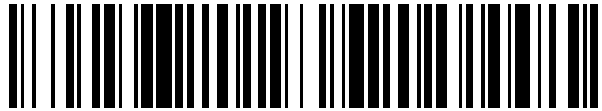


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 732**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009 E 09771468 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2379700**

54 Título: **Medio acondicionado y métodos para hacer el mismo**

30 Prioridad:

19.12.2008 US 339872

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

23.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARMON, ALEXANDER M. y
ANG, ABEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 551 732 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).

MEDIO ACONDICIONADO Y MÉTODOS PARA HACER EL MISMO**Descripción****5 Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de medio acondicionado y métodos para hacer el mismo. Específicamente, la invención se refiere a un método para preparar un medio acondicionado con suero reducido a partir de células derivadas de tejido de cordón umbilical.

10

Antecedentes de la invención

El uso potencial de células madre mesenquimales (CMM) como una forma de terapia en varias enfermedades se ha estudiado extensamente. Sin embargo, hay un creciente número de evidencias que sugieren que las propiedades beneficiosas de CMM pueden ejercerse a través de un efecto paracrino. Se descubrió lo los medios en los que se cultivan CMM estaban enriquecidos con factores tróficos y citoquinas secretadas por las células. Esto ha generado numerosos estudios que utilizan el medio acondicionado por CMM cultivadas en varios modelos de enfermedades de lesión cardíaca, pulmonar y renal así como en muchos otros.

15

20

Se descubrió que las células derivadas postparto (CDPP) y células derivadas del tejido de cordón umbilical (CTU), como CMM, secretan cantidades significativas de factores tróficos y citoquinas. Así, se necesitan procesos estables y expansibles para fabricar medios acondicionados por CDPP y CTU.

25

WO 2006/071794 desvela células postparto derivadas de tejido de cordón umbilical, y métodos para hacer y usar dichas células postparto. WO 2006/071778 desvela el tratamiento de enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados usando células derivadas postparto. WO 2005/001076 desvela células postparto derivadas de tejido de placenta, y métodos de hacer y usar dichas células postparto. <http://tools.invitrogen.com> desvela la adaptación de cultivos celulares a un medio libre de suero.

30

Resumen de la invención

La invención proporciona un método para preparar un medio acondicionado, comprendiendo el método: sembrar una célula derivada de tejido de cordón umbilical humano (CTU) en un cultivo de gota microtransportadora; reducir el contenido de suero del medio de cultivo en una o más etapas incrementales; transferir la CTU del cultivo con contenido reducido de suero a un medio basal libre de suero; cultivar la CTU en el medio basal libre de suero durante no más de 24 horas; y aislar la CTU del medio basal libre de suero dejando un medio acondicionado, donde las proteínas de suero bovino en el medio acondicionado están presentes en una cantidad por debajo del límite detectable de SDS-PAGE y/o ensayo de transferencia Western.

35

40

La CTU se cultiva en el medio basal libre de suero durante hasta 24 horas. En otras realizaciones, el medio acondicionado se filtra, usando un filtro de aproximadamente 22 micrones. En ciertas realizaciones, el medio acondicionado se concentra como con una membrana límite; un ejemplo podría ser una membrana límite de aproximadamente 5 kDa.

45

En otras realizaciones, la reducción del contenido de suero incluye la retirada de CTU del medio de cultivo. En otras realizaciones, la retirada incluye la reducción de contenido de suero del medio de cultivo en incrementos, tal como en incrementos de aproximadamente 5% a aproximadamente 60% y/o incrementos de aproximadamente 50%. En ciertas realizaciones, la CTU se cultiva durante aproximadamente 1 a 3 pasos en cada incremento o durante aproximadamente 2 pasos en cada incremento. El medio de cultivo puede ser un cultivo estático. Ciertas realizaciones pueden incluir cultivar preliminarmente CTU en un medio de cultivo estándar y aislar la CTU del medio de cultivo estándar antes de la siembra.

50

En algunas realizaciones de un método, un medio acondicionado se prepara proporcionando una CTU en un medio de cultivo; reduciendo el contenido de suero del medio de cultivo en una o más etapas incrementales; transfiriendo la CTU de medio de cultivo con contenido reducido de suero a un medio basal libre de suero cuando el contenido de suero alcanza un nivel predeterminado; cultivando la CTU en el medio basal libre de suero durante no más de 24 horas; y aislando la CTU del medio basal libre de suero dejando un medio acondicionado.

55

60

En ciertas realizaciones, la transferencia comprende la reducción de CTU del medio de cultivo o la sustitución del medio de cultivo con suero reducido por el medio basal libre de suero. El medio acondicionado puede filtrarse y concentrarse.

65

En otras realizaciones, un medio acondicionado se genera sembrando una CTU en un medio de cultivo, donde el contenido de suero del medio de cultivo se reduce antes de transferir la CTU a un medio basal libre de suero, y donde la CTU después se aísla del medio basal libre de suero dejando un medio acondicionado. El medio acondicionado puede filtrarse y concentrarse.

Se entenderán otras características y ventajas de la invención por referencia a la descripción detallada y ejemplos que siguen.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra los resultados del Ejemplo 2.

La Figura 2 muestra los resultados del Ejemplo 3

10

Descripción detallada

15 En la siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas se hace referencia a los dibujos acompañantes que forman una parte de la misma. Estas realizaciones se describen con suficiente detalle para permitir a aquellos expertos en la técnica practicar la invención, y se entenderá que pueden utilizarse otras realizaciones y que pueden hacerse cambios estructuras, mecánicos, eléctricos y químicos lógicos si partir del alcance de la invención. Para evitar detalles innecesarios para permitir a aquellos expertos en la técnica practicar las realizaciones aquí descritas, la descripción puede omitir cierta información conocida por aquellos expertos en la técnica. La siguiente descripción detallada, por lo tanto, no debe tomarse en un sentido limitativo, y el alcance de las realizaciones ilustrativas está únicamente definido por las reivindicaciones adjuntas.

20

Para aclarar mejor la invención, se proporcionan las siguientes definiciones.

25 Células madre son células indiferenciadas definidas por la habilidad de una célula sencilla para autorenovarse y para diferenciarse para producir células progenie, incluyendo células progenitoras auto-renovables, progenitoras no renovables y terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su habilidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de varios linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante, y para contribuir sustancialmente a la mayoría, sino a todos, los tejidos después de inyección en blastocitos.

30

35 Las células madre se clasifican de acuerdo con su potencial de desarrollo como: (1) *totipotente*; (2) *pluripotente*; (3) *multipotente*; (4) *oligopotente*; y (5) *unipotente*. Las células topipotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. 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 órgano, tejido o sistema fisiológico particular. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (CMH) pueden producir progenie que incluye CMH (auto-renovación), progenitores *oligopotentes* restringidos por célula sanguínea, y todos los tipos y elementos celulares (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 celulares que las células madre multipotentes. Las células que son *unipotentes* son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

40

45 Las células madre también se categorizan en base a la fuente de la que se obtienen. Una célula madre adulta es generalmente una célula multipotente indiferenciada encontrada en tejido que comprende múltiples tipos de célula diferenciada. La célula madre adulta puede renovarse por sí sola. Bajo circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir los tipos de células especializados del tejido del que se originan, y posiblemente otros tipos de tejido. Una *célula madre embrionaria* es una célula pluripotente de la masa celular interna de un embrión en fase blastocisto. Una célula madre *fetal* es la 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 rápida proliferación y el potencial para diferenciación en muchos linajes celulares. Las células madre postparto pueden derivarse de sangre (por ejemplo, como aquellas obtenidas de sangre del cordón umbilical) o no derivarse de sangre (por ejemplo, como las obtenidas de tejidos sin sangre del cordón umbilical y placenta).

50

55 La *diferenciación* es el proceso por el que una célula no especializada (“independiente”) o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula de nervio o una célula de músculo, por ejemplo. Una célula *diferenciada* es aquella que ha tomado una o más posiciones especializadas (“comprometida”) en el linaje de una célula. El término *comprometido/a*, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha seguido en la secuencia de diferenciación hasta un punto donde, bajo circunstancias normales, continuará hasta diferenciarse en un tipo específico de célula o un subconjunto de tipos de células, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo diferente de célula o revertir a un tipo de célula menos diferenciado. La *desdiferenciación* se refiere al proceso por el que una célula revierte a una posición menos especializada (o comprometida) en el linaje de una célula. Como aquí se usa, el *linaje* de una célula define la herencia de una célula, esto es, de qué célula viene y a qué célula puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula en un plan hereditario de desarrollo y diferenciación.

60

65

En un sentido amplio, una *célula progenitora* es una célula que tiene la capacidad para crear progenies que están más diferenciados que ella misma, y aún mantiene la capacidad para reponer el grupo de progenitores. Por esta definición, las células madre por sí misma son células progenitoras, ya que son los precursores más inmediatos para células finalmente diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, como se describe con más detalle más abajo, puede usarse esta definición amplia de *célula progenitora*. En un sentido más limitado, una célula progenitora a menudo se define como una célula que está intermedia en la secuencia de diferenciación, esto es, surge de una célula madre y es intermedia en la producción de un tipo de célula madura o subconjunto de tipos de células maduras. Este tipo de célula progenitora generalmente no es capaz de renovarse por sí misma. Por consiguiente, si aquí se hace referencia a este tipo de célula, se hará referencia a una *célula progenitora no renovable* o un *progenitor intermedio* o *célula precursora*.

Como aquí se usa, la expresión se diferencia en un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico, se refiere a una célula que se compromete en un linaje específico mesodérmico, ectodérmico o endodérmico, respectivamente. Ejemplos de células que se diferencia en un linaje mesodérmico o dan lugar a células mesodérmicas específicas incluyen, aunque no se limitan a, células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, hemangiogénicas, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas o estromales. Ejemplos de células que se diferencia en linaje ectodérmico incluyen, aunque no se limitan a, células epidérmicas, células neurogénicas y células neurogliaogénicas. Ejemplos de células que se diferencian en linaje endodérmico incluyen, aunque no se limitan a, células pleurogénicas, células hepatogénicas, células que dan lugar al revestimiento del intestino y células que dan lugar a células pancreáticas y esplanológicas.

Las células son más específicamente *células derivadas del ombligo* o *células derivadas del cordón umbilical* (CDC) o células derivadas de tejido de cordón umbilical (CTU). Además, las células pueden describirse como células madre o células progenitoras, usándose éste último término en el sentido amplio. El término *derivado/a* se usa para indicar que las células se han obtenido de su fuente biológica y han crecido o de otra manera manipulado *in vitro* (por ejemplo, cultivado en un medio de cultivo para expandir la población y/o producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de células madre umbilicales y las características únicas de las células derivadas del ombligo de la presente invención se describen con más detalle más abajo.

Se usan varios términos para describir células en cultivo. El *cultivo celular* se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y que crecen bajo condición controlada ("en cultivo" o "cultivadas"). Un *cultivo celular primario* es un cultivo de células, tejidos u órganos tomadas directamente de un organismo u organismos 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, dando como resultado una mayor población de células. Cuando las células se expanden en cultivo, la velocidad de proliferación celular a veces se mide por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número. Esto es referido como *tiempo de duplicación*.

Una *línea celular* es una población de células formada por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada serie de subcultivo es referida como un *paso*. Cuando las células se subcultivan, se hace referencia a que han pasado. Una población específica de células, o una línea celular, a menudo es referida como o caracterizada por el número de veces que ha *pasado*. Por ejemplo, una población celular cultivada que ha pasado diez veces puede ser referida como un cultivo *P10*. El cultivo primario, esto es, el primer cultivo después del aislamiento de células de tejido, es designado P0. Después del primer subcultivo, las células son descritas como un cultivo secundario (P1 o paso 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o paso 2) y etcétera. Aquellos expertos en la técnica entenderán que puede haber muchas duplicaciones de población durante el periodo del paso; por lo tanto el número de duplicaciones de población de un cultivo es mayor que el número del paso. La expansión de células (esto es, el número de duplicaciones de población) durante el periodo entre pasos depende de muchos factores, incluyendo aunque sin limitar la densidad de siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento, y tiempo entre pasos.

Un medio acondicionado es un medio en el que una célula o población específica de células se ha cultivado y después se ha retirado. Cuando las células se cultivan en un medio, secretan factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, aunque no se limitan a, hormonas, citoquinas, matriz extracelular (MEC), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado.

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

Cuando se hace referencia a células vertebradas cultivadas, el término senescencia (también senescencia replicativa o senescencia celular) se refiere a una propiedad atribuible a cultivos celulares finitos; concretamente, su inhabilidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de población (algunas veces referido como límite de Hayflick). Aunque la senescencia celular se describió por primera vez usando células de tipo fibroblasto, la mayoría de los tipos de célula humana normales que pueden crecer satisfactoriamente en cultivo experimentan

senescencia. La vida útil in vitro de diferentes tipos de células varia, pero la vida útil máxima es típicamente inferior a 100 duplicaciones de población (éste es el número de duplicaciones para todas las células en el cultivo para convertirse en senescentes y así dar lugar al cultivo incapaz de dividirse). La senescencia no depende del tipo cronológico, sino que se mide por número de divisiones celulares, o duplicaciones de población que el cultivo haya experimentado. Así, las células que se hacen quiescentes eliminando los factores esenciales de crecimiento son capaces de continuar creciendo y dividiéndose cuando los factores de crecimiento se vuelven a introducir, y a partir de entonces realizan el mismo número de duplicaciones ya que células equivalentes crecen continuamente. Similarmente, 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 que se mantienen no congeladas en el cultivo. Las células senescentes no son células muertas o en extinción; son realmente resistentes a muerte celular programada (apoptosis) y se han mantenido en su estado no divisorio durante un tiempo tan largo como tres años. Estas células son mucho más vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. Aún no se ha descubierto que el estado no divisorio de células senescentes sea reversible mediante ningún agente biológico, químico o viral.

Como aquí se usa, el término *medio de cultivo* generalmente se refiere a un medio suficiente para cultivar células. En particular, un medio preferente en el presente para cultivar las células de la invención comprende Medio Esencial Modificado por Dulbecco (MEMD). Particularmente MEDM-bajo en glucosa (MEDM-BG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El MEDM-BG está preferentemente complementado con suero, más preferentemente suero fetal bovino o suero humano. Típicamente, se añade 15% (v/v) de suero fetal bovino (por ejemplo, suero fetal bovino definido, Hyclone, Logan UT), junto con antibióticos/antimicóticos ((preferentemente 100 Unidad/milímetro penicilina, 100 miligramos/mililitro estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)) y 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). En algunos casos se usan medios de cultivo diferentes, o se proporcionan complementos diferentes, y estos se indican normalmente en el texto como complementos al medio de cultivo. En ciertos medios químicamente definidos las células pueden crecer sin suero presente. En tales casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que pueden añadirse al medio para soportar o mantener las células. Los factores preferentes en el presente que se añadirán para crecimiento en medios libres de suero incluyen un o más de bFGF, EGF, IGF-I y PDGF. En más realizaciones preferentes, dos, tres o los cuatro factores se añaden al medio libre de suero o químicamente definido. 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, los términos *condiciones de crecimiento estándar*, como aquí se usan, se refieren al cultivo de células a 37 °C, en una atmósfera estándar que comprende 5% CO₂. La humedad relativa se mantiene en aproximadamente 100%. Mientras las condiciones anteriores son útiles para el cultivo, se entenderá que tales condiciones son capaces de variar por parte del experto en la técnica que apreciará las opciones disponibles en la técnica para cultivar células.

