó IL-8 en medio derivado de fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 7-2: expresión de proteína IL-8 medida por ELISA

Tipo de Célula	IL-8
hFibro	ND
Aislado de Placenta 1	ND
Aislado de UMBC 1	2058.42±144.67
Aislado de Placenta 2	ND
Aislado de UMBC 2	2368.86±22.73
Aislado de Placenta 3 (O ₂ normal)	17.27±8.63
Aislado de Placenta 3 (O ₂ bajo W/O BME)	264.92±9.88
Resultados del ensayo ELISA para interleucina-8 (IL-8) realizado en células derivadas de la placenta y el cordón umbilical así como fibroblastos de piel humana. Los valores como se presentan aquí son pg/ millones de células, n=2, sem.	
ND: No Detectado	

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

También se probaron las células de la placenta para la expresión de las proteínas seleccionadas por análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana se fijaron con un 4% de formaldehido y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: Factor de von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de músculo liso alfa, y vimentina. Las células tiñeron positivas tanto para actina de músculo liso alfa como para vimentina. Este patrón se conservó hasta el pase 11. Sólo unas pocas células (<5%) en el pase 0 tiñeron positivo para citoqueratina 18.

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

Las células derivadas de la placenta y derivadas del cordón umbilical en el pase 11 también se investigaron por inmunocitoquímica para la expresión de GROalfa, GCP-2 receptor de LDL oxidada 1 y reticulon. Los resultados completos de ese experimento están todavía pendientes.

Discusión y Conclusión

Hasta el momento se ha establecido concordancia entre los niveles de expresión génica medidas por micromatriz y PCT (tanto en tiempo real como convencional) para cuatro genes: receptor de LDL oxidada 1, renina, reticulon e IL-8. LA expresión de estos genes se reguló diferencialmente a nivel de ARNm en células postparto, como el IL-8 también se reguló diferencialmente a nivel de proteína. La presencia del receptor de LDL oxidada no se detectó a nivel de proteína por análisis FACS en células derivadas de la placenta. La expresión diferencial del GCP-2 y el ligando CXC 3 no se confirmo a nivel de ARN,. sin embargo el GCP-2 se detectó a nivel de proteína por análisis FACS en las células derivadas de la placenta. Las diferencias entre estos datos y los obtenidos del experimento de micromatrices pueden deberse a diferencias en la sensibilidad de las metodologías.

Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana tiñeron

positivo para tanto la actina del músculo liso alfa como la vimentina. Este patrón también se observó en células en el pase 11. Estos resultados sugieren que la expresión de vimentina y actina del músculo liso alfa puede conservarse en células con pases, al menos en el Medio de Crecimiento usado en la presente.

5 Las células derivadas del cordón umbilical humano en el paso 0 se sondaron para la expresión de actina del músculo liso alfa y vimentina, y fueron positivas para ambas. El patrón de tinción se conservó hasta el pase 11.

10 En conclusión, los datos del ARNm completos verifican al menos parcialmente los datos obtenidos de los experimentos con micromatrices. A medida que se completen experimentos de proteínas adicionales, se entenderán más ampliamente las relaciones entre el ARNm y la expresión de proteína.

EJEMPLO 8

Caracterización inmunohistoquímica del Fenotipo de PPDC

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

Materiales y Métodos

20 **Preparación del Tejido.** Se recolectó tejido de la placenta y el cordón umbilical humanos y se fijó por inmersión en 4% (p/v) paraformaldehído durante la noche a 4° C. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (ver Tabla 8-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, desarrollada contra conejo; Sigma; o 1:300, desarrollada contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), actina de músculo liso alfa (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; DAKO-Cytomation, Carpinteria, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores: GROalfa anti-humano - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor de LDL oxidada anti-humano 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y NOGO-A anti-humana (1:100; Santa Cruz Biotech). Los especímenes fijados se recortaron con un escalpelo y se colocaron dentro de compuesto de inclusión OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. Los bloques congelados se seccionaron (10 µm de grosor) usando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de cristal para la tinción.

35 **Tabla 8-1: Resumen de Anticuerpos Primarios Usados**

Anticuerpo	Concentración	Vendedor
Vimentina	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Desmina (rb)	1:150	Sigma
Desmina (m)	1:300	Chemicon, Temecula, CA
actina del músculo liso alfa (SMA)	1:400	Sigma
Citoqueratina 18 (CK18)	1:400	Sigma
factor de von Willebrandr (vWF)	1:200	Sigma
45 CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA
GROalfa - PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
50 Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

55 **Inmunohistoquímica.** La inmunohistoquímica se realizó de manera similar a estudios previos (por ejemplo, Messina, et al. (2003) Exper. Neurol. 184: 816-829). Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución bloqueante de proteínas 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 los antígenos intracelulares. En situaciones donde el epítomo de interés estaría localizado en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el Triton se omitió en todos los pasos del procedimiento para evitar la pérdida de epítomos. Además, in situaciones donde el anticuerpo primario se desarrolló contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-a), se usó 3% (v/v) de suero de burro en lugar del suero de cabra a lo largo del procedimiento. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución bloqueante, se aplicaron después a las secciones durante un periodo de 4 horas a temperatura ambiente. Se retiraron las soluciones de anticuerpo primario, y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloqueante junto con IgG-Texas Red anti-ratón de cabra (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG-Alexa 488 anti conejo de cabra (1:250; Molecular Probes) o IpG-FITC anti-cabra de burro (1:150; Santa Cruz

Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicaron 10 µM de DAPI (Molecular Probes durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representó por la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Las imágenes representativas se capturaron usando una videocámara a color digital y software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se tomó usando sólo un filtro de emisión a la vez. Se montaron después montajes por capas usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

Caracterización del Cordón Umbilical. Los marcadores de vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 se expresaron en un subconjunto de las células encontradas dentro del cordón umbilical. En particular, la expresión de vWF y CD34 se restringió a vasos sanguíneos contenidos dentro del cordón. Las células CD34+ estaban en la capa más interna (lado del lumen). La expresión de la vimentina se encontró por toda la matriz y vasos sanguíneos del cordón. La SMA se limitó a la matriz y las paredes externas de la arteria y vena, pero no contenida con los vasos mismos. La CK18 y la desmina se observaron dentro de los vasos solamente, la desmina estando restringida a las capas media y exterior.

Caracterización de la Placenta. La vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 se observaron todas dentro de la placenta y eran regionalmente específicas.

Expresión de Tejido de GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1, y NOGO-A. Ninguno de estos marcadores se observó dentro del tejido del cordón umbilical o la placenta.

Resumen. La vimentina, desmina, actina del músculo liso alfa, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD34 se expresan en células dentro de la placenta y cordón umbilical humanos.

Ejemplo 9

Secreción de Factores Tróficos por Células Postparto Derivadas de la Placenta y el Cordón Umbilical.

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de las PPDCs derivadas de la placenta y el cordón umbilical. Se seleccionaron factores que tenían actividad angiogénica (es decir, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) Rosen et al. (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Salcedo et al. (2000) Blood 96:34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li et al. (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 et al. (2004) Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), metaloproteínasa de la matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-bb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de enlace de heparina (HB-EGF), factor derivado del estroma 1 alfa (SDF-1 alfa), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng et al. (2003) Dev. Biol. 258 ; 319-33), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2), o actividad de quimioquinas (proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), quimioatrayente-1 de monocitos (MCP-1), Rantes (células T normales, reguladas en la activación, expresadas y secretadas), I309, quimioquinas reguladas por activación y timo (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

Métodos y Materiales

Cultivo celular. las PPDCs derivadas de la placenta y el cordón umbilical así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano se cultivaron en Medio de Crecimiento o matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células se criopreservaron en el paso 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de la descongelación de las células, se añadió Medio de Crecimiento a las células seguido por la transferencia a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y la centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 4 mililitros de Medio de Crecimiento, y se contaron las células. Las células se sembraron a 375.000 células/matraz de 75 cm² que contenía 15 mililitros de Medio de Crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio libre de suero (DMEM-glucosa baja (Gibco), 0,1% (p/v) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina/estreptomina (Gibco)) durante 8 horas. Se recogió el medio libre de suero acondicionado el final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenaron a -20° C. Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se despegaron usando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de tripsina se inhibió por la adición de 8 mililitros de Medio de Crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de Medio de Crecimiento. El número de células

se estimó usando un hemocitómetro.

Ensayo ELISA. Las células se cultivaron a 37° C en 5% de dióxido de carbono y oxígeno atmosférico. Las PPDCs 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-1alfa, GCP-2, IL-8 y TGF-beta2 producidas por cada muestra celular se midió por ensayo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son pg/ml/millón de células (n=2, sem).

