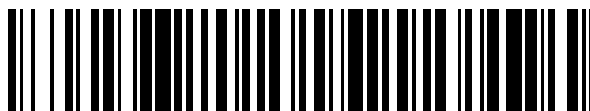


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 226**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004** **E 10183911 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 2341131**

54 Título: **Reparación y regeneración de cartílago y hueso utilizando células derivadas posparto**

30 Prioridad:

27.06.2003 US 483264 P

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

26.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 552 226 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).

Reparación y regeneración de cartílago y hueso utilizando células derivadas posparto

Descripción

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la biología de las células de mamífero y al cultivo celular. En particular, la invención se refiere a células derivadas de tejido posparto con el potencial de diferenciarse a linajes condrogénicos y osteogénicos, y a métodos de preparación y uso de esas células derivadas de tejido posparto, incluidas terapias celulares para afecciones óseas y cartilaginosas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades y afecciones óseas y cartilaginosas afectan a gran parte de la población. En los mamíferos existen tres tipos de cartílago, e incluyen: cartílago hialino, fibrocartílago y cartílago elástico. El cartílago hialino consiste en una masa cartilaginosa que tiene una consistencia firme y elástica, es translúcido y de color azul nacarado. El cartílago hialino se encuentra predominantemente en las superficies articulares de las uniones articulares. Se encuentra también en las placas epifisarias, el cartílago costal, el cartílago traqueal, el cartílago bronquial y el cartílago nasal. El fibrocartílago es esencialmente igual al cartílago hialino salvo porque contiene fibrillas de colágeno tipo I que añaden al cartílago resistencia a la tracción. Las fibras de colágeno se disponen en haces, situándose las células del cartílago entre los haces. El fibrocartílago se encuentra comúnmente en el anillo fibroso del disco intervertebral, las inserciones tendinosas y ligamentosas, los meniscos, la sínfisis pubiana y las inserciones de las cápsulas articulares. El cartílago elástico es también similar al cartílago hialino salvo porque contiene fibras de elastina. Es más opaco que el cartílago hialino y es más flexible y distensible. Estas características vienen definidas en parte por las fibras elásticas incorporadas en la matriz del cartílago. Por lo general, el cartílago elástico está presente en los pabellones auriculares, la epiglotis y la laringe.

Las superficies de los huesos articulares en las articulaciones de los mamíferos están cubiertas con cartílago articular. El cartílago articular evita el contacto directo de las superficies óseas opuestas y permite el movimiento casi sin fricción de los huesos articulares uno con respecto al otro. Comúnmente se observan en mamíferos dos tipos de defectos del cartílago articular e incluyen defectos de espesor total y de espesor parcial. Los dos tipos de defectos difieren no sólo en la gravedad de la lesión física, sino también en la naturaleza de la respuesta de reparación que induce cada tipo de lesión.

Los defectos del cartílago articular de espesor total incluye lesión del cartílago articular, del tejido óseo subcondral subyacente y de la capa calcificada del cartílago situado entre el cartílago articular y el hueso subcondral. Por lo general, los defectos de espesor total surgen durante un traumatismo grave de la articulación o durante las últimas etapas de las enfermedades articulares degenerativas, por ejemplo, durante la osteoartritis. Dado que el tejido óseo subcondral está innervado y vascularizado, la lesión de este tejido es con frecuencia dolorosa. La reacción de reparación inducida por la lesión del hueso subcondral da por lo general como resultado la formación de fibrocartílago en el sitio del defecto de espesor total. Sin embargo, el fibrocartílago carece de las propiedades biomecánicas del cartílago articular y no persiste en la articulación a largo plazo.

Los defectos del cartílago articular de espesor parcial se limitan al propio tejido cartilaginoso. Estos defectos incluyen por lo general fisuras o grietas en la superficie articular del cartílago. Los defectos de espesor parcial se deben a disposiciones mecánicas de la articulación que a su vez inducen desgaste del tejido cartilaginoso dentro de la articulación. En ausencia de innervación y vasculatura, los defectos de espesor parcial no inducen respuestas de reparación y por lo tanto tienden a no sanar. Aunque indoloros, los defectos de espesor parcial degeneran con frecuencia en defectos de espesor total.

El cartílago puede desarrollarse de manera anormal o quedar lesionado por una enfermedad, tal como la artritis reumatoide o la osteoartritis, o por un traumatismo, cada uno de los cuales puede conducir a la deformidad física y al debilitamiento. Se lesione el cartílago por un traumatismo o por anomalías congénitas, su regeneración clínica exitosa es con frecuencia escasa en el mejor de los casos, según la revisión de Howell, *et al.* Osteoarthritis: Diagnosis and Management, 2ª edición, (Filadelfia, W.B. Saunders, 1990) y Kelley, *et al.* Textbook of Rheumatology, 3ª ed., (Filadelfia, W.B. Saunders, 1989).

Las afecciones óseas también están muy extendidas. Por ejemplo, existen generalmente dos tipos de afecciones óseas: las afecciones óseas no metabólicas, tales como las fracturas óseas, la deformación ósea/vertebral, osteosarcoma, mieloma, displasia ósea y escoliosis, y las afecciones óseas metabólicas, tales como la osteoporosis, la osteomalacia, el raquitismo, la osteítis fibrosa, la osteodistrofia renal y la enfermedad ósea de Paget. La osteoporosis, una enfermedad ósea metabólica, es una enfermedad sistémica caracterizada por un aumento de la fragilidad y la fracturabilidad ósea debida a una disminución de la masa ósea y al cambio en la estructura tisular del hueso fino, incluyendo sus principales síntomas clínicos la cifosis vertebral, y fracturas de los huesos dorsolumbares, los centros vertebrales, los cuellos femorales, el extremo inferior del radio, las costillas, el extremo superior del húmero, y otros. En el tejido óseo se producen constantemente la formación y la destrucción

óseas debidas a la resorción ósea. Al deteriorarse el equilibrio entre la formación ósea y la destrucción ósea debidas a la resorción ósea, se produce una reducción cuantitativa del hueso. Tradicionalmente, se han utilizado principalmente supresores de resorción ósea, tales como estrógenos, calcitonina y bisfosfonatos para tratar la osteoporosis.

El injerto óseo se utiliza con frecuencia para tratar afecciones óseas. De hecho, en el mundo desarrollado se realizan anualmente más de 1,4 millones de procedimientos de injerto óseo. La mayoría de estos procedimientos se aplican después de la cirugía de reemplazo articular o durante la reconstrucción quirúrgica tras un traumatismo. El éxito o el fracaso de injerto óseo dependen de varios factores que incluyen la vitalidad del sitio del injerto, el procesamiento del injerto y la compatibilidad inmunitaria del tejido injertado.

En vista de la prevalencia de las afecciones óseas y cartilaginosas, existe una gran demanda de nuevas fuentes de tejido óseo y cartilaginoso para usos terapéuticos, diagnósticos y en investigación.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona una población de células homogénea aislada derivada de tejido de cordón umbilical humano, para su uso en el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa, en la que dicha población celular puede obtenerse mediante digestión enzimática de tejido de cordón umbilical humano exento de sangre con una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica, y en la que dicha población celular es capaz de autorrenovación y de proliferación en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse a células de otros fenotipos, y en la que la población de células:

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

La invención se refiere en general a células derivadas posparto que se derivan de tejido de cordón umbilical humano para su uso en el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa como se relata en las reivindicaciones. El tejido de cordón umbilical humano está exento de sangre y las células son capaces de autorrenovación y de proliferación en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse a una célula de los fenotipos osteocito o condrocito.

En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona células derivadas de tejido posparto humano sustancialmente exentas de sangre, capaces de autorrenovación y de proliferación en cultivo, con el potencial de diferenciarse a una célula de un fenotipo osteogénico o condrogénico; que necesitan L-valina para crecer; capaces de crecer a una concentración de oxígeno de entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 20%; y que tienen adicionalmente al menos una de las siguientes características:

- producción de al menos uno de GCP-2, factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso; ausencia de producción de al menos uno de NOGO-A, GRO-alfa o receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada, según se detecta mediante citometría de flujo;
- producción de al menos uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C;
- ausencia de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, según se detecta mediante citometría de flujo;
- expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para al menos uno de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa, o expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para al menos uno de miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113;
- expresión, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está reducida para al menos uno de: caja homeótica 2 de la baja estatura; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica 2 de mesénquima; homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis"; cristalina, alfa B; activador de morfogénesis 2 asociado a "dishevelled"; proteína DKFZp586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina; dominio 3 de homología con src y rico en cisteínas; gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con el enanismo; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de "frizzled"; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína de caja homeótica iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesícula sináptica; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citocinas; canal de

potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis"; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido atrial natriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína de membrana asociada a vesícula 5; proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF; similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa; y la capacidad de someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo.

La célula derivada posparto de la invención es una célula derivada de tejido de cordón umbilical. En otras formas de realización de la divulgación, es una célula derivada de la placenta. En formas de realización específicas, la célula tiene todas las características identificativas de cualquiera de: en formas de realización de la divulgación, tipo celular PLA 071003 (P8) (número de registro de la ATCC PTA-6074); tipo celular PLA 071003 (P11) (número de registro de la ATCC PTA-6075); tipo celular PLA 071003 (P16) (número de registro de la ATCC PTA-6079); en formas de realización de la invención, tipo celular UMB 022803 (P7) (número de registro de la ATCC PTA-6067); o tipo celular UMB 022803 (P17) (número de registro de la ATCC PTA-6068). Las células derivadas posparto de la invención son células humanas.

Puede inducirse a las células a diferenciarse a un fenotipo osteogénico o condrogénico. Se contemplan métodos para inducir la diferenciación de las células derivadas posparto de la invención. Por ejemplo, puede inducirse a las células a diferenciarse a una célula con un fenotipo osteogénico o condrogénico. Los métodos para inducir la diferenciación de las células de la invención implican preferentemente exponer las células a uno o más agentes inductores de la diferenciación. Los agentes inductores de la osteogénesis incluyen proteínas morfogénicas óseas (por ejemplo, BMP-2, BMP-4) y el factor de crecimiento transformante (TGF-beta1), y combinaciones de los mismos. Los agentes inductores de la condrogénesis incluyen TGF-beta3, GDF-5, y una combinación de los mismos. La divulgación incluye las células inducidas a diferenciarse y las poblaciones, composiciones y productos de las mismas. Las células inducidas a diferenciarse de un linaje osteogénico expresan preferentemente al menos un marcador de linaje osteogénico (por ejemplo, osteocalcina, sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina). La diferenciación de las PPDC a un linaje osteogénico puede evaluarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo pero sin limitarse a, la medición de la mineralización (por ejemplo, tinción de von Kossa). Las células inducidas a diferenciarse de un linaje condrogénico expresan preferentemente al menos un marcador de linaje condrogénico (por ejemplo, glicosaminoglicano, colágeno de tipo II). La diferenciación de las PPDC a un linaje condrogénico puede evaluarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo pero sin limitarse a, tinción con safranina-O o hematoxilina/eosina.

La invención proporciona poblaciones de PPDC de la invención para su uso en el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa. Las PPDC pueden estar inducidas a diferenciarse o estar indiferenciadas. En algunas formas de realización, se mezcla una población de células derivadas posparto con otra población de células. Las poblaciones de células de la invención son sustancialmente homogéneas, es decir, comprenden sustancialmente sólo PPDC (preferentemente al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99% o más de PPDC). La población celular homogénea de la invención comprende células derivadas de tejido de cordón umbilical. La homogeneidad de una población celular puede conseguirse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo), separación con perlas, o mediante proliferación clonal.

La invención también proporciona cultivos celulares heterogéneos y homogéneos que contienen las células derivadas posparto de la invención.

Algunas formas de realización de la invención proporcionan una matriz para implantar en un paciente en la que se han sembrado una o más células derivadas posparto de la invención. La matriz puede contener o tratarse con uno o más factores bioactivos, incluidos agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimetocuerpo de la EPO ("EPO mimetibody"), TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasas); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMENTIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal contra linfocitos T, OKT3)); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios,

aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas e inhibidores plaquetarios); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína).

5 También quedan comprendidos dentro del alcance de la divulgación productos de PPDC, incluidas matrices extracelulares de PPDC, lisados celulares (por ejemplo, fracciones celulares solubles) de PPDC, y medio acondicionado para PPDC.

10 En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones de PPDC y uno o más factores bioactivos, por ejemplo, pero no limitados a, factores de crecimiento, factores inductores de la diferenciación condrogénica u osteogénica, agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimetocuerpo de la EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasas); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMENTIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal contra linfocitos T, OKT3)); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPack (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas e inhibidores plaquetarios); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína).

25 Las composiciones farmacéuticas de las células derivadas posparto quedan incluidas dentro del alcance de la invención y las composiciones farmacéuticas de matriz extracelular producidas de ese modo, los lisados celulares de las mismas, y el medio acondicionado para PPDC quedan incluidos dentro del alcance de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas incluyen preferentemente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas son preferentemente para tratar afecciones óseas o cartilaginosas tal como se define en el presente documento.

30 La divulgación proporciona adicionalmente en algunos aspectos métodos de regeneración de tejido óseo o cartilaginoso en un paciente que lo necesita mediante la administración de las células, matrices o productos de PPDC de la invención en un paciente.

35 La invención proporciona adicionalmente células derivadas posparto, poblaciones de PPDC, matrices o composiciones de la invención para su uso en métodos de tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa en un paciente. La divulgación proporciona adicionalmente lisados celulares, una combinación de lisado celular y matriz extracelular, o un medio acondicionado de la divulgación para su uso en métodos de tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa en un paciente. Las PPDC, matrices (por ejemplo, andamiajes), y composiciones de la invención pueden utilizarse en el tratamiento de afecciones del tejido óseo o cartilaginoso, por ejemplo, pero sin limitarse a, defectos congénitos, fracturas óseas, lesiones o defectos de menisco, deformación ósea/vertebral, osteosarcoma, mieloma, displasia ósea y escoliosis, osteoporosis, enfermedad periodontal, pérdida ósea dental, osteomalacia, raquitismo, osteítis fibrosa, osteodistrofia renal, fusión vertebral, reconstrucción o extracción de disco vertebral, enfermedad ósea de Paget, lesiones de menisco, artritis reumatoide, osteoartritis, o una lesión traumática o quirúrgica en el cartílago o hueso.

40 La invención también proporciona kits que comprenden las células derivadas posparto de la invención. Los kits de la invención pueden contener adicionalmente al menos un componente de una matriz, un segundo tipo de célula, un agente hidratante, un sustrato de cultivo celular, un agente inductor de la diferenciación, medios de cultivo celular e instrucciones, por ejemplo, para el cultivo de las células o la administración de las células y/o los productos celulares.

45 En algunas formas de realización, la divulgación describe métodos para identificar compuestos que modulan la condrogénesis o la osteogénesis de una célula derivada posparto, que comprenden poner en contacto una célula de la invención con dicho compuesto y realizar el seguimiento de la célula para un marcador de condrogénesis o de osteogénesis. También se describen métodos para identificar un compuesto tóxico contra una célula derivada posparto de la invención poniendo en contacto dicha célula con dicho compuesto y realizando el seguimiento de la supervivencia de dicha célula.

60 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y los ejemplos que a continuación siguen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

Definiciones

Los diversos términos utilizados a lo largo de la memoria y en las reivindicaciones se definen como se expone a continuación.

5 Las *células madre* son células indiferenciadas definidas por su capacidad a nivel de célula individual para autorrenovarse y diferenciarse para producir células de la progenie, incluidas células progenitoras auto-renovantes, progenitoras no renovantes y con diferenciación terminal. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* a células funcionales de diversos 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, si no todos, los tejidos después de inyectarse en blastocistos.

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

25 Las células madre también se clasifican en base a la fuente de la que pueden obtenerse. Una *célula madre adulta* es generalmente una célula indiferenciada multipotente que se encuentra en tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre adulta puede renovarse a sí misma y, en circunstancias normales, diferenciarse para producir los tipos especializados de células del tejido del que se originó, y posiblemente otros tipos de tejidos. Una *célula madre embrionaria* es una célula pluripotente de la masa celular interna de un embrión en la etapa de blastocisto. Una *célula madre fetal* es la que procede de membranas o tejidos fetales. Una *célula madre posparto* es una célula multipotente o pluripotente que procede sustancialmente de tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, a saber, la placenta y el cordón umbilical. Se ha descubierto que estas células poseen rasgos característicos de las células madre pluripotentes, incluidos la proliferación rápida y el potencial de diferenciarse a muchos linajes celulares. Las células madre posparto pueden tener origen sanguíneo (por ejemplo, como lo son las obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical) o no tener origen sanguíneo (por ejemplo, como las obtenidas a partir de tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y de la placenta).

35 El *tejido embrionario* se define por lo general como un tejido procedente del embrión (que en los seres humanos se refiere al período desde la fertilización hasta aproximadamente las seis semanas de desarrollo). La expresión *tejido fetal*, se refiere a tejido procedente del feto, que en los seres humanos se refiere al período desde aproximadamente las seis semanas de desarrollo hasta el parto. El *tejido extraembrionario* es tejido asociado con, pero no procedente de, el embrión o el feto. Los tejidos extraembrionarios incluyen membranas extraembrionarias (corion, amnios, saco vitelino y alantoides), cordón umbilical y placenta (que a su vez forma el corion y la decidua basal materna).

45 La *diferenciación* es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una *célula diferenciada* o *inducida a diferenciarse* es la que ha asumido una categoría más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término *comprometida*, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en el que, en circunstancias normales, continuará hasta diferenciarse a un tipo celular específico o a un subconjunto de tipos celulares, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse a un tipo celular diferente o volver a un tipo celular menos diferenciado. *Desdiferenciación* se refiere al proceso por el cual una célula vuelve a una categoría menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el *linaje* de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procedía y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un *marcador específico de linaje* se refiere a una característica específicamente asociada con el fenotipo de las células de un linaje de interés y puede utilizarse para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida al linaje de interés.

60 En un sentido amplio, una *célula progenitora* es una célula que tiene la capacidad de crear progenie más diferenciada que ella misma y que sin embargo conserva la capacidad de reabastecer la reserva de progenitoras. Según esta definición, las propias células madre son también células progenitoras, ya que son las precursoras más inmediatas hacia las células con diferenciación terminal. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, como se describe con mayor detalle más adelante, puede utilizarse esta amplia definición de *células progenitoras*. En un sentido más estricto, una célula progenitora se define con frecuencia como una célula que es una intermediaria en la vía de diferenciación, es decir, que surge de una célula madre y es una intermediaria en la producción de un tipo de célula madura o un subconjunto de tipos celulares. Este tipo de célula progenitora no es

capaz generalmente de autorrenovarse. Por consiguiente, si se hace referencia en el presente documento a este tipo de célula, se denominará *célula progenitora no renovante* o *célula precursora o progenitora intermediaria*.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión *se diferencia a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico* se refiere a una célula que se compromete hasta un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico específico, respectivamente. Los ejemplos de células que se diferencian a un linaje mesodérmico o dan lugar a células mesodérmicas específicas incluyen, pero no se limitan a, células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, hemangiogénicas, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas o estromales. Los ejemplos de células que se diferencian al linaje ectodérmico incluyen, pero no se limitan a, células epidérmicas, células neurogénicas y células neurogliagénicas. Los ejemplos de células que se diferencian al linaje endodérmico incluyen, pero no se limitan a, células pleurigénicas y células hepatogénicas, células que dan lugar al revestimiento intestinal, y células que dan lugar a células pancreogénicas y esplanogénicas.

Los subconjuntos de *células derivadas posparto (PPDC)* se denominan *células derivadas de la placenta (PDC)* de la divulgación o *células derivadas de tejido de cordón umbilical (UDC)* de la invención. Las PPDC de la invención son células derivadas de tejido de cordón umbilical. Las PPDC de la invención abarcan células indiferenciadas e inducidas a diferenciarse. Además, las células pueden describirse como células madre o progenitoras, utilizándose este último término en el sentido amplio. El término *derivada* se utiliza para indicar que las células se han obtenido a partir de su fuente biológica y cultivado o manipulado de otra manera *in vitro* (por ejemplo, cultivadas en un medio de crecimiento para aumentar la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de células derivadas posparto y las características únicas de las células derivadas posparto de la presente invención se describen detalladamente más adelante.

Se utilizan diversos términos para describir las células en cultivo. *Cultivo celular* se refiere generalmente a células sacadas de un organismo vivo, y cultivadas en condiciones controladas ("en cultivo"). Un *cultivo de células primarias* es un cultivo de células, tejidos u órganos sacados directamente de los organismos y antes del primer subcultivo. Las células *se hacen proliferar* en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, lo que da como resultado una mayor población de las células. Cuando las células se hacen proliferar en cultivo, la velocidad de proliferación celular se mide a veces por la cantidad de tiempo necesario para duplicar el número de células. Esto se conoce como *tiempo de duplicación*.

Una *línea celular* es una población de células formada por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se conoce como *pase*. Cuando se subcultivan las células, se dice que han sido *sometidas a pases*. Una población de células, o una línea celular, específica es conocida o se caracteriza a veces por el número de veces que ha sido sometida a pases. Por ejemplo, una población celular cultivada que se ha sometido a pases diez veces puede denominarse cultivo *P10*. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo tras el aislamiento de las células a partir del tejido, se denomina *P0*. Después del primer subcultivo, las células se describen como cultivo secundario (*P1* o *pase 1*). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (*P2* o *pase 2*), y así sucesivamente. Los expertos en la materia entenderán que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el período de pases; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es superior al número de pases. La proliferación de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el período entre pases depende de muchos factores, incluidos pero no limitados a la densidad de siembra, el sustrato, el medio y el tiempo entre pases.

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

En general, un *factor trófico* se define como una sustancia que promueve la supervivencia, el crecimiento, la proliferación, la maduración, la diferenciación y/o el mantenimiento de una célula, o estimula el aumento de la actividad de una célula.

Cuando se hace referencia a las células cultivadas de vertebrados, el término *senescencia* (también *senescencia replicativa* o *senescencia celular*) se refiere a una propiedad atribuible a los cultivos celulares finitos; a saber, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de la población (a veces conocido como *límite de Hayflick*). Aunque la senescencia celular se describió por primera vez utilizando células tipo fibroblasto, la mayoría de los tipos celulares humanos normales que pueden desarrollarse con éxito en cultivo experimentan senescencia celular. La longevidad *in vitro* de los diferentes tipos celulares varía, pero la longevidad máxima es por lo general inferior a 100 duplicaciones de la población (este es el número de duplicaciones para que todas las células del cultivo se vuelvan senescentes y por lo tanto hagan al cultivo incapaz de dividirse). La senescencia no depende del tiempo cronológico, sino más bien se mide por el número de divisiones celulares, o duplicaciones de la población, que ha experimentado el cultivo. Por lo tanto, las células que se hacen quiescentes eliminando los factores de crecimiento esenciales son capaces de reanudar el crecimiento y la división cuando se

reintroducen los factores de crecimiento, y, posteriormente, llevar a cabo el mismo número de duplicaciones que las células equivalentes que se han desarrollado continuamente. Asimismo, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de diversos números de duplicaciones de la población y, a continuación, se descongelan y cultivan, experimentan sustancialmente el mismo número de duplicaciones que las células mantenidas no congeladas en cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; en realidad son resistentes a la muerte celular programada (apoptosis), y se han mantenido en su estado de no división durante hasta tres años. Estas células están realmente vivas y son metabólicamente activas, pero no se dividen. Aún no se ha descubierto que el estado de no división de las células senescentes sea reversible mediante ningún agente biológico, químico o el viral.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión *Medio de crecimiento* se refiere a un medio de cultivo suficiente para que proliferen las células derivadas posparto. El medio de cultivo del Medio de crecimiento contiene preferentemente medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM). Más preferentemente, el Medio de crecimiento contiene glucosa. El Medio de crecimiento contiene preferentemente DMEM con bajo contenido de glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El Medio de crecimiento contiene preferentemente suero a aproximadamente el 15% (v/v) (por ejemplo, suero bovino fetal, suero bovino definido). El Medio de crecimiento contiene preferentemente al menos un antibiótico y/o un antimicótico (por ejemplo, penicilina, estreptomycin, anfotericina B, gentamicina, nistatina, preferentemente, 50 unidades/mililitro de penicilina G sódica y 50 microgramos/mililitro de sulfato de estreptomycin). El Medio de crecimiento contiene preferentemente 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO). Lo más preferentemente, el Medio de crecimiento contiene DMEM con bajo contenido de glucosa, suero, 2-mercaptoetanol y un antibiótico.

Tal como se utiliza en el presente documento, *condiciones de crecimiento normales* se refiere a las condiciones atmosféricas normales que comprenden CO₂ a aproximadamente el 5%, una temperatura de aproximadamente 35°C-39°C, más preferentemente 37°C, y una humedad relativa de aproximadamente el 100%.