Los términos *cantidad efectiva* se refieren a una concentración o cantidad de un compuesto, material o composición, como aquí se describe, que es efectiva para conseguir un resultado biológico particular. Tales resultados incluyen, aunque no se limitan a, la regeneración, reparación o mejora de tejido esquelético, la mejora de flujo sanguíneo y/o la estimulación y/o soporte de angiogénesis en pacientes de isquemia periférica. Tal actividad efectiva puede conseguirse, por ejemplo, administrando las células y/o composición de la presente invención a pacientes de isquémica periférica. Con respecto a una CTU administrada a un paciente *in vivo*, una cantidad efectiva puede oscilar entre como mínimo varios cientos y cómo máximo varios millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad efectiva puede oscilar entre 10³-10¹¹, más específicamente al menos aproximadamente 10⁴ células. Se apreciará que el número de células que se administrarán variarán dependiendo de las características del trastorno a tratar, incluyendo, aunque sin limitar, el tamaño o volumen/área de superficie total a tratar, y la proximidad del sitio de administración en el lugar de la región a tratar, entre otros factores familiares al biólogo médico.

Los términos *tratar, tratando o tratamiento* se refiere a cualquier éxito o indicio de éxito en la disminución o mejora de una lesión, patología o condición, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión o disminución de síntomas o el hecho de que la lesión, patología o condición sea más tolerable para el paciente, reduciendo la velocidad de degeneración o decline, haciendo que el punto final de degeneración sea menos debilitadora, mejorando el bienestar físico o mental del paciente o prolongando la duración de supervivencia. El tratamiento o mejora de síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos, incluyendo los resultados de un examen físico, examen neurológico y/o evaluaciones psiquiátricas.

Los términos *periodo (o tiempo) efectivo y condiciones efectivas* se refieren a un periodo de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos in vitro), necesarios o preferentes para un agente o composición farmacéutica para conseguir su resultado planeado.

Los términos *paciente o sujeto* aquí se usan intercambiamente, y se refieren a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente humanos, que se tratan con las composiciones farmacéuticas o terapéuticas o de acuerdo con los métodos aquí descritos.

Los términos *transportador o medio farmacéuticamente aceptable*, que pueden usarse intercambiamente con los términos *transportador o medio biológicamente compatible*, se refieren a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosis que no solamente son compatibles con las células y otros agentes que se administrarán terapéuticamente, sino que también son adecuados, dentro del alcance del criterio médico sensato, para su uso en contacto con los tejidos de seres humano o animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otra complicación proporcional a una proporción razonable beneficio/riesgo. Como se describe aquí con más detalle, los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la presente invención incluyen líquidos, semi-sólidos (por ejemplo, geles) y materiales sólidos (por ejemplo, andamios celulares y matrices, láminas de tubos y otros materiales conocidos en la técnica y descritos aquí con más detalle). Estos materiales semi-sólidos y sólidos pueden estar diseñados para resistir degradación en el cuerpo (no biodegradable) o pueden estar diseñados para degradarse en el cuerpo (biodegradable, bioerosionable). Un material biodegradable puede ser además bioreabsorbible o bioabsorbible, esto es, puede disolverse y absorberse en fluidos corporales (implantes solubles en agua son un ejemplo), o degradarse y por último eliminarse del cuerpo, bien mediante conversión en otros materiales o rotura y eliminación a través de rutas naturales. La velocidad de degradación puede variar de acuerdo con la velocidad deseada de liberación una vez implantado en el cuerpo. La matriz deseablemente actúa como un andamio temporal hasta que se sustituye por músculo esquelético que acaba de crecer, pericitos, músculo liso vascular o tejido endotelial vascular. Por lo tanto, en una realización, la matriz proporciona liberación prolongada de otros agentes usados junto con las células y puede proporcionar una estructura para desarrollar crecimiento de tejido en el paciente. En otras realizaciones, la matriz simplemente proporciona un andamio temporal para el tejido en desarrollo. La matriz puede estar en forma particulada (macropartículas superiores a 10 micrones de diámetro o micropartículas inferiores a 10 micrones de diámetro) pueden tener la forma de un implante tridimensional estructuralmente estable (por ejemplo, un andamio). El implante puede ser, por ejemplo, un cubo, cilindro, tubo, bloque, película, lámina o una forma anatómica apropiada.

Aquí se usan varios términos con respecto a trasplante celular o de tejido. Los términos *transferencia autóloga*, *trasplante autólogo*, *autoinjerto* y similares se refieren a trasplante donde el donante del trasplante es también el receptor del trasplante. Los términos *transferencia alogénica*, *trasplante alogénico*, *aloinjerto* y similares se refieren a trasplante donde el donante del trasplante es de la misma especie que el receptor del trasplante, pero no es el receptor. Un trasplante de célula en el que las células del donante se han combinado histocompatiblemente con un receptor es referido a veces como una *transferencia singénica*. Los términos *transferencia xenogénica*, *trasplante xenogénico*, *xenoinjerto* y similares se refieren a trasplante donde el donante del trasplante es de una especie diferente al receptor del trasplante.

Las células, poblaciones celulares y preparaciones que incluyen lisados celulares y similares se describen con detalle en las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 2050054098 y 20050058631.

El medio acondicionado de una CTU cultivada puede usarse *in vitro* o *in vivo*. El uso de la CTU u otro medio acondicionado puede permitir los factores tróficos beneficiosos secretados por la CTU que se usarán alogénicamente en un paciente sin introducir células intactas que pueden provocar rechazo u otras respuestas inmunológicas adversas. El medio acondicionado se prepara cultivando células en un medio de cultivo y después retirando las células del medio.

El medio acondicionado preparar a partir de poblaciones de células puede usarse como esta, más concentrado, por ejemplo, mediante ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables como los conocidos en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como compuestos biológicos, por ejemplo composiciones de proteínas farmacéuticamente activas. El medio acondicionado puede usarse *in vitro* o *in vivo*, solo o combinado con células vivas autólogas o singénicas, por ejemplo. El medio acondicionado, si se introduce *in vivo*, puede introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o remotamente para proporcionar el crecimiento celular o los factores tróficos necesarios a un paciente.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, se proporciona un proceso estable y expansible para fabricar medio acondicionado de CTU con suero reducido. En resumen, el método incluye el cultivo de una CTU bajo condiciones de suero reducido. Posteriormente la CTU se lava y cultiva en medio basal libre de suero. Después de aproximadamente 24 horas, el medio acondicionado se recoge, filtra y concentra mediante el uso de una membrana límite de aproximadamente 5 kDa o de similar peso molecular.

Una célula derivada de tejido umbilical mamífero (CTU) puede aislarse siguiendo los métodos descritos en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20050054098 y N° 20050058631. En algunas realizaciones de la divulgación, la célula aislada puede después crecer en cultivo estático siguiendo los métodos descritos en las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20050054098 y N° 20050058631 hasta el momento en el que se haya preparado el medio acondicionado.

El medio acondicionado puede prepararse en cualquier duplicación de población de las células. En otra realización, el medio acondicionado se prepara desde aproximadamente la duplicación de población 20 a

aproximadamente duplicación de población 40. En otra realización más, el medio acondicionado se prepara en aproximadamente duplicación de población 30.

5 El medio acondicionado se prepara primera aislando las células de un medio estándar de cultivo en el que las células crecen. En algunas realizaciones de la divulgación, las células después se siembran en cultivo estático en cualquier densidad de siembra. En una realización las células se siembran en una densidad de desde aproximadamente 1.000 células por cm cuadrado a aproximadamente 10.000 células por cm cuadrado. En otra realización más, las células se siembran en una densidad de aproximadamente 5.000 células por cm cuadrado.

10 Después de la siembra de células, en aproximadamente 5.000 células/cm², las células se retiran del medio estándar de cultivo que tiene un contenido de suero bovino de aproximadamente 15% reduciendo el contenido de suero en el medio en incrementos hasta que las células solamente se cultivan en medio basal. El suero bovino puede reducirse en incrementos de aproximadamente 5% a aproximadamente 60%. En una realización, el suero bovino se reduce en incrementos de aproximadamente 50% (esto es, 15%, 7,5%, 3,25% y 0% de suero bovino en el medio). Se deja que las células crezcan en cada medio de suero reducido durante aproximadamente 1 a 15 aproximadamente 3 pasos. En una realización, se deja que las células crezcan en cada medio de suero reducido durante aproximadamente 2 pasos. Antes de añadir el medio de suero bovino reducido final, las células se siembran en aproximadamente 10.000 células/cm². Cuando se añade el medio basal (0% suero bovino) a las células, las células se mantienen el medio durante no más de 24 horas.

20 El medio acondicionado después se aísla de las células y se filtra usando un filtro de aproximadamente 22 micrones o similar. El filtro pueden estar esterilizado o no. El medio acondicionado filtrado después se concentra usando un filtro límite de aproximadamente 5K o un dispositivo similar. El filtrado se descarta mientras se recoge el medio acondicionado concentrado retenido en el filtro.

25 En otra realización, la CTU aislada se cultiva en cultivo de gota microtransportadora siguiendo los métodos descritos en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20080166328 (Véase Ejemplos) hasta el momento en el que se haya preparado el medio acondicionado.

30 El medio acondicionado puede prepararse en cualquier duplicación de población de las células. En otra realización, el medio acondicionado se prepara desde aproximadamente la duplicación de población 20 a aproximadamente duplicación de población 40. En otra realización más, el medio acondicionado se prepara en aproximadamente duplicación de población 30.

35 Después de la siembra de células, en aproximadamente 10.000 células/cm² en cultivo de gota microtransportadora, se añade el medio estándar de cultivo a las células y se cultiva durante aproximadamente 2 días. Posteriormente, el medio estándar de cultivo se retira y se sustituye por medio basal. Alternativamente, el cultivo de gota microtransportadora puede retirarse del medio estándar de cultivo de manera similar al cultivo estático. Cuando se añade el medio basal (0% suero bovino) a las células, las células se mantienen el medio 40 durante no más de 24 horas.

45 El medio acondicionado después se aísla de las células y se filtra usando un filtro de aproximadamente 22 micrones o similar. El filtro pueden estar esterilizado o no. El medio acondicionado filtrado después se concentra usando un filtro límite de aproximadamente 5K o un dispositivo similar. El filtrado se descarta mientras se recoge el medio acondicionado concentrado retenido en el filtro.

50 El medio acondicionado convencional, aunque es rico en proteínas del tipo de célula cultivada, también es rico en proteínas del suero bovino presente en el medio. El medio acondicionado preparado mediante los métodos anteriormente descritos está concentrado en proteínas humanas. Las proteínas bovinas están presentes en una cantidad que está por debajo de la detección de métodos estándares de caracterización, tales como SDS-PAGE y análisis de de transferencia Western. Las cantidades de detección bajas de proteína bovina en el medio acondicionado son ventajosas debido al posterior riesgo reducido de transmisión de enfermedades y virus bovinos así como riesgo reducido de reacción xenoinmune.

55 El medio acondicionado preparado como aquí se describe es útil en lugar de medio acondicionado convencional.

60 Los siguientes ejemplos describen la invención con más detalle. Estos ejemplos pretenden además ilustrar, no limitar, aspectos de la invención aquí descrita.

EJEMPLO 1

Factores que afectan a la generación de medio acondicionado a partir de células cultivadas en matraces estáticos

65

El fin de este estudio fue determinar si la variación de diferentes factores (volumen del medio, densidad de siembra de células, duración del cultivo, duplicación de población de células, estado proliferativo de células y retirada de suero) en la generación de medio acondicionado afectaría a la cantidad de proteínas así como al perfil de expresión de proteína en el medio acondicionado.

Como el protocolo general, al menos una CTU (aislamiento y caracterización de una CTU puede encontrarse en los Ejemplos 5-14) se sembró en 10.000 células/cm² (a menos que se establezca de otra manera) en matraces T-225 cm² (Corning Inc, Corning NY) en medio de cultivo (MEMD-bajo en glucosa (Gibco, Carlsbad, Ca), 15% (v/v) suero bovino fetal irradiado con gamma (Hyclone, Logan, UT), 4 mM Glutamax (Gibco, Carlsbad, Ca), 50 UI/mL Penicilina (Gibco, Carlsbad, CA) y 50 µg/mL Estreptomina (Gibco, Carlsbad, Ca). Después de 48 horas, el medio gastado se aspiró y el matraz se lavó dos veces con 10 mL D-PBS (Gibco, Carlsbad, CA) cada vez. Durante cada lavado, el matraz se descargó dos veces con una pipeta serológica. Después se añadieron 20 mL (a menos que se establezca de otra manera) de medio basal (MEMD-bajo en glucosa (Gibco, Carlsbad, Ca) y 4 mM Glutamax (Gibco, Carlsbad, Ca)) y las células se cultivaron durante otras 24 horas (a menos que se establezca de otra manera). Después de 24 horas, el medio acondicionado se recogió y filtró con un matraz filtro de 0,22 µm (Corning, Corning NY) y posteriormente se concentró en un tubo filtro centrífugo (Centricon Plus-70, Millipore, Billerica, Ma) con un límite de peso molecular de 5 kDa. Las muestras giraron a 3200 g durante 30 minutos a 20-25 °C en estos tubos filtros centrífugos. Las fracciones retenidas se recogieron mediante una centrifugación invertida de los tubos filtros a 913 g durante 5 minutos a 20-25 °C. El medio concentrado resultante se consideró como el producto final.

Para un estudio de volumen de medio, las células se cultivaron durante 48 horas antes de cambiar a tres volúmenes diferentes de medio basal (10, 25 y 40 mL). Para el estudio de densidad de siembra de células, las células se sembraron en 1.000, 5.000 y 10.000 células/cm² durante 48 horas antes de cambiar al medio basal. Para la duración del estudio de cultivo, las células se cultivaron en medio basal durante 24, 48 y 72 horas antes de cosechar el medio acondicionado. Para la duplicación de población del estudio de células, las células se cultivaron en diferentes duplicaciones de población antes de cambiar al medio basal. La duplicación final de población de células en el momento de la recogida de medio fue 20, 30 y 44. Se usaron dos grupos para comparar el efecto del estado proliferativo de células. El primer grupo consistió en células proliferativas que se sembraron en 5.000 células/cm² y crecieron en medio de cultivo estándar antes de cambiar al medio basal. El segundo grupo consistió en células no proliferativas que se sembraron en 10.000 células/cm² y crecieron en medio que contenía 2% suero antes de cambiar al medio basal. El estudio de retirada de suero tuvo dos grupos. El primer grupo consistió en células que se retiraron durante 2 pasos consecutivos de medio que contenía 15% a 7,5% y finalmente 3,25 con una densidad constante de siembra de 5.000 células/cm² excepto para el último paso que se sembró en 10.000 células/cm² 48 horas antes de cambiar al medio basal. El segundo grupo siguió el protocolo general.

Estimación de proteínas. La concentración total de proteínas en cada muestra de medio concentrado se estimó con el Ensayo Bradford. El ensayo Quick Start Bradford 1 x Reactivo Tinte y el set estándar de albúmina bobina Quick Start se obtuvieron en Bio-Rad (Hercules, Ca). Las muestras se diluyeron apropiadamente con agua Milli-Q para caer dentro del rango lineal de la curva estándar y se mantuvieron en duplicados. La mezcla de muestra y tinte Bradford se agitó brevemente y se incubó a oscuras durante 5 minutos antes de la lectura en una densidad óptica (DO) de 595 nm en un espectrofotómetro (Molecular Devices, SpectraMax 190 con software Softmax Pro v 4.0). La lectura de DO de las muestras se convirtió en concentración de proteína en base a la curva estándar generada a partir de las lecturas DO de los estándares BSA. La concentración de proteínas se convirtió en cantidad total de proteínas presente multiplicando la concentración por el volumen de fracción retenida recogida después de la etapa de concentración.