Ensayo ELISA Multiplexado SearchLight. Las quimiocinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, I309, TARC, Eotaxin, MDC, IL8), BDNF y los factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF) se midieron usando Matrices de Proteoma SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Las Matrices de Proteoma son ELISAs en sándwich multiplexadas para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Las matrices se producen punteando un patrón 2 x2, 3 x 3 ó 4 x 4 de cuatro a 16 anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento de sándwich ELISA, la placa completa se procesa por imágenes para capturar la señal de quimioluminiscencia generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. La cantidad de señal generada en cada punto es proporcional a la cantidad de proteína objetivo en el estándar o la muestra.

Resultados

Ensayo ELISA. Se secretaron MCP-1 e IL-6 por las PPDCs derivadas de la placenta y el cordón umbilical y los fibroblastos dérmicos (Tabla 9-1). El SDF-1alfa se secretó por PPDCs derivados de la placenta cultivados en 5% de O₂ y por fibroblastos. El GPC-2 e IL-8 se secretaron por PPDCs derivadas del cordón umbilical y por PPDCs derivadas de la placenta cultivadas en presencia de BME o 5% de O₂. El GPC-2 también se secretó en fibroblastos humanos. El TGF-beta2 no fue detectable por ensayo ELISA.

Tabla 9-1. Resultados del ensayo ELISA

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1α	GCP-2	IL-8	TGF-β2
Fibroblasto	17±1	61±3	2962	1961	21±1	ND	ND
Placenta (042303)	60±3	41±2	ND	ND	ND	ND	ND
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
Placenta (101503) BME	21±10	67±3	ND	ND	44±9	1769	ND
Placenta (101503) 5% O ₂ , W/O BME	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND
Clave: ND: No Detectado							

Ensayo ELISA Multiplexado SearchLight. Se secretaron TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC e IL-8 de PPDCs derivadas del cordón umbilical (Tablas 9-2 y 9-3). TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC, Eotaxin e IL-8 se secretaron de PPDCs derivadas de la Placenta (Tablas 9-2 y 9-3). No se detectaron Ang2, VEGF o PDGF-bb.

Tabla 9-2. Resultados del Ensayo ELISA Multiplexado SearchLight

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
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
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
Clave: hFB (fibroblastos humanos), P1 (PPDC derivada de la placenta (042303)), U1 (PPDC derivada del cordón umbilical (022803)), P3 (PPDC derivada de la placenta (071003)), U3 (PPDC derivada dl cordón umbilical (071003)). ND: NO detectado										

Tabla 9-3. Resultados del Ensayo ELISA Multiplexado SearchLight

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

Resumen. Células derivadas del cordón umbilical y la placenta secretaron una variedad de factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, como el HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, juegan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, como el BDNF e IL-6, tienen papeles importantes en la regeneración neural.

EJEMPLO 10

Inmunología In vitro

Las líneas celulares derivadas del postparto se evaluaron in vitro para sus características inmunológicas en un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica, si había alguna, estas células se obtendrían tras el trasplante in vivo. Las líneas celulares postparto 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 que presentan antígenos (APC) y se requieren para la estimulación directa de células CD4⁺T vírgenes (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª 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, 5ª Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171), CD178 (Coumans, et.al., (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196), y PD-L2 (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171; Brown, et. al. (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266). La expresión de estas proteínas por células residentes en los tejidos de la placenta se piensa que media el estado inmuno-privilegiado de tejidos de la placenta en el útero. Para predecir la extensión a la que las líneas celulares derivadas del cordón umbilical y la placenta postparto obtienen una respuesta inmune in vivo, las líneas celulares se probaron en una reacción de linfocitos mixta de una dirección (MLR).

Materiales y Métodos

Cultivo Celular. Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento hasta la confluencia 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 despegaron con Tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Se recolectaron las células, se centrifugaron y se re-suspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración de 1x10⁷ por mililitro. Se añadió anticuerpo (Tabla 10-1) a cien microlitros de suspensión celular según las especificaciones del fabricante y se incubaron a oscuras durante 30 minutos a 4º C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para retirar el anticuerpo no enlazado. 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).

Tabla 10-1. Anticuerpos

	Anticuerpo	Fabricante	Número de Catalogo
5	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
10	HLA-G	Abeam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
	CD178 PD-	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
	L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846
	IgG2a de Ratón	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
15	IgG1kappa de Ratón	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

Reacción de Linfocitos Mixta. Los viales criopreservados de las PPDCs derivadas del cordón umbilical del pase 10 etiquetados como línea celular A y las PPDCs derivadas de la placenta del pase 11 etiquetadas como línea celular B se enviaron en hielo seco a CTBR (Senneville, Quebec) para llevar a cabo una reacción de linfocitos mixta usando CTBR SOP N° CAC-031. Se recogieron las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) de múltiples donantes voluntarios masculinos y femeninos. Se trataron líneas celulares PBMC alogénicas estimuladoras (donante), PBMC autólogas y postparto con mitomicina C. Las células estimuladoras autólogas y tratadas con mitomicina C se añadieron a PBMCs respondedoras (receptores) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió $[H^3]$ timidina a cada muestra y se cultivaron durante 18 horas. Después de la recolección de las células, se extrajo el ADN radiomarcado, y se midió la incorporación de $[^3H]$ -timidina usando un contador de centelleo.

El índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) se calculó como la proliferación media del receptor más el donante alogénico tratado con mitomicina C dividido por la proliferación de la línea de base del receptor. El índice de estimulación de las células postparto se calculó como la proliferación media del receptor más la línea celular postparto tratada con mitomicina C dividido por la proliferación de la línea de base del receptor.

Resultados

Reacción de linfocitos mixta -Placenta. Se seleccionaron siete donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un único donante alogénico que mostrase una respuesta de proliferación robusta en una reacción de linfocitos mixta con los otros seis donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante de control positivo alogénico. Los seis donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. El donante de control positivo alogénico y las líneas celulares de la placenta se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción de linfocitos mixta con los seis receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado usando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 10-2). El índice de estimulación media varió de 1,3 (placa 2) a 3 (placa 1) y los controles positivos de donantes alogénicos variaron de 46,25 (placa 2) a 279 (placa 1) (Tabla 10-3).

Tabla 10-2. Datos de Reacción de linfocitos Mixta - Línea Celular B (Placenta)

DPM para Ensayo de Proliferación									
	ID de la Placa ID: Placa1								
5									
	Analítico	Cultivo	Réplicas						
10	número	Sistema	1	2	3		Media	SD	CV
15	IM03-7769	Línea de base de proliferación del receptor	79	119	138		112.0	30.12	26.9
20		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	241	272	175		229.3	49.54	21.6
25		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con Mitomicina C)	23971	22352	20921		22414.7	1525.97	6.8
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con Mitomicina C)	664	559	1090		771.0	281.21	36.5
30	SI (donante)						200		
	SI (línea celular)						7		
35									
	IM03-7770	Línea de base de proliferación del receptor	206	134	262		200.7	64.17	32.0
40		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	1091	602	524		739.0	307.33	41.6
45		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con Mitomicina C)	45005	43729	44071		44268.3	660.49	1.5
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con Mitomicina C)	533	2582	2376		1830.3	1128.24	61.6
50	SI (donante)						221		
	SI (línea celular)						9		
55									

60

65

(continuación)

DPM para Ensayo de Proliferación									
5	IM03-7771	Línea de base de proliferación del receptor	157	87	128	124.0	35.17	28.4	
10		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	293	138	508	313.0	185.81	59.4	
15		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con Mitomicina C)	24497	34348	31388	30077.7	5054.53	16.8	
20		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con Mitomicina C)	601	643	a	622.0	29.70	4.8	
25	SI(donante)				243				
30	SI (línea celular)				5				
35	IM03-7772	Línea de base de proliferación del receptor	56	98	51	68.3	25.81	37.8	
40		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	133	120	213	155.3	50.36	32.4	
45		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con Mitomicina C)	14222	20076	22168	18822.0	4118.75	21.9	
50		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con Mitomicina C)	a	a	a	a	a	a	
55	SI (donante)				275				
60	SI (línea celular)				a				
65	IM03-7768 (donante alogénico)	Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina)	84	242	208	178.0	83.16	46.7	
70		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina)	361	617	304	427.3	166.71	39.0	
75	Línea celular tipo B	Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina)	126	124	143	131.0	10.44	8.0	
80		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina)	822	1075	487	794.7	294.95	37.1	
85									

(continuación)