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

El término *aproximadamente* se refiere a una aproximación de un valor indicado dentro de un intervalo de $\pm 10\%$.

Afección (o lesión o enfermedad) ósea es una expresión incluyente que abarca afecciones, trastornos o enfermedades óseas agudas y crónicas, y metabólicas y no metabólicas. La expresión abarca las afecciones debidas a enfermedad o traumatismo o a la incapacidad del tejido para desarrollarse normalmente. Los ejemplos de afecciones óseas incluyen, pero no se limitan a, defectos óseos congénitos, fracturas óseas, lesiones o defectos del menisco, deformación ósea/vertebral, osteosarcoma, mieloma, displasia ósea y escoliosis, osteoporosis, enfermedad periodontal, pérdida ósea dental, osteomalacia, raquitismo, osteítis fibrosa, osteodistrofia renal, fusión vertebral, reconstrucción o extracción de disco vertebral, y la enfermedad ósea de Paget.

Afección (o lesión o enfermedad) cartilaginosa es una expresión incluyente que abarca afecciones, trastornos o enfermedades, agudas y crónicas, del cartílago. La expresión abarca afecciones que incluyen, pero no se limitan a, defectos congénitos, lesiones de menisco, artritis reumatoide, osteoartritis, o una lesión traumática o quirúrgica en el cartílago.

La expresión *tratar (o tratamiento de) una afección ósea o cartilaginosa* se refiere a mejorar los efectos de, o retrasar, detener o revertir la evolución de, o retrasar o prevenir la aparición de, una afección ósea o cartilaginosa tal como se define en el presente documento.

La expresión *cantidad eficaz* se refiere a una concentración de un reactivo o composición farmacéutica, tal como un factor de crecimiento, un agente de diferenciación, un factor trófico, una población celular u otro agente, que es eficaz para producir un resultado deseado, incluido el crecimiento celular y/o la diferenciación *in vitro* o *in vivo*, o el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa tal como se describe en el presente documento. Con respecto a los factores de crecimiento, una cantidad eficaz puede variar de aproximadamente 1 nanogramo/mililitro a aproximadamente 1 microgramo/mililitro. Con respecto a las PPDC como se administran a un paciente *in vivo*, una cantidad eficaz puede variar de tan solo varios cientos o menos, hasta varios millones o más. En formas de realización específicas, una cantidad eficaz puede variar de 10^3 - 10^{11} . Se entenderá que el número de células a administrar variará dependiendo de las características específicas del trastorno a tratar, incluidas, pero no limitadas al tamaño o volumen/superficie total a tratar, así como la proximidad del sitio de administración a la situación de la zona a tratar, entre otros factores familiares para el biólogo médico.

Las expresiones *período (o tiempo) eficaz* y *condiciones eficaces* se refieren a un período de tiempo o de otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para los métodos *in vitro*), necesarias o preferentes para que un agente o composición farmacéutica consiga su resultado previsto.

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

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

La expresión *vehículo* (o *medio*) *farmacéuticamente aceptable*, que puede utilizarse indistintamente con la expresión *vehículo* o *medio biológicamente compatible*, se refiere a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Como se describe con mayor detalle en el presente documento, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para utilizarse en la presente invención incluyen materiales líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y sólidos (por ejemplo, andamiajes celulares). Tal como se utiliza en el presente documento, el término *biodegradable* describe la capacidad de un material para descomponerse (por ejemplo, degradarse, erosionarse, disolverse) *in vivo*. El término incluye la degradación *in vivo* con o sin la eliminación (por ejemplo, mediante resorción) desde el cuerpo. Los materiales semisólidos y sólidos pueden diseñarse para que resistan la degradación dentro del cuerpo (*no biodegradables*) o pueden diseñarse para que se degraden dentro del cuerpo (*biodegradables*, *bioerosionables*). Un material biodegradable puede ser además *biorreabsorbible* o *bioabsorbible*, es decir, puede disolverse y absorberse en los líquidos corporales (los implantes solubles en agua son un ejemplo), o degradarse y, finalmente, eliminarse del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o por la descomposición y eliminación a través de vías naturales.

En el presente documento se utilizan varios términos con respecto a la terapia de reemplazo celular. Las expresiones *transferencia autóloga*, *trasplante autólogo*, *autoinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de células es también el destinatario de la terapia de reemplazo celular. Las expresiones *transferencia alogénica*, *trasplante alogénico*, *aloinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de células es de la misma especie que el receptor de la terapia de reemplazo celular, pero no es el mismo individuo. Una transferencia de células en la que las células del donante han sido coincidentes en histocompatibilidad con un receptor se conoce a veces como *transferencia singénica*. Las expresiones *transferencia xenogénica*, *trasplante xenogénico*, *xenoinjerto* y similares se refieren a tratamientos en los que el donante de células es de una especie diferente a la del destinatario de la terapia de reemplazo celular.

En el presente documento se utilizan las siguientes abreviaturas:

ANG2 (o Ang2) por angiopoyetina 2;
APC por células presentadoras de antígeno;
BDNF por factor neurotrófico derivado del cerebro;
bFGF por factor de crecimiento de fibroblastos básico;
bid (BID) por "bis in die" (dos veces al día);
BSP por sialoproteína ósea;
CK18 por citoqueratina 18;
Ligando 3 de CXC por ligando 3 del receptor de quimiocinas;
DAPI por 4'-6-Diamidino-2-fenilindol-2HCl;
DMEM por medio esencial mínimo de Dulbecco;
DMEM:lg (o DMEM:Lg, DMEM:LG) por DMEM con bajo contenido de glucosa;
EDTA por ácido etilendiaminotetraacético;
EGF (o E) por factor de crecimiento epidérmico;
EPO por eritropoyetina;
FACS por clasificación de células activadas por fluorescencia;
FBS por suero bovino fetal;
FGF (o F) por factor de crecimiento de fibroblastos;
GCP-2 por proteína 2 quimiotáctica para granulocitos;
GDF-5 por factor 5 de crecimiento y diferenciación;
GFAP por proteína ácida fibrilar de la glía;
HB-EGF por factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina;
HCAEC por células endoteliales de la arteria coronaria humana;
HGF por factor de crecimiento de hepatocitos;
hMSC por células madre mesenquimales humanas;
HNF-1 α por factor de transcripción específico de hepatocitos;
HUVEC por células endoteliales de vena umbilical humana;
I309 por una quimiocina y el ligando para el receptor CCR8 y es responsable de la quimioatracción de linfocitos T de tipo TH2;
IGF por factor de crecimiento insulinoide;
IL-6 por interleucina 6;
IL-8 por interleucina 8;

	<i>K19</i> por queratina 19;
	<i>K8</i> por queratina 8;
	<i>KGF</i> por factor de crecimiento de queratinocitos;
5	<i>MCP-1</i> por proteína 1 quimiotáctica para monocitos;
	<i>MDC</i> por quimiocina derivada de macrófagos;
	<i>MIP1alfa</i> por proteína inflamatoria de macrófagos 1alfa;
	<i>MIP1beta</i> por proteína inflamatoria de macrófagos 1beta;
	<i>MMP</i> por metaloproteasa de matriz (MMP);
10	<i>MSC</i> por células madre mesenquimales;
	<i>NHDF</i> por fibroblastos dérmicos humanos normales;
	<i>NPE</i> por medios para la proliferación de progenitoras neurales;
	<i>OxLDLR</i> por receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada;
	<i>PBMC</i> por células mononucleares de sangre periférica;
15	<i>PBS</i> por solución salina tamponada con fosfato;
	<i>PDC</i> por célula derivada de la placenta;
	<i>PDGF-bb</i> por factor de crecimiento plaquetario;
	<i>PDGFr-alfa</i> por receptor alfa del factor de crecimiento plaquetario;
	<i>PD-L2</i> por ligando de muerte programada 2;
20	<i>PE</i> por ficoeritrina;
	<i>PO</i> por "per os" (por vía oral);
	<i>PPDC</i> por célula derivada posparto;
	<i>Rantes</i> (o <i>RANTES</i>) por expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación;
	<i>rb</i> por conejo;
25	<i>rh</i> por humana recombinante;
	<i>SC</i> por vía subcutánea;
	<i>SCID</i> por inmunodeficiencia combinada grave;
	<i>SDF-1alfa</i> por factor derivado de células del estroma 1alfa;
	<i>SHH</i> por Sonic Hedgehog;
30	<i>SMA</i> por actina de músculo liso;
	<i>SOP</i> por procedimiento normalizado de trabajo;
	<i>TARC</i> por quimiocina regulada por el timo y por activación;
	<i>TCP</i> por plástico de cultivo tisular;
	<i>TGFbeta2</i> por factor de crecimiento transformante beta2;
35	<i>TGFbeta-3</i> por factor de crecimiento transformante beta-3;
	<i>TIMP1</i> por inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz 1;
	<i>TPO</i> por trombopoyetina;
	<i>TuJ1</i> por BIII-tubulina;
	<i>UDC</i> por célula derivada de tejido de cordón umbilical;
40	<i>VEGF</i> por factor de crecimiento del endotelio vascular;
	<i>vWF</i> por factor de von Willebrand; y
	<i>alfaFP</i> por alfa-fetoproteína.

Descripción

45	En un aspecto, la invención proporciona una población de células homogénea aislada derivada de tejido de cordón umbilical humano, para su uso en el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa, en la que dicha población celular puede obtenerse mediante digestión enzimática de tejido de cordón umbilical humano exento de sangre con una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica, y en la que dicha población celular es capaz de autorrenovación y de proliferación en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse a células de otros fenotipos, y en la que la población de células:
50	
	a) produce cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, según se detecta mediante citometría de flujo; y
55	b) no produce ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, según se detecta mediante citometría de flujo. Las células son capaces de autorrenovación y de proliferación en cultivo. Las células derivadas posparto tienen el potencial de diferenciarse a células de otros fenotipos. Las células se derivan de cordón umbilical, en vez de sangre de cordón umbilical. La divulgación también describe células que se derivan de tejido placentario.
60	Las células se han caracterizado en cuanto a varias de sus propiedades celulares, genéticas, inmunitarias y bioquímicas. Por ejemplo, las células se han caracterizado por su crecimiento mediante sus marcadores de superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad para producir determinados factores tróficos bioquímicos, y por sus propiedades inmunitarias.
65	Derivación y proliferación de células derivadas posparto (PPDC)

Según los métodos descritos en el presente documento, se recupera un cordón umbilical humano al finalizar o poco después de finalizar cualquiera de un embarazo a término o prematuro, por ejemplo, después de la expulsión tras el nacimiento. Puede obtenerse tejido posparto de cualquier embarazo completo, a término o sin llegar a término, ya sea un parto vaginal o por otros medios, por ejemplo, por cesárea. El tejido posparto puede transportarse desde el lugar del nacimiento hasta un laboratorio en un recipiente estéril, tal como un matraz, vaso de precipitados, placa de cultivo o bolsa. El recipiente puede tener una solución o medio, incluido pero no limitado a, una solución salina, tal como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier solución utilizada para el transporte de órganos para trasplante, tales como solución perfluorada o solución de la Universidad de Wisconsin. Pueden añadirse al medio o tampón uno o más antibióticos y/o antimicóticos, tales como pero no limitados a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina. El tejido posparto puede aclararse con una solución anticoagulante tal como una solución que contenga heparina. Es preferente mantener el tejido a aproximadamente 4°C-10°C antes de la extracción de las PPDC. Es aún más preferente no congelar el tejido antes de la extracción de las PPDC.

El aislamiento de las PPDC se produce preferentemente en un ambiente aséptico. Preferentemente, la sangre y los desechos se eliminan del tejido posparto antes del aislamiento de las PPDC. Por ejemplo, el tejido posparto puede lavarse con una solución tampón, tal como pero no limitada a, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado puede comprender también uno o más antimicóticos y/o antibióticos, tales como, pero sin limitarse a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos celulares presentes en el tejido posparto se fraccionan en subpoblaciones de las que pueden aislarse las PPDC. Esto puede lograrse mediante técnicas de separación celular incluidas, pero no limitadas a, tratamiento enzimático para disociar el tejido posparto en sus células componentes, seguido de clonación y selección de tipos celulares específicos, por ejemplo pero sin limitarse a, selección en base a marcadores morfológicos y/o bioquímicos; crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de las células no deseadas (selección negativa); separación en base a la capacidad de aglutinación celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación contracorriente); separación a gravedad unitaria; distribución contracorriente; electroforesis; y citometría de flujo, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

En una forma de realización preferente de la divulgación, el tejido posparto que comprende una placenta completa o un fragmento o sección de la misma se desagrega mediante fuerza mecánica (trituration o fuerzas de cizalla), digestión enzimática con enzimas proteolíticas individuales o combinatorias, tal como una metaloproteasa de matriz y/o una proteasa neutra, por ejemplo, collagenasa, tripsina, dispasa, LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN), hialuronidasa y/o pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Por ejemplo, el componente celular del tejido posparto puede desagregarse mediante métodos que utilizan la disociación con collagenasa. Los métodos de digestión enzimática emplean preferentemente una combinación enzimática, tal como una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra. La metaloproteasa de matriz es preferentemente una collagenasa. La proteasa neutra es preferentemente termolisina o dispasa, y lo más preferentemente, es dispasa. Más preferentemente, la digestión enzimática del tejido posparto utiliza una combinación de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica para la digestión del ácido hialurónico, tal como una combinación de collagenasa, dispasa y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) y hialuronidasa. La collagenasa puede ser de tipo 1, 2, 3 ó 4. Otras enzimas conocidas en la técnica para el aislamiento de células incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serín-proteasas, tales como tripsina, quimotripsina o elastasa, que pueden utilizarse en solitario o en combinación con otras enzimas tales como metaloproteasas de matriz, enzimas mucolíticas y proteasas neutras. Las serín-proteasas se utilizan preferentemente de manera consecutiva después del uso de otras enzimas. La temperatura y el período de tiempo que los tejidos o las células están en contacto con las serín-proteasas son especialmente importantes. Las serín-proteasas pueden ser inhibidas por la alfa-2 microglobulina sérica y, por tanto, el medio utilizado para la digestión carece normalmente de suero. En los procedimientos de digestión enzimática se utilizan comúnmente EDTA y ADNasa para aumentar la eficacia de la recuperación celular. El grado de dilución de la digestión también puede afectar en gran medida el rendimiento celular, ya que las células pueden quedar atrapadas dentro del producto digerido viscoso. Las series de combinaciones enzimáticas LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) Blendzyme (Roche) son muy útiles y pueden utilizarse en los métodos de la presente invención. Se conocen otras fuentes de enzimas, y el experto en la materia también pueden obtener tales enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto en la materia también está preparado para evaluar enzimas o combinaciones enzimáticas nuevas o adicionales por su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferentes tienen 0,5 horas, 1 hora, 1,5 horas ó 2 horas de duración, o más. En las formas de realización más preferentes, el tejido se incuba a 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disgregación.

En cierta forma de realización de la divulgación, el tejido posparto que comprende el cordón umbilical y la placenta puede utilizarse sin separación. Como alternativa, el cordón umbilical puede separarse de la placenta mediante cualquier medio conocido en la técnica. En algunas formas de realización de la invención, el tejido

posparto se separa en dos o más secciones, tales como el cordón umbilical y la placenta. En algunas formas de realización de la divulgación, el tejido placentario se separa en dos o más secciones, consistiendo cada sección predominantemente en el elemento neonatal, neonatal y materno, o materno. A continuación, las secciones separadas se disocian mediante disociación mecánica y/o enzimática según los métodos descritos en el presente documento. Las células de linaje neonatal o materno pueden identificarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante análisis del cariotipo o hibridación *in situ* para el cromosoma Y. También puede utilizarse el análisis del cariotipo para identificar las células con cariotipo normal.

Las células aisladas o los tejidos posparto a partir de los que se cultivan las PPDC pueden utilizarse para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células se transfieren a recipientes estériles de cultivo tisular no recubiertos o recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno, gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA)). Las PPDC se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sustentar el crecimiento de las células, tales como, pero sin limitarse a, DMEM (con alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, Advanced DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), y CELL-GRO FREE. El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluidos, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferentemente aproximadamente al 2%-15% (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferentemente aproximadamente al 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluida L-valina; y uno o más antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, en solitario o en combinación. El medio de cultivo comprende preferentemente Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa, suero, BME, un antimicótico y un antibiótico).

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. En una forma de realización preferente, las células se cultivan a una concentración entre aproximadamente un 0 por ciento y aproximadamente un 5 por ciento en volumen de CO₂ en el aire. En algunas formas de realización preferentes, las células se cultivan a una concentración entre aproximadamente un 2 por ciento y aproximadamente un 25 por ciento de O₂ en el aire, preferentemente entre aproximadamente un 5 por ciento y aproximadamente un 20 por ciento de O₂ en el aire. Las células se cultivan preferentemente entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 40°C, más preferentemente entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 39°C, y más preferentemente se cultivan a 37°C. Las células se cultivan preferentemente en una incubadora. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, mediante un biorreactor. Las PPDC se cultivan preferentemente en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína). "Bajo estrés oxidativo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a condiciones de daño nulo o mínimo por radicales libres a las células cultivadas.

En la técnica se conocen métodos para la selección del medio de cultivo, la preparación del medio y las técnicas de cultivo celular más apropiados y se describen en diversas fuentes, incluidas Doyle *et al.*, (eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston.

El medio de cultivo se cambia según sea necesario, por ejemplo, aspirando cuidadosamente el medio desde la placa, por ejemplo, con una pipeta, y reponiéndolo con medio recién preparado. Se sigue incubando hasta que se acumula en la placa un número o densidad suficiente de células. Las secciones de tejido explantado original pueden sacarse y las células restantes tripsinizarse mediante técnicas convencionales o mediante un raspador de células. Después de la tripsinización, se recogen las células, se llevan a un medio recién preparado y se incuban como se ha indicado anteriormente. En algunas formas de realización, el medio se cambia al menos una vez aproximadamente a las 24 horas post-tripsinización para eliminar las células flotantes. Se considera que las células que quedan en el cultivo son PPDC.

Después de cultivar las células o fragmentos de tejido durante un período de tiempo suficiente, las PPDC se habrán multiplicado, ya sea como resultado de la migración desde el tejido posparto o a la división celular, o ambos. En algunas formas de realización de la invención, las PPDC se pasan, o se llevan a un recipiente de cultivo distinto que contiene medio recién preparado del mismo tipo o de un tipo diferente al utilizado inicialmente, en el que la población de células puede hacerse proliferar por mitosis. Las PPDC se pasan preferentemente hasta aproximadamente el 100% de confluencia, más preferentemente de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 85% de confluencia. Un experto en la materia entiende el límite inferior de confluencia para el pase. Las células derivadas de la placenta de la divulgación pueden utilizarse desde el primer subcultivo (pase 0) hasta la senescencia. El número de pases preferente es el que produce un número de células suficiente para una determinada aplicación. En determinadas formas de realización, las células se pasan de 2 a 25 veces, preferentemente de 4 a 20 veces, más preferentemente de 8 a 15 veces, más preferentemente 10 u 11 veces, y lo

más preferentemente 11 veces. Puede realizarse la clonación y/o subclonación para confirmar que se ha aislado una población clonal de células.

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

5

Caracterización de las PPDC

Las PPDC pueden caracterizarse, por ejemplo, por las características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo de duplicación, pases hasta la senescencia), el análisis del cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos incluidos, pero no limitados a, vimentina, desmina, alfa actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand, CD34, GRO-alfa, GCP-2, receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada y NOGO-A), los perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices génicas; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteínas (por ejemplo, mediante ensayo de coagulación de plasma o análisis de medio acondicionado para PPDC, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), análisis de anticuerpos (por ejemplo, ELISA; tinción con anticuerpos para marcadores de superficie celular incluidos, pero no limitados a, CD10, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD80, CD86, CD90, CD117, CD141, CD178, receptor alfa del factor de crecimiento plaquetario (PDGFr-alfa), antígenos HLA de clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), antígenos HLA de clase II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR), B7-H2, y PD-L2), reacción linfocitaria mixta (por ejemplo, como medida de la estimulación de las PBMC alogénicas), y/u otros métodos conocidos en la técnica.

Las PPDC pueden someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo. La duplicación de la población puede calcularse como $\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$. El tiempo de duplicación puede calcularse como (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población).

Las PPDC indiferenciadas producen preferentemente al menos uno de NOGO-A, GCP-2, factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso; resultan más preferentes las células que producen cada uno de GCP-2, factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso. En algunas formas de realización, las PPDC producen dos, tres, cuatro o cinco de estos factores.

En algunas formas de realización, las PPDC no producen al menos uno de NOGO-A, GRO-alfa o receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada, según se detecta mediante citometría de flujo. En algunas formas de realización, las PPDC no producen al menos dos o tres de estos factores.

Las PPDC de la divulgación pueden comprender al menos un marcador de superficie celular de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C. Las PPDC de la invención producen cada uno de estos marcadores de superficie. Las PPDC de la divulgación pueden caracterizarse por la ausencia de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta mediante citometría de flujo. Las PPDC preferentemente no producen ninguno de estos marcadores de superficie.

En algunas formas de realización, las PPDC presentan expresión que, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para al menos uno de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; o al menos uno de miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113. Las PPDC preferentes expresan, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; o niveles aumentados de miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113. En las PPDC en las que la expresión, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para al menos uno de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa, preferentemente no hay niveles relativos aumentados de al menos uno de miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, proteína quinasa C zeta, clon

IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113. En las PPDC en las que la expresión, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para al menos uno de miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113, preferentemente no hay niveles relativos aumentados de al menos uno de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa.

Las PPDC pueden tener expresión que, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está reducida para al menos uno de: caja homeótica 2 de la baja estatura; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica 2 de mesénquima; homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis"; cristalina, alfa B; activador de morfogénesis 2 asociado a "dishevelled"; proteína DKFZp586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina; dominio 3 de homología con src y rico en cisteínas; gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con el enanismo; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de "frizzled"; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína de caja homeótica iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesícula sináptica; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZp586L151; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis"; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido atrial natriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína de membrana asociada a vesícula 5; proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF; similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa; el experto en la materia entenderá que la expresión de una gran diversidad de genes se caracteriza convenientemente en una matriz génica, por ejemplo en un GENECHIP de Affymetrix.

Las PPDC pueden secretar diversos factores bioquímicamente activos, tales como factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas y similares. Las células preferentes de la divulgación secretan al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES y TIMP1. Las PPDC pueden caracterizarse por su ausencia de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGF-bb, MIP1b, I309, MDC y VEGF, como se detecta mediante ELISA. Se dispone de estas y otras características para identificar y caracterizar las células, y distinguir las células de la invención de otras conocidas en la técnica.

En las formas de realización preferentes, la célula comprende dos o más de las características anteriormente indicadas. Resultan más preferentes las células que comprenden, tres, cuatro o cinco o más de las características. Resultan aún más preferentes las células derivadas posparto que comprenden seis, siete u ocho o más de las características. Actualmente resultan aún más preferentes las células que comprenden las nueve características que se reivindican.

También resultan preferentes actualmente células que producen al menos dos de entre GCP-2, NOGO-A, factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso. Resultan más preferentes las células que producen tres, cuatro o cinco de estas proteínas.

El experto en la materia entenderá que los marcadores celulares están sujetos cierta variación en condiciones de crecimiento muy diferentes, y que en general en el presente documento se describen caracterizaciones en Medio de Crecimiento, o variaciones del mismo. Las células derivadas posparto que producen al menos uno, dos, tres o cuatro de entre CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C son células preferentes de la divulgación. Resultan más preferentes las células que producen cinco, seis, o siete de estos marcadores de superficie celular. Resultan aún más preferentes las células derivadas posparto que pueden producir ocho, nueve o diez de las proteínas marcadoras de superficie celular anteriormente indicadas.

Las PPDC que no producen al menos una, dos, tres o cuatro de las proteínas CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR,DP,DQ, según se detecta mediante citometría de flujo, son células preferentes de la divulgación. Resultan preferentes las PPDC que no producen al menos cinco, seis, siete u ocho o más de estos marcadores. Resultan más preferentes las células que no producen al menos nueve o diez de

los marcadores de superficie celular. Las más altamente preferentes son las células que no producen once, doce o trece de las proteínas de identificación anteriormente indicadas.