SDS-PAGE. Se prepararon 5 µg de cada muestra en un tampón de muestra Novex® Tris-Glicina SDS (2X) (Invitrogen, Carlsbad, Ca) con 5% (v/v) β-mercaptoetanol. Después de mezclar, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo antes de añadirse al pozo. Para la separación de proteína, se usó un gel y sistema Novex® Tris-Glicina preformado 4-20% (Invitrogen, Carlsbad, Ca) con tampón de funcionamiento Novex® Tris-Glicina (Invitrogen, Carlsbad, Ca) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los geles se tiñeron con tinte seguro SIMPLYBLUE y se secaron usando el sistema de secado mini-gel DRYEASE (Invitrogen, Carlsbad, Ca) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

TABLA 1-1

Cantidad de proteína total en el producto final de medio acondicionado	
Factor	Cantidad media de proteína (mg)
5	1. Volumen
	a) 10 mL
	b) 25 mL
	c) 40 mL
10	2. Densidad de siembra celular
	a) 1.000 células/cm ²
	b) 5.000 células/cm ²
	c) 10.000 células/cm ²
15	3. Duración de cultivo
	a) 24 horas
	b) 48 horas
	c) 72 horas
20	4. Duplicaciones de población de células
	a) DP20
	b) DP35
	c) DP44
25	5. Estado de proliferación de células
	a) Proliferativo
	b) No proliferativo
	6. Retirada de suero
	a) No retirado
	b) Retirado

TABLA 1-2

Perfil de proteína del producto final de medio acondicionado	
Factor	Patrón de bandas de proteína
30	1. Volumen
35	2. Densidad de siembra de células
40	3. Duración de cultivo
	4. Duplicación de población de células
	5. Estado de proliferación de células
	6. Retirada de suero

Entre los factores estudiados, solamente la densidad de siembra inicial y la duración del cultivo afectaron al contenido total de proteínas con un creciente contenido de proteínas junto con una creciente densidad celular y duración del cultivo. El patrón de bandas de proteínas fue muy consistente entre muestra excepto para las muestras en el estudio de densidad de siembra de células donde las densidades más bajas de siembra dieron como resultado una pérdida de patrón de bandas de proteínas.

EJEMPLO 2

Proteínas con suero reducido en medio acondicionado después de una etapa de reducción de suero

Durante la producción de medio acondicionado, la presencia de proteínas SFB en el producto final es inevitable. Nuestros descubrimientos muestran una cantidad sustancial de proteínas SFB en el producto final. La cantidad de proteína SFB en el producto final se reduce sustancialmente por medio de una etapa de reducción de suero antes de la generación de medio acondicionado.

Generación de medio acondicionado. Hubo tres grupos de estudio. En el primer grupo, se sembraron células en matraces T-225 donde se introdujeron 50 mL de medio de cultivo que contenía 15% SFB. El segundo grupo consistió en células sembradas en matraces T-225 donde se introdujeron 50 mL de medio que contenía 2% SFB. El último grupo consintió en matraces T-225 donde no se sembraron células sino que se llenaron con 50 mL de medio de cultivo que contenía 15% SFB. Después de 48 horas, el medio de cada matraz se recogió y almacenó a -80 °C. Después, los matraces se lavaron dos veces con D-PBS (10mL cada vez) y cada lavado se recogió y almacenó a -80 °C. Después se añadieron 20mL de medio basal a cada matraz y le siguió el protocolo exacto detallado en el Ejemplo 1.

Análisis de proteína. Se realizó una estimación de proteína para el medio y los lavados para determinar la cantidad de proteínas presentes; la metodología se describe en el Ejemplo 1. También se realizó un SDS-PAGE del medio acondicionado final para comparar el patrón de bandas entre grupos; la metodología se describe en el Ejemplo 1. Se usó ensayo de transferencia Western para comparar la cantidad de albúmina de suero bovino (ASB) presente en el producto final de medio acondicionado de cada grupo. Las muestras se prepararon en un tampón de muestra 2x (Invitrogen, Carlsbad, Ca) con 5% β -mercaptoetanol. Después de la mezcla, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo antes de añadirse al pozo. Para la separación de proteína, se usaron un sistema y mini gel 4-20% NOVEX prefabricado (Invitrogen). El gel se transfirió a una membrana PVDF (Invitrogen) en un sistema de transferencia de agua (Bio-Rad, Hercules, CA) usando tampón Towbin estándar con 20% metanol y 0,01% SDS. La transferencia se hizo a 100V durante 2 horas a 4 °C. Después de la transferencia la membrana se bloqueó con un tampón de bloqueo sin base de proteína (Pierce, Rockford, IL) y se incubó con anticuerpo primario durante la noche en un balancín a 4 °C. Se usó monoclonal anti-BSA de ratón (Sc-80705, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) en una dilución de 1:1000 hecha en tampón de bloqueo fresco. La membrana se lavó posteriormente 3 veces durante 5 minutos con PBST (Bio-Rad, Hercules, CA) y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón (HAF007, RnD Systems, Minneapolis, MN). El borrón después se lavó 3 veces durante 5 minutos cada vez en PBST y se incubó en sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Dura, Pierce, Rockford, IL) durante 1 minuto y después se detectó con un sistema digital de formación de imágenes (Bio-Rad, Hercules, CA).

TABLA 2-1

Concentración de proteína en los lavados y producto final de medio acondicionado	
Muestra	Concentración media de proteína (mg/mL)
1. Células + 15% FBS	
a) Medio gastado	8,125 \pm 0,0390
b) Lavado 1	0,335 \pm 0,045
c) Lavado 2	0,040 \pm 0,002
2. Células + 2% FBS	
a) Medio gastado	1,239 \pm 0,098
b) Lavado 1	0,043 \pm 0,004
c) Lavado 2	0,017 \pm 0,002
1. Sin células + 15% FBS	
a) Medio gastado	7,597
b) Lavado 1	0,303
c) Lavado 2	0,033

Véase también Figura 1

Hemos descubierto que el uso de medio que contenía 15% SFB en un matraz de cultivo estático con o sin la presencia de células da como resultado una cantidad sustancial de proteínas que se quedaron atrás en los lavados. La preocupación de si estas proteínas eran derivadas bovinas se confirmó mediante SDS-PAGE y ensayo de transferencia Western por lo que se detectó una cantidad significativa de ASB en el medio acondicionado. Sin embargo, hemos descubierto que al reducir la cantidad de suero en el medio de cultivo de 15% a 2% justo antes del cambio al medio basal, la cantidad de ASB presente en el medio acondicionado se redujo sustancialmente. Siendo la ASB la proteína de suero más abundante, podría inferirse que otras proteínas de suero también se redujeron sustancialmente.

EJEMPLO 3

Comparación de medio acondicionado hecho de matraces estáticos y matraces giratorios con método de una etapa de suero reducido

Generación de medio acondicionado de matraces giratorios. Al menos una CTU se sembró en 5.000 células/cm² en microtransportadores Hillex II (12g/L) (Solohill Engineering Inc, MI) en un matraz giratorio con deflector (Corning, Corning, NY) y se le introdujo medio de cultivo (MEMD-Bajo en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15% (v/v) suero fetal bovino irradiado con gamma (Hyclone, Logan, UT), 4 mM Glutamax (Gibco, Carlsbad, Ca), 50 UI/mL Penicilina (Gibco, Carlsbad, CA) y 50 μ g/mL Estreptomycin (Gibco, Carlsbad, Ca) con una rotación constante de 60 rpm. Después de 4 días, las células pasaron a un matraz giratorio de 500 mL reconstituyendo las células que contenían microtransportadores con microtransportadores frescos en una proporción dividida de 1:5 junto con medio de cultivo fresco. Después de 4 días, el medio gastado se aspiró y los microtransportadores se lavaron dos veces con D-PBS. El primer lavado consistió en 200 mL de PBS con una breve agitación. Después de la aspiración del primer lavado, el segundo lavado consistió en 500 mL de PBS y una incubación de 10 minutos en un agitador magnético durante 10 minutos a 60 rpm. Después de ambos lavados, a las células se les introdujo un medio de cultivo que contenía 2% SFB. Después de 24 horas los microtransportadores se lavaron de nuevo con D-PBS de acuerdo con el procedimiento exacto descrito anteriormente y se les introdujo medio basal en un volumen para la proporción de área de superficie de microtransportador de 0,09 mL/cm². Después de 24 horas, el medio

acondicionado se recogió y filtró con un matraz filtro de 0,22 μm (Corning, Corning NY) y posteriormente se concentró en un tubo filtro centrífugo (Centricon Plus-70, Millipore, Billerica, Ma) con un límite de peso molecular de 5 kDa. Las muestras giraron a 3200 g durante 30 minutos a 20-25 $^{\circ}\text{C}$ en estos tubos filtros centrífugos. Las fracciones retenidas se recogieron mediante una centrifugación invertida de los tubos filtros a 913 g durante 5 minutos a 20-25 $^{\circ}\text{C}$. El medio concentrado resultante se consideró como el producto final.

Generación de medio acondicionado de matraces estáticos. Una o más CTU se sembraron en 30.000 células/ cm^2 en T-225 cm^2 y se les introdujo medio de cultivo (MEMD-Bajo en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 2% (v/v) suero fetal bovino irradiado con gamma (Hyclone, Logan, UT), 4 mM Glutamax (Gibco, Carlsbad, Ca), 50 UI/mL Penicilina (Gibco, Carlsbad, CA) y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Estreptomina (Gibco, Carlsbad, Ca). Después de 48 horas, el medio gastado se aspiró y el matraz se lavó dos veces con 10 mL D-PBS (Gibco, Carlsbad, CA) cada vez. Durante cada lavado, el matraz se descargó dos veces con una pipeta serológica. Después se añadieron medio basal (MEMD-bajo en glucosa (Gibco, Carlsbad, Ca) y 4 mM Glutamax (Gibco, Carlsbad, Ca)) en un volumen de para la proporción de área de superficie de microtransportador de 0,09 mL/cm^2 y la células se cultivaron durante otras 24 horas (a menos que se establezca de otra manera). Después de 24 horas, el medio acondicionado se recogió y filtró con un matraz filtro de 0,22 μm (Corning, Corning NY) y posteriormente se concentró en un tubo filtro centrífugo (Centricon Plus-70, Millipore, Billerica, Ma) con un límite de peso molecular de 5 kDa. Las muestras giraron a 3200 g durante 30 minutos a 20-25 $^{\circ}\text{C}$ en estos tubos filtros centrífugos. Las fracciones retenidas se recogieron mediante una centrifugación invertida de los tubos filtros a 913 g durante 5 minutos a 20-25 $^{\circ}\text{C}$. El medio concentrado resultante se consideró como el producto final.

Determinación de densidad celular final. Después de haber sembrado el medio acondicionado, el resto de las células se lavaron con D-PBS (sin Ca y Mg) (Gibco, Carlsbad, Ca) y se sometieron a tripsinización del matraz o microtransportadores con TrypLE Select (Gibco, Carlsbad, Ca). Las células separadas se neutralizaron después en medio de cultivo completo y se contaron para números y viabilidad con un contador celular basado en el flujo (GUAVA Technologies). Una alícuota de la mezcla celular se diluye 10x con el tinte fluorescente que tiñe células muertas y después se introduce en la máquina. Se calculó y corrigió el número final de células para el área de superficie total del cultivo disponible para obtener la densidad celular final. En el caso de los microtransportadores Hillex II, 1,2 g de microtransportadores tienen un área de superficie total aproximada de 515 cm^2 .

Análisis de proteína. Se realizó una estimación de proteína para el medio y los lavados para determinar la cantidad de proteínas presentes; la metodología se describe en el Ejemplo 1. También se realizó un SDS-PAGE del medio acondicionado final para comparar el patrón de bandas entre grupos; la metodología se describe en el Ejemplo 1. Se hizo ensayo de transferencia de ASB, como el descrito en el Ejemplo 1, en el medio acondicionado.

TABLA 3-1

Cantidad de proteína en el producto final de medio acondicionado y densidad celular final		
Muestra	Proteína media	Densidad celular (células/ cm^2)
Matraz estático	0,1040 \pm 0,0335	33233
Matraz giratorio*	0,4314 \pm 0,1058	27780

*Extrapolado de valores derivados de la concentración de 70mL de medio acondicionado con la misma cantidad usada en el cultivo de matraz estático (20 mL)

Véase también Figura 2

Quando se cultivaron en matraces giratorios, la cantidad total de proteínas recuperadas en el medio acondicionado fue 4 veces más que en los frascos estáticos y la densidad celular final en matraces estáticos y giratorios fue casi comparable. La presencia de ASB en el medio acondicionado del matraz giratorio fue sustancialmente inferior en comparación con la del matraz estático.

EJEMPLO 4

Determinación de proteínas de interés presentes en el medio acondicionado mediante ELISA múltiple

Generación de medio acondicionado. Se hicieron medios acondicionados de matraces estáticos y matraces giratorios de acuerdo con métodos descritos en el Ejemplo 3.

Detección de proteínas de interés. Las muestras se diluyeron para 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con medio basal en tubos micro-centrifugadores siliconados para reducir la pérdida de proteínas mediante la adhesión y se transportador congeladas a Pierce Biotechnology, Inc, Woburn, MA para la determinación de cantidad de proteínas humanas y bovinas de interés presentes mediante ensayo múltiple SERCHLIGHT ELISA. Las proteínas de interés se midieron usando selección Proteom SEARCHLIGHT. Las selecciones proteom son ELISAs sándwich múltiples para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pozo. Las selecciones se producen localizando un patrón de 2x2, 3x3 o 4x4 de cuatro a 16 anticuerpos diferentes de captura en cada pozo de una placa de 96 pozos. Después de un procedimiento ELISA sándwich típico, la placa completa se somete a análisis de imagen para una captura de señal

quimioluminiscente generada en cada localización dentro de cada pozo de la placa. La cantidad de señal generada en cada localización es proporcional a la cantidad de proteína diana en el estándar o muestra original.

TABLA 4-1

Concentración de proteínas específicas en medio acondicionado			
Proteínas específica humana	Concentración (pg/mL)	Proteínas específica bovina	Concentración (pg/mL)
1. Matraz estático		1. Matraz estático	
a) FNDC	3755	a) IFN- γ	ND
b) FCH	56799	b) IL-1 β	ND
c) IL-6	247585	c) IL-2	ND
d) ITMP-1	27274212	d) IL-4	ND
e) ITMP-2	2003995	e) IL-6	ND
f) FCEV	885	f) TNF- α	ND
g) FCF	2440		
h) IL-8	250434		
i) MMP-7	126		
j) FCDP-AB	803		
2. Matraz giratorio		2. Matraz giratorio	
a) FNDC	4001	a) IFN- γ	ND
b) FCH	181928	b) IL-1 β	ND
c) IL-6	685722	c) IL-2	ND
d) ITMP-1	21747883	d) IL-4	ND
e) ITMP-2	21747883	e) IL-6	ND
f) FCEV	475	f) TNF- α	ND
g) FCF	103		
h) IL-8	521599		
i) MMP-7	127		
j) FCDP-AB	485		
ND – No detectable			

La concentración por medio de filtración con una membrana límite de 5 kDa demostró ser un método factible. Este proceso es expansible al uso de sistemas de filtración ATF. El análisis de contenidos de medio acondicionado reveló cantidades significativas de factores de crecimiento humano y citoquinas (BDNF, IL-8, HGF, TIMP-1, TIMP-2, VEGF, FGFb, IL-6 y MMP-7) y cantidades no detectables de proteínas bovinas (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 y TNF- α), excepto para ASB que se descubrió que estaba presente en cantidades variables dependiendo de la condición inicial de crecimiento de suero para hacer el medio acondicionado.