ID de Placa: Placa 2										
5	Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV		
			1	2	3					
10	IM03-7773	Línea de base de proliferación del receptor	908	181	330	473.0	384.02	81.2		
		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	269	405	572	415.3	151.76	36.5		
15		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con Mitomicina C)	29151	28691	28315	28719.0	418.70	1.5		
20		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con Mitomicina C)	567	732	905	734.7	169.02	23.0		
25	SI (donante) SI (línea celular)					61 2				
30	IM03-7774	Línea de base de proliferación del receptor	893	1376	185	818.0	599.03	73.2		
		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	261	381	568	403.3	154.71	38.4		
35		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con Mitomicina C)	53101	42839	48283	48074.3	5134.18	10.7		
40		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con Mitomicina C)	515	789	294	532.7	247.97	46.6		
45	SI (donante) SI (línea celular)					59 1				
50	IM03-7775	Línea de base de proliferación del receptor	1272	300	544	705.3	505.69	71.7		
		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	232	199	484	305.0	155.89	51.1		
55		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con Mitomicina C)	23554	10523	28965	21014.0	9479.74	45.1		
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con Mitomicina C)	768	924	563	751.7	181.05	24.1		
60	SI (donante) SI (línea celular)					30 1				

65

(continuación)

ID de Placa: Placa 2									
5	Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV	
			1	2	3				
10 15 20	IM03-7776	Línea de base de proliferación del receptor	1530	137	1046	904.3	707.22	78.2	
		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	420	218	394	344.0	109.89	31.9	
		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con Mitomicina C)	28893	32493	34746	32044.0	2952.22	9.2	
		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con Mitomicina C)	a	a	a	a	a	a	
25	SI (donante)					35			
	SI (línea celular)					a			

Tabla 10-3. Índice de Estimulación medio de células de la placenta y un donante alogénico en una reacción de linfocitos mixta con seis receptores alogénicos individuales

30 Índice de Estimulación Media		
	Recipiente	Placenta
35 Placa 1 (receptores 1-3)	279	3
Placa 2 (receptores 4-6)	46.25	1.3

Reacción de Linfocitos Mixta - Cordón Umbilical. Se seleccionaron seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un único donante alogénico que mostrase una respuesta de proliferación robusta en una reacción de linfocitos mixta con los otros cinco donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante de control positivo alogénico. Los cinco donantes de sangre restantes se seleccionaron como recipientes. El donante de control positivo alogénico y las líneas celulares de la placenta se trataron con mitocina C y se cultivaron en una reacción de linfocitos mixta con los cinco receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado usando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 10-4). El índice de estimulación media varió de 6,5 (placa 1) a 9 (placa 2) y los controles positivos de donantes alogénicos variaron de 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 10-5).

Tabla 10-4. Reacción de Linfocitos Mixta - Línea Celular A (Cordón umbilical)

DPM para ensayo de Proliferación										
Placa ID: Placa I										
Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV			
		1	2	3						
5 10 15 20	IM04-2478	Línea de base de proliferación del receptor	1074	406	391	623.7	390.07	62.5		
		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	672	510	1402	861.3	475.19	55.2		
		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con Mitomicina C)	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7		
		MLR con línea celular (célula tipo A tratada con Mitomicina C)	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3		
25	SI (donante) SI (línea celular)					70 8				
30 35 40	IM04-2479	Línea de base de proliferación del receptor	530	508	527	521.7	11.93	2.3		
		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	701	567	1111	793.0	283.43	35.7		
		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con Mitomicina C)	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1		
		MLR con línea celular (célula tipo A tratada con Mitomicina C)	5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3		
40	SI (donante) SI (línea celular)					47 7				
45 50 55	IM04-2480	Línea de base de proliferación del receptor	1192	854	1330	1125.3	244.90	21.8		
		Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	2963	993	2197	2051.0	993.08	48.4		
		Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con Mitomicina C)	25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7		
		MLR con línea celular (célula tipo A tratada con Mitomicina C)	2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1		
60	SI (donante) SI (línea celular)					23 3				

(continuación)

DPM para ensayo de Proliferación										
Placa ID: Placa 1										
Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas 2			Media	SD	CV			
		1	2	3						
IM04-2481	Línea de base de proliferación del receptor	695	451	555	567.0	122.44	21.6			
	Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	738	1252	464	818.0	400.04	48.9			
	MLR allogenic donor IM04-2477 (Mitomycin C treated)	13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8			
	MLR with cell line (Mitomycin C treated cell type A)	4495	3671	4674	4280.0	534.95	12.5			
SI (donante)					31					
SI (línea celular)					8					
Placa ID: Placa 2										
Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV			
		1	2	3						
IM04-2482	Línea de base de proliferación del receptor	432	533	274	413.0	130.54	31.6			
	Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	1459	633	598	896.7	487.31	54.3			
	MLR allogenic donor IM04-2477 (Mitomycin C treated)	24286	30823	31346	28818.3	3933.82	13.7			
	MLR with cell line (Mitomycin C treated cell type A)	2762	1502	6723	3662.3	2724.46	74.4			
SI (donante)					70					
SI (línea celular)					9					
IM04-2477 (donante alogénico)	Línea de base de proliferación del receptor	312	419	349	360.0	54.34	15.1			
	Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina)	567	604	374	515.0	123.50	24.0			
Línea celular tipo A	Línea de base de proliferación del receptor	5101	3735	2973	3936.3	1078.19	27.4			
	Control de la autoestimulación (Células autólogas tratadas con Mitomicina C)	1924	4570	2153	2882.3	1466.04	50.9			

Tabla 10-5. Índice de Estimulación media de células umbilicales y un donante alogénico en una reacción de linfocitos mixta con cinco receptores alogénicos individuales

Índice de Estimulación Media		
	Recipiente	Cordón Umbilical
Placa 1 (receptores 1-4)	42.75	6.5
Placa 2 (receptor 5)	70	9

Marcadores Celulares que presentan Antígenos - Placenta. Los histogramas de las células de placenta analizadas por citometría de flujo muestran expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, según se señala por el valor de fluorescencia consistente con el control de IgG, indicando que las líneas celulares de la placenta carecen de las moléculas de la superficie celular requeridas para estimular directamente las células CD4+T.

Marcadores Inmuno-moduladores - Placenta. Los histogramas de las células de la placenta analizadas por citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, según se señala por el valor aumentado de fluorescencia en relación al control de IgG, y expresión negativa de CD178 y HLA-G, según se señala por el valor de fluorescencia consistente con el control de IgG.

Marcadores Celulares que presentan Antígenos - Cordón Umbilical. Los histogramas de las células del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo muestran expresión negativa de LA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, según se señala por el valor de fluorescencia consistente con el control de IgG, indicando que las líneas celulares del cordón umbilical carecen de las moléculas de la superficie celular requeridas para estimular directamente las células CD4+T.

Marcadores Inmuno-moduladores - Cordón umbilical. Los histogramas de las células del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, según se señala por el valor aumentado de fluorescencia en relación al control de IgG, y expresión negativa de CD178 y HLA-G, según se señala por el valor de fluorescencia consistente con el control de IgG.

Resumen. En las reacciones de linfocitos mixtas realizadas con líneas celulares de la placenta, el índice de estimulación media varió de 1,3 a 3; y el de los controles positivos alogénicos varió de 46,25 a 279. En las reacciones de linfocitos mixtas realizadas con líneas celulares del cordón umbilical el índice de estimulación media varió de 6,5 a 9, y la de los controles positivos alogénicos varió de 42,75 a 70. Las líneas celulares de la placenta y el cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas de estimulación de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, medida por citometría de flujo. Las líneas celulares de la placenta y el cordón umbilical fueron negativas para la expresión de PD-L2, medida por citometría de flujo. Las PBMCs de donantes alogénicos contienen células que presentan antígenos que expresan HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, permitiendo de este modo la estimulación de células CD4+T vírgenes. La ausencia de moléculas de superficie celular que presentan antígenos en las células derivadas de la placenta y el cordón umbilical requeridas para la estimulación directa de células CD4+T vírgenes y la presencia de PD-L2, una proteína inmuno-moduladora, puede explicar el índice de estimulación baja mostrado por estas células en un MLR en comparación con los controles alogénicos.

Ejemplo 11

Ensayo de Coagulación de Plasma

La terapia celular puede inyectarse sistemáticamente para ciertas aplicaciones cuando las células son capaces de apuntar al sitio de acción. Es importante que las células inyectadas no causen trombosis, que puede ser fatal. El factor tisular, una glicoproteína procoagulante enlazada a la membrana, es la iniciadora de la cascada de coagulación extrínseca, que es la vía de coagulación predominante in vivo. El factor tisular también juega un papel importante en la formación de vasos embrionarios, por ejemplo, en la formación de la pared vascular primitiva (Brodsky et al. (2002) Exp. Nephrol. 10:299-306). Para determinar el potencial de las PPDCs de iniciar la coagulación, se evaluaron las PPDCs derivadas del cordón umbilical y la placenta para la expresión del factor tisular y su capacidad de iniciar la coagulación del plasma.