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

10 Resulta preferente que las células derivadas posparto presenten expresión que, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, esté aumentada para al menos uno de al menos uno, dos o tres de entre interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; o al menos uno, dos o tres de entre miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113. Resultan más preferentes las células que presentan expresión relativa elevada de cuatro o cinco, y resultan aún más preferentes las células capaces de aumentar la expresión relativa de seis, siete u ocho de los genes anteriormente indicados de los respectivos conjuntos de genes. Lo más preferentemente, las células presentan expresión que, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para una combinación de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa, o una combinación de miembro A2 de la superfamilia de lectinas tipo C, tumor de Wilms 1, miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1, renina, receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, proteína quinasa C zeta, clon IMAGE:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, regulada por disminución en el cáncer de ovario 1 y clon DKFZp547K1113.

30 Para algunas formas de realización, resultan preferentes las células que, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, tienen expresión reducida de al menos uno de los genes correspondientes a: caja homeótica 2 de la baja estatura; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica 2 de mesénquima; homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis"; cristalina, alfa B; activador de morfogénesis 2 asociado a "dishevelled"; proteína DKFZp586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina; dominio 3 de homología con src y rico en cisteínas; gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción 3 relacionado con el enanismo; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de "frizzled"; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; proteína de caja homeótica iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesícula sináptica; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZp586L151; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis"; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido atrial natriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); proteína de membrana asociada a vesícula 5; proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF; similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa. Resultan más preferentes las células que tienen, con respecto a los fibroblastos humanos, las células madre mesenquimales o las células de médula ósea de cresta ilíaca, expresión reducida de al menos 5, 10, 15 ó 20 genes que corresponden a los enumerados anteriormente. Actualmente resultan más preferentes las células con expresión reducida de al menos 25, 30 ó 35 de los genes correspondientes a las secuencias enumeradas. También resultan más preferentes las células derivadas posparto con expresión reducida, con respecto a la de un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, de genes que corresponde a 35 o más, 40 o más, o incluso la totalidad de las secuencias enumeradas.

60 La secreción de determinados factores de crecimiento y otras proteínas celulares puede hacer las células de la invención particularmente útiles. Aunque la secreción de tales factores es útil, las PPDC también pueden caracterizarse por su ausencia de secreción de factores en el medio. Los ejemplos de células derivadas de la placenta de la divulgación se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se les asignaron los números de registro de la ATCC de la siguiente manera: (1) el nombre de cepa PLA 071003 (P8) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó en número de registro PTA-6074; (2) el nombre de cepa PLA 071003 (P11) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó en número de registro PTA-6075; y (3) el

nombre de cepa PLA 071003 (P16) se depositó el 16 de junio de 2004 y se le asignó en número de registro PTA-6079.

Los ejemplos de células derivadas de tejido de cordón umbilical de la invención se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) el 10 de junio de 2004, y se les asignaron los números de registro de la ATCC de la siguiente manera: (1) al nombre de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el número de registro PTA-6067; y (2) al nombre de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el número de registro PTA-6068.

Las PPDC pueden aislarse. La invención también proporciona composiciones de PPDC, incluidas poblaciones de PPDC de la invención para su uso en el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa. La población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo PPDC (preferentemente al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99% o más de PPDC). La población celular homogénea de la invención comprende células derivadas de tejido de cordón umbilical. Las poblaciones homogéneas de células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden carecer de células del linaje materno. Las poblaciones homogéneas de células derivadas de la placenta pueden ser de linaje neonatal o materno. La homogeneidad de una población celular puede conseguirse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo), separación con perlas, o mediante proliferación clonal.

Los métodos de la divulgación incluyen adicionalmente métodos para producir una población de células derivadas posparto haciendo proliferar una célula de la invención en cultivo. Las células derivadas posparto de la invención se hacen proliferar preferentemente en presencia de oxígeno de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 20%. Las células derivadas posparto de la invención se hacen proliferar preferentemente en medio de cultivo tal como, pero no limitado a, medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), medio de crecimiento de células madre mesenquimales, Advanced DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), RPMI1640, CELL-GRO FREE, medio F10 de Ham, medio F12 de Ham, DMEM/F12, medio de Dulbecco modificado por Iscove, o medio basal de Eagle. El medio de cultivo contiene preferentemente bajo o alto contenido de glucosa, suero a aproximadamente el 2%-15% (v/v), betamercaptoetanol y un antibiótico. El medio de cultivo puede contener al menos uno de factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento del endotelio vascular, y factor de crecimiento epidérmico. Las células de la invención pueden cultivarse sobre una superficie no recubierta o recubierta. Las superficies para el cultivo de las células pueden estar recubiertas por ejemplo, con gelatina, colágeno (por ejemplo, natural o desnaturalizado), fibronectina, laminina, ornitina, vitronectina o proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL). En algunas formas de realización, se mezcla una población de células derivadas posparto con otra población de células.

Cultivo de PPDC en un medio condrogénico

Puede inducirse a las PPDC a diferenciarse a un linaje condrogénico sometiéndolas a condiciones de cultivo celular que induzcan la diferenciación. Las PPDC pueden cultivarse en un medio condrogénico que comprende factores de crecimiento condrogénicos exógenos específicos (por ejemplo, en cultivo), tales como, por ejemplo, uno o más de GDF-5 o factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF-beta3), con o sin ascorbato.

El medio condrogénico preferente está complementado con un antibiótico, aminoácidos incluidos prolina y glutamina, piruvato sódico, dexametasona, ácido ascórbico e insulina/transferrina/selenio. El medio condrogénico está complementado preferentemente con hidróxido sódico y/o colágeno. Lo más preferentemente, el medio de cultivo condrogénico está complementado con colágeno. Las células pueden cultivarse a una densidad alta o baja. Las células se cultivan preferentemente en ausencia de suero.

Cultivo de PPDC en un medio osteogénico

Puede inducirse a las PPDC a diferenciarse a un linaje osteogénico sometiéndolas a condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación. En algunas formas de realización, las PPDC se cultivan en un medio osteogénico tal como, pero no limitado a, un medio (por ejemplo, DMEM con bajo contenido de glucosa) que contiene dexametasona entre aproximadamente 10^{-7} molar y aproximadamente 10^{-9} molar en combinación con sal de ascorbato fosfato (por ejemplo, ascorbato-2-fosfato) de aproximadamente 10 micromolar a aproximadamente 50 micromolar y beta-glicerofosfato entre aproximadamente 10 nanomolar y aproximadamente 10 milimolar. El medio incluye preferentemente suero (por ejemplo, suero bovino, suero de caballo). El medio osteogénico también puede comprender uno o más antibióticos/antimicóticos. El medio osteogénico está complementado preferentemente con factor de crecimiento transformante beta (por ejemplo, TGF-beta1) y/o proteína morfogénica ósea (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, o una combinación de las mismas; lo más preferentemente BMP-4).

Evaluación de la diferenciación

Puede inducirse a las PPDC a diferenciarse a un linaje ectodérmico, endodérmico o mesodérmico. Los métodos para caracterizar las células diferenciadas que se desarrollan a partir de las PPDC de la invención, incluyen, pero no se limitan a, métodos histológicos, morfológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos, o el uso de

marcadores de superficie celular, o genéticamente o molecularmente, o identificando factores secretados por la célula diferenciada, y por las cualidades inductivas de las PPDC diferenciadas.

La diferenciación condrogénica puede evaluarse, por ejemplo, mediante tinción con safranina-O para la expresión de glicosaminoglicano por las células o tinción con hematoxilina/eosina, o mediante la detección de un marcador de linaje condrogénico (por ejemplo, proteoglicanos y glicosaminoglicanos sulfatados, queratina, condroitina, colágeno tipo II) en el cultivo o más preferentemente en las propias células.

Las PPDC pueden analizarse para un fenotipo osteogénico mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, la tinción de von Kossa o mediante la detección de marcadores osteogénicos tales como osteocalcina, sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina, osteonectina, osteopontina, colágeno tipo I, proteínas morfológicas óseas y/o factor de unión nuclear $\alpha 1$ en el cultivo o más preferentemente en las propias células.

Métodos de utilización de las PPDC o componentes o productos de las mismas

Ingeniería genética de las PPDC

Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética utilizando cualquiera de diversos vectores, incluidos, pero no limitados a, vectores virales integrativos, por ejemplo, vector de retrovirus o vectores virales adenoasociados; vectores de replicación no integrativos, por ejemplo, vectores del virus del papiloma, vectores de SV40, vectores adenovirales; o vectores virales de replicación defectuosa. Otros métodos de introducción de ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o mediante inyección directa del ADN.

Las células hospedadoras están preferentemente transformadas o transfectadas con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos de control de expresión apropiados tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable.

Después de la introducción del ADN extraño, puede dejarse crecer a las células modificadas en medio enriquecido y, a continuación, cambiarse a medios selectivos. El marcador seleccionable en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y hacerse proliferar a líneas celulares.

El presente método puede utilizarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen el producto génico.

Puede utilizarse cualquier promotor para activar la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen pero no se limitan al promotor/potenciador CMV, SV 40, papilomavirus, virus de Epstein-Barr o promotor del gen de la elastina. Preferentemente, los elementos de control utilizados para controlar la expresión del gen de interés deben permitir la expresión regulada del gen de manera que el producto se sintetice solamente cuando sea necesario *in vivo*. Si se desea la expresión transitoria, se utilizan preferentemente promotores constitutivos en un vector no integrativo y/o de replicación defectuosa. Como alternativa, podrían utilizarse promotores inducibles para activar la expresión del gen insertado cuando sea necesario.

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

Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para anular o atenuar la expresión de factores que promueven la inflamación o el rechazo en el sitio del implante. Más adelante se analizan técnicas de modulación negativa para la reducción de los niveles de expresión del gen diana o niveles de actividad del producto del gen diana. "Modulación negativa", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una reducción del nivel y/o actividad del producto del gen diana con respecto al nivel y/o actividad del producto del gen diana en ausencia del tratamiento modulador. Puede reducirse o anularse la expresión de un gen natural de un condrocito u osteocito utilizando varias técnicas, incluidas, por ejemplo, la inhibición de la expresión inactivando completamente el gen (comúnmente denominada "knockout") utilizando la técnica de recombinación homóloga. Por lo general, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón en sentido 5' a dicha región) se interrumpe mediante un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, lo que evita la producción de ARNm normal a partir del gen diana y que da como resultado la inactivación del gen. Un gen también puede inactivarse creando una delección en una parte de un gen, o delecionando todo el gen. Mediante el uso de un constructo con dos regiones de homología con el gen diana que estén muy distantes en el genoma, pueden deleccionarse las secuencias que se interponen entre las dos regiones (Mombaerts *et al.*, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 88:3084).

También pueden utilizarse, según la invención, ARN pequeño de interferencia antisentido, ADNzimas y moléculas de ribozima que inhiben la expresión del gen diana para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por

ejemplo, las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de los complejos génicos principales de histocompatibilidad (HLA) han demostrado ser más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Aún más, pueden utilizarse moléculas de triple hélice para reducir el nivel de actividad del gen diana.

Estas técnicas se describen detalladamente en L.G. Davis *et al.* (eds.), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn.

La IL-1 es un potente estimulador de la resorción del cartílago y de la producción de mediadores inflamatorios por los condrocitos (Campbell *et al.*, 1991, J. Immun 147:1238). Utilizando cualquiera de las técnicas anteriormente indicadas, puede anularse o atenuarse la expresión de IL-1 en las células de la invención para reducir el riesgo de resorción del cartílago implantado o la producción de mediadores inflamatorios por las células de la invención. Asimismo, puede anularse o atenuarse la expresión de moléculas del MHC de clase II con el fin de reducir el riesgo de rechazo del tejido implantado.

Una vez modificadas por ingeniería genética las células de la invención, pueden implantarse directamente en el paciente para permitir el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa, por ejemplo, una enfermedad reumatoide o articular, o para producir un producto génico antiinflamatorio, tal como, por ejemplo, péptidos o polipéptidos correspondientes al idiotipo de anticuerpos neutralizantes para GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, u otras citocinas inflamatorias.

Como alternativa, las células modificadas por ingeniería genética pueden utilizarse para producir nuevo tejido *in vitro*, que a continuación se implanta en el sujeto, como se describe en el presente documento.

Secreción de factores tróficos

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

En algunos aspectos de la invención, una población de PPDC sustenta la supervivencia, la proliferación, el crecimiento, el mantenimiento, la maduración, la diferenciación o el aumento de la actividad de las células, incluidas células de médula ósea, condrocitos, condroblastos, y mezclas de las mismas. En algunos aspectos de la invención, una población de PPDC sustenta a las células, incluidas células de médula ósea, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, y mezclas de las mismas. En algunos aspectos de la invención, una población de PPDC sustenta a las células, incluidas células de médula ósea, condrocitos, condroblastos, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, y mezclas de las mismas. En otras formas de realización, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo PPDC (preferentemente al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99% o más de PPDC).

Las PPDC tienen la capacidad de sustentar la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de otros tipos celulares en cocultivo. En algunas formas de realización, las PPDC se cocultivan *in vitro* para proporcionar soporte trófico a otras células, incluidas, pero no limitadas a, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, condrocitos, condroblastos, y/o células de médula ósea, o combinaciones de las mismas. Para el cocultivo, puede ser deseable que las PPDC y las demás células deseadas se cocultiven en condiciones en las que los dos tipos de células estén en contacto. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sembrando las células como una población heterogénea de células en un medio de cultivo o sobre un sustrato de cultivo adecuado. Como alternativa, las PPDC pueden cultivarse primero hasta la confluencia y emplearse como sustrato para el segundo tipo de célula deseado en cultivo. En esta última forma de realización, las células pueden separarse además físicamente, por ejemplo, mediante una membrana o dispositivo similar, de manera que pueda extraerse el otro tipo de célula y utilizarse por separado después del periodo de cocultivo. En otras formas de realización, la divulgación contempla que las otras células deseadas se cultiven en contacto con el medio acondicionado, la matriz extracelular y/o el lisado celular de las PPDC. La divulgación contempla que el uso de las PPDC en cocultivo para promover la proliferación y diferenciación de otros tipos celulares pueda hallar aplicabilidad en la investigación y en áreas clínicas/terapéuticas. Por ejemplo, puede utilizarse un cocultivo de PPDC para facilitar el crecimiento y la diferenciación de células de un determinado fenotipo en cultivo, por ejemplo, condrocitos u osteocitos, con fines de investigación básica o para su uso en ensayos de selección de fármacos, por ejemplo. El cocultivo de PPDC también puede utilizarse para la proliferación *ex vivo* de células de un fenotipo osteogénico o condrogénico para su posterior administración con fines terapéuticos. Por ejemplo, pueden recolectarse células de un individuo, hacerse proliferar *ex vivo* en cocultivo con las PPDC, a continuación devolverlas a ese individuo (transferencia autóloga) o a otro individuo (transferencia alogénica o alogénica). En estas formas de realización, se entenderá que, después de la proliferación *ex vivo*, podría administrarse la población mixta de células que comprenden las PPDC a un paciente

que necesite tratamiento, por ejemplo, para una afección ósea o cartilaginosa tal como se describe en el presente documento. Como alternativa, en situaciones en las que sea apropiada o deseable la transferencia autóloga, las poblaciones celulares cocultivadas pueden separarse físicamente en cultivo, lo que permite extraer las células autólogas para administrarlas al paciente.

Medio acondicionado de PPDC

Otra forma de realización de la divulgación se ocupa del uso de las PPDC para la producción de un medio acondicionado, ya sea de PPDC indiferenciadas o de PPDC incubadas en condiciones que estimulan la diferenciación a un linaje osteogénico o condrogénico. Tales medios acondicionados se contemplan para su uso en el cultivo de células *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, células madre o progenitoras, incluidas, pero no limitadas a, células de médula ósea, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, condroblastos y condrocitos, o *in vivo* para sustentar a células trasplantadas que comprenden poblaciones homogéneas o heterogéneas de PPDC, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, condrocitos, condroblastos y células de médula ósea, por ejemplo.

Aplicaciones terapéuticas de las PPDC

Las PPDC de la invención pueden utilizarse para tratar a pacientes que requieren la reparación o sustitución de tejido óseo o cartilaginoso resultado de una enfermedad o traumatismo o de la incapacidad del tejido para desarrollarse normalmente, o para proporcionar una función cosmética, tal como para aumentar los rasgos faciales u otros rasgos corporales. El tratamiento puede implicar el uso de las células de la invención para producir nuevo tejido cartilaginoso o tejido óseo. Por ejemplo, las células inducidas a diferenciarse condrogénicas o indiferenciadas de la invención pueden utilizarse para tratar una afección cartilaginosa, por ejemplo, la artritis reumatoide o la osteoartritis o una lesión traumática o quirúrgica del cartílago. Como otro ejemplo, las células inducidas a diferenciarse osteogénicas o indiferenciadas de la invención pueden utilizarse para tratar afecciones óseas, incluidas enfermedades óseas metabólicas y no metabólicas. Los ejemplos de afecciones óseas incluyen desgarros meniscales, fusión vertebral, extracción de disco vertebral, reconstrucción vertebral, fracturas óseas, deformación ósea/vertebral, osteosarcoma, mieloma, displasia ósea, escoliosis, osteoporosis, enfermedad periodontal, pérdida de hueso dental, osteomalacia, raquitismo, osteítis fibrosa, osteodistrofia renal y enfermedad ósea de Paget.

Las células de la invención pueden administrarse en solitario o en forma de mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las PPDC incluyen, pero no se limitan a, otras células multipotentes o pluripotentes o condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo o células de médula ósea. Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con las PPDC inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse juntas durante un período de tiempo antes de la administración.

Las PPDC pueden administrarse con otras moléculas biológicas o fármacos beneficiosos (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando las PPDC se administran con otros agentes, pueden administrarse juntas en una única composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los demás agentes (ya sea antes o después de la administración de los demás agentes). Los factores bioactivos que pueden administrarse conjuntamente incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimetocuerpo de la EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasas); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMENTIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal contra linfocitos T, OKT3)); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios, aspirina, dipyridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas e inhibidores plaquetarios); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), así como anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden administrarse conjuntamente con un factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.827.735.

En una forma de realización, las PPDC se administran como células indiferenciadas, es decir, tal como se cultivan en el Medio de Crecimiento. Como alternativa, en una forma de realización de la divulgación, las PPDC pueden administrarse después de exponerlas en cultivo a condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo deseado, por ejemplo, un fenotipo condrogénico u osteogénico.

Las células de la invención pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, introducirse (por ejemplo, por medio de un catéter o jeringa), o administrarse de otra manera, directa o indirectamente, al sitio que necesita la

reparación o el aumento. Las células pueden administrarse por medio de una matriz (por ejemplo, un andamiaje tridimensional). Las células pueden administrarse con vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Las vías de administración de las células de la invención o composiciones o componentes (por ejemplo, ECM, lisado celular, medio acondicionado) de las mismas incluyen la administración intramuscular, oftálmica, parenteral (incluida la intravenosa), intraarterial, subcutánea, oral y nasal. Las vías particulares de administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, vías de administración intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intravertebral y/o perivertebral.

Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en una ubicación precisa en el cuerpo es por lo general un medio adecuado de administración. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas pueden administrarse a una ubicación más general (por ejemplo, a lo largo de una zona afectada de manera difusa, por ejemplo), desde la que migran a una ubicación particular, por ejemplo, respondiendo a señales químicas.

Otras formas de realización de la divulgación abarcan métodos de tratamiento mediante la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares (por ejemplo, lisados celulares o componentes de los mismos) o productos (por ejemplo, matriz extracelular, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por las PPDC o mediante modificación genética, medio acondicionado del cultivo de PPDC) de PPDC. Una vez más, estos métodos pueden comprender adicionalmente la administración de otros agentes activos, tales como agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimetocuerpo de la EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasas); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMENTIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal contra linfocitos T, OKT3)); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas e inhibidores plaquetarios); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), anestésicos locales, y factor inhibidor de cicatrices tal como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.827.735.

Los regímenes y las formas de dosificación para administrar las PPDC o cualquiera de las demás composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrollan según la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado de cada paciente, por ejemplo, la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando, la edad, el sexo, el peso corporal y el cuadro clínico general, y otros factores conocidos por los médicos. Por lo tanto, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica a administrar a un paciente viene determinada por estos factores tal como se conoce en la técnica.

En algunas formas de realización de la invención, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir a un paciente antes de iniciar la terapia celular con las PPDC. Además, se ha demostrado que las PPDC no estimulan las PBMC alogénicas en una reacción linfocitaria mixta. Por consiguiente, puede tolerarse en algunos casos el trasplante con PPDC alogénicas, o incluso xenogénicas.

Sin embargo, en otros casos puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse administrando las células en un dispositivo encapsulado. Las PPDC pueden encapsularse en una cápsula que sea permeable a los nutrientes y al oxígeno que necesita la célula y a los factores terapéuticos que la célula está secretando, pero impermeable a factores humores inmunitarios y a células. Preferentemente el encapsulante es hipoalergénico, se encuentra con facilidad y de forma estable en un tejido diana, y proporciona una protección adicional a la estructura implantada. En la técnica se conocen estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria contra las células trasplantadas. Como alternativa, las PPDC pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

Puede determinarse la supervivencia de las PPDC trasplantadas en un paciente vivo mediante el uso de diversas técnicas de exploración, por ejemplo, exploraciones mediante tomografía axial computarizada (TAC o TC), resonancia magnética (RM) o tomografía por emisión de positrones (TEP). La determinación de la supervivencia del trasplante también puede realizarse *post mortem* extrayendo el tejido diana y examinándolo visualmente o con un microscopio. Como alternativa, las células pueden tratarse con tinciones que sean específicas para las células de un linaje específico. Las células trasplantadas también pueden identificarse mediante la incorporación previa de colorantes indicadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, Fast Blue, bisbenzamida, micropartículas férricas, o productos génicos indicadores introducidos genéticamente, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

La integración funcional de las PPDC trasplantadas en un sujeto puede evaluarse examinando la restauración de la función perjudicada o afectada, por ejemplo, la restauración de la función articular u ósea, o el aumento de la función.

5 **Composiciones y composiciones farmacéuticas**

Las composiciones de PPDC, incluidas por ejemplo las composiciones farmacéuticas, para su uso en el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa, quedan incluidas dentro del alcance de la invención. Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más factores bioactivos, por ejemplo pero sin limitarse a, un factor de crecimiento, un factor inductor de la diferenciación, un factor de supervivencia celular tal como el inhibidor de la caspasa, un antiinflamatorio tal como el inhibidor de la quinasa p38, o un factor angiogénico tal como VEGF o bFGF. Algunos ejemplos de factores bioactivos incluyen PDGF-bb, EGF, bFGF, IGF-1 y LIF. En algunas formas de realización, se cultivan PDPC indiferenciadas o inducidas a diferenciarse en contacto con el factor bioactivo. En algunas formas de realización, las PPDC indiferenciadas permanecen indiferenciadas tras el contacto con el factor bioactivo. En otras formas de realización, el factor bioactivo induce la diferenciación de las PPDC.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender poblaciones homogéneas de PPDC en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para las células de la invención incluyen sustancias transportadoras orgánicas o inorgánicas adecuadas que no reaccionan de manera perjudicial con las células de la invención o composiciones o componentes de las mismas. En la medida en que sean biocompatibles, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina (por ejemplo, solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas e carbohidratos, tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidina. Tales preparaciones pueden esterilizarse, y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y colorantes. En la técnica se conocen vehículos farmacéuticos adecuados para su uso en la presente invención y se describen, por ejemplo, en *Pharmaceutical Sciences* (17ª ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y en el documento WO 96/05309.

La dosificación (por ejemplo, el número de células a administrar) y la frecuencia de administración de las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención dependerá de varios factores, incluidos pero no limitados a, la naturaleza de la afección a tratar, la gravedad de los síntomas de la afección, las características del paciente (por ejemplo, la edad, la estatura, el sexo, la salud).

Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las PPDC, composiciones y matrices producidas según la invención pueden utilizarse para reparar o reemplazar tejido cartilaginoso dañado o destruido, para aumentar el tejido cartilaginoso existente, para introducir tejido nuevo o modificado, para modificar prótesis artificiales, o para unir estructuras o tejidos biológicos. Por ejemplo, algunas formas de realización de la invención incluirían (i) prótesis de cadera recubiertas con constructos de tejido cartilaginoso de reemplazo cultivadas en cultivos tridimensionales; (ii) la reconstrucción de rodilla con constructos de tejido cartilaginoso; (iii) prótesis de otras articulaciones que requieren la reconstrucción y/o sustitución de cartílago articular; y (iv) la reconstrucción cosmética con constructos de tejido cartilaginoso.