La presente invención no se limita a las realizaciones anteriormente descritas y ejemplificadas. Es capaz de variaciones y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 5

Aislamiento de células

Aislamiento de célula umbilical. Se obtuvieron cordones umbilicales de Intercambio de Investigación Nacional sobre la Enfermedad (IINE, Filadelfia, PA). Se obtuvieron tejidos siguiendo las entregas normales. Los protocolos de aislamiento celular se realizaron asépticamente en una cubierta de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los restos, el cordón se lavó en tampón fosfato salino (TFS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de penicilina e 100 Unidades/milímetro y estreptomina en 100 miligramos/mililitro, y anfotericina B en 25 microgramos/mililitro (Invitrogen Carlsbad, CA). Los tejidos se desasociaron mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de medio (MEMD-bajo en glucosa o MEMD-alto en glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido se picó en un pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo).

El tejido después se digirió en medio MEMD-bajo en glucosa o MEMD-alto en glucosa, conteniendo cada uno 100 Unidades/mililitro, estreptomina en 100 miligramos/mililitro y anfotericina B en 0,25 microgramos/mililitro y las enzimas de digestión. En algunos experimentos se usó una mezcla de enzima de colagenasa y dispasa ("C:D") (colagenasa (Sigma, St. Louis, MO), 500 Unidades/mililitro; y dispasa (Invitrogen), 50 Unidades/mililitro, en medio MEMD-bajo en glucosa). En otros experimentos, se usó una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:D:H = colagenasa, 500 Unidades/mililitro; dispasa 50 Unidades/mililitro; y hialuronidasa (Sigma), 5 Unidades/mililitro, en MEMD-bajo en glucosa). Los tubos cónicos que contienen 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 durante 5 minutos, el sobrenadante se aspiró. La bolita se volvió a suspender en 20 mililitros de medio de cultivo (MEMD-bajo en glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) suero fetal bovino (SFB; suero fetal bovino definido; Lot # AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina en 100 Unidades por mililitro; estreptomocina en 100 microgramos por mililitro y anfotericina B en 0,25 microgramos por mililitro; (cda uno de Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un filtro celular BD FALCON de nailon de 70 micrones (BD Biosciences, San Jose, CA). Un enjuague adicional de 5 mililitros que comprendía medio de cultivo pasó a través del filtro. La suspensión celular pasó después a través de un filtro celular de nailon de 40 micrones (BD Biosciences, San Jose, CA) y le siguió un enjuague de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

El filtrado se volvió a suspender en medio de crecimiento (volumen total 50 mililitro) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. Este proceso se repitió dos veces más.

Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y la bolita celular se volvió a suspender en 5 mililitros de medio de cultivo fresco. El número de células viables se determinó usando tinte azul de tripano. Después, las células se cultivaron bajo condiciones estándares.

Las células aisladas de tejidos del cordón umbilical se sembraron en 5.000 células/cm² en matraces T-75 cubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento. Después de dos días, el medio gastado y las células no adheridas se aspiraron del matraz. Las células después se repusieron con medio de crecimiento y crecieron hasta confluencia (aproximadamente 10 días desde el paso 0) al paso 1. En los posteriores pasos (desde el paso 1 a 2, etc.), las células alcanzaron sub-confluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pasos posteriores, las células se sembraron en 5.000 células/cm². Las células crecieron en una incubadora humidificada con 5 por ciento de dióxido de carbono a 37 °C.

Las células se aislaron de tejidos en medio MEMD-bajo en glucosa con LIBERASE (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) y hialuronidasa (5 Unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue como se ha descrito para otras digestiones de proteasa anteriormente, aunque se usó la mezcla LIBERASE/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzima C:D o C:D:H. La digestión del tejido con LIBERASE dio como resultado el aislamiento de poblaciones celulares de tejidos que se expandieron rápidamente.

Se compararon procedimientos para aislar células del cordón umbilical usando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión fueron: 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 que utilizan estas condiciones diferentes de digestión de enzimas.

Se hicieron otros intentos para aislar grupos de células del cordón umbilical mediante diferentes técnicas. En un caso, el cordón umbilical se cortó en rodajas y se lavó con medio de cultivo para desplazar los coágulos de sangre y el material gelatinoso. La mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de cultivo se recogió y centrifugó a 150 x g. La bolita se volvió a suspender y se sembró en matraces cubiertos de gelatina en medio de cultivo. De estos experimentos se aisló una población celular que rápidamente se expandió.

También se han aislado células de muestras de sangre de cordón umbilical conseguidas de IINE. El protocolo de aislamiento usado fue el de la solicitud de patente internacional PCT/US2002/029971 por Ho et al. Las muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre de cordón umbilical (IINE, Filadelfia, PA) se mezclaron con tampón de lisis (115 milimolar cloruro de amonio esterilizado con filtro, 10 milimolar bicarbonato de sodio, 0,1 milimolar EDTA amortiguado a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron en una proporción de 1:20 sangre de cordón con tampón de lisis. La suspensión celular resultante se sometió a vórtice durante 5 segundos, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 x g). La bolita celular se volvió a suspender en Medio Esencial Mínimo Completo (Gibco, Carlsbad, CA) que contenía 10 por ciento de suero fetal bovino (Hyclone, Logan UT), 4 milimolar glutamina (Mediatech Herndon, VA), penicilina en 100 Unidades por mililitro y estreptomocina en 100 microgramos por mililitro (Gibco, Carlsbad, CA). Las células que se volvieron a suspender se centrifugaron (10 minutos a 200 x g), el sobrenadante se aspiró y la bolita celular se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente matraces T75 (Corning, NY), matraces T75 cubiertos con laminina o matraces T15 cubiertos con fibronectina (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

Para determinar si las poblaciones aisladas podían aislarse bajo diferentes condiciones y expandirse bajo una variedad de condiciones después del aislamiento, las células se digirieron en medio de cultivo con o sin 0,001 por ciento (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) usando la combinación de enzima de C:D:H, de acuerdo con los procedimientos proporcionados anteriormente. Todas las células crecieron en presencia de penicilina en 100 Unidades por mililitro y estreptomocina en 100 microgramos por mililitro. Bajo todas las condiciones testadas, las células se unieron y expandieron bien entre el paso 0 y 1 (Tabla 5-2). Se demostró que las células en condiciones 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pasos después de la siembra en cuyo punto se criopreservaron.

La combinación de C:D:H proporcionó la mejor producción celular después del aislamiento y generó células que se expandieron durante muchas más generaciones en el cultivo que otras condiciones (Tabla 5-1). No se consiguió una población celular expandible usando colagenasa o hialuronidasa solas. No se intentó determinar si este resultado es específico de la colagenasa que fue probada.

Tabla 5-1: Aislamiento de células de tejido de cordón umbilical usando varias combinaciones de enzima

Digestión de enzima	Células aisladas	Expansión de células
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)	+++

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

Las células se unieron y expandieron bien entre el paso 0 y 1 bajo todas las condiciones testadas por digestión y crecimiento de enzimas (Tabla 5-2). Las células en condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pasos después de la siembra en cuyo punto se criopreservaron. Todas las células se criopreservaron para análisis adicionales.

Tabla 5-2: Aislamiento y expansión de cultivo de células bajo varias condiciones:

Condición	Medio	15% FBS	BME	Gelatina	20% O ₂	Factores de crecimiento
1	MEMD-Bg	Y	Y	Y	Y	N
2	MEMD-Bg	Y	Y	Y	N (5%)	N
3	MEMD-Bg	Y	Y	N	Y	N
4	MEMD-Bg	Y	Y	N	N (5%)	N
5	MEMD-Bg	N (2%)	Y	N (Laminina)	Y	FCE/FCF (20 ng/ml)
6	MEMD-Bg	N (2%)	Y	N (Laminina)	N (5%)	FCE/FCF (20 ng/ml)
7	MEMD-Bg	N (2%)	Y	N (Fibronectina)	Y	FCDP/FCEV
8	MEMD-Bg	N (2%)	Y	N (Fibronectina)	N (5%)	FCDP/FCEV
9	MEMD-Bg	Y	N	Y	Y	N
10	MEMD-Bg	Y	N	Y	N (5%)	N
11	MEMD-Bg	Y	N	N	Y	N
12	MEMD-Bg	Y	N	N	N (5%)	N
13	MEMD-Bg	N (2%)	N	N (Laminina)	Y	FCE/FCF (20 ng/ml)
14	MEMD-Bg	N (2%)	N	N (Laminina)	N (5%)	FCE/FCF (20 ng/ml)
15	MEMD-Bg	N (2%)	N	N (Fibronectina)	Y	FCDP/FCEV
16	MEMD-Bg	N (2%)	N	N (Fibronectina)	N (5%)	FCDP/FCEV

Las células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron mediante citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas mediante digestión de enzima.

Las preparaciones contenían glóbulos rojos y plaquetas. Ninguna célula nucleada se unió y dividió durante las primeras 3 semanas. El medio cambio 3 semanas después de la siembra y no se observaron células que se unieran o crecieran.

Las poblaciones de células pudieron aislarse del tejido umbilical de manera eficiente usando la combinación de enzimas colagenasa (una metaloproteasa), dispasa (proteasa neutral) e hialuronidasa (enzima mucolítica que rompe el ácido hialurónico). También puede usarse LIBERASE, que es una mezcla de colagenasa y una proteasa neutral. También se usó Blendzyme 3, que es colagenasa (4 unidades Wunsch/gramo) y termolisina (1714 unidades caseína/gramo), junto con hialuronidasa para aislar células. Estas células se expandieron rápidamente sobre muchos pasos cuando se cultivaron en medio de cultivo de expansión en plástico cubierto de gelatina.

Las células también se aislaron de sangre residual en los cordones, pero no de la sangre del cordón. La presencia de células en coágulos de sangre lavados del tejido, que se adhieren y crecen bajo las condiciones usadas, puede deberse a las células que se están liberando durante el proceso de disección.

Referencia

Ho et al., WO2003025149 A2 "POBLACIONES CELULARES QUE CO-EXPRESAN CD49C Y CD90", NEURONYX, INC. N° de Solicitud PCT/US02/29971, presentada 20020920, A2, publicada 20030327, A3 publicada 20031218.

5 EJEMPLO 6

Características de crecimiento de células

10 El potencial de expansión celular de células se comparó con otras poblaciones de células madre aisladas. El proceso de expansión celular a senescencia es referido como límite de Hayflick (Hayflick, "La longevidad de células humana cultivadas". J. Am. Geriatr. Soc., 1974; 22(1); 1-12, Hayflick, "La estrategia de senescencia", Gerontologist, 1974; 14(1); 37-45).

15 Los matraces de plástico con cultivo de tejido se cubrieron añadiendo 20 mililitros 2% (p/v) gelatina (Tipo B: 225 Boom; Sigma, St. Louis, MO) a un matraz T75 (Corning, Inc., Corning, NY) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de gelatina, se añadieron 10 mililitros de tampón fosfato salino (TFS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y después se aspiraron.

20 Para comparación de potencial de expansión de crecimiento se utilizaron las siguientes poblaciones celulares: células madre mesenquimales (CMM; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de adiposa (publicación de patente de Estados Unidos US20040058412); iii) fibroblastos dérmicos de piel normal (cc-2509 lote # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); y iv) células derivadas del ombligo. Las células se sembraron inicialmente en 5.000 células/cm² en matraces T75 cubiertos con gelatina en medio de crecimiento. Para pasos posteriores, los cultivos celulares se trataron de la siguiente manera. Después de tripsinización, se contaron las células viables
25 tiñendo con azul de tripano. La suspensión celular (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). Se estimaron números de células viables usando un hemocitómetro.

30 Después del conteo, las células se sembraron en 5.000 células/cm² en matraces T75 cubiertos con gelatina en 25 mililitros de medio de cultivo fresco. Las células crecieron en una atmósfera estándar (5 por ciento dióxido de carbono (v/v)) a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia pasaron; este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron senescencia.

35 En cada paso, las células se tripsinizaron y contaron. Se calcularon la producción celular viable, las duplicaciones de población [$\ln(\text{células iniciales}/\text{células finales})/\ln 2$], y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de población). Con el fin de determinar la expansión celular óptima, se determinó la producción celular total por paso multiplicando la producción total para el paso previo por el factor de expansión para cada paso (esto es, factor de expansión = células iniciales/células finales).

40 También se analizó el potencial de expansión de células depositadas en el paso 10. Se usó un conjunto diferente de condiciones. Se analizaron fibroblastos dérmicos de piel normal (cc-2509 lote # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas del ombligo y células derivada de placenta. Estas poblaciones celulares se habían depositado previamente en el paso 10 y se habían cultivado en 5.000 células/cm² en cada paso hasta ese punto. Se determinó el efecto de densidad celular en las poblaciones celulares después de descongelar las células
45 en el paso 10. Las células descongeladas se sembraron después en 1.000 células/cm² en medio de cultivo. Las células crecieron bajo condiciones atmosféricas estándares a 37 °C. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las células pasaron hasta que alcanzaron aproximadamente 85% de confluencia. Las células pasaron posteriormente hasta senescencia, esto es, hasta que no se pudieron expandir más. Las células se tripsinizaron y contaron en cada paso. Se calcularon la producción celular, la duplicación de población [$\ln(\text{células iniciales}/\text{células finales})/\ln 2$], y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de población). La producción celular total se determinó por paso multiplicando la producción total para el paso previo por el factor de expansión para cada paso
50 (esto es, factor de expansión = células iniciales/células finales).

55 El potencial de expansión de cultivos de células derivadas de tejido de cordón umbilical recién aisladas bajo condiciones bajas de siembra celular se analizó en otro experimento. Células derivadas del ombligo se aislaron como se ha descrito en el Ejemplo 5. Las células se sembraron en 1.000 células/cm² y pasaron como se ha descrito anteriormente hasta senescencia. Las células crecieron bajo condiciones atmosféricas estándares a 37 °C. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana. Las células pasaron hasta que alcanzaron aproximadamente 85% de confluencia. En cada paso, las células se tripsinizaorn y contaron mediante tinte con azul de tripano. Se calcularon la producción celular, la duplicación de población [$\ln(\text{célula inicial}/\text{célula final})/\ln 2$], y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de población) para cada paso. La producción celular total se determinó por paso multiplicando la producción total para el paso previo por el factor de expansión para cada paso (esto es, factor de expansión = célula inicial/célula final). Las células crecieron en matraces cubiertos y no cubiertos con gelatina.

65 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. Cultivo con

oxígeno bajo de células progenitoras de sistema nervioso central, US20040005704). Con el fin de determinar si la expansión celular de células derivadas del ombligo podría mejorarse alterando las condiciones de cultivo celular, los cultivos de células derivadas del ombligo crecieron en condiciones de oxígeno bajo. Las células se sembraron en 5.000 células/cm² en medio de crecimiento en matraces cubiertos con gelatina. Las células inicialmente se cultivaron bajo condiciones atmosféricas estándares hasta el paso 5, en cuyo punto se transfirieron a condiciones de cultivo con oxígeno bajo (5% O₂).