Métodos y Materiales

Factor Tisular Humano. Se reconstituyó SIMPLASTIN, un factor tisular humano (Organon Tekailca Corporation, Durham, NC), con 20 mililitros de agua destilada. La solución madre fue diluida en serie (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 después de almacenó en hielo antes del uso. A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se le añadieron 100 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 microlitros diluidos de SIMPLASTIN (excepto un pocillo vacío), 30 microlitros de 0.1M de cloruro de calcio, y 100 microlitros de plasma humano normal. La placa fue

colocada 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.

5 **Células postparto y J-82.** Se cultivaron células J-82 (ATCC, MD) en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Gibco, Carlsbad, CA) que contenía 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan UT), pirovato de sodio 1 milimolar (Sigma Chemical, St. Louis, MO), L-Glutamina 2 milimolar (Mediatech Herndon, VA),, 1 x aminoácidos no esenciales (Mediatech Herndon, VA). a un 70% de confluencia, las células se transfirieron a pocillos de una placa de 96 pocillos a 100.000, 50.000 y 25.000 células/pocillo. Las células postparto derivadas de la placenta y el cordón umbilical se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Se transfirieron las células derivadas de la placenta en el pase 5 y las células derivadas del cordón umbilical en los pases 5 y 18 a pocillos a 50.000 células/pocillo. El medio de cultivo se retiró 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 incubadas con células de anticuerpos de factor anti-tejido 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 colocó 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.

20 **Tinción de Anticuerpos.** Las células se lavaron en PBS y se despegaron de los matraces con Tripsina/EDTA (Gibco Carlsbad, CA). Se recolectaron las células, se centrifugaron y se re-suspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se añadió anticuerpo a 100 microlitros de suspensión celular de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron a oscuras 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 retirar el anticuerpo no enlazado. Las células se re-suspendieron en 100 microlitros de 3% de FBS y se añadió el anticuerpo secundario según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron a oscuras durante 30 minutos a 4° C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para retirar el anticuerpo secundario no enlazado. Las células lavadas se re-suspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron pro citometría de flujo.

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

Resultados

35 El análisis de citometría de flujo reveló que tanto las células postparto derivadas de la placenta como del cordón umbilical expresaron factor tisular. Un ensayo de coagulación de plasma demostró que el factor tisular era activo. Tanto las células derivadas de la placenta como del cordón umbilical aumentaron la tasa de coagulación como se indica por el tiempo a media absorbancia máxima ($T_{1/2}$ a máxima; Tabla 11-1). Se observó coagulación con tanto células tempranas (P5) como tardías (P18). La $T_{1/2}$ a máxima es inversamente proporcional al número de células J82. La preincubación de células del cordón umbilical con CNTO 859, un anticuerpo para el factor tisular, inhibió la reacción de coagulación, mostrando de este modo que el factor tisular era responsable del tejido.

45

50

55

60

65

Tabla 11-1. Se evaluó el efecto del factor tisular humano (SIMPLASTIN), células derivadas de la placenta (Pla), y células derivadas del cordón umbilical (Umb) en la coagulación de plasma. El tiempo a la media absorbancia máxima T½ a máxima en el aplanamiento en segundos se usó como una unidad de medida

5	Dilución de SIMPLASTIN	T½ a máxima (segundos)
	1:2	61
	1:4	107
10	1:8	147
	1:16	174
	1:32	266
15	1:64	317
	1:128	378
	0 (control negativo)	1188
20		
	Células J-82 cells	
	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

Resumen. Las PPDCs derivadas de la placenta y cordón umbilical expresan factor tisular. La adición de un anticuerpo al factor tisular puede inhibir el factor tisular. El factor tisular se encuentra normalmente en células en una conformación que es inactiva pero se activa por tensión mecánica o química (por ejemplo LPS) (Sakariassen et al. (2001) *Thromb. Res.* 104:149-74; Engstad et al. (2002) *Int. Immunopharmacol.* 2:1585-97). Por lo tanto, la minimización de la tensión durante el proceso de preparación de las PPDCs puede evitar la activación del factor tisular. Además de la actividad trombogénica, el factor tisular se ha asociado con la actividad angiogénica. Por lo tanto, la actividad del factor tisular puede ser beneficiosa cuando las PPDCs derivadas del cordón umbilical o la placenta se trasplantan en tejido pero debería inhibirse cuando las PPDCs se inyectan por vía intravenosa.

Figura 11-1. La coagulación de plasma con células J82 y células del cordón umbilical sin (A) y con (B) CNTO 859, factor tisular anti-humano, 20 µg/mililitros. El tratamiento con anticuerpos mostró que la coagulación se debió al factor tisular en células umbilicales.

EJEMPLO 12

Diferenciación de Células Postparto con el Fenotipo de Cardiomiocitos

Hay una necesidad tremenda para terapia que ralentice la progresión de y/o cure enfermedad del corazón, como enfermedad isquémica del corazón e insuficiencia cardiaca congestiva. Las células que pueden diferenciarse en cardiomiocitos que puedan integrarse completamente en el músculo cardiaco del paciente sin arritmias es altamente deseable. Se ha demostrado que las células madre mesenquimales de roedor tratadas con 5-azacitidina expresan marcadores de cardiomiocitos (Fukuda et al. (2002) *C. R. Biol.* 325:1027-38). Lo mismo no se ha

demostrado para células madre humanas adultas. Se han usado factores adicionales para mejorar la diferenciación de células madre incluyendo oxígeno bajo (Storch (1990) Biochim. Biophys. Acta 1055:126-9), ácido retinoico (Wobus et al. (1997) J. Mol. Cell Cardiol. 29:1525-39), DMSO (Xu et al. (2002) Circ. Res. 91:501-8), y cloruro de queleritrina (Solicitud de PCT Internacional N° WO03/025149), que efectúa la translocación de PKC del citosol a la membrana plasmática y es un inhibidor de la actividad de PKC. En el presente estudio, las PPDCs (P10) se trataron con 5-azacitidina ya sea sola o en combinación con DMSO o cloruro de queleritrina y marcadores de cardiomiocitos medidos por PCR en tiempo real.

Métodos y Materiales

Células. Células derivadas del cordón umbilical (P10) y células derivadas de la placenta (P24) criopreservadas se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces recubiertos de gelatina. Las células se sembraron a 5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos en Medio de Crecimiento durante 24 horas. El medio se cambió a 0, 3, 10 y 30 μM de 5-azacitidina (Sigma, St. Louis, MO) sola o con 5 μM de cloruro de queleritrina (Sigma), 1% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (sigma), o 1 μM de ácido retinoico (Sigma) en MEM-alfa (Sigma), insulina, transferrina y selenio (ITS; Sigma), 10% (v/v) de suero bovino fetal, penicilina y estreptomina, y células incubadas a 37° C, 5% (v/v) de O₂ durante 48 ó 72 horas. El medio se cambió después a MEM-alfa, insulina, transferrina y selenio, 10% (v/v) de suero bovino fetal, penicilina y estreptomina, y las células se incubaron a 37° C, 5% (v/v) de O₂ durante 14 días.

Extracción de ARN y Transcripción Inversa. Las células se lisaron con 150 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit RNeasy 96, Qiagen, Valencia, CA), y se almacenaron a -80° C. Se descongelaron los lisados celulares y el ARN se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit RNeasy 96, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de DNasa de 2,7 U/muestra (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80° C. El ARN se sometió a transcripción inversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25° C durante 10 minutos, 37° C durante 60 minutos y 95° C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20° C.

[0287] **PCR.** Se realizó el PCR en muestras de ADNc usando productos de expresión génica Assays-on-Demand™ miosina cardíaca (hs00165276 ml), miosina esquelética (Hs00428600), GATA 4 (Hs00171403 ml), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA), y mezcla maestra de PCR Universal TaqMan de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencias 7000 con software ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente de 50° C durante 2 minutos y 95° C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos y 60° C durante 1 minuto. Se usaron como un control el ADNc del corazón y el del músculo esquelético (Ambion Austin TX).

Resultados

El análisis del ARN del músculo cardíaco mostro expresión de miosina cardíaca y GATA 4. El análisis del ARN del músculo esquelético mostro la expresión de miosina esquelética y miosina cardíaca pero no del GATA 4. Las células derivadas de la placenta (P24) tratadas durante 72 horas con factores y cultivados durante 14 días adicionales expresaron GATA 4, pero no miosina esquelética o miosina cardíaca. Las células derivadas del cordón umbilical (P12) tratadas durante 48 horas y cultivadas durante 14 días adicionales expresaron niveles bajos de GATA 4, pero no miosina esquelética o miosina cardíaca. Muestras adicionales de las células de la placenta y el cordón umbilical que se analizaron mostraron expresión de GATA 4 bajo las condiciones probadas.