Por ejemplo, puede realizarse la evaluación de lesiones internas del cartílago articular en, por ejemplo, la rodilla, la cadera, el codo, el tobillo y la articulación glenohumeral, mediante técnicas artroscópicas. En algunas formas de realización, se extrae la parte lesionada o deteriorada del tejido cartilaginoso, por ejemplo, mediante cirugía artroscópica, seguido de injerto de cartílago. Los constructos de tejido cartilaginoso también pueden emplearse en la cirugía reconstructiva para diferentes tipos de articulaciones. Los procedimientos detallados se han descrito en Resnick, D., y Niwayama, G., (eds.), 1988, *Diagnosis of Bone and Joint Disorders*, 2ª ed., W.B. Sanders Co.

La reparación o sustitución de cartílago dañado puede potenciarse mediante la fijación de las células y/o el tejido cartilaginoso implantados en el sitio de reparación. Pueden utilizarse diversos métodos para fijar las nuevas células y/o tejido cartilaginoso en su lugar, incluidos: parches derivados de tejidos biocompatibles, que pueden colocarse sobre el sitio; suturas bioabsorbibles u otros elementos de fijación, por ejemplo, clavos, grapas, tachuelas, tornillos y anclajes; dispositivos de fijación no absorbibles, por ejemplo, suturas, clavos, tornillos y anclajes; adhesivos.

En una forma de realización de la divulgación, las PPDC y el tejido óseo producido según la invención pueden utilizarse para reparar o reemplazar tejido óseo dañado o destruido, para aumentar el tejido óseo existente, para introducir tejido nuevo o modificado, o modificar prótesis artificiales. Las células de la invención pueden administrarse en solitario, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o sembradas sobre o en una matriz como se describe en el presente documento.

Uso de las PPDC para el trasplante

Los métodos de tratamiento de la presente invención implican la implantación de las PPDC o células transdiferenciadas en individuos que lo necesitan. Las células de la presente invención pueden ser alogénicas o autólogas y pueden administrarse al sitio de necesidad terapéutica o hacerse "migrar de manera dirigida" al sitio.

En una forma de realización de la divulgación, las células de la presente invención pueden diferenciarse *in vitro* antes de implantarse un paciente. La diferenciación *in vitro* permite la aplicación controlada de factores bioactivos.

Las células de la presente invención pueden inducirse a diferenciarse *in situ* o pueden introducirse *in vivo* para proporcionar soporte trófico a células endógenas. La dosificación adecuada de implantación de células en los seres humanos puede determinarse a partir de la información existente relacionada con la actividad de las células o con la densidad de células para el reemplazo de hueso o cartílago. Esta información también es útil para calcular una dosis apropiada de material implantado. Además, puede hacerse seguimiento al paciente para determinar si puede hacerse una implantación adicional o reducirse el material implantado en consecuencia.

Para potenciar la diferenciación, la supervivencia o la actividad de las células implantadas, pueden añadirse factores bioactivos adicionales, incluidos factores de crecimiento, agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimetocuerpo de la EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasas); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMENTIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal contra linfocitos T, OKT3); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas e inhibidores plaquetarios); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), y anestésicos locales. Para potenciar la vascularización y supervivencia del tejido óseo trasplantado, pueden añadirse factores angiogénicos tales como VEGF, PDGF o bFGF ya sea en solitario o en combinación con células endoteliales o sus precursoras incluidas células CD34+, CD34+/CD117+.

Como alternativa, las PPDC a trasplantar pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen tales factores de crecimiento, antioxidantes, agentes antiapoptóticos, antiinflamatorios o factores angiogénicos.

Las PPDC pueden utilizarse para tratar enfermedades o afecciones óseas o cartilaginosas o para aumentar o reemplazar hueso o cartílago. La enfermedad o las afecciones a tratar incluyen, pero no se limitan a, la osteoartritis, la osteoporosis, la artritis reumatoide, la condrosis deformante, enfermedades de la cavidad oral y dental (por ejemplo, defectos y fractura dental), reemplazo de articulaciones, anomalías congénitas, fractura ósea y tumores (benignos y malignos).

Pueden añadirse a las células trasplantadas uno o más de otros componentes, incluidos componentes de la matriz extracelular seleccionados, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos. Como alternativa, las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen y produzcan factores de crecimiento. Los detalles sobre la ingeniería genética de las células de la invención se proporcionan más adelante. Los factores bioactivos que pueden incorporarse provechosamente en la formulación de células incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimetocuerpo de la EPO, TPO, IGF-I y IGFII, HGF, inhibidores de caspasas); antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALIN, TOLMENTIN, SUPROFEN); inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales contra IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales contra linfocitos T (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo monoclonal contra linfocitos T, OKT3); antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos antitrombina, anticuerpos contra receptores plaquetarios, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas e inhibidores plaquetarios); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), y anestésicos locales. Por ejemplo, las células pueden administrarse conjuntamente con un factor inhibidor de cicatrices como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.827.735.

Formulación de PPDC para el trasplante

En una forma de realización no limitativa, se prepara una formulación que comprende las células de la invención para administrarse directamente al sitio en el que se desea la producción de nuevo tejido óseo o cartilaginoso. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las células de la invención pueden suspenderse en una solución de hidrogel para inyección. Los ejemplos de hidrogeles adecuados para utilizarse en la invención incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. Como alternativa, puede dejarse endurecer la solución de hidrogel que contiene las células, por ejemplo en un molde, para formar una matriz con células dispersadas en la misma antes de la implantación. O, una vez que la matriz se ha endurecido, pueden cultivarse las formaciones celulares de manera que se hagan proliferar las células por mitosis antes de la implantación. El hidrogel es un polímero orgánico (natural o sintético), que se reticula a través de enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura reticular abierta tridimensional que inmoviliza las moléculas de agua para formar un gel. Los ejemplos de materiales que pueden utilizarse para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliácridatos, que se reticulan iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol que se reticulan mediante la temperatura o el pH, respectivamente. En algunas formas de realización, el soporte para las PPDC de la invención es biodegradable.

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

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

Los ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden hacerse reaccionar con aniones son poli(vinilaminas), poli(vinil piridina), poli(vinil imidazol), y algunos polifosfacenos sustituidos con imino. También pueden formarse la sal de amonio o cuaternaria de los polímeros a partir de los nitrógenos de la cadena principal o grupos imino colgantes. Los ejemplos de grupos laterales básicos son grupos amino e imino.

El alginato puede reticularse iónicamente con cationes divalentes, en agua, a temperatura ambiente, para formar una matriz de hidrogel. Debido a estas condiciones moderadas, el alginato ha sido el polímero más comúnmente utilizado para la encapsulación de células de hibridoma, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 4.352.883 concedida a Lim. En el proceso de Lim, se suspende una solución acuosa que contiene los materiales biológicos a encapsular en una solución de un polímero soluble en agua, la suspensión se conforma en gotitas que se configuran en microcápsulas discretas por contacto con cationes multivalentes, a continuación la superficie de las microcápsulas se reticula con poliaminoácidos para formar una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

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

Los polifosfacenos adecuados para la reticulación tienen una mayoría de grupos de cadena lateral que son ácidos y capaces de formar puentes de sal con cationes divalentes o trivalentes. Los ejemplos de grupos laterales ácidos preferentes son grupos de ácido carboxílico y grupos de ácido sulfónico. Los polifosfacenos hidrolíticamente estables están hechos de monómeros que tienen grupos laterales de ácido carboxílico que se reticulan mediante cationes divalentes o trivalentes tales como Ca^{2+} o Al^{3+} . Pueden sintetizarse polímeros que se degraden mediante hidrólisis incorporando monómeros con imidazol, éster de aminoácido o grupos laterales de glicerol. Por ejemplo, puede sintetizarse un poli[bis(carboxilatofenoxi)]fosfaceno (PCPP) polianiónico, que se reticula con cationes multivalentes disueltos en medios acuosos a temperatura ambiente o inferior para formar matrices de hidrogel.

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

La hidrólisis de la cadena lateral da como resultado la erosión del polímero. Los ejemplos de cadenas laterales que se hidrolizan son imidazoles sustituidos y no sustituidos y ésteres de aminoácidos en los que el grupo está unido al átomo de fósforo a través de un enlace amino (los polímeros de polifosfaceno en los que ambos grupos R están fijados de esta manera se conocen como poliaminofosfacenos). Para los poliimidazolfosfacenos, algunos de los grupos "R" en la cadena principal del polifosfaceno son anillos de imidazol, fijados al fósforo en la cadena principal a través de un átomo de nitrógeno del anillo. Otros grupos "R" pueden ser residuos orgánicos que no

participan en la hidrólisis, tales como grupos metil fenoxi u otros grupos que se muestran en el artículo científico de Allcock, *et al.*, *Macromolecule* 10:824 (1977). En la técnica se conocen métodos de síntesis de los materiales de hidrogel, así como métodos para preparar tales hidrogeles.

También pueden incluirse en la formulación otros componentes, incluidos pero no limitados a, cualquiera de los siguientes: (1) tampones para proporcionar pH e isotonicidad apropiados; (2) lubricantes; (3) materiales viscosos para retener las células en o cerca del sitio de administración, incluidos, por ejemplo, alginatos, agares y gomas vegetales; y (4) otros tipos de células que pueden producir un efecto deseado en el sitio de administración, tal como, por ejemplo, potenciación o modificación de la formación de tejido o de sus características fisicoquímicas, o como sustento para la viabilidad de las células, o inhibición de la inflamación o el rechazo. Las células pueden cubrirse con un apósito para heridas apropiado para evitar que las células abandonen el sitio. Los expertos en la materia conocen tales apósitos para heridas.

Formulación de un parche de tejido cartilaginoso u óseo

El cultivo o los cocultivos de PPDC en un pocillo preformado permiten fabricar un parche de tejido de espesor y volumen predeterminados. El volumen del parche de tejido resultante depende del volumen del pocillo y del número de PPDC en el pocillo. Puede prepararse tejido de un volumen predeterminado óptimo mediante experimentación de rutina modificando uno o ambos de los parámetros anteriormente mencionados.

La superficie del pocillo en contacto con la célula puede recubrirse con una molécula que dificulte la adhesión de las PPDC a la superficie en contacto con la célula. Los reactivos de recubrimiento preferentes incluyen reactivos a base de silicio, es decir, reactivos a base de diclorodimetilsilano o politetrafluoroetileno, es decir, TEFLON. En la técnica se conocen procedimientos para materiales de recubrimiento con reactivos a base de silicio, específicamente diclorodimetilsilano. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press. Se entiende que pueden ser útiles en la práctica de la presente invención otros reactivos biocompatibles que impidan la fijación de las células a la superficie del pocillo.

Como alternativa, el pocillo puede moldearse a partir de un material biocompatible maleable o moldeable que no permita la fijación de las células *per se*. Los materiales preferentes que impiden tal fijación celular incluyen, pero no se limitan a, agarosa, vidrio, plástico para cultivo celular sin tratar y politetrafluoroetileno, es decir, TEFLON. Se dispone en el mercado de plásticos para cultivo celular sin tratar, es decir, plásticos que no han sido tratados con o elaborados a partir de materiales con carga electrostática, y pueden adquirirse, por ejemplo, de Falcon Labware, Becton-Dickinson, Lincoln Park, N.J. Sin embargo, los materiales anteriormente mencionados no pretenden ser limitativos. Se entiende que puede ser útil en la práctica de la presente invención cualquier otro material biocompatible maleable o moldeable que dificulte intrínsecamente la fijación de las PPDC.

El tamaño y la forma del pocillo pueden determinarse por el tamaño y la forma del defecto del tejido a reparar. Por ejemplo, se contempla que el pocillo pueda tener una superficie en sección transversal de 25 cm². Esta es la superficie en sección transversal media de un cóndilo femoral humano adulto. En consecuencia, se prevé que puede prepararse una sola pieza de cartílago según la invención con el fin de revestir todo el cóndilo femoral. La profundidad del pocillo es preferentemente superior a aproximadamente 0,3 cm y preferentemente de aproximadamente 0,6 cm de profundidad. El espesor del cartílago articular natural en una unión articular de adulto suele ser de aproximadamente 0,3 cm. Por consiguiente, la profundidad del pocillo debe ser lo suficientemente grande para permitir que se forme un parche de cartílago de aproximadamente 0,3 cm. El pocillo debe ser lo suficientemente profundo para contener medio de cultivo que cubra el parche de tejido.

Se contempla que un parche de tejido preparado según la invención pueda "recortarse" a un tamaño y una forma preseleccionados por un cirujano que realiza la reparación quirúrgica del tejido dañado. El recorte puede realizarse utilizando un instrumento afilado de corte, es decir, un bisturí, unas tijeras o un dispositivo artroscópico equipado con un filo cortante, mediante procedimientos conocidos en la técnica.

El pocillo preformado puede moldearse en un bloque de gel de agarosa en condiciones asépticas. La agarosa es un material económico, biocompatible, maleable y moldeable que puede utilizarse para moldear pocillos preformados, de manera rápida y fácil. Como se ha mencionado anteriormente, las dimensiones del pocillo pueden depender del tamaño del tapón de tejido resultante que se desea.

Puede prepararse un pocillo preformado vertiendo una solución caliente de agarosa LT fundida (BioRad, Richmond, Calif.) en una placa de cultivo tisular que contiene un cilindro, teniendo el cilindro unas dimensiones que reflejan la forma del pocillo a formar. El experto en la materia puede elegir el tamaño y la forma del pocillo, y pueden depender de la forma del defecto del tejido a reparar. Una vez la agarosa se ha enfriado y ha solidificado alrededor del cilindro, se extrae cuidadosamente el cilindro con unas pinzas. La superficie de la placa de cultivo tisular que queda expuesta al eliminar el cilindro se cubre con agarosa fundida. Esto sella la parte inferior del pocillo y proporciona una superficie adhesiva para las células en la base del pocillo. Cuando la agarosa LT fundida recién añadida se enfría y solidifica, el pocillo preformado resultante es adecuado para el cultivo, y para inducir la

diferenciación de las PPDC. Sin embargo, se entenderá que pueden utilizarse métodos alternativos para preparar un pocillo preformado útil en la práctica de la invención.

5 Pueden sembrarse y cultivarse PPDC en suspensión en el pocillo preformado. Puede inducirse a las PPDC a diferenciarse a un fenotipo condrogénico u osteogénico en cultivo en el pocillo o pueden haber sido inducidas a diferenciarse antes de sembrarse en el pocillo. Las células pueden diluirse añadiendo medio de cultivo a una densidad celular de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^9 PPDC por mililitro.

10 Las células pueden formar un tapón cohesivo de células. El tapón cohesivo de células puede extraerse del pocillo e implantarse quirúrgicamente en el defecto tisular. Se prevé que las PPDC indiferenciadas pueden diferenciarse *in situ* para formar de ese modo tejido *in vivo*.

15 Pueden identificarse defectos cartilaginosos y óseos por inferencia utilizando la tomografía asistida por ordenador (exploración por TAC); examen de rayos X, resonancia magnética (RM), análisis de marcadores de líquido sinovial o suero, o mediante cualesquiera otros procedimientos conocidos en la técnica. Los defectos en los mamíferos también son fácilmente identificables visualmente durante un examen artroscópico o durante una cirugía abierta de la articulación. El tratamiento de los defectos puede efectuarse durante un procedimiento quirúrgico abierto o artroscópico utilizando los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento.

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

25 El parche de tejido tiene óptimamente un tamaño y una forma tales que cuando el parche se implanta en el defecto, los bordes del tejido implantado quedan directamente en contacto con los bordes del defecto. Además, el parche de tejido puede fijarse en su lugar durante el procedimiento quirúrgico. Esto puede efectuarse fijando quirúrgicamente el parche en el defecto con suturas biodegradables y/o aplicando un bioadhesivo a la superficie de contacto entre el parche y el defecto.

30 En algunos casos, el tejido dañado puede extirparse quirúrgicamente antes de implantar el parche de tejido.

Trasplante de PPDC mediante andamiajes

35 Las células de la invención o los cocultivos de las mismas pueden sembrarse sobre o en un andamio tridimensional e implantarse *in vivo*, donde las células sembradas proliferarán sobre el andamio y formarán un tejido óseo o cartilaginoso de reemplazo *in vivo* en cooperación con las células del paciente.

40 En algunos aspectos de la divulgación, la matriz comprende tejido descelularizado, tal como matriz extracelular, lisados celulares (por ejemplo, fracciones celulares solubles), o combinaciones de los mismos, de las PPDC. En algunas formas de realización, la matriz es biodegradable. En algunos aspectos de la invención, la matriz comprende polímeros naturales o sintéticos. Las matrices de la invención incluyen andamiajes, estructuras reticulares, estructuras de autoensamblaje, y similares, biocompatibles, ya sean biodegradables o no, líquidas o sólidas. Tales matrices se conocen en la técnica de la terapia celular, la reparación quirúrgica, la ingeniería de tejidos y la cicatrización de heridas. Preferentemente, las matrices se tratan previamente (por ejemplo, se siembran, se inoculan, se ponen en contacto) con las células de la invención. Más preferentemente, las matrices se pueblan con células en estrecha asociación con la matriz o sus espacios. En algunos aspectos de la invención, las células se adhieren a la matriz. En algunas formas de realización, las células están contenidas dentro de o entrecruzan los espacios intersticiales de la matriz. Las más preferentes son las matrices sembradas en las que las células se encuentran en estrecha asociación con la matriz y que, cuando se utilizan terapéuticamente, inducen o sustentan la

45 increscencia de las células del paciente y/o la angiogénesis adecuada. Las matrices sembradas pueden introducirse en el cuerpo de un paciente de cualquier manera conocida en la técnica, incluida pero no limitada a, implantación, inyección, fijación quirúrgica, trasplante con otros tejidos, y similares. Las matrices de la invención pueden configurarse a la forma y/o al tamaño de un tejido u órgano *in vivo*.

50 Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el andamio puede diseñarse de manera que la estructura de andamio: (1) proporcione soporte a las células sembradas sin posterior degradación; (2) proporcione soporte a las células desde el momento de la siembra hasta que el trasplante de tejido es remodelado por el tejido del hospedador; (2) permita que las células sembradas se fijen, proliferen y se desarrollen en una estructura de tejido con suficiente integridad mecánica para darse soporte a sí misma *in vitro*, momento en el que el andamio se degrada. Se proporciona una revisión del diseño del andamiajes en Hutmacher, J. Bionat. Sci. Polymer Edn., 12(1):107-124 (2001).

65 Los andamiajes de la invención pueden administrarse en combinación con uno cualquiera o más de entre factores de crecimiento, células, por ejemplo células de médula ósea, condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo, o sus precursoras, medicamentos u otros componentes descritos anteriormente que estimulen la formación de tejido, o mejoren o potencien de otra manera la puesta en

práctica de la invención. Las PPDC que se sembrarán sobre los andamiajes pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen factores de crecimiento o medicamentos.

5 Las células de la divulgación pueden utilizarse para producir nuevo tejido *in vitro*, que a continuación puede implantarse, trasplantarse o insertarse de otra manera en un sitio que requiere la reparación, la sustitución o el aumento de tejido en un paciente.

10 En una forma de realización no limitativa de la divulgación, las células de la invención se utilizan para producir un constructo tisular tridimensional *in vitro*, que a continuación se implanta *in vivo*. Como un ejemplo de la producción de constructos tisulares tridimensionales, véase la patente de Estados Unidos N° 4.963.489. Por ejemplo, las células de la invención pueden inocularse o "sembrarse" sobre un andamiaje o armazón tridimensional, y hacerse proliferar o cultivarse *in vitro* para formar un tejido vivo que puede implantarse *in vivo*.

15 Las células de la invención pueden cultivarse libremente en un recipiente de cultivo hasta la subconfluencia o la confluencia, recogerse del cultivo e inocularse sobre un armazón tridimensional. La inoculación del armazón tridimensional con una alta concentración de células, por ejemplo, de aproximadamente 10^6 a 5×10^7 células por mililitro, dará como resultado la constitución del soporte tridimensional en períodos de tiempo relativamente más cortos.

20 Los ejemplos de andamiajes que pueden utilizarse en la presente invención incluyen mallas no tejidas, espumas porosas o péptidos de autoensamblaje. Las mallas no tejidas pueden formarse, por ejemplo, utilizando fibras compuestas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se vende con el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). También son posibles andamiajes las espumas, compuestas, por ejemplo, por copolímero poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas mediante procesos tales como la criodesecación, o liofilizadas, como se analiza en la patente de EE.UU. N° 6.355.699. También pueden utilizarse hidrogeles tales como péptidos de autoensamblaje (por ejemplo, RAD16). Estos materiales se utilizan frecuentemente como soportes para el crecimiento de tejido.

30 El armazón tridimensional puede estar hecho de materiales cerámicos, incluidos pero no limitados a: mono, di, tri, alfa-tri, beta-tri y tetra-fosfato cálcico, hidroxiapatita fluoroapatitas, sulfatos cálcicos, fluoruros cálcicos, óxidos de calcio, carbonatos cálcicos, fosfatos de calcio y magnesio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS (Universidad de Florida, Gainesville, FL), y mezclas de los mismos. Existen varios materiales cerámicos biocompatibles porosos adecuados actualmente disponibles en el mercado comercial tales como SURGIBON (Unilab Surgibone, Inc., Canadá), ENDOBON (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS (Mathys, A.G., Bettlach, Suiza) e INTERPORE (Interpore, Irvine, CA, Estados Unidos), y productos de injerto óseo de colágeno mineralizado tales como HEALOS (Orquest, Inc., Mountain View, CA) y VITOSS, RHAKOSS y CORTOSS (Orthovita, Malvern, PA). El armazón puede ser una mezcla, mezcla o composite de materiales naturales y/o sintéticos. En algunas formas de realización, el andamiaje está en forma de jaula. En una forma de realización preferente, el andamiaje está recubierto con colágeno.

40 Según una forma de realización preferente, el armazón es un fieltro, que puede estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PCL, PLA, PGA, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro mediante técnicas convencionales de procesamiento textil que consisten en prensado, corte, cardado y punzonado.

45 En otra forma de realización preferente, las células de la invención se siembran sobre los andamiajes de espuma que pueden ser estructuras composite. Además, el armazón tridimensional puede moldearse en una forma útil, tal como la de la parte externa de la oreja, un hueso, articulación u otra estructura específica del cuerpo a reparar, reemplazar o aumentar.

50 En otra forma de realización preferente, las células de la invención se siembran sobre un armazón que comprende un dispositivo protésico para su implantación en un paciente, tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.200.606. Tal como se describe en la misma, se han desarrollado diversos dispositivos protésicos clínicamente útiles para su uso en procedimientos de injerto óseo y cartilaginoso (véase, por ejemplo Bone Grafts and Bone Substitutions. Ed. M.B. Habal y A.H. Reddi, W.B. Saunders Co., 1992). Por ejemplo, se han utilizado y siguen siendo ampliamente utilizados en el entorno clínico dispositivos de reemplazo de rodilla y cadera eficaces. Muchos de estos dispositivos se fabrican utilizando diversos materiales inorgánicos que tienen baja actividad inmunogénica, que funcionan de forma segura en el cuerpo. Los ejemplos de materiales sintéticos que han sido ensayados y probados incluyen aleaciones de titanio, fosfato cálcico, hidroxiapatita cerámica, y diversas aleaciones de acero inoxidable y cobalto-cromo. Estos materiales proporcionan soporte estructural y pueden formar un andamiaje en el que puede darse la vascularización y migración celular del hospedador. La presente invención proporciona una fuente de células que puede utilizarse para "sembrar" tales dispositivos protésicos. En la forma de realización preferente, las PPDC se mezclan primero con un material de soporte antes de aplicarse a un dispositivo. Los materiales de soporte adecuados conocidos para los expertos en la materia incluyen, pero no se limitan a, gelatina, fibrina, colágeno, almidón, polisacáridos, sacáridos, proteoglicanos, polímeros sintéticos, fosfato cálcico o materiales cerámicos.

El armazón puede tratarse antes de la inoculación de las células de la invención con el fin de potenciar la fijación celular. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, podrían tratarse matrices de nailon con ácido acético 0,1 molar e incubarse en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nailon. Podría tratarse poliestireno de manera similar utilizando ácido sulfúrico.

Además, las superficies externas del armazón tridimensional pueden modificarse para mejorar la fijación o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como mediante el recubrimiento por plasma del armazón o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular y/u otros materiales tales como, pero sin limitarse a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, entre otros.

En algunas formas de realización, el andamiaje está compuesto por o está tratado con materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también estimulan y sustentan el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden tratarse adicionalmente para hacer el andamiaje no trombogénico. Tales tratamientos incluyen antitrombóticos tales como la heparina, y tratamientos que modifican la carga superficial del material tal como el recubrimiento por plasma.

En algunas formas de realización, la superficie del andamiaje tiene textura. Por ejemplo, en algunos aspectos de la invención, el armazón está provisto de un patrón de surcos y salientes. Los surcos son preferentemente inferiores a aproximadamente 500 micrómetros, más preferentemente inferiores a aproximadamente 100 micrómetros, y lo más preferentemente entre aproximadamente 10 nanómetros y 10 micrómetros. Tales "microsurcos" permiten que las células se alineen y/o migren guiadas por los surcos de la superficie. Véase, por ejemplo, *Odontology*. 2001; 89(1):2-11. El andamiaje con textura puede utilizarse, por ejemplo, como implante dental.