En otros experimentos las células se expandieron en placas no cubiertas, cubiertas con colágeno, cubiertas con fibronectina, cubiertas con laminina y cubiertas con matrigel. Se demostró que los cultivos se expandieron bien en estas matrices diferentes.

Las células derivadas del ombligo se expandieron durante más de 40 pasos generando producciones de > 1E17 células en 60 días. Sin embargo, CMMs y fibroblastos tuvieron senescencia después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque las células derivadas de adiposa y omentales se expandieron durante casi 60 días generaron producciones totales de células de 4,5E12 y 4,24E13, respectivamente. Así, cuando se sembraron en 5.000 células/cm² bajo las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas del ombligo se expandieron mucho mejor que otros tipos de células cultivados bajo las mismas condiciones (Tabla 6-1).

Tabla 6-1: Características de crecimiento para diferentes poblaciones celulares cultivadas hasta senescencia

Tipo de célula	Senescencia	Duplicaciones totales de población	Producción (Células totales)
MSC	24 d	8	4,72 E7
Célula derivada de adiposa	57 d	24	4,5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2,82 E13
Umbilical	65 d	42	6,15 E17

Las células derivadas del ombligo y células de fibroblastos se expandieron durante más de 10 pasos generando producciones celulares de > 1E11 células en 60 días (Tabla 6-2). Después de 60 días bajo estas condiciones, los fibroblastos tuvieron senescencia, mientras las células derivadas del ombligo tuvieron senescencia después de 80 días, completando > 50 duplicaciones de población.

Tabla 6-2: Características de crecimiento para diferentes poblaciones celulares usando expansión celular de baja densidad desde el paso 10 hasta senescencia

Tipo de célula (Paso Nº)	Senescencia	Duplicaciones totales de población	Producción (Células totales)
Fibroblasto (P10)	80 días	43,68	2,59 E11
Umbilical (P10)	80 días	53,6	1,25 E14

Las células se expandieron bien bajo condiciones de oxígeno reducido, aunque el cultivo bajo condiciones con oxígeno bajo no parece tener un efecto significativo en la expansión celular para células derivadas de tejido de cordón umbilical. Ya se ha demostrado que las condiciones atmosféricas estándares son satisfactorias para cultivar suficiente número de células, y no se necesita cultivo con oxígeno bajo para el crecimiento de células derivadas del cordón umbilical.

Las condiciones actuales para la expansión celular de células derivadas de tejido del cordón umbilical aisladas en crecimiento en densidades de aproximadamente 5.000 células/cm², en medio de cultivo en matraces cubiertos y no cubiertos con gelatina, bajo oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar grandes números de células en el paso 11. Además, los datos sugieren que las células pueden expandirse fácilmente usando condiciones de cultivo de menor densidad (por ejemplo, 1.000 células/cm²). La expansión de células derivadas de tejido de cordón umbilical en condiciones de oxígeno bajo también facilita la expansión celular, aunque aún no se ha observado un crecimiento incremental en potencial de expansión celular cuando se utilizan estas condiciones para el cultivo. En el presente, el cultivo de células derivadas de tejido del cordón umbilical bajo condiciones atmosféricas estándares es preferente para generar grandes grupos de células. Cuando las condiciones de cultivo se alternan, sin embargo, la expansión puede alterarse de la misma manera. Esta estrategia puede usarse para mejorar la capacidad proliferativa y diferenciativa de estas poblaciones celulares.

Bajo las condiciones utilizadas, mientras el potencial de expansión de CMM y células derivadas de adiposa es limitado, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se expanden rápidamente a grandes números.

Referencias

Hayflick, "La longevidad de células humana cultivadas", J Am Geriatr Soc., 1974; 22; 1-12.

Hayflick, "La estrategia de senescencia", Gerontologist, 1974; 14(1); 37-45.
 Publicación de patente de Estados Unidos N° 20040058412.
 Publicación de patente de Estados Unidos N° 20040048372.
 Publicación de patente de Estados Unidos N° 20040005704.

5

EJEMPLO 7

Crecimiento de células en medio que contiene D-valina

10 Las líneas celulares usadas en terapia celular son preferentemente homogéneas y están libres de cualquier tipo de célula contaminante. Las células humanas usada en terapia celular deberían tener un número normal (46) de cromosomas con estructural normal. Para identificar líneas celulares derivadas de tejido de cordón umbilical que son homogéneas y están libres de células de origen de tejido posparto se analizaron cariotipos de muestras celulares.

15 Se sembraron células derivadas del ombligo (P5) y fibroblastos (P9) en 5.000 células/cm² en matraces T75 cubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas el medio se retiró y las células se lavaron con tampón fosfato salino (TFS), (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se sustituyó por un medio de cultivo modificado (MEMD con D-valina (orden especial Gibco), 15% (v/v) suero bovino fetal dializado (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma), penicilina en 50 Unidades/mililitro y estreptomycin en 50 miligramos/mililitro (Gibco)).

20 Las células derivadas del ombligo y células de fibroblastos sembradas en medio que contenía D-valina no proliferaron, a diferencia de células sembradas en medio de cultivo que contenía suero dializado. Las células de fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando en tamaño y cambiando la forma. Todas las células murieron y finalmente se separaron de la superficie del matraz después de cuatro semanas. Así, puede concluirse que las células derivadas de tejido de cordón umbilical requieren L-valina ara crecimiento celular y para mantener viabilidad a largo plazo. L-valina preferentemente se elimina del medio de cultivo para células derivadas de tejido del cordón umbilical.

30 **Referencias**

Hongpaisan, "Inhibición de proliferación de fibroblastos contaminantes por D-valina en cultivos de células de musculatura lisa de miometrio humano", Cell Biol Int., 2000; 24; 1-7.

35 Sordillo et al., "Cultivo de células epiteliales mamarias bovinas en medio modificado con D-valina: retirada selectiva de fibroblastos contaminantes", Cell Biol Int Rep., 1988; 12; 355-64.

EJEMPLO 8

Análisis de cariotipo de células

40 Las líneas celulares usadas en terapia celular son preferentemente homogéneas y están libres de cualquier tipo celular contaminantes. Las células humanas usadas en terapia celular deberían tener un número normal (46) de cromosomas con estructura normal. Para identificar líneas celulares derivadas de tejido del cordón umbilical que son homogéneas y están libres de células de origen de tejido postparto, se analizaron cariotipos de muestras celulares.

45 Las células derivadas de tejido del cordón umbilical de tejido de un neonato masculino se cultivaron en medio de cultivo. Se seleccionó tejido de cordón umbilical de un neonato masculino (X, Y) para permitir la distinción entre células derivadas neonatales y células derivadas maternas (X, X). Las células se sembraron en 5.000 células por centímetro cuadrado en medio de cultivo en un matraz T75 (Corning, Corning, NY) y se expandieron hasta 80% de confluencia. Un matraz T75 que contenía células se llenó hasta el cuello con medio de cultivo. Las muestras se entregaron mediante mensajero a un laboratorio de citogenética médica (tiempo estimado de transporte de laboratorio a laboratorio es una hora). El Centro para Genética Humana y Molecular, en la Escuela Médica de Nueva Jersey, Newark, NJ, realizó el análisis de cromosomas. Las células se analizaron durante metafase cuando los cromosomas se ven mejor. De veinte células contadas en metafase, cinco fueron analizadas para número normal de cariotipo homogéneo (dos). Una muestra celular se caracterizó como homogénea si se observaban dos cariotipos. Una muestra celular se caracterizó como heterogénea si se observaron más de dos cariotipos. Cuando se identificó un número de cariotipo homogéneo (cuatro) se contaron y analizaron más células en metafase.

60 La plantilla del laboratorio de citogenética interpretó que todas las muestras celulares enviadas para análisis de cromosomas mostraban apariencia normal. Tres de las dieciséis líneas celulares analizadas mostraron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) lo que indica la presencia de células derivadas de origen neonatal y maternal (Tabla 8-1). Cada una de las muestra celulares se caracterizó como homogénea (Tabla 8-1).

65

Tabla 8-1. Resultados de cariotipo de células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Tejido	Paso	Células contadas en metafase	Células analizadas en metafase	Número de cariotipos	Cariotipo ISCN
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Umbilical	3	20	5	2	46, XX

Leyenda: N- Neonatal; V- región vellosa; M- lado maternal; C – clon

El análisis de cromosomas identificó células derivadas del ombligo cuyos cariotipos parecen normales cuando los interpretó un laboratorio de citogenética clínica. El análisis de cariotipos también identificó líneas celulares libres de célula maternas, como lo determinó el cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 9

Evaluación citométrica de flujo de marcadores de superficie celular

La caracterización de proteínas de superficie celular o “marcadores” mediante citometría de flujo puede usarse para determinar una identidad de línea celular. La consistencia de la expresión puede determinarse a partir de múltiples donantes, y en células expuestas a diferentes condiciones de procesamiento y cultivo. Las líneas celulares aisladas del ombligo se caracterizaron por citometría de flujo, proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

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

Las células adherentes en los matraces se lavaron en tampón fosfato salino (TFS); (Gibco, Carlsbad, MO), y se separaron con Tripsina/EDTA (Gibco). Las células se cosecharon, centrifugaron y volvieron a suspender en 3% (v/v) FBS en TFS en una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se añadió anticuerpo al marcador de superficie celular de interés (véase más abajo) a 100 mililitros de suspensión celular y la mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con TFS y se centrifugaron para eliminar anticuerpos no unidos. Las células se volvieron a suspender en 500 microlitros TFS y se analizaron mediante citometría de flujo.

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

Se usaron los siguientes anticuerpos para marcadores de superficie celular.

Tabla 9-1: Anticuerpos usados en caracterización de marcadores de superficie celular de CDO

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

Las células del cordón umbilical se analizaron en los pasos 8, 15 y 20.

Para comparar diferencias entre donantes, se compararon células derivadas del cordón umbilical de diferentes donantes.

Las células derivadas del cordón umbilical cultivadas en matraces cubiertos con gelatina se compararon con células derivadas del cordón umbilical cultivadas en matraces no cubiertos.

Se compararon cuatro tratamientos usados para aislamiento y preparación de células. Se compararon células derivadas de tejido mediante tratamiento con 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispasa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispasa.

Las células derivadas del cordón umbilical en el paso 8, 15 y 19 analizadas mediante citometría de flujo expresaron todas CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicado por la mayor fluorescencia en relación con el control IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicado por valores de fluorescencia consistentes con el control IgG.

Las células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes separados analizadas mediante citometría de flujo se mostraron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejado en los mayores valores de fluorescencia en relación con el control IgG. Estos valores fueron negativos para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con el control IgG.

Las células derivadas del cordón umbilical expandidas en matraces con gelatina y no cubiertos analizadas mediante citometría de flujo fueron todas positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con mayores valores de fluorescencia en relación con el control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con el control IgG.

El análisis de células derivadas del cordón umbilical mediante citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Las células derivadas del 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 fue consistente entre variaciones en variables que incluían donante, paso, recubrimiento de superficie de vaso de cultivo, enzimas de digestión y capa de placenta. Se observaron algunas variaciones en los promedios y rangos de curva en el histograma de valor de fluorescencia individual, pero todas las curvas positivas bajo todas las condiciones analizadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia superiores a los del control IgG, confirmando de este modo que las células comprenden una población homogénea que tiene expresión positiva de los marcadores.

EJEMPLO 10

Análisis de células mediante selección de oligonucleótido

Se usaron selecciones de oligonucleótido para comparar perfiles de expresión de genes de células derivadas del ombligo y placenta con fibroblastos, células madre mesenquimales humanas y otra línea celular derivada de médula ósea humana. Este análisis proporcionó una caracterización de las células e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

Células derivadas de tejido. Se obtuvieron cordones umbilicales y placenta humanos del Intercambio de Investigación Nacional sobre la Enfermedad (IINE, Filadelfia, PA) de entregas todo el periodo normal con el consentimiento de los pacientes. Los tejidos se recibieron y las células se aislaron como se ha descrito en el Ejemplo 5. Las células se cultivaron en medio de cultivo en matraces de plástico de cultivo de tejido cubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5% CO₂.

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

Células madre mesenquimales humanas (CMMh). Se compraron CMMh en Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en medio MSCGM (Cambrex). Las células crecieron en plástico cultivado con tejido estándar a 37 °C con 5% CO₂.

Células de cresta ilíaca de médula ósea humana (CIMO). Se recibió cresta ilíaca de médula ósea humana de IINE con el consentimiento del paciente. La médula fue procesada de acuerdo con el método descrito por Ho et al. (WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ y 0,1 mM EDTA, pH 7,2) en una proporción de 1 parte de médula ósea por 20 partes de tampón de lisis. La suspensión celular se sometió a vórtices, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. El sobrenadante se descartó y la bolita celular se volvió a suspender en Medio Esencial Mínimo-alfa (Invitrogen) complementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 4mM de glutamina. Las células se centrifugaron de nuevo y la bolita celular se volvió a suspender en medio fresco. Las células mononucleares viables se contaron usando exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de

plástico cultivados con tejido en 5×10^4 células/cm². Las células se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ en O₂ atmosférico estándar o en 5% CO₂. Las células se cultivaron durante 5 días sin cambios de medio. El medio y las células no adherentes se eliminaron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en el cultivo.

5 Los cultivos de células que crecieron de manera activa se retiraron de los matraces con una rasqueta celular en tampón fosfato salino frío (TFS). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El sobrenadante se retiró y las células se volvieron a suspender en TFS fresco y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se retiró y la bolita celular se congeló inmediatamente y se almacenó a -80 °C. El mRNA celular se extrajo y se transcribió a cADN. cADN se transcribió después a cARN y se etiquetó con biotina. El cARN etiquetado con biotina se hibridizó con selección de oligonucleótido Affymetrix GENECHIP HG-U133A (Affymetrix, Santa Clara, CA). Las hibridizaciones y los datos de recogida se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los análisis de datos se realizaron usando "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) software de ordenador versión 1.21 (Tusher et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5116-5121).

15 En este estudio se analizaron la diferentes poblaciones de células. Las células junto con la información del paso, el sustrato de cultivo y el medio de cultivo se enumeran en la Tabla 10-1.

Tabla 10-1. Células analizadas por el estudio de microselección. Las líneas celulares están enumeradas por su código de identificación junto con el paso en el momento del análisis, sustrato de cultivo celular y medio de cultivo

Población celular	Paso	Sustrato	Medio
Umbilical (022803)	2	Gelatina	MEMD, 15% SFB, βME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	MEMD, 15% SFB, βME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	MEMD, 15% SFB, βME
Placenta (042203)	12	Gelatina	MEMD, 15% SFB, βME
Placenta (042903)	4	Gelatina	MEMD, 15% SFB, βME
Placenta (071003)	3	Gelatina	MEMD, 15% SFB, βME
ICBM (070203) (5% O ₂)	3	Plástico	MEM 10% SFB
ICBM (062703) (O ₂ est)	5	Plástico	MEM 10% SFB
ICBM (062703) (5% O ₂)	5	Plástico	MEM 10% SFB
CMSH (Lote 2F 1655)	3	Plástico	MSCGM
CMSH (Lote 2F 1656)	3	Plástico	MSCGM
CMSH (Lote 2F 1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	MEMD-F12, 10% SFB
hFibroblasto CDCD39SK)	4	Plástico	MEMD-F12, 10% SFB

40 Los datos se evaluaron con el Análisis de Componentes Principales con software SAM como se ha descrito anteriormente. El análisis reveló 290 genes que se expresaron en diferentes cantidades relativas en las células analizadas. Este análisis proporcionó comparaciones relativas entre las poblaciones.