Resumen. Las células derivadas de la placenta y el cordón umbilical no tratadas expresan constitutivamente GATA 4, un factor de transcripción nuclear en cardiomiocitos, células de Sertoli, y hepatocitos.

EJEMPLO 13

Evaluación de Terapia Cardiovascular Basada en Células Postparto en un Modelo de Ligación Coronaria en Roedor

Los modelos animales de fallo cardíaco han aumentado nuestra comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y han ayudado en el desarrollo de nuevos tratamientos para la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF). La oclusión de arteria coronaria, o el bloqueo de los vasos que irrigan el tejido del corazón, en la rata imitan estrechamente la fisiopatología del infarto de miocardio agudo en humanos y se han usado con éxito para estudiar invenciones farmacológicas para el CHF. El trasplante de células humana en lesiones cardíacas es un tratamiento terapéutico viable potencial para el CHF.

El objetivo de este estudio era determinar la eficacia del tratamiento de células humanas intracardiacas cuando se administran 15 minutos después de la oclusión de arteria coronaria en un modelo animal de

isquemia/infarto de miocardio.

Métodos y Materiales

5 La instalación de pruebas Charles River Worcester, MA está acreditada por la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio, Internacional (AAALAC) y registrada en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos para realizar investigaciones en animales de laboratorio. Todas las condiciones de la prueba se ajustan a la Ley de Protección de los Animales (9 CFR) y sus modificaciones. El protocolo se revisó y aprobó por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en la instalación de pruebas para el cumplimiento de las regulaciones antes del inicio del estudio.

10 Los animales que tienen características identificadas en la Tabla 13-1, se alojaron individualmente en jaulas de micro-aislamiento en camas de autocable. Las jaulas cumplen con los estándares expuestos en La Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

15

Tabla 13-1. Características animales

20	Especie:	<i>Rattus norvegicus</i>
	Cepa:	Rnu
	Fuente:	Charles River Laboratories
	Edad de Dosificación:	6-8 semanas
	Peso en la Dosificación:	-200-250 g
25	Número de Machos (incluyendo repuestos):	40 + 10

30 Se proporcionó Dieta Certificada por Purina (irradiada) a los animales ad libitum. Esta dieta se analizó rutinariamente por el fabricante para los componentes nutricionales y contaminantes ambientales. Los resultados de los análisis del fabricante están en un archivo en la Instalación de Pruebas.

35 Se proporcionó agua del grifo filtrada en autoclave ad libitum. Las muestras del agua filtrada se analizaron para sólidos disueltos totales, dureza, contenido microbiológico específico y contaminantes ambientales seleccionados. Los resultados de estos análisis están en un archivo en la Instalación de Pruebas.

40 Se establecieron controles ambientales para mantener temperaturas de 18 a 26° C (64 a 79° F) con una humedad relativa del 30% al 70%. Se mantuvo un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 horas. Se mantuvieron diez o más cambios de aire por hora en las habitaciones de los animales. En la recepción y antes del uso en el estudio, los animales se mantuvieron durante un mínimo de cuatro días para acondicionamiento de acuerdo con el Programa de Gestión del Proveedor de la Instalación de Pruebas como se describe en el Procedimiento de operación Estándar de la Instalación de Pruebas, Recepción, Acondicionamiento, y cuarentena de Animales de Laboratorio.

45 Cada animal se identificó por un número único y este número se indicó por una punción en la oreja. Los animales se asignaron aleatoriamente a grupos por una distribución ordenada por peso de tal manera que los pesos corporales individuales no excedían de ±20% del peso medio.

50 Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 miligramos/kilogramo) y buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo) como un único coctel dado por vía intramuscular (IM). Después del establecimiento de la anestesia, los animales se entubaron usando un angiocatéter de calibre 18-16, de 2 pulgadas de largo, o un angiocatéter de tamaño apropiado, y se mantuvieron en respiración de aire de la sala (suplementada con oxígeno) y un ventilador de presión positiva a lo largo del procedimiento quirúrgico. Se dio anestesia adicional de forma incremental como fue necesario. También se administró terapia antibiótica preoperatoria, Benzatina/Procaína penicilina G, 40.000 unidades/kilogramo, IM. Se administró terapia antibiótica adicional cada 48 horas.

55 Se colocaron almohadillas de electrodos alrededor de las patas apropiadas de los animales para recibir una señal ECG utilizable. Los animales se posicionaron en una almohadilla de calentamiento para ayudar a mantener la temperatura corporal a lo largo del procedimiento. Se insertó una sonda de temperatura rectal en los animales para monitorizar la temperatura corporal. Se administró pomada oftálmica a cada ojo. Los sitios quirúrgicos (área torácica) se prepararon para cirugía aséptica eliminando cualquier exceso de pelaje y limpiando suavemente el área con esponjas que habían sido empapadas en 70% de alcohol isopropílico, que se permitió que secase. Se aplicó después Medi Sepps™ o solución similar al área y también se permitió que secase. El área se cubrió adecuadamente para cirugía aséptica estricta.

60 Se hizo una incisión quirúrgica en la piel sobre el cuarto espacio intercostal. Se usó disección roma a través de las capas musculares para acceder a la cavidad torácica. Se insertó con cuidado un retractor en el cuarto espacio intercostal y se abrió para permitir el acceso a la cavidad interior. Se abrió con cuidado el pericardio mediante

65

separación del tejido suave con bastoncillos de algodón humedecidos en solución salina estéril. Se usó un bastoncillo de algodón humedecido para empujar ligeramente el ápice del corazón en la abertura donde se unió una longitud de 6-0 de sutura de seda al miocardio para la manipulación del corazón. Después de una pausa para permitir que el corazón se recuperase, la sutura colocada en el ápice se usó para facilitar al corazón fuera de la cavidad torácica y para colocar suficiente tensión en el corazón para permitir el acceso al corazón superior y la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). Se colocó otra longitud de 6-0 de sutura de seda en el miocardio para rodear la LAD. La presión de la sutura apical se liberó y se permitió que el corazón retornase al interior de la cavidad torácica.

Una vez que el ritmo cardíaco y el ECG volvieron los valores de la línea de base, las ligaduras alrededor de la LAD se ataron para ocluir la LAD. Esto era una oclusión permanente con la sutura atada y los extremos recortados. Una vez que la ligadura se hubo atado, el cirujano buscó las siguientes indicaciones de oclusión exitosa: cambio en el color del área del corazón directamente debajo de la ligadura a un blanco/blanco grisáceo como resultado de una finalización del flujo sanguíneo al área y un cambio significativo en el ECG correspondiente a la oclusión de la LAD. Pueden desarrollarse arritmias dentro de los primeros 10 minutos de la oclusión. La rata se monitorizó estrechamente durante este periodo temporal para el caso de que fuese necesaria reanimación. En el caso de arritmia severa e insuficiencia de la rata para volver al ritmo sinusal normal sin asistencia, se prestó ayuda por masaje cardíaco. Aproximadamente 15 minutos después del inicio de la oclusión de la LAD, el área del ventrículo izquierdo hecha isquémica se trató con vehículo a artículo de prueba por inyección directa en el miocardio isquémico. El tratamiento consistió de tres a diez inyecciones intramiocardiacas (100 microlitros/inyección) en la zona isquémica del miocardio.

Las células humanas se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces T300 recubiertos de gelatina. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco, Carlsbad CA) y se tripsinizaron usando Tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad CA). La tripsinación se paró añadiendo Medio de Crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g, se retiró el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en aproximadamente 1 mililitro de Medio de Crecimiento por millón de células. Se retiró una alícuota de células y se añadió azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). El número de células viables se estimó usando un hemocitómetro. La suspensión celular se centrifugó y resuspendió en 1 mililitro de Medio de Crecimiento que contenía 10% (v/v) de DMSO (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO) por 5 millones de células y se transfirió a crioviales (Nalgene). Las células se enfriaron a aproximadamente 1° C/minuto durante la noche en un congelador a -80° C usando un contenedor de congelación "Mr Frosty" (Nalgene, Rochester, NY). Los recipientes de células se transfirieron a nitrógeno líquido. Los recipientes se enviaron de CBAT, Somerville, NJ a Charles River, Worcester, MA en hielo seco y se almacenaron a -80° C. Aproximadamente 1-2 horas antes de la inyección de las células en los animales, se descongeló rápidamente un recipiente de células en un baño de agua a 37° C. Bajo condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad BSL2, las células se añadieron a 40 mililitros de PBS con magnesio y calcio (Sigma St. Louis, MO) y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos antes de resuspender el pellet celular en 10 mililitros de PBS. El número de células y la viabilidad se estimaron como se ha descrito anteriormente. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS a una concentración final de 10⁶ células viable/100 microlitros. La suspensión celular se cargó en jeringuillas de 1 mililitro con una aguja de 30G y se mantuvieron en hielo. La viabilidad se evaluó de nuevo hasta 5 horas en hielo.