En algunas formas de realización, es importante recrear en cultivo el microambiente celular que se encuentra *in vivo*, de manera que pueda variar el grado de crecimiento de las células de la invención antes de su implantación *in vivo* o uso *in vitro*. Además, pueden añadirse al medio de cultivo factores de crecimiento, agentes inductores de la diferenciación condrogénica, agentes inductores osteogénicos y factores angiogénicos antes de, durante o después de la inoculación de las células para activar la diferenciación y la formación de tejido por las PPDC o cocultivos de las mismas.

Puede modificarse el armazón tridimensional de manera que se potencie el crecimiento de las células y la producción de tejido sobre el mismo, o de manera que se reduzca el riesgo de rechazo del implante. Por lo tanto, pueden añadirse al armazón uno o más compuestos biológicamente activos, incluidos pero no limitados a, antiinflamatorios, inmunosupresores o factores de crecimiento.

Usos terapéuticos de la matriz extracelular o lisado celular derivados de las PPDC

Como alternativa a la implantación de las células de la invención, o al tejido vivo producido a partir de las mismas, la divulgación describe un componente o producto de las PPDC, tal como la matriz extracelular (ECM) o el lisado celular producidos por esas células para su uso en la reparación, la sustitución o el aumento tisular.

En algunas formas de realización, después de haberse cultivado *in vitro* las células de la invención, tal como, por ejemplo, utilizando un sistema de andamiaje tridimensional que se describe en el presente documento, de manera que se haya secretado sobre el armazón una cantidad deseada de ECM. En una forma de realización de la divulgación, una vez la ECM es secretada sobre el armazón, pueden extraerse las células. La ECM puede procesarse para su uso posterior, por ejemplo, como preparación inyectable.

En algunas formas de realización de la divulgación, se destruyen las células y se extraen del armazón restos celulares (por ejemplo, membranas celulares). Este proceso puede llevarse a cabo de varias maneras diferentes. Por ejemplo, el tejido vivo puede congelarse instantáneamente en nitrógeno líquido sin un crioprotector, o el tejido puede sumergirse en agua destilada estéril de manera que las células estallen en respuesta a la presión osmótica. Una vez muertas las células, pueden romperse las membranas celulares y extraerse los restos celulares tratándolos con un aclarado con detergente suave, como EDTA, CHAPS o un detergente zwitteriónico. Una ventaja de utilizar un aclarado con detergente suave es que solubiliza las proteínas unidas a la membrana, que con frecuencia son muy antigénicas.

Como alternativa, el tejido puede digerirse enzimáticamente y/o extraerse con reactivos que rompen las membranas celulares. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas (por ejemplo, desoxirribonucleasa y ribonucleasa). Los ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alcohol alquililpoliéter (TRITON®X-100), octilfenoxi polietoxi-

etanol (Rohm y Haas Philadelphia, PA), BRIJ-35, un lauril éter de polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, CA), polisorbato 20 (Tween 20®), un monolaureato de polietoxietanol sorbitán (Rohm y Haas), lauril éter de polietileno (Rohm y Haas); y detergentes iónicos tales como, por ejemplo, dodecil sulfato sódico, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen de 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o no ramificada.

Los andamiajes que comprenden la ECM pueden utilizarse terapéuticamente como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la ECM puede recogerse del andamiaje. La recogida de la ECM puede lograrse de diversas maneras, dependiendo, por ejemplo, de si el andamiaje es biodegradable o no biodegradable. Por ejemplo, si el armazón no es biodegradable, la ECM puede extraerse sometiendo el armazón a sonicación, chorros de agua a alta presión, raspado mecánico o tratamiento suave con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de lo anterior.

Si el armazón es biodegradable, la ECM puede recogerse, por ejemplo, permitiendo que el armazón se degrade o disuelva en solución. Como alternativa, si el armazón biodegradable está compuesto por un material que puede en sí inyectarse junto con la ECM, el armazón y la ECM pueden procesarse *in toto* para su posterior inyección. Como alternativa, la ECM puede extraerse del armazón biodegradable mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la recogida de ECM desde un armazón no biodegradable. Todos los procesos de recogida se diseñan preferentemente para no desnaturalizar la ECM o el lisado celular producidos por las células de la divulgación.

Una vez recogida la ECM, ésta puede procesarse adicionalmente. La ECM puede homogeneizarse hasta partículas finas mediante técnicas conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, mediante sonicación, de manera que puedan pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes de la ECM pueden reticularse, si se desea, mediante irradiación gamma. Preferentemente, la ECM puede irradiarse entre 0,25 mega rads y 2 mega rads para esterilizar y reticular la ECM. Resulta posible la química de reticulación utilizando agentes que sean tóxicos, tal como el glutaraldehído, pero generalmente no resulta preferente.

Los lisados celulares preparados a partir de las poblaciones de las células derivadas posparto de la divulgación también tienen muchas utilidades. En una forma de realización, se preparan lisados de células enteras, por ejemplo, rompiendo las células sin posterior separación de las fracciones celulares. En otra forma de realización, se separa una fracción de membrana celular a partir de una fracción soluble de las células mediante métodos de rutina conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, o métodos similares. El uso de fracciones celulares solubles *in vivo* permite utilizar en un paciente el medio intracelular beneficioso sin provocar rechazo o una respuesta adversa. En la técnica se conocen métodos para lisar células e incluyen diversos medios de rotura mecánica, rotura enzimática o rotura química, o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su medio de crecimiento y, por lo tanto, que contiene factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células limpias de medio, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones superiores a la densidad de población original, si resulta preferente. Los lisados celulares preparados a partir de poblaciones de células derivadas posparto pueden utilizarse tal como están, concentrarse adicionalmente mediante, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como sustancias biológicas, por ejemplo composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares pueden utilizarse *in vitro* o *in vivo*, en solitario o por ejemplo, con células. Los lisados celulares, si se introduce *in vivo*, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o a distancia para proporcionar a un paciente, por ejemplo, los factores de crecimiento celular necesarios.

Las cantidades y/o relaciones de proteínas pueden ajustarse mezclando la ECM o el lisado celular producidos por las células de la invención con una ECM o un lisado celular de uno o más de otros tipos celulares. Además, pueden incorporarse en la preparación de ECM o lisado celular sustancias biológicamente activas tales como proteínas, factores de crecimiento y/o medicamentos. Las sustancias biológicamente activas de ejemplo incluyen antiinflamatorios y factores de crecimiento que promueven la curación y la reparación tisular. Las células pueden administrarse conjuntamente con las ECM o los lisados celulares. Puede formularse una ECM o un lisado celular de las PPDC para la administración como se ha descrito anteriormente para las PPDC.

El procedimiento descrito anteriormente para preparar una ECM o un lisado celular inyectables se lleva a cabo preferentemente en condiciones estériles utilizando materiales estériles. La ECM o el lisado celular procesados en un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden inyectarse por vía subcutánea o por vía intradérmica para tratar afecciones óseas o cartilaginosas, por ejemplo, aumentando el tejido o reparando o corrigiendo anomalías congénitas, defectos adquiridos o defectos cosméticos.

Uso de las PPDC para el detección *in vitro* de la eficacia o toxicidad de fármacos

Las células y los tejidos de la invención pueden utilizarse *in vitro* para cribar una gran diversidad de compuestos para determinar la eficacia y citotoxicidad de agentes farmacéuticos, factores de

crecimiento/reguladores, antiinflamatorios. Con este fin, las células de la invención, o los cultivos tisulares descritos anteriormente, se mantienen *in vitro* y se exponen al compuesto a ensayar. La actividad de un compuesto citotóxico puede medirse por su capacidad para dañar o matar las células en cultivo. Esto puede evaluarse fácilmente mediante técnicas de tinción vital. El efecto de los factores de crecimiento/regulación puede evaluarse analizando el número de células vivas *in vitro*, por ejemplo, mediante recuentos totales de células y recuentos diferenciales de células. Esto puede lograrse utilizando técnicas citológicas y/o histológicas convencionales, incluido el uso de técnicas inmunocitoquímicas mediante anticuerpos que definen los antígenos celulares específicos del tipo. Puede evaluarse el efecto de diversos fármacos sobre las células de la invención ya sea en cultivo en suspensión o en el sistema tridimensional descrito anteriormente.

Las células y los tejidos de la invención pueden utilizarse como sistemas modelo para el estudio de estados fisiológicos o patológicos. Por ejemplo, las articulaciones que están inmovilizadas sufren de forma relativamente rápida en varios aspectos. La actividad metabólica de los condrocitos parece afectada, ya que pronto se observa una pérdida de proteoglicanos y un aumento del contenido de agua. El aspecto blanco y reluciente normal del cartílago cambia a un color apagado y azulado, y el espesor del cartílago se reduce. Sin embargo, aún no está claro qué grado de este cambio se debe a la deficiencia nutricional *versus* al grado debido a un desajuste de la homeostasis metabólica dependiente del estrés. Las células y los tejidos de la invención pueden utilizarse para determinar las necesidades nutricionales del cartílago en diferentes condiciones físicas, por ejemplo, presurización intermitente, y mediante una acción de bombeo del medio nutriente dentro y fuera del constructo cartilaginoso. Esto puede ser especialmente útil para estudiar las causas subyacentes a la disminución de la resistencia a la tracción relacionada con la edad o relacionada con la lesión de, por ejemplo, un cartílago articular, por ejemplo, en la rodilla, que predispone al cartílago debilitado a una lesión traumática.

Las células y los tejidos de la invención también pueden utilizarse para estudiar el mecanismo de acción de las citocinas, los factores de crecimiento y los mediadores inflamatorios, por ejemplo, IL-1, TNF y las prostaglandinas. Además, pueden cribarse agentes farmacéuticos y/o citotóxicos para detectar los más eficaces para un paciente en particular, tal como los que reducen o previenen la resorción de cartílago o hueso, o potencian de otra manera el crecimiento equilibrado de los mismos. Los agentes que hayan demostrado ser eficaces *in vitro* podrían utilizarse para tratar al paciente terapéuticamente.

Uso de las PPDC para producir moléculas biológicas

En una forma de realización adicional, las células de la invención pueden cultivarse *in vitro* para producir productos biológicos con alto rendimiento. Por ejemplo, tales células, que producen de forma natural un producto biológico particular de interés (por ejemplo, un factor de crecimiento, un factor regulador o una hormona peptídica), o que han sido modificadas por ingeniería genética para que produzcan un producto biológico, podrían someterse a proliferación clonal utilizando, por ejemplo, el sistema de cultivo tridimensional descrito anteriormente. Si las células excretan el producto biológico en el medio nutriente, el producto puede aislarse fácilmente a partir del medio acondicionado o gastado mediante técnicas de separación convencionales, por ejemplo, tales como la precipitación diferencial de proteínas, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel, la electroforesis y la cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Puede utilizarse un "biorreactor" para aprovechar el método de flujo para alimentar, por ejemplo, un cultivo tridimensional *in vitro*.

Básicamente, a medida que se hacen pasar los medios recién preparados por el cultivo tridimensional, el producto biológico se elimina por lavado del cultivo y, a continuación, puede aislarse del efluente, como se ha indicado anteriormente.

Como alternativa, un producto biológico de interés puede permanecer dentro de la célula y, por tanto, su recogida puede hacer necesario lisar las células. A continuación, el producto biológico puede purificarse utilizando una cualquiera o más de las técnicas anteriormente mencionadas.

Kits

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

En otro aspecto, la invención proporciona kits que utilizan las PPDC, poblaciones de PPDC, de la invención, componentes y productos de las PPDC de la divulgación en varios métodos para el aumento, la regeneración y la reparación como se ha descrito anteriormente. En algunas formas de realización, los kits pueden incluir una o más

poblaciones celulares, incluidas al menos PPDC y un vehículo farmacéuticamente aceptable (líquido, semisólido o sólido). Los kits también pueden incluir opcionalmente un medio de administración de las células, por ejemplo mediante inyección. Los kits pueden incluir adicionalmente instrucciones para el uso de las células. Los kits preparados para su uso en hospitales de campaña, como por ejemplo para uso militar, pueden incluir suministros para todo el procedimiento, incluidos los andamiajes tisulares, las suturas quirúrgicas, y similares, en los que las células se utilizarán junto con la reparación de lesiones agudas. Los kits para ensayos y métodos *in vitro* como se describen en el presente documento pueden contener uno o más de (1) PPDC o componentes o productos de las PPDC, (2) reactivos para poner en práctica el método *in vitro*, (3) otras células o poblaciones celulares, cuando proceda, y (4) instrucciones para llevar a cabo el método *in vitro*.

Crioconservación y creación de un banco de PPDC

Las PPDC de la invención pueden crioconservarse y mantenerse o almacenarse en un "banco de células". La crioconservación de las células de la invención puede llevarse a cabo según métodos conocidos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las células pueden suspenderse en un "medio congelante", tal como, por ejemplo, un medio de cultivo que comprende adicionalmente del 0 al 95 por ciento de FBS y del 0 al 10 por ciento de dimetilsulfóxido (DMSO), con o sin un 5 a 10 por ciento de glicerol, a una densidad, por ejemplo, de aproximadamente $0,5$ a 10×10^6 células por mililitro. El medio de crioconservación puede comprender agentes de crioconservación, incluidos pero no limitados a, metilcelulosa. Las células se dispensan en ampollas de vidrio o plástico, que a continuación se sellan y se transfieren a la cámara de congelación de un congelador de velocidad controlada. La velocidad óptima de congelación puede determinarse empíricamente. Un congelador de velocidad programable por ejemplo, puede dar un cambio de temperatura de -1°C a -10°C por minuto. La temperatura de crioconservación preferente es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C , más preferentemente es de aproximadamente -90°C a aproximadamente -160°C , y lo más preferentemente es de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C . Las células crioconservadas se transfieren preferentemente a nitrógeno líquido antes de descongelarse para su uso. En algunas formas de realización, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C , se transfieren a un área de almacenamiento con nitrógeno líquido. Las células crioconservadas pueden almacenarse durante un período de años.

Las células crioconservadas de la invención constituyen un banco de células, porciones de las cuales pueden "sacarse" mediante descongelación y, a continuación, utilizarse según sea necesario. La descongelación generalmente debe llevarse a cabo rápidamente, por ejemplo, transfiriendo una ampolla de nitrógeno líquido a un baño de agua a 37°C . Los contenidos descongelados de la ampolla deben transferirse inmediatamente en condiciones estériles a un recipiente de cultivo que contenga un medio apropiado tal como DMEM acondicionado con FBS al 10 por ciento.

En todavía otro aspecto, la divulgación proporciona también la creación de un banco de tejidos, células, componentes celulares y poblaciones celulares de la invención. Como se ha analizado anteriormente, las células se crioconservan fácilmente. Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos de crioconservación de células en un banco, en el que las células se almacenan congeladas y se asocian con una caracterización completa de las células en base a las propiedades inmunitarias, bioquímicas y genéticas de las células. Las células así congeladas pueden utilizarse para un tratamiento autólogo, singénico o alogénico, dependiendo de los requisitos del procedimiento y de las necesidades del paciente. Preferentemente, la información sobre cada muestra crioconservada se almacena en un ordenador, que puede consultarse en base a las necesidades del cirujano, del procedimiento y del paciente, realizándose coincidencias adecuadas en base a la caracterización de las células o poblaciones. Preferentemente, las células de la invención se cultivan y se hacen proliferar hasta la cantidad de células deseada y se preparan composiciones de células terapéuticas ya sea por separado o como cocultivos, en presencia o ausencia de una matriz o soporte. Aunque para algunas aplicaciones puede ser preferente utilizar células recién preparadas, el resto pueden crioconservarse y guardarse en el banco congelando las células e introduciendo la información en el ordenador para asociar la entrada de ordenador con las muestras. Aun cuando no es necesario hacer coincidir una fuente o donante con un receptor de tales células, con fines inmunitarios, el sistema del banco hace que sea fácil hacer coincidir, por ejemplo, las propiedades bioquímicas o genéticas deseables de las células del banco con las necesidades terapéuticas. Tras hacer coincidir las propiedades deseadas con una muestra del banco, la muestra se recupera, y se prepara para su uso terapéutico. También pueden conservarse componentes o lisados celulares preparados como se describe en el presente documento (por ejemplo, crioconservados, liofilizados) y crearse bancos de los mismos según la presente divulgación.

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

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Derivación de células a partir de tejidos posparto

El objetivo de este estudio era obtener poblaciones de células a partir de tejidos placentario y de cordón umbilical. Se obtuvieron cordón umbilical y placenta posparto tras el nacimiento de un embarazo a término o prematuro. Las células se recolectaron de 5 donantes distintos de tejido de cordón umbilical y placentario. Se ensayaron diferentes métodos de aislamiento de células en cuanto a su capacidad para producir células con: 1) el potencial de diferenciarse a células con diferentes fenotipos, o 2) el potencial de proporcionar factores tróficos críticos útiles para otras células y tejidos.

Métodos y materiales

Derivación de células de cordón umbilical. Se obtuvieron cordones umbilicales del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Los tejidos se obtuvieron tras partos normales. El protocolo de aislamiento de células se realizó asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los residuos, se lavó el cordón umbilical en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicótico y antibiótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen Carlsbad, CA)). A continuación, se disociaron mecánicamente los tejidos en placas de cultivo tisular de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM con bajo contenido de glucosa o DMEM con alto contenido de glucosa; Invitrogen), picando el tejido finamente hasta obtener una pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo). A continuación, se digirió el tejido en medio DMEM con bajo contenido de glucosa o en medio DMEM con alto contenido de glucosa, conteniendo cada uno antimicótico y antibiótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen)) y enzimas de digestión. En algunos experimentos, se utilizó una mezcla enzimática de collagenasa y dispasa ("C:D"; collagenasa (Sigma, St. Louis, MO), 500 unidades/mililitro, y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro en medio DMEM con bajo contenido de glucosa). En otros experimentos se utilizó una mezcla de collagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:H:D") (collagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro, y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro, en DMEM con bajo contenido de glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las enzimas de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Enviro, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen), suero bovino fetal al 15 por ciento (v/v) (FBS; suero bovino definido; lote n° AND18475; Hyclone, Logan, UT), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA). La suspensión celular se filtró a través de un filtro celular de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences). Se hizo pasar por el filtro un aclarado de 5 mililitros más que comprendía Medio de crecimiento. A continuación, se hizo pasar la suspensión celular por un filtro celular de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences) y seguido de un aclarado de 5 mililitros más de Medio de crecimiento.

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

Tras la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de Medio de crecimiento recién preparado. El número de células viables se determinó mediante tinción con azul de tripano. A continuación, Las células se cultivaron en condiciones normales.

Las células aisladas a partir de células de cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces en T de 75 cm² recubiertos con gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen), suero bovino definido al 15 por ciento (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote n° AND18475), 2-mercaptoetanol al 0,001 por ciento (v/v) (Sigma), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen)). Al cabo de aproximadamente 2-4 días, se aspiró de los matraces el medio gastado. Las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar los residuos y las células de origen sanguíneo. A continuación, se reabasteció a las células con Medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días del pase 0 al pase 1). En pases posteriores (del pase 1 al 2, etc.), las células alcanzaron la subconfluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pases posteriores, las células se sembraron a 5000 células/cm². Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con dióxido de carbono al 5 por ciento y oxígeno al 20 por ciento, a 37°C.

Aislamiento de las células placentarias. Se obtuvo tejido placentario del NDRI (Filadelfia, PA). Los tejidos eran de un embarazo y se obtuvieron en el momento de un parto quirúrgico normal. Se aislaron células placentarias como se describe para el aislamiento de las células de cordón umbilical.

El siguiente ejemplo se refiere al aislamiento de poblaciones distintas de células de origen materno y de origen neonatal de tejido placentario.

El protocolo de aislamiento celular se realizó asépticamente en una campana de flujo laminar. El tejido placentario se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicótico y antibiótico (100 U/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen) para eliminar la sangre y los residuos. A continuación, se seccionó el tejido placentario en tres secciones: la línea superior (lado o aspecto neonatal), la línea media (aislamiento de células mixtas, neonatales y maternas, o zona de las vellosidades) y la línea inferior (lado o aspecto materno).

Las secciones separadas se lavaron individualmente varias veces en PBS con antibiótico/antimicótico para eliminar adicionalmente la sangre y los residuos. A continuación, cada sección se disoció mecánicamente en placas de cultivo tisular de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen) hasta obtener una pulpa fina. La pulpa se transfirió a tubos cónicos de 50 mililitros. Cada tubo contenía aproximadamente 5 gramos de tejido. El tejido se digirió en medio DMEM con bajo contenido de glucosa o en medio DMEM con alto contenido de glucosa que contenía antimicótico y antibiótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen)) y enzimas de digestión. En algunos experimentos se utilizó una mezcla enzimática de collagenasa y dispasa ("C:D") que contenía collagenasa (Sigma, St. Louis, MO) a 500 unidades/mililitro y dispasa (Invitrogen) a 50 unidades/mililitro en medio DMEM con bajo contenido de glucosa. En otros experimentos se utilizó una mezcla de collagenasa, dispasa y hialuronidasa (C:H:D) (collagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro, y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro en DMEM con bajo contenido de glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las enzimas de digestión se incubaron durante 2 horas a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm.

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, el sobrenadante resultante se retiró por aspiración. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen), suero bovino fetal al 15% (v/v) (FBS; suero bovino definido; lote n° AND18475; Hyclone, Logan, UT), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), antibiótico/antimicótico (100 U/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen)). La suspensión celular se filtró a través de un filtro celular de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences), seguido de un aclarado con 5 mililitros más de Medio de crecimiento. La suspensión celular total se hizo pasar a través de un filtro celular de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences), seguido de 5 mililitros más de Medio de crecimiento como aclarado.

El filtrado se resuspendió en Medio de crecimiento (un volumen total de 50 ml) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 50 mililitros de Medio de crecimiento recién preparado. Este proceso se repitió dos veces más. Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de Medio de crecimiento recién preparado. Se determinó un recuento de células mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano. A continuación, las células se cultivaron en condiciones normales.

Aislamiento de células con LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN). Se aislaron células a partir de cordón umbilical en medio DMEM con bajo contenido de glucosa con LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianápolis, IN) y hialuronidasa (5 unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fueron como se ha descrito para otras digestiones con proteasas anteriormente indicadas utilizando una mezcla de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN)/hialuronidasa en lugar de la mezcla enzimática C:D o C:H:D. La digestión del tejido con LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN) dio como resultado el aislamiento de poblaciones celulares a partir de tejidos posparto que proliferaron fácilmente.

Aislamiento celular mediante otras combinaciones enzimáticas. Se compararon procedimientos para el aislamiento celular a partir del cordón umbilical mediante diferentes combinaciones enzimáticas. Las enzimas comparadas para la digestión incluían: i) collagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla de collagenasa:dispasa (C:D); v) mezcla de collagenasa:hialuronidasa (C:H); vi) mezcla de dispasa:hialuronidasa (D:H); y vii) mezcla de collagenasa:dispasa:hialuronidasa (C:D:H). Se observaron diferencias en el aislamiento celular mediante estas diferentes condiciones de digestión enzimática (Tabla 1-1).

Aislamiento de células a partir de sangre residual en los cordones. Se realizaron intentos para aislar reservas de células de cordón umbilical mediante diferentes enfoques. En un caso, el cordón umbilical se cortó y se lavó con Medio de crecimiento para sacar los coágulos de sangre y el material gelatinoso. Se recogió la mezcla de sangre, material gelatinoso y Medio de crecimiento y se centrifugó a 150 x g. El sedimento se resuspendió y se sembró sobre matraces recubiertos con gelatina en Medio de crecimiento. A partir de estos experimentos se aisló una población celular que proliferó fácilmente.