45 La Tabla 10-2 muestra las distancias euclídeas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclídeas se basaron en la comparación de las células en base e los 290 genes que se expresaron de manera diferenciada entre los tipos de células. La distancia euclídea es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

Tabla 10-2. Las distancias euclídeas para los pares de células. La distancia euclídea se calculó para los tipos de células usando 290 genes que se expresaron de manera diferenciada entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclídea.

Par celular	Distancia Euclídea
ICBM-CMSH	24,71
Placenta-umbilical	25,52
ICBM-Fibroblasto	36,44
ICBM-Placenta	37,09
Fibroblasto-CMS	39,63
ICBM-Umbilical	40,15
CMS-Umbilical	46,86

65 Tablas 10-3, 10-4 y 10-5 muestra la expresión de genes aumentados en células derivadas de tejido umbilical (Tabla 10-3), aumentados en células derivadas de placenta (Tabla 10-4), y reducidos en células derivadas de cordón umbilical y placenta.

Tabla 10-4. Genes que específicamente aumentaron en expresión en células derivadas del cordón umbilical en comparación con las otras líneas celulares que se sometieron a ensayo.

Genes aumentados en células derivadas del ombligo		
Conjunto de sonda ID	Nombre del gen	Número de acceso NCBI
202859_x_at	Interleuquina 8	NM_000584
211506_s_at	Interleuquina 8	AF043337
210222_s_at	Reticulón 1	BC000314
204470_at	Quimioquina (motivo C-X-C ligando 1 (actividad estimulante de crecimiento de melanoma))	NM_001511
206336_at	Quimioquina (motivo C-X-C ligando 6 (proteína 2 quimiotáctica de granulocito))	NM_002993
207850_at	Quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3	NM_002090
203485_at	Reticulón 1	NM_021136
202644_at	Factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducido por alfa	NM_006290

Tabla 10-3. Genes que específicamente aumentaron en expresión en las células derivadas de placenta en comparación con las otras líneas celulares que se sometieron a ensayo.

Genes aumentados en células derivadas de placenta		
Conjunto de sonda ID	Nombre del gen	Número de acceso NCBI
209732_at	Lectina tipo C (dependiente de calcio, dominio de reconocimiento de carbohidrato, miembro 2 superfamilia (inducida por activación))	AF070642
206067_s_at	Tumor Wilms 1	N_024426
207016_s_at	Familia de deshidrogenasa 1 aldeído, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	Receptor de lipoproteína oxidada de baja densidad (tipo lectina)	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGE:4179671, mRNA, cds parcial	AF070642
202178_at	Proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	Proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	Cancer 1 en ovario regulado hacia abajo	NM_014890
213542_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cADN DKFZp547K113 (del clon DKFZp547K113)	AI246730

Tabla 10-5. Genes que disminuyeron en expresión en las células del cordón umbilical y placenta en comparación con las otras líneas celulares que se sometieron a ensayo.

Genes reducidos en células derivadas del ombligo y placenta			
Conjunto de sonda ID	Nombre del gen	Número de acceso NCBI	
5	210135_s_at	Homeobox de estatura corta	AF022654.1
	205824_at	Proteína 2 de choque térmico 27kDa	NM_001541.1
	209687_at	Quimioquina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor 1 derivado de célula estromal)	U19495.1
10	203666_at	Quimioquina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor 1 derivado de célula estromal)	NM_000609.1
	212670_at	Elastina (estenosis aórtica supraavalvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
15	213381_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cADN DKFZp586M022 (del clon DKFZp586M022)	N91149
	206201_s_at	Homeobox 2 mesenquimal (homeobox específico de arresto de crecimiento)	NM_005924.1
20	205817_at	Homeobox sine oculis homólogo 1 (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
	209283_at	Cristalino, alfa B	AF007162.1
	212793_at	Activado asociado desarreglado de morfogénesis 2	BF513244
25	213488_at	Proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
	209763_at	Similar a neuralina 1	AL049176
	205200_at	Tetranectina (proteína de unión de plasminógeno)	NM_003278.1
	205743_at	Homología tres src (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
30	200921_s_at	Gen 1 de traslocación de célula B, anti-proliferativo	NM_001731.1
	206932_at	Colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
35	204198_s_at	Factor de transcripción 3 relacionado con pigmeos	AA541630
	219747_at	Proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
	204773_at	Receptor interleuquina 11, alfa	N_004512.1
	202465_at	Mejora de procolágeno C-endopeptidasa	NM_002593.2
40	203706_s_at	Homólogo 7 crespado (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
	212736_at	Gen hipotético BC008967	BE299456
	214587_at	Colágeno, tipo VIII, alfa 1	NM_877796
	201645_at	Tenascina C (hexabranquión)	NM_002160.1
	210239_at	Proteína 5 homeobox de lorquois	U90304.1
45	203903_s_at	Hepaestina	NM_07799.1
	205816_at	Integrina, beta 8	NM_002214.1
	203069_at	Glicoproteína 2 de vesícula sináptica	NM_014849.1
	213909_at	<i>Homo sapiens</i> cADN FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
50	206315_at	Factor 1 de citoquina de tipo receptor	NM_004750.1
	204401_at	Canal activado por calcio de conductancia de potasio intermedio/pequeño, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
	216331_at	Integrina, alfa 7	AK022548.1
55	209663_s_at	Integrina, alfa 7	AF072132.1
	213125_at	Proteína DKFZP586L	AW007573
	202133_at	Co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ)	AA081084
60	206511_at	Homeobox sine oculis homólogo 2 (<i>Drosophila</i>)	NM_016932.1
	213435_at	Proteína KIAA1034	AB028957.1
	206115_at	Respuesta 3 de crecimiento temprano	NM_004430.1
	213707_s_at	Homeobox 5 menos distal	NM_005221.3
65	218181_s_at	Proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1

(continuación)

5	209160_at	Reductasa aldo-keto familia 1, miembro C3 (deshidrogenasa hidroesteroide 3-alfa, tipo II)	AB018580.1
	213905_x_at	Biglicano	AA845258
	201261_x_at	Biglicano	BC002416.1
10	202132_at	Co-activador transcripcional con motivo de unión de PDZ (ATZ)	AA081084
	214701_s_at	Fibronectina 1	AJ276395.1
	213791_at	Proencefalina	NM_006211.1
	205422_s_at	Integrina 1 de tipo beta (con dominios de repetición de tipo EGF)	NM_004791.1
15	214927_at	<i>Homo sapiens</i> cARN con cADN de inserción de longitud completa EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
	206070_at	EphA3	AF213459.1
	212805_at	Proteína KIAA0367	AB002365.1
20	219789_at	Receptor C de péptido natriurético/ciclasa C guanilato (receptor C de péptido atrionatriurético)	A1628360
	219054_at	Proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
25	213429_at	<i>Homo sapiens</i> mRNA; cADN DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
	204929_s_at	Proteína 5 de membrana asociada a vesícula	NM_006634.1
	201843_s_at	Proteína matriz 1 extracelular de tipo fibulina que contiene ECG	NM_004105.2
30	221478_at	BCL2/adenovirus E 1B 19kDa que interactúa con proteína tipo 3	AL132665.1
	201792_at	Proteína 1 de unión AE	NM_001129.2
	204570_at	Subunidad de citocromo c oxidasa VIIa polipéptido 1 (músculo)	NM_001864.1
35	201621_at	Neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
	202718_at	Proteína 2 de unión con factor de crecimiento de tipo insulina, 36 kDa	NM_000597.1

40 Tablas 10-6, 10-7 y 10-8 muestran la expresión de genes aumentados en fibroblastos humanos (Tabla 10-6), células derivadas de ICBM (Tabla 10-7) y CMM (Tabla 10-8).

45

50

55

60

65

Tabla 10-6. Genes que aumentaron en expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares que se sometieron a ensayo.

Genes aumentados en fibroblastos	
5	Fosfatasa 2 con especificidad dual
	Proteína KIAA0527
	Homo sapiens cADN: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	Polipéptido 1 intermedio, citoplásmico de dineína
10	Anquirina 3, nodo de Ranvier (anquirina G)
	Inhibina, beta A (activina A, activina AB alfa polipéptido)
	Etonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	Proteína KIAA1053
15	Proteína 1A asociada a microtúbulo
	Proteína 41 de dedo cinc
	Proteína HSPC019
	Homo sapiens cADN: FLJ23564 fis, clon LNG10773
	Homo sapiens cARN: cADN DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
20	Proteína LIM (similar a enigma de unión con C de proteína quinasa de rata)
	Inhibidor de potenciador de gen polipéptido de luz kappa en células B, proteína asociada a complejo quinasa
	Proteína hipotética FLJ22004
	Secuencia mRNA humana (clon CTG-A4)
25	ESTs, moderadamente similar a factor 2 de tipo receptor de citoquina; precursor CRL2 de receptor de citoquina [Homo sapiens]
	Factor de crecimiento transformador, beta 2
	Proteína hipotética MGC29643
	Antígeno identificado por anticuerpo monoclonal MRC OX-2

Tabla 10-7. Genes que aumentaron en expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares que se sometieron a ensayo.

Genes aumentados en células ICBM	
35	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de repetición anquirina cardiaca • Región ORF de clase MHC • Integrina, alfa 10
40	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína hipotética FLJ22362 • UDP-N-acetil-alfa-D-galactosaminasa:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
45	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína inducida por interferón 44 • SRY (región Y determinada por seco)-caja 9 (displasia campomélica, inversión autosómica de sexo)
50	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína 1-1 asociada con queratina • Hipocalcina de tipo 1 • 1 dentado (síndrome de Alagille) • Gránulo secretor proteoglicano 1

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 10-8. Genes que aumentaron en expresión en las células CMM en comparación con las otras líneas celulares que se sometieron a ensayo.

Genes aumentados en células MSC	
5	<ul style="list-style-type: none"> • Interleuquina 26 • Maltasa-gluocamilasa (alfa-glucosidasa) • Receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 2
10	<ul style="list-style-type: none"> • Homólogo oncongen viral osteosarcoma murino v-fos FBJ • Proteína hipotética DC42 • Receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 2 • Homólogo B oncongen viral osteosarcoma murino FBJ • Secuencia transformadora derivada de línea celular MCF.2
15	<ul style="list-style-type: none"> • Canal de potasio, subfamilia K, miembro 15 • Homeoproteína 1 de clase emparejada con cartílago • <i>Homo sapiens</i> cADN FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206 • <i>Homo sapiens</i> cADN FLJ34668 fis, clon LIVER20000775 • Proto-oncogen jun B
20	<ul style="list-style-type: none"> • Células B CLL/Linfoma 6 (proteína de dedo cinc 51) • Proteína de dedo cinc 36, tipo C3H, homóloga (ratón)

El ejemplo presente se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células derivadas de cordón umbilical y placenta. Este análisis incluyó células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y tres placentas diferentes. El estudio también incluyó dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesenquimales y tres líneas de células de cresta ilíaca de médula ósea. El mRNA que estas células expresaron se analizó en una selección de oligonucleótido GENECHIP que contenía sondas de oligonucleótido para 22.000 genes.

El análisis reveló que había presentes transcripciones para 290 genes en diferentes cantidades en estos cinco tipos diferentes de células. Estos genes incluyen siete genes que aumentaron específicamente en las células derivadas de tejido umbilical y diez genes que aumentaron específicamente en las células derivadas de placenta. Se encontraron cincuenta y cuatro genes que tenían específicamente niveles más bajos de expresión en placenta y cordón umbilical.

La expresión de los genes seleccionados se confirmó con PCR, como se muestra en el Ejemplo 11. Las células en general, y células derivadas del ombligo en particular, tienen diferentes perfiles de expresión genética, por ejemplo, en comparación con otras células humanas, tales como células derivadas de la médula ósea y fibroblastos aquí analizados.

EJEMPLO 11

Marcadores de célula

Los perfiles de expresión genética de células derivadas del cordón umbilical se compararon con aquellos derivados de otras fuentes usando un GENECHIP Affymetrix. Se identificaron seis genes "firma": receptor 1 LDL oxidado, interleuquina-8 (IL-8), renina, reticulón, receptor ligando 3 quimioquina (CXC ligando 3) y proteína quimiotáctica de granulocito 2 (GCP-2). Estos genes "firma" se expresaron en niveles relativamente altos en células derivadas del ombligo.

Los procedimientos descritos en este ejemplo se realizaron para verificar los datos de la microselección y comparar datos para expresión de genes y proteínas, así como para establecer una serie de ensayos fiables para la detección de identificadores únicos para células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Las células derivadas del ombligo (cuatro aisladas), y fibroblastos dérmicos humanos normales (FDHN; neonatales y adultos) se cultivaron en medio de cultivo en matraces T75 cubiertos con gelatina. Células madre mesenquimales (CMM) se cultivaron en el kit Bullet de medio de cultivo para células madre mesenquimales (MCCMM; Cambrex, Walkerville, MD).

Para los experimentos con IL-8, las células se descongelaron de nitrógeno líquido y se colocaron en placas en matraces cubiertos con gelatina en 5.000 células/cm², se cultivaron durante 48 horas en medio de cultivo y después se cultivaron de nuevo durante 8 horas en 10 mililitros de medio privado de suero [MEMD-bajo en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (50 Unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro) (Gibco) y 0,1% (p/v) de albúmina de suero bovino (ASB; Sigma, St. Louis, MO)]. Después se extrajo ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes se congelaron a -80 °C hasta el análisis ELISA.

El cordón umbilical, así como los fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de cultivo en matraces T75 cubiertos de gelatina. Las células se congelaron en el paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y transfirieron a tubos centrifugadores de 15 mililitros. Después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó. Las células se volvieron a suspender en medio de cultivo de 4 mililitros y se contaron. Las células crecieron en un matraz de 75 cm² que contenía 15 mililitros de medio de cultivo en 375.000 célula/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio privado de suero durante 8 horas. El medio privado de suero se recogió 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) a cada matraz. Después de que las células se separaron del matraz, la actividad de la tripsina se neutralizó con 8 mililitros de medio de cultivo. Las células se transfirieron a un tubo centrifugador de 15 mililitros y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y se añadió 1 mililitro de medio de cultivo a cada tubo para volver a suspender las células. Se calculó el número de células con un hemocitómetro.

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

Se extrajo ARN de células derivadas de cordón umbilical confluyente y de fibroblastos, o para expresión de IL-8, de células tratadas como se ha descrito anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mini Kit RNeasy; Qiagen, Valencia, CA). Se extrajo ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mini Kit RNeasy; Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a tratamiento ADNasa (2,7 Unidades/muestra) (Sigma St. Louis, MO). ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80 °C. También se extrajo ARN de cordón umbilical humano. El tejido (30 miligramos) se suspendió en 700 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogenizaron mecánicamente y se procedió a la extracción de ARN de acuerdo con la especificación del fabricante. Se extrajo ARN con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80 °C.

ARN se transcribió de manera 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 microselección de cADN como regulados únicamente en células del cordón umbilical (genes firma – incluyendo receptor LDL oxidado, interleuquina-8, renina y reticulón) se volvieron a investigar usando PCR convencional a tiempo real.