Después de la administración del tratamiento (Tabla 13-2) y la estabilización del corazón, el cirujano empezó a cerrar la incisión quirúrgica. Se retiró el retractor. Los pulmones se sobre-inflaron durante 3 -4 respiraciones y se inspeccionaron visualmente lo máximo posible para asegurar que estaban completamente re-inflados. Esto creó una presión negativa necesaria para evitar un neumotórax después de la recuperación. Para evacuar fluido y el exceso de aire de la cavidad torácica después de cerrar la cavidad, se colocó un catéter intravenoso (es decir, calibre 20, 2 mm de longitud) a través de las capas de la piel y el músculo de tal manera que la punta permaneciese en la cavidad torácica. Se tuvo cuidado para que la punta no perforase el pulmón o el corazón. Las costillas separadas y el músculo asociado se suturaron juntos con sutura apropiada. Las capas superiores del músculo se suturaron usando un patrón continuo simple. La piel se cerró con seda 4-0 usando un patrón de colchón horizontal. Se unió una jeringuilla de 10 mililitros al catéter intravenoso que se había colocado anteriormente en la cavidad torácica y se tiró lentamente del émbolo para extraer fluidos y aire de la cavidad. Al mismo tiempo, se extrajo el catéter con cuidado del sitio de entrada, permitiendo de este modo que la masa del músculo colindante y la piel sellaran la punción. Se retiró la sábana quirúrgica y se dieron los fluidos (es decir solución láctica de Ringer , 25 mililitros/kilogramo por vía subcutánea [SC] o vía intraperitoneal [IP]).

Tabla 13-2 Regímenes de Tratamiento

5	Gr. No.	No. of Machos	Artículo de Prueba	Nivel de Dosificación (células/animal)	Conc. De Dosis (células/mililitros)	Vía / Régimen de Dosis	Tiempo de Administración del Tratamiento	Día de Necropsia
	1	8	Vehículo	0	0	Inyecciones directas en la región isquémica del ventrículo izquierdo del corazón, consistentes de 3 a 10 inyecciones intramiocárdicas 100 µL en total.	15 minutos después del ligado de la arteria coronaria	Día 28 (± 1 Día)
10	2	8	Placenta #4 (P10) (A)	1 millón	10 millones			
	3	8	Umbilical (P10) (B)					
15	4	8	Placenta #3 (P10) (C)					
20	5	8	Fibroblastos humanos 1F1853 (P10) (D)					
25	Gr. = Grupo; No. = Número; Conc. = Concentración							

Inmediatamente después de que cada rata e había sometido a tratamiento con artículo de prueba y la incisión se hubo suturado, el animal se sometió a un examen de (ECG). La anestesia se mantuvo hasta la finalización del examen de eco. Tras la finalización del examen de eco, la ventilación se suspendió, y la rata se retornó al área de recuperación para recuperarse en una jaula de recuperación oxigenada, climatizada.

Se completó un segundo examen de eco de cada animal sobreviviente al final del estudio (aproximadamente 28 días después del tratamiento), antes de la finalización. Durante el segundo examen, los animales se anestesiaron como se ha descrito anteriormente.

Para cada examen de eco, se afeitó el área torácica izquierda, y se calentó, se aplicó gel ultrasónico a la piel para potenciar el contacto con el transductor. Las almohadillas de electrodos se colocaron alrededor de las extremidades apropiadas para recibir una señal ECG. Las imágenes ecocardiográficas incluían vistas de eje corto y eje largo para permitir la determinación de las dimensiones de la cavidad ventricular, la contractilidad, el flujo sanguíneo a través de la vasculatura, y el grosor de la pared. Estas imágenes se guardaron en un disco óptico para análisis adicional. Después del examen, el medio de gel se retiró de la piel con gasa o toallita de papel. La rata se retiró del ventilador y se colocó en una jaula de recuperación calentada hasta la movilidad.

A la conclusión de los procedimientos quirúrgicos, se apagó la ventilación respiratoria. Se observó a los animales para reflejo de pedal. Posteriormente se retiraron la sonda rectal y los electrodos ECG, y se extubó al animal y se colocó en una jaula de recuperación oxigenada calentada. Después de la recuperación completa de la anestesia, se dio a los animales buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo, SC). Se hicieron observaciones regularmente hasta que los animales mostraron movilidad completa e interés en comida y agua. Los animales se colocaron entonces en una jaula de alojamiento limpia y se retornó al animal a la sala de alojamiento. Los animales se monitorizaron para la integridad de la incisión quirúrgica dos veces al día después de la cirugía.

Se dieron analgésicos (es decir buprenorfina, 0,05 miligramos/kilogramo SC.) dos veces al día durante 4 días después de la operación y posteriormente cuando fue necesario. Las indicaciones visuales del dolor post-operatorio incluyen falta de posturas y movimientos corporales normales (por ejemplo, el animal permanece en posición encogida, antipatía, falta de comer/beber, falta de aseo, etc.

Se registró el peso corporal para cada animal antes del tratamiento inicial, semanalmente después, y en el día de la necropsia. Los animales que se encontraron muertos se pesaron y se les practicó la autopsia.

Para recolectar el corazón, cada rata se anestesió como se hizo para la cirugía. Se canuló la vena yugular. El corazón fue detenido en diástole con KCl infundido a través de la cánula yugular. Se retiró después el corazón de la cavidad torácica. Se realizó después una necropsia limitada en el corazón después de lo cual el corazón se colocó en 10% de formalina tamponada neutra. El resto de cada cadáver fue después descartado sin evaluación adicional.

Los corazones de todos los animales que se encontraron muertos o fueron sacrificados moribundos se

colocaron en 4% de paraformaldehído hasta que se evaluaron. El resto de cada cadáver fue después descartado sin evaluación adicional.

5 **Histología y Análisis de Imagen.** Los tejidos fijados seccionados con una matriz de corazón coronal de acero inoxidable (Harvard Apparatus Holliston, MA) produjeron cuatro secciones de tejido en serie de dos milímetros de grosor. Las secciones se procesaron y se embebieron en parafina en serie usando métodos rutinarios. Se obtuvieron secciones de cinco micras por micrómetro y se tiñeron con Tri-cromo de Masson para Tejido Conectivo (Poly Scientific Bay Shore, NY) usando los métodos del fabricante. Se tomaron y analizaron microfotografías electrónicas usando métodos de análisis de imagen desarrollados por Phase 3 Imaging System (Glen Mills, PA). Las microfotografías de las secciones teñidas con tri-cromo se analizaron color-métricamente electrónicamente para determinar el área total del ventrículo y la pared libre y el área de la tinción diferencial.

Resultados

15 No hubo pérdida en la viabilidad inicial de las células durante 5 horas en el vehículo cuando se mantuvo en hielo. Las células se inyectaron en el infarto con uno a tres puntos de entrada de la aguja y múltiples cambios en la dirección de la orientación de la aguja.

20 Las mediciones de ecocardiografía tomadas de las ratas tratadas de infarto se usaron para evaluar los resultados. El acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo y la fracción de eyección se utilizaron de manera similar. Estos valores se calcularon como se describe por Sahn et al. (1978) *Circulation* 58:1072-1083. El acortamiento fraccional de los animales tratados con vehículo disminuyó significativamente de 47,7% \pm 8,3% en el Día 0 a 23,5% \pm 30,2% al Día 28 ($p < 0,05$). Los animales que fueron tratados con células derivadas del postparto mostraron diferencias pequeñas, no significativas entre el acortamiento fraccional entre el Día 0 y el 28. No hubo diferencia significativa entre el acortamiento fraccional entre los grupos en el Día 0. Cada grupo tenía ocho animales al comienzo pero algunos no sobrevivieron al experimento. Los animales tratados con fibroblastos experimentaron mayor mortalidad (80%) que los grupos tratados con PPDCs.

30 Los corazones recogidos a la finalización del estudio se sometieron a análisis histológico. Los corazones se detuvieron en diástole y se fijaron. Los resultados se calcularon de un algoritmo para estimar el porcentaje del área total del corazón que comprende el infarto. El tamaño del infarto en los animales tratados con vehículo fue del 22,9% \pm 6,7% del área del corazón, mientras que el tamaño del infarto en los corazones tratados con células derivadas de la placenta (aislado 1) fue del 13,9% \pm 3,7%, con las células del cordón umbilical fue del 12,5% \pm 2,5%, con las células derivadas de la placenta (aislado 2) fue del 12,9% \pm 3,4%, y con los fibroblastos fue del 19,3% \pm 8,0%. La diferencia en el tamaño del infarto de los animales tratados con células en relación a los animales tratados con vehículo no fue estadísticamente significativa por o la prueba t de Student o por ANOVA.