Aislamiento de células a partir de sangre de cordón umbilical. Las células también se aislaron a partir de muestras de sangre de cordón umbilical obtenidas del NDRI. El protocolo de aislamiento utilizado en este caso fue el de la solicitud de patente internacional PCT/US02/29971 de Ho *et al.* Las muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre de cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) se mezclaron con tampón de lisis (cloruro

de amonio 155 milimolar esterilizado por filtración, bicarbonato potásico 10 milimolar, EDTA 0,1 milimolar tamponado a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron en una relación de 1:20 entre sangre de cordón umbilical y tampón de lisis. La suspensión celular resultante se agitó en vórtex durante 5 segundos, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. La fracción celular soluble se centrifugó (10 minutos a 200 x g). El sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contenía suero bovino fetal al 10 por ciento (Hyclone, Logan UT), glutamina 4 milimolar (Mediatech Herndon, VA), 100 unidades de penicilina por 100 mililitros y 100 microgramos de estreptomycin por 100 mililitros (Gibco, Carlsbad, CA). Las células resuspendidas se centrifugaron (10 minutos a 200 x g), el sobrenadante se aspiró, y el sedimento celular se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en matraces T75 (Corning, NY), en matraces T75 recubiertos con laminina o en matraces T175 recubiertos con fibronectina (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

Aislamiento de células derivadas posparto mediante diferentes combinaciones enzimáticas y condiciones de crecimiento. Para determinar si las poblaciones celulares pueden aislarse en diferentes condiciones y hacerse proliferar en diversas condiciones inmediatamente después del aislamiento, se digirieron las células en Medio de crecimiento con o sin 2-mercaptoetanol al 0,001 por ciento (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), utilizando la combinación enzimática de C:D:H, según los procedimientos proporcionados anteriormente. Las células derivadas de la placenta así aisladas se sembraron en diversas condiciones. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina/estreptomycin. (Tabla 1-2).

Aislamiento de células derivadas posparto mediante diferentes combinaciones enzimáticas y condiciones de crecimiento. En todas las condiciones, las células se fijaron y proliferaron bien entre el pase 0 y 1 (Tabla 1-2). Las células en las condiciones 5 a 8 y 13 a 16 demostraron proliferar bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se crioconservaron. Todas las células se guardaron en el banco.

Resultados

Aislamiento celular mediante diferentes combinaciones enzimáticas. La combinación de C:D:H proporcionó el mejor rendimiento celular después del aislamiento y generó células que proliferaron durante muchas más generaciones en cultivo que las demás condiciones (Tabla 1-1). No se logró una población celular que pudiese proliferar utilizando colagenasa o hialuronidasa solamente. No se intentó determinar si este resultado es específico del colágeno que se ensayó.

Aislamiento de células derivadas posparto mediante diferentes combinaciones enzimáticas y condiciones de crecimiento. Las células se fijaron y proliferaron bien entre el pase 0 y 1 en todas las condiciones ensayadas para la digestión enzimática y el crecimiento (Tabla 1-2). Las células en las condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se crioconservaron. Todas las células se guardaron en el banco.

Aislamiento de células a partir de sangre residual en los cordones. Las células nucleadas se fijaron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron mediante citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas mediante digestión enzimática.

Aislamiento de las células a partir de sangre de cordón umbilical. Las preparaciones contenían glóbulos rojos y plaquetas. Ninguna célula nucleada se fijó ni dividió durante las primeras 3 semanas. El medio se cambió 3 semanas después de la siembra y no se observó que las células se fijaran ni crecieran.

Resumen. Las poblaciones de células pueden aislarse a partir de tejido de cordón umbilical y placentario más eficazmente utilizando la combinación enzimática de colagenasa (una metaloproteasa de matriz), dispasa (proteasa neutra) y hialuronidasa (una enzima mucolítica que descompone el ácido hialurónico). También puede utilizarse LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN), que es una Blendzyme. En el presente estudio también se utilizó Blendzyme 3 que es colagenasa (4 unidades Wunsch/g) y termolisina (1714 unidades de caseína/g) junto con hialuronidasa para aislar células. Estas células proliferan fácilmente durante muchos pases cuando se cultivan en Medio de crecimiento en plástico recubierto con gelatina.

Se aislaron células derivadas posparto a partir de sangre residual en los cordones, pero no a partir de la sangre del cordón. La presencia de células en los coágulos de sangre lavados del tejido que se adhieren y crecen en las condiciones utilizadas puede deberse a que se liberan células durante el proceso de disección.

Tabla 1-1: Aislamiento de células a partir de tejido de cordón umbilical mediante diferentes combinaciones enzimáticas

Digestión enzimática	Células aisladas	Proliferación celular
Colagenasa	X	X
Dispasa	+ (> 10 h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa:Dispasa	++ (< 3 h)	++
Colagenasa:Hialuronidasa	++ (< 3 h)	+
Dispasa: hialuronidasa	+ (> 10 h)	+
Colagenasa:Dispasa:Hialuronidasa	+++ (< 3 h)	+++
Leyenda: + = bueno, ++ = muy bueno, +++ = excelente, X = sin éxito		

Tabla 1-2: Aislamiento y proliferación en cultivo de las células derivadas posparto en condiciones variables:

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

Referencia

1. HO, Tony, W.; KOPEN, Gene, C.; RIGHTER, William, F.; RUTKOWSKI, J., Lynn; HERRING, W., Joseph; RAGAGLIA, Vanessa; WAGNER, Joseph WO2003025149 A2 CELL POPULATIONS WHICH CO-EXPRESS CD49C AND CD90, NEURONYX, INC. Solicitud N° PCT/US02/29971 US, presentada el 20/09/2002, A2 publicada el 27/03/2003, A3 publicada el 18/12/2003.

EJEMPLO 2

Evaluación de medios de crecimiento para las células derivadas posparto

Se evaluaron varios medios de cultivo celular en cuanto a su capacidad para sustentar el crecimiento de las células derivadas de la placenta. Se evaluó el crecimiento de las células derivadas de la placenta en oxígeno a concentración normal (20%) y a baja concentración (5%) al cabo de 3 días mediante el ensayo colorimétrico MTS.

Métodos y material

Se sembraron células derivadas de la placenta en el pase 8 (P8) a 1×10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (n° de cat. SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)). Después de 8 horas, el medio se cambió como se describe en la Tabla 2-1, y las células se incubaron en oxígeno a concentración normal (20%, v/v) o a baja concentración (5%, v/v) a 37°C, CO₂ al 5% durante 48 horas. Se añadió MTS al medio de cultivo (CELLTITER 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI) durante 3 horas y se midió la absorbancia a 490 nanómetros (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

Tabla 2-1. Medio de cultivo

Medio de cultivo	Proveedor	% de suero bovino fetal añadido (v/v)
DMEM con bajo contenido de glucosa	Gibco Carlsbad CA	0, 2, 10
DMEM con alto contenido de glucosa	Gibco	0, 2, 10
RPMI 1640	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2, 10
Cell gro-free (sin suero, sin proteínas)	Mediatech, Inc	-
F10 de Ham	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
MSCGM (completo con suero)	Cambrex, Walkersville, MD	0, 2, 10
Completo-sin suero, con albúmina	Mediatech, Inc.	-
Medio de crecimiento	NA	-
F12 de Ham	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
De Iscove	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
Medio basal de Eagle	Mediatech, Inc.	0, 2, 10
DMEM/F12 (1:1)	Mediatech, Inc.	0, 2, 10

Resultados

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

El efecto del suero. La adición de suero a los medio en condiciones normales de oxígeno dio como resultado un incremento dependiente de la dosis reproducible en la absorbancia y, por lo tanto, el número de células viables. La adición de suero para completar el MSCGM dio como resultado una disminución dependiente de la dosis en la absorbancia. En los medios sin suero añadido, las células crecieron en Cellgro, F10 de Ham y DMEM.

El efecto del oxígeno. La reducción de oxígeno parecía aumentar la velocidad de crecimiento de las células en Medio de crecimiento, F10 de Ham y MSCGM.

En orden de crecimiento decreciente, los medios que dieron como resultado el mejor crecimiento de las células fueron: Medio de crecimiento > MSCGM > de Iscove + FBS al 10% = DMEM-HG + FBS al 10% = F12 de Ham + FBS al 10% = RPMI 1640 + FBS al 10 %.

Resumen. Las células derivadas posparto pueden cultivarse en diversos medios de cultivo en oxígeno a concentración normal o baja. El crecimiento a corto plazo de las células derivadas de la placenta se determinó en 12 medios basales con suero al 0%, 2% y 10% (v/v) en O₂ al 5% ó 20%. En general, las células derivadas de la placenta no crecían en condiciones sin suero con las excepciones de F10 de Ham y Cellgro-free, que tampoco tienen proteínas. El crecimiento en estos medios sin suero fue de aproximadamente el 25%-33% del crecimiento máximo observado con el Medio de crecimiento que contenía suero al 15%. Este estudio demuestra que las células derivadas de la placenta pueden cultivarse en condiciones sin suero y que el Medio de crecimiento es uno de varios medios (suero al 10% en medio de Iscove, RPMI o F12 de Ham) que puede utilizarse para cultivar células derivadas de la placenta.

El medio sin suero más prometedor fue CELLGRO-FREE, un medio sin suero ni proteínas, sin hormonas ni factores de crecimiento, que está diseñado para el crecimiento de las células de mamífero *in vitro* (información del producto de Mediatech).

El medio completo-sin suero también desarrollado para el cultivo sin suero no fue tan eficaz para sustentar el crecimiento de las células derivadas de la placenta. Completo-sin suero fue desarrollado por Mediatech, en base a una mezcla 50/50 de DMEM/F12 con menores porcentajes de RPMI 1640 y 5A de McCoy. Este medio también contiene elementos traza seleccionados y carbohidratos de alto peso molecular, vitaminas adicionales, una fuente de proteína no animal y una pequeña cantidad de BSA (1 gramo/litro). No contiene insulina, transferrina, colesterol, ni factores de crecimiento o de fijación. Es bicarbonato tamponado para su uso con CO₂ al 5%. Originalmente diseñado para hibridomas y líneas celulares en suspensión, puede ser adecuado para algunas líneas celulares dependientes del anclaje.

EJEMPLO 3

Crecimiento de células derivadas posparto en medio que contiene D-valina

Se ha descrito que puede utilizarse un medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma L-valina normal para inhibir selectivamente el crecimiento de las células tipo fibroblasto en cultivo (Hongpaisan, 2000; Sordillo *et al.*,

1988). Se evaluó el crecimiento de las células derivadas posparto en un medio que contenía D-valina en ausencia de L-valina.

Métodos y material

Se sembraron células derivadas de la placenta (P3), fibroblastos (P9) y células derivadas de cordón umbilical (P5) a 5×10^3 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas, se eliminó el medio y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se reemplazó con un Medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (pedido extraordinario, Gibco), suero bovino fetal dializado al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)).

Resultados

Las células derivadas de la placenta, derivadas de cordón umbilical y los fibroblastos sembrados en el medio que contenía D-valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en el Medio de crecimiento que contenía suero dializado. Los fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando de tamaño y cambiando de forma. Todas las células murieron y, finalmente, se soltaron de la superficie del matraz al cabo de 4 semanas.

Resumen. Las células derivadas posparto necesitan L-valina para su crecimiento celular y para su viabilidad a largo plazo. Preferentemente, no se elimina la L-valina del medio de crecimiento para las células derivadas posparto.

Referencias

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

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

EJEMPLO 4

Medios de crioconservación para células derivadas posparto

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

Métodos y material

Las células derivadas de la placenta cultivadas en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03, Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)), en un matraz T75 recubierto con gelatina, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco) y se tripsinizaron utilizando 1 mililitro de tripsina/EDTA (Gibco). La tripsinización se detuvo añadiendo 10 mililitros de Medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a $150 \times g$, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 1 mililitro de Medio de crecimiento. Se sacó una alícuota de la suspensión celular, 60 microlitros, y se añadió a 60 microlitros de azul de tripano (Sigma). Se estimó el número de células viables mediante un hemocitómetro. La suspensión celular se dividió en cuatro alícuotas iguales que contenían 88×10^4 células cada una. La suspensión celular se centrifugó y se resuspendió en 1 mililitro de cada uno de los medios que se presentan a continuación y se transfirió a crioviales (Nalgene).

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

Las células se enfriaron a aproximadamente 1°C/minuto durante la noche en un congelador de -80°C utilizando un recipiente de congelación "Mr Frosty" según las instrucciones del fabricante (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de células se transfirieron a nitrógeno líquido durante 2 días antes de descongelarse rápidamente en un baño de agua a 37°C. Las células se añadieron a 10 mililitros de Medio de crecimiento y se centrifugaron antes de estimar el número de células y la viabilidad como se ha indicado anteriormente. Las células se sembraron en matraces recubiertos con gelatina a 5.000 células/cm² para determinar si las células se fijaban y proliferaban.

Resultados

Se evaluó, mediante tinción con azul de tripano, que la viabilidad inicial de las células a crioconservar era del 100%.

Hubo una reducción proporcional del número de células con viabilidad para C6295 debida a la lisis celular. Las células viables crioconservadas en las cuatro soluciones se fijaron, se dividieron y produjeron una monocapa confluyente en el plazo de 3 días. No hubo diferencia apreciable en la velocidad de crecimiento estimada.

Resumen. La crioconservación de células es un procedimiento disponible para la preparación de un banco de células o un producto celular. Se compararon cuatro mezclas de crioconservación en cuanto a su capacidad para proteger a las células humanas derivadas de la placenta del daño por congelación. El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y dimetilsulfóxido al 10% (v/v) (DMSO) es el medio preferente entre los comparados para la crioconservación de las células derivadas de la placenta.

EJEMPLO 5

Características de crecimiento de las células derivadas posparto

Se comparó el potencial de proliferación celular de las células derivadas posparto con otras poblaciones de células madre aisladas. La técnica de la proliferación celular hasta la senescencia se conoce como límite de Hayflick (Hayflick L. The longevity of cultured human cells. J. Am. Geriatr. Soc. 22(1):1-12, 1974; Hayflick L. The strategy of senescence. Gerontologist 14(1):37-45, 1974). Las células derivadas posparto son muy adecuadas para el uso terapéutico ya que pueden hacerse proliferar fácilmente hasta obtener cantidades suficientes de células.

Materiales y método

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

Comparación del potencial de proliferación de las células derivadas posparto con otras poblaciones celulares. Para comparar el potencial de proliferación del crecimiento, se utilizaron las siguientes poblaciones celulares: i) Células madre mesenquimales (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) Células derivadas de tejido adiposo (patente de Estados Unidos N° 6.555.374 B1; solicitud de patente de Estados Unidos con N° de publicación US2004/0058412); iii) Fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); iv) Células derivadas de cordón umbilical; y v) Células derivadas de la placenta. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), con suero bovino definido al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote n° AND18475), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). Para pases posteriores, los cultivos celulares se trataron de la siguiente manera. Después de la tripsinización, se realizó el recuento de las células viables después de la tinción con azul de tripano. La suspensión celular (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). Se estimó el número de células viables mediante un hemocitómetro.

Tras el recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en 25 mililitros de Medio de crecimiento recién preparado. Las células se cultivaron en atmósfera normal con dióxido de carbono al 5% a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia, se sometieron a pases; este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron la senescencia.

En cada pase, las células se tripsinizaron y se realizó su recuento. Se calcularon el rendimiento de células viables, la duplicación de la población [$\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población). Con el fin de determinar la proliferación celular óptima, se determinó el rendimiento celular total por pase multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de proliferación para cada pase (es decir, factor de proliferación = células finales/células iniciales).

Potencial de proliferación de los bancos de células a baja densidad. Se ensayó también el potencial de proliferación de las células guardadas en el banco en el pase 10. Se utilizó un conjunto de condiciones diferente. Se ensayaron fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas de cordón umbilical y células derivadas de la placenta. Estas poblaciones celulares habían sido guardadas en el banco en el pase 10 previamente, habiéndose sembrado a 5.000 células/cm² y dejado crecer hasta la confluencia en cada pase hasta ese momento. Se determinó el efecto de la densidad celular sobre las poblaciones celulares tras la descongelación de las células en el pase 10. Las células se descongelaron en condiciones normales y se realizó el recuento utilizando tinción con azul de tripano. A continuación, las células descongeladas se sembraron a 1.000 células/cm² en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero

bovino definido al 15 por ciento (v/v) (Hyclone, Logan, UT; lote n° AND18475), 2-mercaptoetanol al 0,001 por ciento (Sigma, St. Louis, MO), antibiótico/antimicótico (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA)). Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas normales a 37°C. El Medio de crecimiento se cambió dos veces por semana y las células se sometieron a pases a medida que alcanzaban aproximadamente el 85% de confluencia. Las células se sometieron a pases posteriormente hasta la senescencia, es decir, hasta que no pudieron hacerse proliferar más. Las células se tripsinizaron y se realizó su recuento en cada pase. Se calcularon el rendimiento celular, la duplicación de la población ($\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población). El rendimiento celular total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de proliferación para cada pase (es decir, factor de proliferación = células finales/células iniciales).

Proliferación de células derivadas posparto a baja densidad a partir de una siembra inicial de células. En otro experimento se ensayó el potencial de proliferación de cultivos de células derivadas posparto recién aisladas en condiciones de siembra a baja concentración celular. Se aislaron células derivadas de cordón umbilical y derivadas de la placenta tal como se describe en el presente documento. Las células se sembraron a 1.000 células/cm² y se sometieron a pases como se ha descrito anteriormente hasta la senescencia. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas normales a 37°C. El Medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se sometieron a pases a medida que alcanzaban aproximadamente el 85% de confluencia. En cada pase, las células se tripsinizaban y se realizaba su recuento mediante tinción con azul de tripano. Se calcularon el rendimiento celular, la duplicación de la población ($\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población) para cada pase. El rendimiento celular total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de proliferación para cada pase (es decir, factor de proliferación = células finales/células iniciales). Las células se cultivaron en matraces recubiertos y no recubiertos con gelatina.

Proliferación de células derivadas de la placenta de origen neonatal o materno clonales. Puede utilizarse la clonación con el fin de hacer proliferar con éxito una población de células neonatales o maternas a partir de tejido placentario. Tras el aislamiento de tres poblaciones diferentes de células a partir de la placenta (aspecto neonatal, aspecto materno y zona de las vellosidades), estas poblaciones celulares se hicieron proliferar en condiciones normales de crecimiento y, a continuación, se determinó el cariotipo para revelar la identidad de las poblaciones celulares aisladas. Al aislar las células a partir de una madre que da a luz a un niño, es posible distinguir los cromosomas masculinos de los femeninos realizando extensiones de cromosomas en metafase. Estos experimentos pueden utilizarse para demostrar que las células de la línea superior tienen cariotipo positivo para el fenotipo neonatal, las células de la línea media tienen cariotipo positivo para los fenotipos neonatal y materno, y las células de la línea inferior tienen cariotipo positivo para las células maternas.

Proliferación de las células en condiciones de cultivo con baja concentración de oxígeno. Se ha demostrado que las condiciones de cultivo celular con baja concentración de O₂ pueden mejorar la proliferación celular en determinadas circunstancias (Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J.; McKay, Ron; Studer, Lorenz. Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. US20040005704). Con el fin de determinar si la proliferación celular de las células derivadas posparto podría mejorarse modificando las condiciones de cultivo celular, se hicieron crecer cultivos de células derivadas de cordón umbilical en condiciones de baja concentración de oxígeno. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en Medio de crecimiento en matraces recubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente en condiciones atmosféricas normales hasta el pase 5, momento en el que se transfirieron a condiciones de cultivo con baja concentración de oxígeno (O₂ al 5%).

Evaluación de otras condiciones de crecimiento. En otros experimentos, las células derivadas posparto se hicieron proliferar en placas no recubiertas, recubiertas con colágeno, recubiertas con fibronectina, recubiertas con laminina, y recubiertas con proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA)). Se ha demostrado que los cultivos proliferan bien en estas diferentes matrices.

Resultados

Comparación del potencial de proliferación de las células derivadas posparto vs. otras poblaciones de células madre y células no madre. Las células derivadas de cordón umbilical y derivadas de la placenta proliferaron durante más de 40 pases generando rendimientos celulares de > 1E17 células en 60 días. Por el contrario, las MSC y los fibroblastos experimentaron senescencia después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas de tejido adiposo como las omentales proliferaron durante casi 60 días, generaron rendimientos celulares totales de 4.5E12 y 4.24E13 respectivamente. Por lo tanto, cuando se sembraron a 5.000 células/cm² en las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas posparto proliferaron mucho mejor que los demás tipos celulares cultivados en las mismas condiciones (Tabla 5-1).

Potencial de proliferación de los bancos de células a baja densidad. Las células derivadas de cordón umbilical, derivadas de la placenta y los fibroblastos proliferaron durante más de 10 pases generando rendimientos celulares de > 1E11 células en 60 días (Tabla 5-2). Al cabo de 60 días en estas condiciones, los fibroblastos se

hicieron senescentes, mientras que las poblaciones de células derivadas de cordón umbilical y derivadas de la placenta experimentaron senescencia al cabo de 80 días, completando > 50 y > 40 duplicaciones de la población, respectivamente.

Proliferación de las células derivadas posparto a baja densidad a partir de una siembra de células inicial. Se sembraron células derivadas posparto a baja densidad (1.000 células/cm²) en matraces o placas recubiertas con gelatina y no recubiertas. El potencial de crecimiento de estas células en estas condiciones fue bueno. Las células proliferaron rápidamente en una fase de crecimiento logarítmico. La velocidad de proliferación celular fue similar a la observada cuando las células derivadas posparto se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces recubiertos con gelatina en Medio de crecimiento. No se observaron diferencias en el potencial de proliferación celular entre el cultivo en matraces no recubiertos o en matraces recubiertos con gelatina. Sin embargo, las células parecían fenotípicamente mucho más pequeñas en los matraces recubiertos con gelatina, y se observaron más fenotipos de células más grandes en los matraces no recubiertos.

Proliferación de células derivadas de la placenta de origen neonatal o materno clonales. Puede hacerse proliferar una población de células neonatales o maternas clonales a partir de células derivadas de la placenta aisladas del aspecto neonatal o del aspecto materno, respectivamente, de la placenta. Las células se someten a dilución en serie y, a continuación, se siembran en placas recubiertas con gelatina en Medio de crecimiento para la proliferación a 1 célula/pocillo en placas recubiertas con gelatina de 96 pocillos. A partir de esta clonación inicial, se identifican los clones proliferativos, se tripsinizan y se vuelven a sembrar en placas recubiertas con gelatina de 12 pocillos en Medio de crecimiento y posteriormente se someten a pases en matraces recubiertos con gelatina T25 a 5.000 células/cm² en Medio de crecimiento. Se realiza la subclonación para asegurar que se ha identificado una población clonal de células. Para los experimentos de subclonación, las células se tripsinizan y se vuelven a sembrar a 0,5 células/pocillo. Los subclones que crecen bien se hacen proliferar en matraces T25 recubiertos con gelatina a 5.000 células/cm²/matraz. Las células se someten a pases a 5.000 células/cm² / matraz T75. Pueden representarse gráficamente las características de crecimiento de un clon para demostrar la proliferación celular. Un análisis del cariotipo puede confirmar que el clon sea neonatal o materno.

Proliferación de las células en condiciones de cultivo con baja concentración de oxígeno. Las células derivadas posparto proliferaron bien en las condiciones de baja concentración de oxígeno. El cultivo en condiciones de baja concentración de oxígeno no parece tener un efecto significativo sobre la proliferación celular para las células derivadas posparto. Ya se ha demostrado la eficacia de las condiciones atmosféricas normales para cultivar un número suficiente de células, y no es necesario el cultivo con baja concentración de oxígeno para el crecimiento de las células derivadas posparto.

Resumen. Tiene que ser posible producir productos de células comercialmente viables en cantidades suficientes para proporcionar tratamiento terapéutico a los pacientes que lo necesiten. Pueden hacerse proliferar en cultivo células derivadas posparto para tales fines. Se hicieron comparaciones del crecimiento de las células derivadas posparto en cultivo con el de otras poblaciones celulares, incluidas las células madre mesenquimales. Los datos demostraron que las líneas celulares derivadas posparto tal como se han desarrollado en el presente documento pueden hacerse proliferar durante más de 40 duplicaciones para proporcionar un número suficiente de células, por ejemplo, para bancos para estudios preclínicos. Además, estas poblaciones de células derivadas posparto pueden hacerse proliferar bien a baja o alta densidad. Este estudio ha demostrado que las células madre mesenquimales, por el contrario, no pueden hacerse proliferar para obtener grandes cantidades de células.

Las condiciones de proliferación celular actuales de células derivadas posparto aisladas en crecimiento a densidades de aproximadamente 5.000 células/cm² en Medio de crecimiento en matraces recubiertos con gelatina o no recubiertos, en condiciones normales de oxígeno atmosférico, son suficientes para generar grandes números de células en el pase 11. Además, los datos sugieren que las células pueden hacerse proliferar fácilmente utilizando condiciones de cultivo a menor densidad (por ejemplo, 1.000 células/cm²). La proliferación de células derivadas posparto en condiciones de baja concentración de oxígeno también facilita la proliferación celular, aunque aún no se ha observado una mejora incremental en el potencial de proliferación celular cuando se utilizan estas condiciones para el crecimiento. Actualmente, el cultivo de células derivadas posparto en condiciones atmosféricas normales resulta preferente para generar grandes reservas de células. Sin embargo, cuando se modifican las condiciones de cultivo, puede modificarse asimismo la proliferación de las células derivadas posparto. Puede utilizarse esta estrategia para potenciar la capacidad de proliferación y de diferenciación de estas poblaciones celulares.