Se realizó PCR en muestras de cADN usando productos de expresión de gen vendidos bajo el nombre comercial productos de expresión de gen ASSAY-ON-DEMAND (Applied Biosystems). Receptor LDL oxidado (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulón (Hs00382515); ligando 3 CXC (Hs0017061); GPC-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH se mezclaron con cADN y mezcla maestra PCR universal TaqMan de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) usando una sistema de detección Sequence 7000 con un software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín de Usuario #2 de Applied Biosystems para Sistema de Detección ABI Prism 7700 Sequence).

Se realizó PCR convencional usando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de PCR a tiempo real. Se realizó PCR usando 2 microlitros de solución cADN (1 x polimerasa Taq (nombre comercial AMPLITAQ GOLD) tampón de reacción PCR mezcla universal (Applied Biosystems) y desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. La amplificación se optimizó para cada conjunto cebador. Para IL-8, ligando 3 CXC y reticulón (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C ruante 30 segundos durante 30 ciclos); para renina (94 °C durante 15 segundos, 53 °C durante 15 segundos y 72 °C ruante 30 segundos durante 38 ciclos); para receptor LDL oxidado y GAPDH (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C ruante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores usados para amplificación están enumerados en la Tabla 11-1. La concentración de cebador en la reacción final PCR fue 1 micromolar excepto para GAPDH que fue 0,5 micromolar. Los cebadores GAPDH fueron los mismos que para PCR a tiempo real, excepto que la sonda del fabricante TAqMan o se añadió a la reacción final de PCR. Las muestras se separaron en 2% (p/v) gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes se capturaron en película 667 (Universal Twinpack, VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara POLAROID de longitud focal fija (VWR International, South Plainfield, NJ).

Tabla 11-1: Cebadores usados

Nombre del cebador	Cebadores
5 Receptor LDL oxidado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEC N° ID:1) A: 5'-AGAATGGAAAAGTGAATAGG -3' (SEC N° ID:2)
Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC -3' (SEC N° ID:3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG -3' (SEC N° ID:4)
10 Reticulón	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEC N° ID:5) A: 5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEC N° ID:6)
Interleuquina-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEC N° ID:7) A: 5'-CTTCAAAAAGTTCTCCACAACC-3' (SEC N° ID:8)
15 Ligando 3 quimioquina (CXC)	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEC N° ID:9) A: 5'-TCCTGTGAGTTGGTGCTCC -3' (SEC N° ID:10)

20 Las células derivadas del cordón umbilical se fijaron con 4% paraformaldehído frío (p/v) (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 en el paso 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y el paso 11 (P11) (dos aislados de células derivadas del cordón umbilical) y fibroblastos (P11). Se realizó inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítipes: vimentina (1:500; Sigman, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma – incrementada contra conejo; o 1:300; Chemicon, Temecula, CA – incrementada contra ratón), actina de musculatura lisa alfa (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), Factor von Willebrand (FvW; 1:200; Sigma), y CD34 (CD34 humano Clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpintería, CA). Además, se analizaron los siguientes marcadores en las células derivadas del cordón umbilical en el paso 11; GROalfa anti-humano – PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); GCP-2 anti-humano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor 1 LDL oxidado anti-humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y NOGA-A anti-humano (1:100; Santa Cruz, Biotech).

30 Los cultivos se lavaron con tampón fosfato salino (TFS) y se expuso a una solución bloqueadora de proteína TFS, 4% (v/v) suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigman, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Donde se localizó el epítipe de interés sobre la superficie celular (CD34, ox-Ldl R1), se omitió Triton X-100 en todas las etapas del procedimiento con el fin de prevenir la pérdida de epítipe. Además, en caso donde el anticuerpo primario se incrementó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se usó 3% (v/v) suero de burro en lugar de suero de cabra a lo largo del proceso. Después se aplicaron anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, a los cultivos durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpo primario se eliminaron y los cultivos se lavaron con TFS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloqueo 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 después se lavaron y se aplicaron 10 micromolares DAPI (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos de las células.

45 Después de inmunotinción, se visualizó fluorescencia usando un filtro apropiado de fluorescencia en un microscopio invertido epi-fluorescente Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó señal de fluorescencia sobre tinción de control donde se siguió el procedimiento entero explicado anteriormente con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario (N° 1 control). Se capturaron imágenes representativas usando una videocámara digital de color y software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras con triple tinción, se tomó cada imagen usando solamente un filtro de emisión cada vez. Los montajes con capas se prepararon después usando software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

55 Las células adherentes en los matraces se lavaron con tampón fosfato salino (TFS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con Tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se cosecharon, centrifugaron y volvieron a suspender en 3% (v/v) FBS en TFS en una concentración celular de 1×10^7 /mililitro. Se entregaron cien microlitros de alícuotas a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón Perm./Lavado (BD Pharmigen, San Diego, CA). Se añadió anticuerpo a alícuotas siguiendo 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 TFS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que necesitaban un anticuerpo secundario se volvieron a suspender en 100 microlitros de 3% FBS. El anticuerpo secundario se añadió siguiendo 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 TFS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células lavadas se volvieron a suspender en 0,5 microlitros TFS y se analizaron mediante citometría de flujo. Se usaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 LDL oxidado (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmigen, Bedford, MA), Kappa IgG1 de ratón (P-4685 y M-5284; Sigma) e IgG de cabra contra mono (sc-3743; Santa Cruz, Biotech). El análisis de citometría de flujo se realizó con FACscalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

Los resultados de PCR a tiempo real par genes “firma” seleccionados realizados en cADN de células derivadas de cordón umbilical humano, fibroblastos adultos y neonatales y células madre mesenquimales (CMM) indican que tanto la expresión del reticulón y del receptor LDL oxidado fueron mayores en células derivadas del ombligo en comparación con otras células. Los datos obtenidos de PCR a tiempo real se analizaron con el método $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ligando 3 CXC y GCP-2 entre células y controles. Los resultados de PCR a tiempo real se confirmaron con PCR convencional. Las secuencias de productos PCR validaron además estas observaciones. No se encontró una diferencia significativa en el nivel de expresión de ligando 3 CXC entre células y controles usando cebadores de ligando 3 CXC de PCR convencional enumerados en la Tabla 11-1.

La expresión de la citoquina IL-8 en células del cordón umbilical se elevó en células derivadas del cordón umbilical cultivadas en medio de cultivo y privadas de suero. Todos los datos de PCR a tiempo real se validaron con PCR convencional y mediante productos de secuencias de PCR.

Después del crecimiento en medio libre de suero, los medios acondicionados se examinaron para la presencia de IL-8. Las mayores cantidades de IL-8 se detectaron en medios en los que se habían cultivado células umbilicales (Tabla 11-2). No se detectó IL-8 en medio en el que se habían cultivado fibroblatos dérmicos humanos.

Tabla 11-2: Expresión de proteína IL-8 media por ELISA

Tipo de célula	IL-8
Fibroblastos humanos	ND
Asilado 1 UMBC	2058,42 ± 144,67
Aislado 2 UMBC	2368,86 ± 22,73
Resultados del ensayo ELISA para interleuquina-8 (IL-8) realizado en células derivadas del cordón umbilical así como fibroblastos dérmicos humanos. Los valores aquí presentados son picogramo/millón células, n=2, sem.	
ND = No Detectado	

Las células derivadas de cordón umbilical humano en el paso 0 fueron sometidas a sonda para la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (paso 0), las células se fijaron con 4% paraformaldehído y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: Factor von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de musculatura lisa alfa y vimentina. Las células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para actina de musculatura lisa alfa y vimentina, siendo el patrón de tinción consistente hasta el paso 11.

La producción de GROalfa, GCP-2, receptor 1 LDL oxidado y reticulón (NOGO-A) en células derivadas del cordón umbilical en el paso 12 se investigó mediante inmunocitoquímica. Las células derivadas del cordón umbilical fueron GCP-2 positivas, pero con este método no se detectó producción de GRO alfa. Además, las células fueron NOGO-A positivas.

Se ha establecido un acuerdo entre niveles de expresión de ge medido por microselección y PCR (tanto a tiempo real como convencional) para cuatro gentes: receptor 1 LDL oxidado, renina, reticulón e IL-8. La expresión de estos genes se reguló de manera diferenciada en el nivel mRNA en células derivadas del cordón umbilical, con IL-8 también regulado de manera diferenciada en el nivel de proteína. La expresión diferencial de GCP-2 y ligando 3 CXC no se confirmó en el nivel de mRNA. Aunque este resultado no respalda los datos originalmente obtenidos en el experimento de microselección, esto puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

Las células derivadas del cordón umbilical humano en el paso 0 fueron sometidas a sonda para la expresión de actina de musculatura lisa alfa y vimentina y fueron positivas para ambos. El patrón de tinción se conservó hasta el paso 11.

EJEMPLO 12

Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos celulares

Los fenotipos de células encontrados en cordón umbilical humano se analizaron mediante inmunohistoquímica.

El tejido de cordón umbilical humano se cosechó y la inmersión se fijó en 4% (p/v) paraformaldehído durante la noche a 4 °C. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpo dirigidos a los siguientes epítopes (véase Tabla 12-1): vimentina (1:500; Sigman, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma – incrementada contra conejo; o 1:300, incrementada contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), actina de musculatura lisa alfa (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), Factor von Willebrand (FvW; 1:200; Sigma), y CD34 (CD34 humano Clase III;

1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se analizaron los siguientes marcadores: GROalfa anti-humano – PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); GCP-2 anti-humano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor 1 LDL oxidado anti-humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y NOGO-A anti-humano (1:100; Santa Cruz, Biotech). Los especímenes se recortaron con un escalpelo y se colocaron en compuesto incrustado con OCT (OCT Tejido-Tek; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. Los bloques congelados se seccionaron (10 micrones de grosor) usando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de cristal para tinción.

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 tampón fosfato salino (TFS) y se expusieron a soluciones de bloqueo de proteínas que contenían TFS, 4% (v/v) suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3% (v/v) Tritón (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a antígenos intracelulares. En casos donde el epítipo de interés estaría situado sobre la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), el tritón se omitió en todas las etapas del proceso con el fin de prevenir pérdida de epítipo. Además, en casos donde el anticuerpo primario se incrementó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se usó 3% (v/v) suero de burro en lugar de suero de cabra a lo largo del proceso. Después se aplicaron anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, a las secciones durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpo primario se eliminaron y los cultivos se lavaron con TFS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloqueo 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 después se lavaron y se aplicaron 10 micromolares DAPI (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos de las células.

Después de inmunotinción, se visualizó fluorescencia usando un filtro apropiado de fluorescencia en un microscopio invertido epifluorescente Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representó mediante señal de fluorescencia sobre la tinción control. Se capturaron imágenes representativas usando una videocámara digital de oclor y software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras con triple tinción, se tomó cada imagen usando solamente un filtro de emisión cada vez. Los montajes con capas se prepararon después usando software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Tabla 12-1: 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 de musculatura lisa alfa (AML)	1:400	Sigma
Citoqueratina 18 (CK18)	1:400	Sigma
Factor von Willebrand (FvW)	1:200	Sigma
CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA
GROalfa-PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

Los marcadores vimentina, desmina, SMA, CK18, FvW y CD34 se expresaron en un subconjunto de las células encontrada en el cordón umbilical (datos no mostrados). En particular, la expresión de FvW y CD34 se restringió a vasos sanguíneos contenidos en el cordón. Las células CD34+ estuvieron en la capa más interior (lado lumen). Se encontró expresión de vimentina en la matriz y vasos sanguíneos del cordón. SMA se limitó a la matriz y paredes externas de la arteria y vena, pero no se encontró dentro de los propios vasos. Se observaron CD18 y desmina solamente en los vasos, estando la desmina restringida al medio y capas externas.

Vimentina, desmina, actina de musculatura lisa alfa, citoqueratina 18, Factor von Willebrand y CD34 se expresaron en células dentro del cordón umbilical humano. En base a los estudios de caracterización *in vitro* que muestran que solamente se expresan vimentina y actina de musculatura lisa alfa, los datos sugieren que el proceso actual de aislamiento de células derivadas de cordón umbilical cosecha subpoblaciones de células o que las células aisladas cambian la expresión de los marcadores para expresar vimentina y actina de musculatura lisa alfa.

EJEMPLO 13
Secreción de factores tróficos

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de células del cordón umbilical. Se seleccionaron factores que tienen actividad angiogénica (esto es, factor de crecimiento de hepatocitos (FCH) (Rosen et al. (1997) *Ciba Found. Symp.* 212:215-26), proteína 1 quimiotáctica de monocito (PQM-1) (Salcedo et al. (2000) *Blood* 96; 34-40), interleuquina-8 (IL-8) (Li et al. (2003) *J. Immunol.* 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocito (FCQ), factor de crecimiento de fibroblasto básico (FCFb), factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) (Hughes et al.

(2004) Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), inhibidor de tejido de metaloproteinasas de matriz 1 (ITMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (FCE-UH), factor derivado estromal 1 alfa (FDS-1alfa), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) (Cheng et al., (2003) Dev. Biol. 258; 319-33), interleuquina-6 (IL-6), proteína-2 quimiotáctica de granulocito (GPC-2), factor de crecimiento transformante beta2 (FCTbeta2), o actividad de quimioquina (proteína inflamatoria de macrófago 1alfa (PIM 1alfa), proteína inflamatoria de macrófago 1beta (PIM 1beta), quimioattractante-1 de monocito (MCP-1), rantes (célula T normal regulada en activación, expresada y secretada), I309, quimioquina regulada por activación de timo (CRAT), eotaxina, quimioquina derivada de macrófago (QDM), IL-8).

Las células derivadas del cordón umbilical, así como fibroblastos derivados de prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de cultivo en matraces T75 cubiertos de gelatina. Las células se criopreservaron en el paso 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, se añadió medio de cultivo a las células, seguido de transferencia a un tubo centrifugador de 15 mililitros y centrifugación de las células a 150 x durante 5 minutos. La bolita celular se volvió a suspender en medio de cultivo de 4 mililitros y las células se contaron. Las células se sembraron en 5.000 células/cm² en matraces T75 que contenía cada uno 15 mililitros de medio de cultivo, y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a medio libre de suero (MEMD-bajo en glucosa (Gibco), 0,1% (p/v) albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina (50 Unidades/mililitro) y estreptomycin (50 microgramos/mililitro, Gibco)) durante 8 horas. El medio libre de suero acondicionado se recogió al final de la incubación mediante centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20 °C).

Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con tampón fosfato salino (TFS) y se separaron usando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de la tripsina se neutralizó con la adición de 8 mililitros de medio de cultivo. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y las células se volvieron a suspender en 1 mililitro de medio de cultivo. Se calculó el número de células con un hemocitómetro.

Las células crecieron a 37 °C en 5% dióxido de carbono y oxígeno atmosférico. La cantidad de PQM-1, IL-6, FCEV, FDS-1alfa, GCP-2, IL-8 y FCT-beta2 producidos por cada muestra celular se determinó mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son picogramos por mililitro por células de millón (n=2, sem).

Las quimioquinas (PIM1alfa, PIM1beta, FQM-1, Rantes, I309, CRAT, Eotaxina, QMD, IL8), y factores angiogénicos (FCH, FCQ, FCFb, FCEV, TIMP1, ANG2, FCDP, TPO, FCE-UH se midieron usando selección de proteoma SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Los ensayos de proteoma son ELISAs múltiples sándwich para la medición cuantitativa de dos a dieciséis proteínas por pozo. Las selecciones se producen localizando un patrón de 2x2, 3x3 o 4x4 de cuatro a dieciséis anticuerpos diferentes de captura en cada pozo de una placa con 9 pozos. Después de un procedimiento de ELISA sándwich, la placa entera se trata como imagen para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada localización en capa pozo de la placa. La señal generada en cada localización es proporcional a la cantidad de proteína diana en el estándar o muestra original.