35 **Resumen.** Los resultados del presente estudio sugieren que las células derivadas del postparto pueden tener algún beneficio para reducir el daño de un infarto de miocardio quirúrgicamente inducido en ratas. Los animales tratados con vehículo mostraron una reducción significativa en la función cardíaca en el día 28 en comparación al día 0, como se midió por acortamiento fraccional, mientras que los animales tratados con células derivadas de la placenta y el cordón umbilical mostraron cambio mínimo durante los 28 días del estudio. Los animales tratados con fibroblastos mostraron cambio mínimo pero sólo dos animales sobrevivieron al estudio. La evaluación del tamaño del infarto sugirió que puede haber alguna reducción modesta, pero no estadísticamente significativa, en el tamaño del infarto en los animales tratados con células derivadas del postparto en comparación con los controles de vehículo en el Día 28. Tomados en conjunto, estos datos establecen la eficacia de las células derivadas del postparto para reducir el daño de infarto de miocardio.

Ejemplo 14

Las PPDCs pueden ser inyectadas como un Complejo Matriz-Célula

55 Las células derivadas del cordón umbilical postparto son útiles para terapias regenerativas. Se evaluó el tejido producido por las células derivadas del postparto trasplantadas en ratones SCID con un material biodegradable. Los materiales evaluados fueron Vicryl no tejido, espuma 35/65 PCL/PGA e hidrogel de péptido autoensamblante RAD 16.

Métodos y Materiales

60 **Cultivo Celular.** Las células derivadas del cordón umbilical se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces recubiertos de gelatina.

65 **Preparación de la muestra.** Se sembraron un millón de células viables en 15 microlitros de Medio de Crecimiento en supercántigos de Vicryl no tejido de 5 mm de diámetro, 2,225 mm de grosor (64,33 mg/cc; Lot#3547-47-1) o espuma 35/65 PCL/PGA de 5 mm de diámetro (LOT# 3415-53). Se permitió que las células se uniesen

durante dos horas antes de añadir más Medio de Crecimiento para cubrir los supercántigos. Las células se cultivaron en supercántigos durante la noche. Los supercántigos sin células también se incubaron en medio.

5 Se obtuvieron péptidos auto-ensamblantes RAD 16(Matriz 3D, Cambridge, MA bajo un acuerdo de transferencia de material) como una solución estéril en agua 1% (p/v), que se mezcló 1:1 con 1×10^6 células en 10% (p/v) de sacarosa (Sigma, St Louis, MO), HEPES 10 milimolar en medio modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) inmediatamente antes del uso. La concentración final de células en el hidrogel RAD16 fue 1×10^6 células/100 microlitros.

10

MATERIAL DE PRUEBA (N=4/Rx)

1. Vicryl no tejido + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
2. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
3. Péptido auto-ensamblante RAD16 + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
4. Espuma 35/65 PCL/PGA
- 15 5. Vycril no tejido

Preparación de los Animales. Los animales utilizados en este estudio fueron manejados y mantenidos de acuerdo con los requisitos actuales de la Ley de Protección de los Animales. EL cumplimiento con las Leyes Públicas anteriores se logró adhiriéndose a las regulaciones de Protección de los Animales (9 CFR) y conforme a los estándares actuales promulgados en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7ª edición.

20 *Ratones (Mus Mscatlatlats)IFox Chase SCID/Macho (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, 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 una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramos de KETASET (clorhidrato de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) y 10 miligramos/kilogramo de ROMPUN (xilacina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de la anestesia, la espalda completa de los animales desde el área cervical dorsal hasta el área lumbosacra dorsal se recorto de pelo usando cortadoras de pelo para animales eléctricas. El área fue después fregada con diacetato de clorhexidina, aclarada con alcohol, secada y pintada con una solución de yodoforo acuosa del 1% de yodo disponible. Se aplicó una pomada oftálmica a los ojos para evitar el secado del tejido durante el periodo de la anestesia.

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

35 **Alojamiento de los Animales.** Los ratones se alojaron individualmente en jaulas de microaislamiento a lo largo del curso del estudio dentro de un intervalo de temperatura de 64° F a 79° F y humedad relativa del 60% al 70%, y se mantuvieron aproximadamente en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. La temperatura y humedad relativa se mantuvieron dentro de los intervalos indicados en la mayor medida posible. La dieta consistió de Pico Mouse Chow 5058 (Purina Co.) Irradiado y se dio agua ad libitum.

40 Los ratones fueron sacrificados a sus intervalos designados por inhalación de dióxido de carbono. Los sitios de implante subcutáneo con su piel suprayacente fueron escindidos y congelados para histología.

50 **Histología.** La piel escindida con el implante se fijó con 10% de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Las muestras con tejido suprayacente y adyacente fueron bisecadas centralmente, procesadas con parafina, y embebidas en la superficie de corte usando métodos rutinarios. Se obtuvieron secciones de tejido de cinco micras por micrótopo y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Poly Scientific Bay Shore, NY) usando métodos rutinarios.

Resultados

60 **Formación de la Red Endotelial: Las PPDCs Promueven la Angiogénesis In Vitro**

La angiogénesis, o la formación de nueva vasculatura, es necesaria para el crecimiento de nuevo tejido. La inducción de la angiogénesis es un objetivo terapéutico importante en muchas condiciones patológicas. El presente estudio estaba dirigido a identificar actividad angiogénica potencial de las células postparto en ensayos in vitro. El estudio siguió un método bien establecido de sembrar células endoteliales en una placa de cultivo recubierta con un extracto de la membrana basal (Nicosia and Ottinetti (1990) In Vitro Cell Dev. Biol. 26(2):119-28). El tratar células

5 endoteliales en una matriz extracelular con factores angiogénicos estimulará a las células para formar una red que es similar a los capilares. Esto es un ensayo in vitro común para probar estimuladores e inhibidores de la formación de vasos sanguíneos (Ito et al. (1996) Int. J. Cancer 67(1): 148-52). Los presentes estudios usan un sistema de co-cultivo con las células postparto sembradas en insertos de pocillos de cultivo. Los insertos permeables permiten el intercambio pasivo de componentes del medio entre el medio de cultivo postparto y endotelial.

Materiales y Métodos

Cultivo Celular

10 *Células derivadas de Tejido Postparto.* Se recibieron placenta y cordón umbilical humanos y las células se aislaron como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento o matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37° C con 5% de CO₂. Las células usadas para los experimentos eran de alrededor del pase 4 al 12.

15 Se tripsinizaron las células postparto que crecían activamente, se contaron y sembraron en insertos de cultivo de tejido de 6,5 mm de diámetro Costar® Transwell® (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48-72 horas en Medio de Crecimiento a 37° C con un 5% de CO₂.

20 *Células madre mesenquimales humanas (hMSC).* Las hMSCs se adquirieron de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Los cultivos se incubaron a 37° C con un 5% de CO₂.

25 Se tripsinizaron las MSCs que crecían activamente, se contaron y se sembraron en insertos de cultivo de tejido de 6,5 mm de diámetro Costar® Transwell® (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48-72 horas en Medio de Crecimiento a 37° C con un 5% de CO₂.

30 *Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC).* Las HUVEC se obtuvieron de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separado en medio celular endotelial o EBM o EGM (Cambrex). Las células se cultivaron en plástico de tejido cultivado estándar a 37° C con un 5% de CO₂. Las células usadas en el ensayo eran de alrededor del pase 4 al 10.

35 *Células endoteliales de la arteria coronaria humana (HCAEC).* Las HCAEC se adquirieron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Las células se mantuvieron en cultivos separados en formulaciones de medio o EBM o EGM. Las células se cultivaron en plástico de cultivo de tejido estándar a 37° C de CO₂. Las células usadas para los experimentos eran de alrededor del pase 4 al 8.

40 **Ensayos Matrigel™.** Las placas de cultivo se recubrieron con Matrigel™ de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente, el Matrigel™, (BD Discovery Labware, Bedford, MA) se descongeló a 4° C y se alicuotaron y distribuyeron uniformemente 250 microlitros en cada pocillo de una placa de 24 pocillos congelada (Corning). La placa fue después incubada a 37° C durante 30 minutos para permitir que el material se solidificase. Los cultivos de células endoteliales que crecían activamente se tripsinizaron y contaron. 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 en los pocillos recubiertos a 20.000 células por pocillo en aproximadamente 0,5 mililitros de Medio de Crecimiento con 2% (v/v) de FBS. Las células se incubaron después durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células se estableciesen.