En las condiciones utilizadas, aunque el potencial de proliferación de las MSC y las células derivadas de tejido adiposo es limitado, las células derivadas posparto proliferan fácilmente hasta un gran número.

Referencias

- 1) Hayflick L. The longevity of cultured human cells. J Am Geriatr Soc. Enero de 1974; 22(1):1-12.
- 2) Hayflick L. The strategy of senescence. Gerontologist. Febrero de 1974; 14(1):37-45.
- 3) Patente US20040058412
- 4) Patente US20040048372

6) Csete, Marie; (Ann Arbor, MI); Doyle, John; (South Pasadena, CA); Wold, Barbara J.; (San Marino, CA); McKay, Ron; (Bethesda, MD); Studer, Lorenz; (New York, NY). Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. US20040005704.

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

Tipo celular	Senescencia	Duplicaciones totales de la población	Rendimiento celular total
MSC	24 días	8	4.72 E7
Células derivadas de tejido adiposo (Artecel, patente de EE.UU. nº 6.555.374)	57 días	24	4.5 E12
Fibroblastos	53 días	26	2.82 E13
Células derivadas de cordón umbilical	65 días	42	6.15 E17
Células derivadas de placenta	80 días	46	2.49 E19

Tabla 5-2: Características de crecimiento para diferentes poblaciones celulares utilizando proliferación del crecimiento a baja densidad desde el pase 10

Tipo celular	Senescencia	Duplicaciones totales de la población	Rendimiento celular total
Fibroblastos (P10)	80 días	43,68	2.59 E11
Células derivadas de cordón umbilical (P10)	80 días	53,6	1.25 E14
Células derivadas de placenta (P10)	60 días	32,96	6.09 E12

EJEMPLO 6

Análisis del cariotipo de las PPDC

Las líneas celulares utilizadas en terapia celular son preferentemente homogéneas y carecen de cualquier tipo de células contaminantes. Las células humanas utilizadas en terapia celular deben tener una estructura y número de cromosomas (46) normales. Para identificar las líneas celulares de placenta y cordón umbilical derivadas posparto que son homogéneas y carecen de células de origen tisular no posparto, se analizaron los cariotipos de muestras celulares.

Materiales y métodos

Se cultivaron PPDC de tejido posparto de un neonato varón en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (FBS) (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA)). Se seleccionó tejido posparto de un neonato varón (X,Y) para permitir la distinción entre las células de origen neonatal y las células de origen materno (X,X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en Medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se hicieron proliferar hasta aproximadamente el 80% de confluencia. Se llenó hasta el cuello con Medio de crecimiento un matraz T25 que contenía las células. Las muestras se enviaron a un laboratorio de citogenética clínica por mensajería (el tiempo estimado de transporte de laboratorio a laboratorio es de una hora). El análisis cromosómico fue realizado por el Center for Human & Molecular Genetics de la New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase, momento en el que los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células en metafase contadas, se analizaron cinco para determinar un número de cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra de células se caracterizaba como homogénea si se observaban dos cariotipos. Una muestra de células se caracterizaba como heterogénea si se observaban más de dos cariotipos. Se realizó el recuento de las células en metafase adicionales y se analizaron cuando se identificaba un número de cariotipo heterogéneo (cuatro).

Resultados

El personal del laboratorio de citogenética interpretó que todas las muestras celulares enviadas para el análisis cromosómico presentaban una apariencia normal. Tres de las dieciséis líneas celulares analizadas presentaron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) que indicaba la presencia de células derivadas de ambos orígenes neonatal y materno (Tabla 6-1). Se aislaron células derivadas del tejido Placenta-N del aspecto neonatal de la placenta. En el pase cero, esta línea celular parecía XY homogénea. Sin embargo, en el pase nueve, la línea celular era heterogénea (XX/XY), lo que indicaba una presencia anterior no detectada de células de origen materno.

Tabla 6-1. Resultados del cariotipo de las PPDC

Tejido	pase	Células en metafase contadas	Células en metafase analizadas	Número de cariotipos	Cariotipo ISCN
Placenta	22	20	5	2	46, XX
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Placenta	2	20	5	2	46, XX
Umbilical	3	20	5	2	46, XX
Placenta-N	0	20	5	2	46, XY
Placenta-V	0	20	5	2	46, XY
Placenta-M	0	21	5	4	46, XY[18]/ 46, XX[3]
Placenta-M	4	20	5	2	46, XX
Placenta-N	9	25	5	4	46, XY[5]/ 46, XX[20]
Placenta-N C1	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C3	1	20	6	4	46, XY[2]/ 46, XX[18]
Placenta-N C4	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C15	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C20	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C22	1	20	5	2	46, XY

Leyenda: N- lado neonatal; V- zona de las vellosidades; M- lado materno; C- clon

Resumen. El análisis cromosómico identificó PPDC derivadas de placenta y de cordón umbilical cuyos cariotipos parecían normales según la interpretación de un laboratorio de citogenética clínica. El análisis del cariotipo también identificó líneas celulares sin células maternas, determinado por un cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 7

Evaluación de marcadores de superficie de células derivadas posparto humanas mediante citometría de flujo

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

Materiales y métodos

Medios. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco Carlsbad, CA), con suero bovino fetal al 15% (v/v) (FBS); (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO) y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA).

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

Tinción con anticuerpos. Las células adherentes en los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Según las especificaciones del fabricante, se añadió a cien microlitros de suspensión celular anticuerpo contra el marcador de superficie celular de interés (Tabla 7-1) y la mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo.

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

Anticuerpos contra marcadores de superficie celular. Se utilizaron los siguientes anticuerpos contra marcadores de superficie celular.

Tabla 7-1. Anticuerpos contra marcadores de superficie celular

Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555394
CD31	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555446
CD34	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555821
CD44	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555478
CD45RA	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555489
CD73	BD Pharmingen (San Diego, CA)	550257
CD90	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555596
CD117	BD Biosciences (San Jose, CA)	340529
CD141	BD Pharmingen (San Diego, CA)	559781
PDGFr-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

Comparación de células derivadas de la placenta y de cordón umbilical. Las células derivadas de la placenta se compararon con las células derivadas de cordón umbilical en el pase 8.

Comparación entre pases. Las células de la placenta y del cordón umbilical se analizaron en los pases 8, 15 y 20.

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

Comparación del recubrimiento de superficie. Las células derivadas de la placenta cultivadas en matraces recubiertos con gelatina se compararon con las células derivadas de la placenta cultivadas en matraces no recubiertos. Las células derivadas de cordón umbilical cultivadas en matraces recubiertos con gelatina se compararon con las células derivadas de cordón umbilical cultivadas en matraces no recubiertos.

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

Comparación de la capa placentaria. Se compararon las células aisladas del aspecto materno del tejido placentario con las células aisladas de la zona de las vellosidades del tejido placentario y las células aisladas del aspecto fetal neonatal de la placenta.

Resultados

Se compararon células derivadas de la placenta con células derivadas de cordón umbilical. Las derivadas de la placenta y de cordón umbilical analizadas mediante citometría de flujo demostraron ser positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicado por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al testigo de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por los valores de fluorescencia comparable a la del testigo de IgG. Se consideraron las variaciones en los valores de fluorescencia de las curvas positivas. La media (es decir, CD13) y el rango (es decir, CD90) de las curvas positivas presentaron cierta variación, pero las curvas parecían normales, lo que confirma una población homogénea. Ambas curvas presentaron individualmente valores superiores al del testigo de IgG.

Comparación entre pases de células derivadas de la placenta. Todas las células derivadas de la placenta en los pases 8, 15 y 20 analizadas mediante citometría de flujo fueron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como se refleja en el aumento del valor de la fluorescencia con respecto al testigo de IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, con valores de fluorescencia coherentes con el testigo de IgG.

Comparación entre pases de células derivadas de cordón umbilical. Todas las células derivadas de cordón umbilical en el pase 8, 15 y 20 analizadas mediante citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicado por el aumento de fluorescencia con respecto al testigo de IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por unos valores de fluorescencia coherentes con el testigo de IgG.

Comparación entre donantes de células derivadas de la placenta. Cada una de las células derivadas de la placenta aisladas de distintos donantes analizadas mediante citometría de flujo expresó CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, con valores de fluorescencia aumentados con respecto al testigo de IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indica el valor de fluorescencia coherente con el testigo de IgG.

Comparación entre donantes de células derivadas de cordón umbilical. Cada una de las células derivadas de cordón umbilical aisladas de distintos donantes analizadas mediante citometría de flujo dio positivo para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al testigo de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ con valores de fluorescencia coherentes con el testigo de IgG.

El efecto del recubrimiento de superficie con gelatina en las células derivadas de la placenta. Todas las células derivadas de la placenta que se hicieron proliferar en matraces recubiertos con gelatina o no recubiertos analizadas mediante citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al testigo de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ indicado por unos valores de fluorescencia coherentes con el testigo de IgG.

El efecto del recubrimiento de superficie con gelatina en las células derivadas de cordón umbilical. Todas las células derivadas de cordón umbilical que se hicieron proliferar en matraces con gelatina y no recubiertos analizadas mediante citometría de flujo fueron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, con aumento de los valores de fluorescencia con respecto al testigo de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, con valores de fluorescencia coherentes con el testigo de IgG.

Evaluación del efecto del procedimiento de digestión enzimática utilizado para la preparación y el aislamiento de las células sobre el perfil del marcador de superficie celular. Todas las células derivadas de la placenta aisladas utilizando diversas enzimas de digestión analizadas mediante citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como indica el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al testigo de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indican los valores de fluorescencia coherentes con el testigo de IgG.

Comparación de capa de la placenta. Las células derivadas de las capas materna, de las vellosidades y neonatal de la placenta, respectivamente, analizadas mediante citometría de flujo dieron positivo para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como indica el aumento del valor de la fluorescencia con respecto al testigo de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indican los valores de fluorescencia coherentes con el testigo de IgG.

Resumen. El análisis de las células derivadas posparto de la placenta y de cordón umbilical mediante citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Las células derivadas posparto de la placenta y de cordón umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-A,B,C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ. Esta identidad era coherente entre las variaciones en las variables, incluidos el donante, el pase, el recubrimiento de superficie del recipiente de cultivo, las enzimas de digestión y la capa de la placenta. Se observó cierta variación en las medias y los rangos de la curva del histograma del valor de fluorescencia individuales, pero todas las curvas positivas en todas las condiciones ensayadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia superiores a los del testigo de IgG, lo que confirma que las células comprenden una población homogénea que tiene expresión positiva de los marcadores.

EJEMPLO 8

Análisis de células derivadas de tejido posparto mediante matrices GENECHIP® de Affymetrix

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

Materiales y métodos

Aislamiento y cultivo celular

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

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

Células madre mesenquimales humanas (hMSC). Se adquirieron hMSC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron según las especificaciones del fabricante en medios MSCGM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico de cultivo tisular convencional a 37°C con CO₂ al 5%.

Células de médula ósea de cresta ilíaca (ICBM) humanas. Se recibieron células de médula ósea de cresta ilíaca humanas del NDRI con el consentimiento del paciente. La médula ósea se procesó según el método esbozado por Ho, *et al.* (WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (NH₄Cl 155 micromolar, KHCO₃ 10 micromolar y EDTA 0,1 micromolar, pH 7,2) en una relación de 1 parte de médula ósea y 20 partes de tampón de lisis. La suspensión celular se agitó en vórtex, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en Medio Esencial Mínimo alfa (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) y glutamina 4 micromolar. Las células se centrifugaron de nuevo y el sedimento celular se resuspendió en medio recién preparado. Se realizó el recuento de las células mononucleares viables mediante exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico de cultivo tisular a 5×10^4 células/cm². Las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%, a una concentración normal de O₂ atmosférico o de O₂ al 5%. Las células se cultivaron durante 5 días sin cambio de medios. Los medios y las células no adherentes se eliminaron al cabo de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

Aislamiento de ARNm y análisis Gene Chip. Se eliminaron de los matraces los cultivos de células en crecimiento activo con un raspador de células en solución salina tamponada con fosfato fría (PBS). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS recién preparado y se centrifugaron de nuevo. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. Se extrajo el ARNm celular y se transcribió a ADNc. A continuación, el ADNc se transcribió a ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con una matriz de oligonucleótidos HG-U133A GENECHIP (Affymetrix, Santa Clara CA). La hibridación y la recogida de datos se realizaron según las especificaciones del fabricante. Los análisis se realizaron mediante el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Universidad de Stanford; Tusher, V.G. *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 5116-5121).

Resultados

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

Tabla 8-1. Células analizadas mediante el estudio de micromatrices. Las líneas celulares se enumeran por sus códigos de identificación junto con el pase en el momento del análisis, el sustrato de crecimiento celular y los medios de crecimiento.

Población celular	Pase	Sustrato	Medios
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, BME
ICBM (070203) (O ₂ al 5%)	3	Plástico	MEM FBS al 10%
ICBM (062703) (O ₂ normal)	5	Plástico	MEM FBS al 10%
ICBM (062703) (O ₂ al 5%)	5	Plástico	MEM FBS al 10%
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
Fibroblasto h. (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%
Fibroblasto h. (ATCC CRL-1501)	4	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%

Los datos se evaluaron mediante un Análisis de Componentes Principales, que analizó los 290 genes que se expresaron de manera diferenciada en las células. Este análisis permite una comparación relativa de las similitudes entre las poblaciones. La **Tabla 8-2** muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclidianas se basaron en la comparación de las células en base a los 290 genes que se expresaron de manera diferenciada entre los tipos celulares. La distancia euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

Tabla 8-2. Las distancias euclidianas para los pares de células. La distancia euclidiana se calculó para los tipos celulares utilizando los 290 genes que se expresaron de manera diferenciada entre los tipos celulares. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclidiana.

Par de células	Distancia euclidiana
ICBM-hMSC	24,71
Placenta-umbilical	25,52
ICBM-fibroblasto	36,44
ICBM-placenta	37,09
Fibroblasto-MSC	39,63
ICBM-umbilical	40,15
Fibroblasto-umbilical	41,59
MSC-placenta	42,84
MSC-umbilical	46,86
ICBM-placenta	48,41

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

Tabla 8-3. Genes que demostraron tener una expresión específicamente aumentada en las células derivadas de la placenta en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en las células derivadas de la placenta		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI
209732_at	Lectina de tipo C (dependiente de calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro 2 de la superfamilia (inducida por activación)	AF070642
206067_s_at	tumor de Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2	AB015228
206367_at	renina	NM_000537
210004_at	receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina)	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parcial	AF070642
202178_at	proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	regulada por disminución en el cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 8-4. Genes que demostraron tener una expresión específicamente aumentada en las células derivadas de cordón umbilical en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en las células derivadas de cordón umbilical		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI
202859_x_at	interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	interleucina 8	AF043337
210222_s_at	reticulón 1	BC000314
204470_at	ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma)	NM_001511
206336_at	ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos)	NM_002993
207850_at	ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	NM_002090
203485_at	reticulón 1	NM_021136
202644_s_at	factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa	NM_006290

Tabla 8-5. Genes que demostraron tener una expresión disminuida en las células derivadas de cordón umbilical y de la placenta, en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes disminuidos en las células derivadas de cordón umbilical y de la placenta		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI
210135_s_at	caja homeótica 2 de la baja estatura	AF022654.1
205824_at	proteína 2 de choque térmico de 27kDa	NM_001541.1
209687_at	ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma)	U19495.1
203666_at	ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células del estroma)	NM_000609.1
212670_at	elastina (estenosis aórtica supravalvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	caja homeótica 2 de mesénquima (caja homeótica específica de la detención del crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	homólogo 1 de caja homeótica de "sine oculis" (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador de morfogénesis 2 asociado a "dishevelled"	BF513244
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143.1

	209763_at	similar a neuralin 1	AL049176
	205200_at	tetranectina (proteína de unión a plasminógeno)	NM_003278.1
5	205743_at	dominio tres de homología con src (SH3) y rico en cisteínas	NM_003149.1
	200921_s_at	gen 1 de translocación de linfocitos B, antiproliferativa	NM_001731.1
	206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
	204198_s_at	factor de transcripción 3 relacionado con el enanismo	AA541630
10	219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
	204773_at	receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
	202465_at	potenciador de procolágeno C-endopeptidasa	NM_002593.2
	203706_s_at	homólogo 7 de "frizzled" (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
15	212736_at	gen hipotético BC008967	BE299456
	214587_at	colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
	201645_at	tenascina C (hexabraquion)	NM_002160.1
	210239_at	proteína de caja homeótica iroquois 5	U90304.1
	203903_s_at	hefaestina	NM_014799.1
20	205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
	203069_at	glicoproteína 2 de vesícula sináptica	NM_014849.1
	213909_at	ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
	206315_at	factor 1 similar al receptor de citocinas	NM_004750.1
25	204401_at	canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
	216331_at	integrina, alfa 7	AK022548.1
	209663_s_at	integrina, alfa 7	AF072132.1
	213125_at	proteína DKFZP586L151	AW007573
30	202133_at	coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
	206511_s_at	homólogo 2 de caja homeótica de "sine oculis" (<i>Drosophila</i>)	NM_016932.1
	213435_at	proteína KIAA1034	AB028957.1
	206115_at	respuesta de crecimiento precoz 3	NM_004430.1
35	213707_s_at	caja homeótica de "distal less" 5	NM_005221.3
	218181_s_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
	209160_at	familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II)	AB018580.1
40	213905_x_at	biglicano	AA845258
	201261_x_at	biglicano	BC002416.1
	202132_at	coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
	214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
45	213791_at	proencefalina	NM_006211.1
	205422_s_at	integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF)	NM_004791.1
	214927_at	clon de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de <i>Homo sapiens</i> EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
50	206070_s_at	EphA3	AF213459.1
	212805_at	proteína KIAA0367	AB002365.1
	219789_at	receptor de péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido atrial natriurético C)	A1628360
	219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
55	213429_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
	204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesícula 5 (miobrevina)	NM_006634.1
	201843_s_at	proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF	NM_004105.2
60	221478_at	similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa	AL132665.1
	201792_at	proteína 1 de unión a AE	NM_001129.2
	204570_at	polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo)	NM_001864.1

201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
202718_at	proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa	NM_000597

5

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

10 **Tabla 8-6.** Genes que demostraron tener una expresión aumentada en los fibroblastos en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en fibroblastos		
15	Fosfatasa 2 de doble especificidad	
	Proteína KIAA0527	
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23224 fis, clon ADSU02206	
	Dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1	
	Anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G)	
20	Inhibina, beta A (activina A, activina AB, polipéptido alfa)	
	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función supuesta)	
	Proteína KIAA1053	
	Proteína 1A asociada a microtúbulos	
25	Proteína con dedos de zinc 41	
	Proteína HSPC019	
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23564 fis, clon LNG10773	
	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)	
	Proteína LIM (similar a enigma de unión a proteína quinasa C de rata)	
30	Inhibidor del potenciador del gen del polipéptido de cadena ligera kappa en linfocitos B, proteína asociada al complejo quinasa	
	Proteína hipotética FLJ22004	
	Secuencia de ARNm humano (clon CTG-A4)	
35	ESTs, Moderadamente similar al factor 2 similar al receptor de citocinas; precursor CRL2 del receptor de citocinas [<i>Homo sapiens</i>]	
	Factor de crecimiento transformante, beta 2	
	Proteína hipotética MGC29643	
	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2	

40

Tabla 8-7. Genes que demostraron tener una expresión aumentada en las células derivadas de ICBM en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en células ICBM	
45	Proteína de repetición de anquirina cardiaca
	ORF de la región MHC de clase I
	Integrina, alfa 10
	Proteína hipotética FLJ22362
50	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
	Proteína 44 inducida por interferón
	SRY (región determinante del sexo del cromosoma Y)-caja 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)
	Proteína asociada a queratina 1-1
55	Tipo hipocalcina 1
	Jagged 1 (síndrome de Alagille)
	Proteoglicano 1, gránulo de secreción

60 **Tabla 8-8.** Genes que demostraron tener una expresión aumentada en las células MSC en comparación con las demás líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en las células MSC	
65	interleucina 26
	maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)

5	subfamilia 4 de receptores nucleares, grupo A, miembro 2
	homólogo de oncogén viral de osteosarcoma murino v-fos FBJ
	proteína hipotética DC42
	subfamilia 4 de receptores nucleares, grupo A, miembro 2
	homólogo B de oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ
	proteína 1 de vía de señalización inducible por WNT1
	secuencia transformante derivada de la línea celular MCF.2
10	canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
	homeoproteína clase paired de cartílago 1
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
	proto-oncogén jun B
15	LLC de linfocitos B/linfoma 6 (proteína con dedos de zinc 51)
	proteína con dedos de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

Resumen. Se realizó un análisis GENECHIP para proporcionar una caracterización molecular de las células derivadas posparto de cordón umbilical y de la 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 celulares de médula ósea de cresta iliaca. Se analizó el ARNm expresado por estas células mediante GENECHIP de Affymetrix que contenía sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

Los resultados demostraron que 290 genes se expresaban de manera diferenciada en estos cinco tipos celulares diferentes. Estos genes incluyen diez genes que están aumentados específicamente en las células derivadas de la placenta y siete genes aumentados específicamente en las células derivadas de cordón umbilical. Se descubrió que cincuenta y cuatro genes tienen niveles de expresión específicamente inferiores en placenta y l cordón umbilical.

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

Referencia

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

EJEMPLO 9

Marcadores celulares en células derivadas posparto

Se evaluaron las similitudes y diferencias en las células derivadas de la placenta humana y el cordón umbilical humano comparando sus perfiles de expresión génica con los de las células derivadas de otras fuentes (mediante una matriz GENECHIP de Affymetrix). Se identificaron seis genes "firma": receptor de LDL oxidada 1, interleucina-8, renina, reticulón, ligando 3 del receptor de quimiocinas (ligando 3 de CXCR3), y proteína 2 quimiotáctica para granulocitos (GCP-2). Estos genes "firma" se expresaron a niveles relativamente altos en las células derivadas posparto.

Los estudios de la presente invención se llevaron a cabo para verificar los datos de micromatrices y para identificar la concordancia/discordancia entre genes y expresión de proteínas, así como para establecer varios ensayos fiables para la detección de identificadores únicos para las células derivadas de cordón umbilical y de la placenta.

Métodos y materiales

Células. Se cultivaron células derivadas de la placenta (tres aislados, incluido un aislado predominantemente neonatal según se identifica mediante análisis del cariotipo), células derivadas de cordón umbilical (cuatro aislados), y fibroblastos dérmicos normales humanos (NHDF; neonatal y adulto), en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), beta-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA) en un matraz T75 recubierto con gelatina. Se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) en medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

Para el experimento de secreción de IL-8, se descongelaron las células del nitrógeno líquido y se sembraron en matraces recubiertos con gelatina a 5.000 células/cm², se cultivaron durante 48 horas en Medio de crecimiento, y, a continuación, se cultivaron durante un período adicional de 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA), y albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (BSA; Sigma, St. Louis, MO)). Después de este tratamiento, se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares. A continuación, se congelaron los sobrenadantes a -80°C para el análisis ELISA.

Cultivo celular para el ensayo ELISA. Se cultivaron en Medio de crecimiento, en matraces T75 recubiertos con gelatina, células posparto derivadas de la placenta y del cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano. Las células se congelaron en el paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se realizó el recuento. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² que contenía 15 mililitros de Medio de crecimiento a 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. Se recogió el medio de privación de suero al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos, y se almacenó a -20°C.

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

Ensayo ELISA. Se analizó la cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero mediante ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se examinaron según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

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

Transcripción inversa. Se realizó la transcripción inversa del ARN mediante 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 que se determinó, mediante micromatriz de ADNc, estaban regulados únicamente en las células derivadas posparto (genes firma – incluidos receptor de LDL oxidada, interleucina-8, renina y reticulón), se investigaron adicionalmente utilizando PCR en tiempo real y convencional.

PCR en tiempo real. Se realizó una PCR en muestras de ADNc utilizando los productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND: receptor de LDL oxidada (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulón (Hs00382515); ligando 3 de CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH se mezclaron con ADNc y TaqMan Universal PCR Master Mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencias "ABI PRISM 7000 Sequence Detection System" con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del termociclador 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 de PCR se analizaron según las especificaciones del fabricante (boletín del usuario nº2 del sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 de Applied Biosystems).