Las células derivadas del ombligo y fibroblastos dérmicos secretaron PQM-1 e IL-6 (Tabla 13-1). Los fibroblastos secretaron FDS-1alfa y GCP-2. Las células derivadas del ombligo secretaron GCP-2 e IL-8. ELISA no detectó FCT-beta2 de ningún tipo de célula.

Tabla 13-1. Resultados ELISA: Detección de factores tróficos

	PQM-1	IL-6	FCEV	FDS-1α	GPC-2	IL-8	FCT-beta2
Fibroblasto	17 ± 1	61 ± 3	29 ± 2	19 ± 1	21 ± 1	ND	ND
Umbilical (022803)	1150 ± 74	4234 ± 289	ND	ND	160 ± 11	2058 ± 145	ND
Umbilical (071003)	2794 ± 84	1356 ± 43	ND	ND	2184 ± 98	2369 ± 23	ND

Leyenda: ND: No Detectado., =/- sem

Ensayo ELISA múltiple SearchLight: Células secretaron ITMP1, TPO, FCQ, FCH, FCF, FCE-UH, FNDC, PIM1beta, FQM1, RANTES, I309, CRAT, QMD e IL-8 (Tablas 13-2 y 13-3). No se detectaron Ang2, FCEV o FCDP.

Tabla 13-2. Resultados de ensayo ELISA múltiple de SearchLight

	ITMP1	ANG2	FCDP	TPO	FCQ	FCH	FCF	FCEV	FCEUH	FNDC
FBh	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
U1	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
U3	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

Leyenda: FBh (Fibroblastos humanos), U1 (derivados del ombligo (022803)), U3 (derivados del ombligo (071003)).
 ND: No Detectado

Tabla 13-3. Resultados de ensayo ELISA múltiple de SearchLight

	PIM1a	PIM1B	PQM	RANTES	I309	CRAT	Eotaxina	QMD	IL8
FBh	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
U1	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
U3	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

Leyenda: FBh (Fibroblastos humanos), U1 (derivados del ombligo (022803)), U3 (derivados del ombligo (071003)).
 ND: No Detectado

Las células derivadas del ombligo secretaron un número de factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, tales como FCH, FCFb, PQM-1 e IL-8, juegan papeles importantes en angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como FNDC e IL-6, tienen papeles importantes en regeneración o protección neural.

EJEMPLO 14
Inmunología *in vitro*

Las líneas celulares de cordón umbilical se evaluaron *in vitro* para sus características inmunológicas en un esfuerzo de predecir la respuesta inmunológica, si hubiera alguna, que estas células podrían obtener después de trasplante *in vivo*. Las líneas celulares de cordón umbilical se sometieron a ensayo mediante citometría de flujo para la expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 Y B7-H2. Estas proteínas se expresan en células que presentan antígeno (CPA) y son necesarias para estimulación directa de células CD4⁺ que no se han sometido a tratamiento (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª Ed. (2003) Saunders, Filadelfia, p. 171). Las líneas celulares también se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª Ed. (2003) Saunders, Filadelfia, 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, Filadelfia, p. 171; Brown et al. (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266). Se piensa que la expresión de estas proteínas por células que residen en tejidos de placenta media el estado inmuno-privilegiado de tejidos de placenta en el útero. Para predecir la extensión con la que las líneas celulares derivadas del ombligo obtienen una respuesta inmune *in vivo*, las líneas celulares se analizaron en una reacción mezclada de linfocito en una dirección (MLR).

Las células se cultivaron en medio de cultivo (MEMD-bajo en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15% (v/v) suero fetal bovino (SFB); (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 50 Unidades/mililitro penicilina, 50 microgramos/mililitro estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA)) hasta confluencia en matraces T75 (Corning, Corning, NY) cubiertos con 2% gelatina (Sigma, St. Louis, MO).

Las células se lavaron en tampón fosfato salino (TFS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con Tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se cosecharon, centrifugaron y volvieron a suspender en 3% (v/v) FBS en TFS en una concentración de 1x10⁷ por mililitro. Se añadió anticuerpo (Tabla 14-1) a cien microlitros de suspensión celular siguiendo las especificaciones del fabricante y se centrifugaron a oscuras durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con TFS y se centrifugaron para eliminar anticuerpos no unidos. Las células se volvieron a suspender en quinientos microlitros de TFS y se analizaron mediante citometría de flujo usando un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 14-1. Anticuerpos

Anticuerpo	Fabricante	Número de Catálogo
HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557227
CD86	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555665
B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)	sc- 19681
PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846
IgG2a de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG1 kappa de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

Los viales criopreservados del paso 10 con células derivadas del cordón umbilical etiquetadas como línea celular A se enviaron en hielo seco a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción mezclada de linfocito usando CTBR SOP N° CAC-301. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de múltiples donantes voluntarios masculinos y femeninos. CMSP estimuladoras alogénicas (donante), CMSP autólogas y líneas celulares se trataron con mitomicina C. Las células estimuladoras autólogas y tratadas con mitomicina C se añadieron a CMSP respondedoras (receptor) y se cultivaron durante 4 días. Después de incubación, se añadió [³H]-timidina a cada muestra y se cultivó durante 18 horas. Después de cosechar las células, se extrajo ADN radioetiquetado, y la incorporación de [³H]-timidina se midió usando un contador de escintilación.

El índice de estimulación para el donante alogénico (IEDA) se calculó como una proliferación media del receptor más donante alogénico tratado con mitomicina C dividido entre la proliferación referencia del receptor. El índice de estimulación de células derivadas del cordón umbilical se calculó como la proliferación media del receptor más línea celular tratada con mitomicina C dividido entre la proliferación referencia del receptor.

Se analizó a seis donantes humanos voluntarios de sangre para identificar un único donante alogénico que mostrara una respuesta robusta de proliferación en una reacción mezclada de linfocito con los otros cinco donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante alogénico positivo control. Los otros cinco donantes de sangre se seleccionaron como receptores. El donante alogénico positivo control y las líneas celulares derivadas del cordón umbilical se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción mezclada de linfocito con los cinco receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado usando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 14-2). El índice medio de estimulación osciló entre 6,5 (placa 1) y 9 (placa 2) y los controles positivos de donantes alogénicos oscilaron entre 42,75 (placa 1) y 70 (placa 2) (Tabla 14-3).

Tabla 14-2. Datos de reacción mezclada de linfocito – línea celular A (Cordón umbilical)

DPM para ensayo de proliferación Placa ID: Placa 1									
Número analítico	Sistema de cultivo	Réplicas			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM04-2478	Referencia de proliferación de receptor	1074	406	391	623,7	390,07	62,5		
	Control de autoestimulación (células autólogas tratada con mitomicina C)	672	510	1402	861,3	475,19	55,2		
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	43777	48391	3823	4346	5087,1	11,7		
	MRL con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2914	5622	6109	4881,7	1721,3	35,3		
SI (donante)				70					
SI (línea celular)				8					

(continuación)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

DPM para ensayo de proliferación Placa ID: Placa 1							
Número analítico	Sistema de cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
		1	2	3			
M04-2479	Referencia de proliferación de receptor	530	508	527	521,7	11,93	2,3
	Control de autoestimulación (células autólogas tratada 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
	MRL con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	5086	3932	1497	3505,0	1832,21	52,3
SI (donante) SI (línea celular)					47 7		
IM04-2480	Referencia de proliferación de receptor	1192	854	1330	1125,3	244,90	21,80
	Control de autoestimulación (células autólogas tratada con mitomicina C)	29,63	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
	MRL con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2596	5076	3426	3699,3	1262,39	34,1
SI (donante) SI (línea celular)					23 3		
IM04-2481	Referencia de proliferación de receptor	695	451	555	567,0	122,44	21,6
	Control de autoestimulación (células autólogas tratada con mitomicina C)	738	1252	464	818,0	400,04	48,9
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	13177	24885	15444	17835,3	6209,52	34,8
	MRL con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	4495	3671	4674	4280,0	534,95	12,5
SI (donante) SI (línea celular)					31 8		

(continuación)

		Placa ID: Placa 2						
Número Analítico	Sistema de cultivo	Réplicas			Media	SD	CV	
		1	2	3				
5 10 15 20	Referencia de proliferación de receptor	432	533	274	413,0	130,54	31,6	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratada con mitomicina C)	1456	633	598	896,7	487,311	54,3	
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	24286	30823	31346	28818,3	3933,82	13,7	
	MRL con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2762	1502	6723	3662,3	2724	74,4	
25	SI (donante) SI (línea celular)				70 9			
30	Referencia de proliferación de receptor	312	419	349	360,0	54,34	15,1	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratada con mitomicina)	567	604	374	515,0	123,50	24,0	
35 40	Referencia de proliferación de receptor	5101	3735	2973	3936,3	1078,19	27,4	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratada con mitomicina)	1924	4570	2153	2882,3	1466,04	50,9	

45 **Tabla 14-3.** Índice medio de estimulación de células derivadas del cordón umbilical y un donante alogénico en una reacción mezclada de linfocito con cinco receptores individuales alogénicos.

	Receptor	Cordón umbilical
50 Placa 1 (receptores 1-4)	42,75	6,5
Placa 2 (receptor 5)	70	9

55 Los histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizadas mediante citometría de flujo muestra expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como lo indica el valor fluorescente consistente con el control IgG, lo que indica que las líneas celulares derivadas del cordón umbilical carecen de moléculas de superficie celular requeridas para estimular directamente CSMP alogénicos (por ejemplo, células CD4⁺).

60 Los histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizadas mediante citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, como lo indica el valor aumentado de fluorescencia en relación con el control IgG, y la expresión negativa de CD178 y HLA-G, como lo indica el valor fluorescente consistente con el control IgG.

65 En las reacciones mezcladas de linfocito realizados con líneas celulares derivadas del cordón umbilical, el índice medio de estimulación osciló entre 6,5 y 9, y el de los controles positivos alogénicos entre 42,75 y 70. Las

líneas celulares derivadas del cordón umbilical fueron negativas para la expresión de proteínas estimulantes HLA-DR, HLA-PD, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como lo midió la citometría de flujo. Las líneas celulares derivadas del cordón umbilical fueron negativas para la expresión de proteínas inmuno-moduladoras HLA-G y CD178 y positivas para la expresión de PD-L2, como lo mide la citometría de flujo. Las CSMP de donante alogénico contienen células presentes de antígeno que expresan HLA-DP, DR, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, permitiendo de ese modo la estimulación de CSMP alogénicas (por ejemplo, células CD4⁺ T que no se han sometido a tratamiento). La ausencia de moléculas de superficie celular que presentan antígeno en células derivadas del cordón umbilical requirió la estimulación directa de CSMP alogénicas (por ejemplo, células CD4⁺ T que no se han sometido a tratamiento) y la presencia de PD-L2, una proteína inmuno-moduladora, puede representar el índice bajo de estimulación mostrado por estas células en MLR en comparación con controles alogénicos.

Referencias

Bruder et al., USP 6.355.239 B1 (2002)
 15 Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 5ª Ed. (2003) Saunders, Filadelfia, p. 171.
 Bouteiller et al., Placenta, 2003; 24:S10-S15.
 Coumans et al., Journal of Immunological Methods, 1999; 224:185-196.
 Brown et al., The Journal of Immunology, 2003; 170:1257-1266.

20 **LISTADO SECUENCIAL**

- <110> HARMON ALEXANDER M. ANG, ABEL
- 25 <120> MEDIO ACONDICIONADO Y MÉTODOS PARA HACER UN MEDIO ACONDICIONADO
- <130> 026038.0229PTUS
- <140> PCTUS0967904
- 30 <141> 2009-12-14
- <150> 12/399.872
- <151> 2008-12-19
- 35 <160> 10
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 40 <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> Descripción de Secuencia artificial: cebador sintético
- <400> 1
- gagaaatcca aagagcaaat gg 22
- 50 <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> Descripción de Secuencia artificial: cebador sintético
- <400> 2
- 60 agaattgaaa actggaatag g 21
- <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 65 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador sintético

<400> 3
 tcttcgatgc ttcggattcc 20

5

<210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

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

<400> 4
 gaattctcgg aatctcgtt g 21

15

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

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

<400> 5
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

25

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

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

<400> 6
 Agtaaacatt gaaaccacag cc 22

35

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

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

<400> 7
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20

50

<210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

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

<400> 8
 ctcaaaaac ttctccaca cc 22

60

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

65

ES 2 551 732 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador sintético

5 <400> 9
cccacgccac gctctcc 17

<210> 10

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador sintético

15 <400> 10
tcctgtcagt tgggtctcc 19

20

25

30

35

40

45

50

55

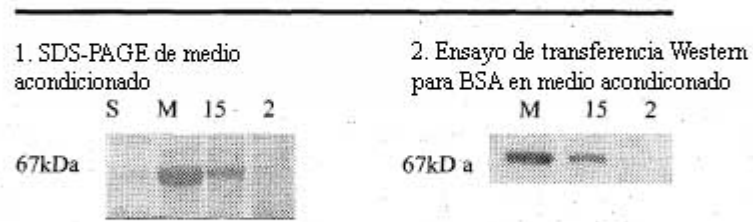
60

65

Reivindicaciones

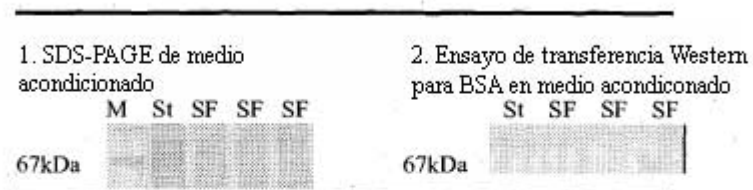
- 5 1. Un método para preparar un medio acondicionado, comprendiendo el método:
sembrar una célula derivada de tejido del cordón umbilical humano (CTU) en un cultivo de gota microtransportadora;
reducir el contenido de suero del medio de cultivo en una o más etapas incrementales;
transferir la CTU del cultivo con contenido reducido de suero a un medio basal libre de suero;
10 cultivar la CTU en el medio basal libre de suero durante no más de 24 horas; y
aislar la CTU del medio basal libre de suero dejando un medio acondicionado, donde las proteínas de suero bovino
en el medio acondicionado están presentes en una cantidad por debajo del límite detectable de SDS-PAGE y/o
ensayo de transferencia Western.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde el método comprende transferir la CTU del medio de cultivo con contenido
reducido de suero a un medio basal libre de suero cuando el contenido de suero alcanza un nivel predeterminado.
3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2 que además comprende filtrar el medio acondicionado.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además comprende concentrar el medio
acondicionado.
5. El método de la reivindicación 4, donde el medio acondicionado está concentrado con una membrana límite.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, donde el contenido de suero se reduce en incrementos de aproximadamente 5%
a aproximadamente 60%.
7. El método de la reivindicación 1, donde la CTU crece durante aproximadamente 1 a 3 pasos en cada incremento.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones a 1 a 7, que además comprende cultivar preliminarmente la
CTU en un medio de cultivo estándar y aislar la CTU del medio de cultivo estándar antes de la siembra.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1



Leyenda:
 S- Estándares de peso molecular
 M - No células + 15% FBS
 15 - Células + 15% FBS
 2 - Células + 2% FBS

Figura 2



Leyenda:
 M - Estándares de peso molecular
 St - Matraz estático
 SF - Matraz giratorio