50 Los cultivos de células endoteliales se trataron después con o bFGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o VEGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) para servir como un control positivo para las respuesta de las células endoteliales. Los insertos Transwell sembrados con células postparto se añadieron a los pocillos apropiados con Medio de Crecimiento con un 2% de FBS en la cámara de insertos. Los cultivos se incubaron a 37° C con un 5% de CO₂ durante aproximadamente 24 horas. La placa de pocillos se retiro de la incubadora, y las imágenes de los cultivos de células endoteliales se tomaron con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

Resultados

60 En un sistema de co-cultivo con células derivadas de la placenta o con células derivadas del cordón umbilical, las HUVEC forman redes de células. Las células HUVEC forman redes de células limitadas en experimentos co-cultivo con hMSC y con bFGF 10 nanomolar. Las células HUVEC sin ningún tratamiento mostraron muy poca o ninguna formación de redes. Estos resultados sugieren que las células postparto liberan factores angiogénicos que estimulan las HUVEC.

65 En un sistema de co-cultivo con células derivadas de la placenta o con células derivadas del cordón umbilical, las CAECs forman redes de células.

La Tabla 15-1 muestra niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células postparto en Medio de Crecimiento. Las células postparto se sembraron sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 37° C en oxígeno atmosférico durante 48 horas en los insertos y después se cambiaron a un medio con 2% de FBS y se retornaron a 37° C durante 24. horas. Se retiraron los medios, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80° C, y se analizaron por el ensayo ELISA multiplexado SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados muestran las medias de las mediciones de duplicados. Los resultados muestran que las células postparto no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivado de las plaquetas-bb (PDGF-bb) o factor de crecimiento epidérmico de enlace con heparina (HBEGF). Las células liberan cantidades medibles de inhibidor del tejido de metalinoproteasa-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 15-1. Factores angiogénicos potenciales liberados de células postparto. Las células postparto se cultivaron en 24 horas en medio con 2% de FBS en oxígeno atmosférico. Los medios se retiraron y ensayaron por el ensayo ELISA multiplexado SearchLight (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis de duplicados. Los valores son concentraciones en los medios informados en microgramos 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)
Placenta (P4)	91655.3	175.5	<2.0	275.5	3.0	58.3	7.5	644.6	<1.2
Placenta (P11)	1592832.4	28.1	<2.0	1273.1	193.3	5960.3	34.8	12361.1	1.7
Cordón Umbilical (P4)	81831.7	<9.8	<2.0	365.9	14.1	200.2	5.8	<4.0	<1.2
Solo medio	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

La Tabla 15-2 muestra niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células postparto. Las células postparto se sembraron sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento a 5% de oxígeno durante 48 horas en los insertos y después se cambiaron a un medio con 2% de FBS y se retornaron a incubación con 5% de O₂ durante 24 horas. Los medios se retiraron, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80° C, y se analizaron por el ensayo ELISA multiplexado SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados muestran las medias de las mediciones de duplicados. Los resultados muestran que las células postparto no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivado de las plaquetas-bb (PDGF-bb) o factor de crecimiento epidérmico de enlace con heparina (HBEGF). Las células liberan cantidades medibles de inhibidor del tejido de metalinoproteasa-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 15-2. Factores angiogénicos potenciales liberados de células postparto. Las células postparto se cultivaron en 24 horas en medio con 2% de FBS en 5% de oxígeno. Los medios se retiraron y ensayaron por el ensayo ELISA multiplexado SearchLight (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis de duplicados. Los valores son concentraciones en los medios informados en microgramos 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)
Placenta (P4)	72972.5	253.6	<2.0	743.1	2.5	30.2	15.1	1495.1	<1.2
Placenta (P11)	458023.1	55.1	<2.0	2562.2	114.2	2138.0	295.1	7521.3	1.8
Cordón Umbilical (P4)	50244.7	<9.8	<2.0	403.3	10.7	156.8	5.7	<4.0	<1.2
Solo medio	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

Resumen. Las células postparto pueden estimular a tanto las células endoteliales de la vena umbilical humana como de la arteria coronaria para formar redes en un ensayo Matrigel™ in vitro. Este efecto es similar a las

de factores angiogénicos conocidos en este sistema de ensayo, sugiriendo que las células postparto son útiles para estimular la angiogénesis in vivo

Depósito Biológico de Células Derivadas del Postparto y Cultivos

5 Consistentes con la descripción detallada y los ejemplos escritos proporcionados en la presente, los ejemplo de células derivadas del cordón umbilical de la invención se depositaron en el American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) el 10 de Junio del 2004, y se les asignó los Números de Acceso ATCC siguientes: 10 (1) a la cepa de designación UMB 022803 (P7) se le asignó el N° de Acceso PTA-6067; y (2) a la cepa de designación UMB 022803 (P17) se le asignó el N° de Acceso PTA-6068.

15 Como con las células derivadas del cordón umbilical, los ejemplos de células derivadas de la placenta de la invención también se depositaron con la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se les asignaron los Números de Acceso ATCC siguientes: (1) cepa de designación PLA 071003 (P8) se depositó el 15 de Junio del 2004 y se le asignó el N° de Acceso PTA-6074; (2) cepa de designación PLA 071003 (P11) se depositó el 15 de Junio del 2004 y se le asignó N° de Acceso PTA-6075; y (3) cepa de designación PLA 071003 (P16) se depositó el 16 de Junio del 2004 y se le asignó el N° de Acceso PTA-6079.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> ETHICON, INCORPORATED
- <120> CELULAS DERIVADAS DEL POSTPARTO PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD DEL CORAZON Y DEL SISTEMA CIRCULATORIO
- 25 <130> P055850EP
- <150> EP 04777287.6
- 30 <151> 2004-06-25
- <150> PCT/US2004/020957
- <151> 2004-06-25
- 35 <150> US 60/483264
- <151> 2003-06-27
- <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- 45 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
- 50 <400> 1
- gagaaatcca aagagcaaat gg 22
- <210> 2
- <211> 21
- 55 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
- 60 <400> 2
- agaatggaaa actggaatag g 21
- <210> 3
- 65 <211> 20
- <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 5
 <400> 3
 tcttcgatgc ttcggattcc 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 15
 <400> 4
 gaattctcgg aatctctggt g 21
 20
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 30
 <400> 5
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 40
 <400> 6
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 50
 <400> 7
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético
 60
 <400> 8
 cttcaaaaac ttctccacaa cc 22
 <210> 9
 <211> 17

ES 2 550 267 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 9
cccacgccac gctctcc 17

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

15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

20 <400> 10
tcctgtcagt tgggtctcc 19

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una población homogénea de células humanas derivadas del tejido del cordón umbilical, para su uso en el tratamiento de una enfermedad del corazón o del sistema circulatorio, en la que dicha población de células se puede obtener aislando el tejido del cordón umbilical humano libre de sangre en presencia de metaloproteasa, proteasa neutra y actividades enzimáticas mucolíticas, y en la que dicha población de células es capaz de auto-renovarse y expandirse en cultivo, tiene el potencial para diferenciarse en células u otros fenotipos y en la que la población de células:
- 10 a) produce cada uno de CD 10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como se detectan por citometría de flujo; y
b) no produce ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR,DP,DQ, como se detectan por citometría de flujo.
- 15 **2.** La población homogénea de células para el uso de la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad es una cardiomiopatía.
- 3.** La población homogénea de células para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que las células mantienen un cariotipo normal con los pases.
- 20 **4.** La población homogénea de células de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que la cardiomiopatía es idiopática.
- 5.** La población homogénea de células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la que la cardiomiopatía es cardiomiopatía isquémica o cardiomiopatía no isquémica.
- 25 **6.** La población homogénea de células para el uso de la reivindicación 5, en la que la cardiomiopatía es una cardiomiopatía no isquémica seleccionada de cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertrófica y cardiomiopatía restrictiva.
- 30 **7.** La población homogénea de células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha enfermedad del corazón o del sistema circulatorio es infarto de miocardio.
- 8.** La población homogénea de células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se obtienen aislándolas en presencia de actividades de hialuronidasa, colagenasa y dispasa.
- 35 **9.** La población celular para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se administran con una población de otro tipo de células.
- 10.** La población celular para el uso de la reivindicación 9, en la que los otros tipos de células son mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, cardiomiocitos, angioblastos o hemangioblastos, o progenitores de mioblastos, miocitos, cardiomioblastos, angioblastos, hemangioblastos o cardiomiocitos.
- 40 **11.** La población celular para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se administran en conjunción con otra molécula biológicamente activa, en la que la molécula biológicamente activa se administra en secuencia con, o se coadministra con las células.
- 45 **12.** La población celular para el uso de la reivindicación 11, en la que la molécula biológicamente activa es un agente antitrombogénico, agente anti-apoptótico o agente anti-inflamatorio.
- 50 **13.** La población celular para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se siembran sobre un supercántigo tridimensional antes del implante.

55

60

65