PCR convencional. Se realizó una PCR convencional con un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. La PCR se realizó utilizando 2 microlitros de solución de ADNc, 1 X tampón de reacción TAQ Polymerase (nombre comercial AMPLITAQ GOLD) Universal Mix PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA), y desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. Se optimizó la amplificación para cada conjunto de cebadores: para IL-8, ligando 3 de CXC y reticulón (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para la renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para el receptor de LDL oxidada y GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 33

ciclos). Los cebadores utilizados para la amplificación se enumeran en la Tabla 1. La concentración de cebador en la reacción de PCR final fue 1 micromolar a excepción de GAPDH, que fue 0,5 micromolar. Los cebadores GAPDH fueron los mismos que la PCR en tiempo real, salvo porque no se añadió la sonda TaqMan del fabricante a la reacción de PCR final. Las muestras se procesaron en gel de agarosa al 2% (p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes se capturaron con una película 667 Universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ) utilizando una cámara POLAROID con distancia focal (VWR International, South Plainfield, NJ).

Tabla 9-1: Cebadores utilizados

10	Nombre del cebador	Cebadores	
	Receptor de LDL oxidada	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3'	(SEQ ID NO:1)
		A: 5'-AGAATGGAAAAGTGAATAGG-3'	(SEQ ID NO:2)
	Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3'	(SEQ ID NO:3)
15		A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3'	(SEQ ID NO:4)
	Reticulón	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3'	(SEQ ID NO:5)
		A: 5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3'	(SEQ ID NO:6)
	Interleucina-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3'	(SEQ ID NO:7)
		A: 5'-CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC-3'	(SEQ ID NO:8)
20	Ligando 3 de quimiocina (CXC)	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3'	(SEQ ID NO:9)
		A: 5'-TCCTGTCTAGTTGGTGCTCC-3'	(SEQ ID NO:10)

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

Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA), y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para tener acceso a los antígenos intracelulares. Cuando el epítipo de interés se encontraba en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el Triton X-100 en todas las etapas del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítomos. Además, en los casos en los que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGA-A), se utilizó suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el proceso. A continuación, se aplicaron a los cultivos los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían solución de bloqueo junto con IgG de cabra anti-ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG de cabra anti-conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o IgG de burro anti-cabra - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). A continuación, los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia mediante un filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representaba la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control donde se siguió todo el procedimiento esbozado anteriormente con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario (control no primario). Se capturaron imágenes representativas con una cámara de vídeo digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se tomó utilizando un solo filtro de emisión a la vez. A continuación, se prepararon montajes en capas utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Preparación de células para el análisis FACS. Las células adherentes en los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 /mililitro. Se llevaron alícuotas de cien microlitros a tubos cónicos. Las células teñidas para los antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadió a las alícuotas el anticuerpo según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron

para eliminar el anticuerpo sobrante. Las células que necesitaban un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de FBS al 3%. El anticuerpo secundario se añadió según la especificación del fabricante, y las células se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo secundario sobrante. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: receptor de LDL oxidada 1 (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 kappa de ratón, (P-4685 y M-5284; Sigma), e IgG de burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech).

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

Resultados

Los resultados de la PCR en tiempo real para los genes "firma" seleccionados realizada sobre ADNc de células derivadas de fibroblastos adultos y neonatales, células madre mesenquimales (MSC) y placentas humanas, indican que tanto el receptor de LDL oxidada como la renina se expresaban a un nivel más alto en las células derivadas de la placenta en comparación con otras células. Los datos obtenidos a partir de la PCR en tiempo real se analizaron mediante el método $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. Los niveles de expresión del receptor de LDL oxidada y reticulón fueron mayores en las células derivadas de cordón umbilical en comparación con otras células. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión del ligando 3 de CXC y GCP-2 entre las células derivadas posparto y los controles (datos no mostrados). El ligando 3 de CXC se expresó a niveles muy bajos. GCP-2 se expresó a niveles comparables con los de los fibroblastos adultos y neonatales humanos. Los resultados de la PCR en tiempo real se confirmaron mediante PCR convencional. La secuenciación de los productos de PCR validó adicionalmente estas observaciones. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de ligando 3 de CXC entre las células derivadas posparto y los controles utilizando los cebadores de ligando 3 de CXC de PCR convencional que figuran en la Tabla 9-1.

La expresión de la citocina IL-8 en células derivadas posparto está elevada en las células derivadas posparto cultivadas en Medio de crecimiento y las privadas de suero. Todos los datos de PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y secuenciando los productos de PCR.

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

Tabla 9-2: expresión de la proteína IL-8 medida mediante ELISA

Tipo celular	IL-8
Fibroblastos humanos	ND
Aislado de placenta 1	ND
Aislado de UMBC 1	2058,42±144,67
Aislado de placenta 2	ND
Aislado de UMBC 2	2368,86±22,73
Aislado de placenta 3 (O ₂ a concentración normal)	17,27±8,63
Aislado de placenta 3 (O ₂ a baja concentración sin BME)	264,92±9,88
Resultados del ensayo ELISA para la interleucina-8 (IL-8) realizados en células derivadas de la placenta y de cordón umbilical, así como fibroblastos dérmicos humanos. Los valores presentados aquí son picogramos/millón de células, n=2, eem.	
ND: no detectado	

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

Las células derivadas de la placenta también se ensayaron para la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana se fijaron con paraformaldehído al 4% y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: factor von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, alfa actina de músculo liso y vimentina. Las células presentaron tinción positiva para alfa actina de músculo liso y para vimentina. Este patrón se conservó hasta el pase 11. Sólo unas pocas células (< 5%) en el pase 0 presentaron tinción positiva para la citoqueratina 18.

Se sondaron células derivadas de cordón umbilical humano en el pase 0 para la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: factor von Willebrand,

CD34, citoqueratina 18, desmina, alfa actina de músculo liso y vimentina. Las células derivadas de cordón umbilical fueron positivas para alfa actina de músculo liso y vimentina, siendo el patrón de tinción coherente hasta el pase 11.

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

Se investigó mediante inmunocitoquímica la producción de GROalfa, GCP-2, receptor de LDL oxidada 1 y reticulón (NOGO-A) en las células derivadas de cordón umbilical en el pase 11. Las células derivadas de cordón umbilical fueron positivas para GCP-2, pero no se detectó producción de GRO alfa mediante este método. Además, las células fueron positivas para NOGO-A.

Resumen. Se estableció la concordancia entre los niveles de expresión génica medidos mediante micromatrices y PCR (tanto en tiempo real como convencional) para cuatro genes: receptor de LDL oxidada 1, renina, reticulón e IL-8. La expresión de estos genes estaba regulada de manera diferenciada a nivel del ARNm en las células derivadas posparto, estando regulada la IL-8 también de manera diferenciada a nivel de proteínas. No se detectó la presencia de receptor de LDL oxidada a nivel de proteínas mediante análisis FACS en las células derivadas de la placenta. No se confirmó la expresión diferencial de GCP-2 y ligando 3 de CXC a nivel de ARNm; sin embargo, se detectó GCP-2 a nivel de proteínas mediante análisis FACS en las células derivadas de la placenta. Aunque este resultado no respalda los datos originalmente obtenidos a partir del experimento de micromatrices, esto puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células derivadas de la placenta humana presentaron tinción positiva para alfa actina de músculo liso y vimentina. Este patrón también se observó en las células en el pase 11. Estos resultados sugieren que la expresión de vimentina y alfa actina de músculo liso puede conservarse en las células durante los pases, al menos en el Medio de crecimiento utilizado en el presente documento.

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

En conclusión, los datos de ARNm completo verifican, al menos parcialmente, los datos obtenidos a partir de los experimentos de micromatrices.

EJEMPLO 10

Caracterización inmunohistoquímica del fenotipo PPDC

Se analizaron mediante inmunohistoquímica los fenotipos de las células que se encuentran en los tejidos posparto humanos, a saber, el cordón umbilical y la placenta.

Materiales y métodos

Preparación de tejidos. Se recolectaron tejido de cordón umbilical y placentario humanos, y se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v) durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (véase la **Tabla 10-1**): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, generada contra conejo; Sigma; o 1:300, generada contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (CD34 humana clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores: anti-GROalfa humana - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-receptor de LDL oxidada 1 humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y anti-NOGO-A humana (1:100; Santa Cruz Biotech). Las muestras fijadas se recortaron con un bisturí y se colocaron dentro del compuesto de inclusión OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. A continuación, se cortaron los bloques congelados (10 micrómetros de espesor) con un criostato convencional (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para la tinción.

Tabla 10-1: Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Vimentina	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Desmina (rb)	1:150	Sigma
Desmina (m)	1:300	Chemicon, Temecula, CA
Alfa actina de músculo liso (SMA)	1:400	Sigma
Citoqueratina 18 (CK18)	1:400	Sigma
Factor de von Willebrand (vWF)	1:200	Sigma
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

Inmunohistoquímica. Se realizó la inmunohistoquímica de manera similar a los estudios anteriores (por ejemplo, Messina, *et al.* (2003) *Exper. Neurol.* 184:816-829). Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para tener acceso a los antígenos intracelulares. En los casos en los que el epítipo de interés se encontraba en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el tritón en todas las etapas del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítipos. Además, en los casos en los que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el procedimiento. A continuación, se aplicaron a los cortes los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario, y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían solución de bloqueo junto con IgG de cabra anti-ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG de cabra anti-conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o IgG de burro anti-cabra - FITC (1:150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia con el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva estaba representada por la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Se capturaron imágenes representativas con una cámara de vídeo digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se tomó utilizando un solo filtro de emisión a la vez. A continuación, se prepararon montajes en capas utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

Caracterización de cordón umbilical. Se expresaron los marcadores vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 en un subconjunto de las células que se encuentran dentro del cordón umbilical (datos no mostrados). En particular, la expresión de vWF y CD34 estaba restringida a los vasos sanguíneos contenidos en el cordón. Las células CD34+ se encontraban en la capa más interna (lado del lumen). Se encontró expresión de vimentina por toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón umbilical. La SMA estaba limitada a la matriz y las paredes exteriores de la arteria y la vena, pero no estaba contenida en los propios vasos. Se observaron CK18 y desmina dentro de los vasos solamente, estando la desmina restringida a las capas media y exterior.

Caracterización de placenta. Se observaron vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 dentro de la placenta y eran específicas de la zona.

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

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

EJEMPLO 11:

Inmunología in vitro de células derivadas posparto

Se evaluaron líneas celulares derivadas posparto *in vitro* en cuanto a sus características inmunitarias en un esfuerzo por predecir la respuesta inmunitaria, de haberla, que estas células podrían inducir tras el trasplante *in vivo*. Se analizaron líneas celulares derivadas posparto mediante citometría de flujo para la expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas son expresadas por las células presentadoras de antígeno (APC) y son necesarias para la estimulación directa de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171). También se analizaron líneas celulares mediante citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171), CD178 (Coumans, *et al.*, (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196), y PD-L2 (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003). Saunders, Philadelphia, p 171; Brown, *et al.* (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266). Se cree que la expresión de estas proteínas por parte de las células que se encuentran en los tejidos de la placenta interviene en el estado inmunoprivilegiado de los tejidos de la placenta *in utero*. Para predecir el grado en que las líneas celulares derivadas de la placenta y del cordón umbilical posparto inducen una respuesta inmunitaria *in vivo*, las líneas celulares se ensayaron en una reacción linfocitaria mixta (MLR) unidireccional.

Materiales y métodos

Cultivo celular. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (FBS); (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA)) hasta la confluencia en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con gelatina al 2% (Sigma, St. Louis, MO).

Tinción con anticuerpos. Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se añadió anticuerpo (**Tabla 11-1**) a cien microlitros de suspensión celular según las especificaciones del fabricante y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en quinientos microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 11-1. 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, Reino Unido)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846

IgG2a de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG1kappa de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

Reacción linfocitaria mixta. Se enviaron en hielo seco al CTBR (Senneville, Quebec), viales crioconservados de PPDC derivadas de cordón umbilical del pase 10 marcadas como línea celular A y PPDC derivadas de placenta del pase 11 marcadas como línea celular B, para llevar a cabo una reacción linfocitaria mixta utilizando CTBR SOP no. CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios varones y mujeres. Se trataron con mitomicina C, PBMC alogénicas estimuladoras (donante), PBMC autólogas, y líneas celulares derivadas posparto. Se añadieron células estimuladoras autólogas y tratadas con mitomicina C a PBMC respondedoras (receptores) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió a cada muestra [³H]timidina y se cultivaron durante 18 horas. Después de recolectar las células, se extrajo el ADN marcado radiactivamente, y se midió la incorporación de [³H]-timidina con un contador de centelleo.

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

Resultados

Reacción linfocitaria mixta - placenta. Se sometieron a criba siete donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un solo donante alogénico que presentara una fuerte respuesta de proliferación en una reacción linfocitaria mixta con los otros seis donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante

aloténico de control positivo. Los seis donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. El donante aloténico de control positivo y líneas celulares derivadas de la placenta se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción linfocitaria mixta con los seis receptores aloténicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 11-2). El índice medio de estimulación varió entre 1,3 (placa 2) y 3 (placa 1) y los donantes aloténicos de control positivo variaron entre 46,25 (placa 2) y 279 (placa 1) (Tabla 11-3).

Tabla 11-2. Datos de la reacción linfocitaria mixta - Línea celular B (placenta)

DMP para el ensayo de proliferación								
ID de placa: Placa 1								
Número del análisis	Sistema de cultivo	Replicaciones			Media	DE	CV	
		1	2	3				
IM03-7769	Medida inicial de la proliferación del receptor	79	119	138	112,0	30,12	26,9	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	241	272	175	229,3	49,54	21,6	
	Donante aloténico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	23971	22352	20921	22414,7	1525,97	6,8	
	MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	664	559	1090	771,0	281,21	36,5	
SI (donante)					200			
SI (línea celular)					7			
IM03-7770	Medida inicial de la proliferación del receptor	206	134	262	200,7	64,17	32,0	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1091	602	524	739,0	307,33	41,6	
	Donante aloténico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	45005	43729	44071	44268,3	660,49	1,5	
	MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	533	2582	2376	1830,3	1128,24	61,6	
SI (donante)					221			

	SI (línea celular)					9		
5								
	IM03-7771	Medida inicial de la proliferación del receptor	157	87	128	124,0	35,17	28,4
10		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	293	138	508	313,0	185,81	59,4
		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	24497	34348	31388	30077,7	5054,53	16,8
15		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	601	643	a	622,0	29,70	4,8
	SI (donante)					243		
	SI (línea celular)					5		
20								
	IM03-7772	Medida inicial de la proliferación del receptor	56	98	51	68,3	25,81	37,8
25		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	133	120	213	155,3	50,36	32,4
		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	14222	20076	22168	18822,0	4118,75	21,9
30		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a
	SI (donante)					275		
	SI (línea celular)					a		
35								
	IM03-7768 (donante alogénico)	Medida inicial de la proliferación del receptor	84	242	208	178,0	83,16	46,7
40		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	361	617	304	427,3	166,71	39,0
	Línea celular tipo B	Medida inicial de la proliferación del receptor	126	124	143	131,0	10,44	8,0
45		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	822	1075	487	794,7	294,95	37,1
50	ID de placa: Placa 2							
	Número del análisis	Sistema de cultivo	Replicaciones			Media	DE	CV
			1	2	3			
	IM03-7773	Medida inicial de la proliferación del receptor	908	181	330	473,0	384,02	81,2
55		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	269	405	572	415,3	151,76	36,5
		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	29151	28691	28315	28719,0	418,70	1,5
60		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	567	732	905	734,7	169,02	23,0
	SI (donante)					61		
65	SI (línea celular)					2		

5	IM03-7774	Medida inicial de la proliferación del receptor	893	1376	185	818,0	599,03	73,2
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	261	381	568	403,3	154,71	38,4
10		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	53101	42839	48283	48074,3	5134,18	10,7
15		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	515	789	294	532,7	247,97	46,6
	SI (donante)					59		
	SI (línea celular)					1		
20	IM03-7775	Medida inicial de la proliferación del receptor	1272	300	544	705,3	505,69	71,7
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	232	199	484	305,0	155,89	51,1
25		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	23554	10523	28965	21014,0	9479,74	45,1
30		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	768	924	563	751,7	181,05	24,1
	SI (donante)					30		
	SI (línea celular)					1		
35	IM03-7776	Medida inicial de la proliferación del receptor	1530	137	1046	904,3	707,22	78,2
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	420	218	394	344,0	109,89	31,9
40		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	28893	32493	34746	32044,0	2952,22	9,2
45		MLR con línea celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a
	SI (donante)					35		
	SI (línea celular)					a		

Tabla 11-3. Índice medio de estimulación de células de la placenta y un donante alogénico en una reacción linfocitaria mixta con seis receptores alogénicos individuales.

Índice medio de estimulación		
	Receptor	Placenta
Placa 1 (receptores 1-3)	279	3
Placa 2 (receptores 4-6)	46,25	1,3

Reacción linfocitaria mixta - cordón umbilical. Se sometieron a criba seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un solo donante alogénico que presentara una fuerte respuesta de proliferación en una reacción linfocitaria mixta con los otros cinco donantes de sangre. Este donante se seleccionó como el donante alogénico de control positivo. Los cinco donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. El donante alogénico de control positivo y las líneas celulares derivadas de cordón umbilical se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción linfocitaria mixta con los cinco receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 11-4). El

índice medio de estimulación varió entre 6,5 (placa 1) y 9 (placa 2) y los donantes alogénicos de control positivo variaron entre 42,75 (placa 1) y 70 (placa 2) (Tabla 11-5).

Tabla 11-4. Datos de la reacción linfocitaria mixta - Línea Celular A (cordón umbilical)

DMP para el ensayo de proliferación ID de placa: Placa 1								
Número del análisis	Sistema de cultivo	Replicaciones			Media	DE	CV	
		1	2	3				
IM04-2478	Medida inicial de la proliferación del receptor	1074	406	391	623,7	390,07	62,5	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	672	510	1402	861,3	475,19	55,2	
	Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	43777	48391	38231	43466,3	5087,12	11,7	
	MLR con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2914	5622	6109	4881,7	1721,36	35,3	
SI (donante) SI (línea celular)					70 8			
IM04-2479	Medida inicial de la proliferación del receptor	530	508	527	521,7	11,93	2,3	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	701	567	1111	793,0	283,43	35,7	
	Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	25593	24732	22707	24344,0	1481,61	6,1	
	MLR con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	5086	3932	1497	3505,0	1832,21	52,3	
SI (donante) SI (línea celular)					47 7			
IM04-2480	Medida inicial de la proliferación del receptor	1192	854	1330	1125,3	244,90	21,8	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	2963	993	2197	2051,0	993,08	48,4	
	Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	25416	29721	23757	26298,0	3078,27	11,7	
	MLR con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2596	5076	3426	3699,3	1262,39	34,1	

SI (donante) SI (línea celular)						23 3			
IM04-2481	Medida inicial de la proliferación del receptor	695	451	555		567,0	122,44	21,6	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	738	1252	464		818,0	400,04	48,9	
	Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	13177	24885	15444		17835,3	6209,52	34,8	
	MLR 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			
ID de placa: Placa 2									
Número del análisis	Sistema de cultivo		Replicaciones 1 2 3				Media	DE	CV
IM04-2482	Medida inicial de la proliferación del receptor	432	533	274		413,0	130,54	31,6	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1459	633	598		896,7	487,31	54,3	
	Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	24286	30823	31346		28818,3	3933,82	13,7	
	MLR con línea celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2762	1502	6723		3662,3	2724,46	74,4	
SI (donante) SI (línea celular)						70 9			
IM04-2477 (donante alogénico)	Medida inicial de la proliferación del receptor	312	419	349		360,0	54,34	15,1	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	567	604	374		515,0	123,50	24,0	
Línea celular tipo A	Medida inicial de la proliferación del receptor	5101	3735	2973		3936,3	1078,19	27,4	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	1924	4570	2153		2882,3	1466,04	50,9	

Tabla 11-5. Índice medio de estimulación de células derivadas de cordón umbilical y un donante alogénico en una reacción linfocitaria mixta con cinco receptores alogénicos individuales.

Índice medio de estimulación		
	Receptor	Cordón umbilical
Placa 1 (receptores 1-4)	42,75	6,5
Placa 2 (receptor 5)	70	9

Marcadores de células presentadoras de antígenos - Placenta. Los histogramas de las células derivadas de la placenta analizadas mediante citometría de flujo presentan expresión negativa de HLA-DR,DP,DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como indica el valor de fluorescencia coherente con el testigo de IgG, lo que indica que las líneas celulares derivadas de la placenta carecen las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente las PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺).

Marcadores de inmunomodulación - Células derivadas de la placenta. Los histogramas de las células derivadas de la placenta analizadas mediante citometría de flujo presentan expresión positiva de PD-L2, como indica el aumento del valor de fluorescencia con respecto al testigo de IgG, y expresión negativa de CD178 y HLA-G, como indica el valor de fluorescencia coherente con el testigo de IgG (datos no mostrados).

Marcadores de células presentadoras de antígenos - Células derivadas de cordón umbilical. Los histogramas de las células derivadas de cordón umbilical analizadas mediante citometría de flujo presentan expresión negativa de HLA-DR,DP,DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como indica el valor de fluorescencia coherente con el testigo de IgG, lo que indica que las líneas celulares derivadas de cordón umbilical carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente las PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺).

Marcadores de inmunomodulación - Células derivadas de cordón umbilical. Los histogramas de las células derivadas de cordón umbilical analizadas mediante citometría de flujo presentan expresión positiva de PD-L2, como indica el aumento del valor de fluorescencia con respecto al testigo de IgG, y expresión negativa de CD178 y HLA-G, como indica el valor de fluorescencia coherente con el testigo de IgG.

Resumen. En las reacciones linfocitarias mixtas llevadas a cabo con líneas celulares derivadas de la placenta, el índice medio de estimulación variaba entre 1,3 y 3, y el de los controles positivos alogénicas variaba entre 46,25 y 279. En las reacciones linfocitarias mixtas llevadas a cabo con líneas celulares derivadas de cordón umbilical, el índice medio de estimulación variaba entre 6,5 y 9, y el de los controles positivos alogénicas variaba entre 42,75 y 70. Las líneas celulares derivadas de la placenta y de cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas estimuladoras HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, según se mide mediante citometría de flujo. Las líneas celulares derivadas de la placenta y de cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178, y positivas para la expresión de PD-L2, según se mide mediante citometría de flujo. Las PBMC de donantes alogénicos contienen células presentadoras de antígenos que expresan HLA-DP,DR,DQ, CD80, CD86 y B7-H2, permitiendo de este modo la estimulación de las PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ vírgenes). La ausencia de moléculas de superficie celular presentadoras de antígenos en las células derivadas de la placenta y de cordón umbilical necesarias para la estimulación directa de las PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ vírgenes) y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el bajo índice de estimulación presentado por estas células en una MLR en comparación con los controles alogénicos.

Referencias

Bruder SP *et al.* USP 6.355.239 B1 (2002).

Abbas, AK, Lichtman, AH. Cellular and Molecular Immunology, 5ª ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171.

Bouteiller P.Le *et al.*, (2003) Placenta 24; S10-S15.

Coumans B *et al.*, (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196].

Brown, Julia *et al.* (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266.

EJEMPLO 12

Secreción de factores tróficos por las células derivadas posparto

Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de las PPDC derivadas de la placenta y de cordón umbilical. Se seleccionaron factores con actividad angiogénica (es decir, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen *et al.* (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína 1 quimiotáctica para monocitos (MCP-1) (Salcedo *et al.* (2000) Blood 96; 34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li *et al.* (2003). J. Immunol. 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Hughes *et al.* (2004). Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), inhibidor tisular de metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento plaquetario (PDGF-bb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor 1a derivado de células del estroma (SDF-1a)), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)) (Cheng *et al.* (2003) Dev. Biol. 258:319-33), interleucina-6 (IL-6), proteína 2 quimiotáctica para granulocitos (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2)), o actividad quimiocina (proteína inflamatoria de macrófagos 1a (MIP 1a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), quimioatrayente para monocitos 1 (MCP-1), Rantes (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación), 1309, quimiocina regulada por el timo y por activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

Métodos y material

Cultivo celular. Se cultivaron PPDC derivadas de la placenta y de cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)) en matraces T75 recubiertos con gelatina. Las células se criopreservaron en el paso 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de descongelar las células, se añadió Medio de crecimiento a las células, seguido de transferencia a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 4 mililitros de Medio de crecimiento, y se realizó el recuento de las células. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en un matraz T75 que contenía 15 mililitros de Medio de crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio sin suero (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco), albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (Sigma), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco)) durante 8 horas. El medio sin suero acondicionado se recogió al final de la incubación mediante centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -0°C. Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se desprendieron utilizando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad tripsina se inhibió añadiendo 8 mililitros de Medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de Medio de Crecimiento. Se estimó el número de células mediante un hemocitómetro.

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

Ensayo ELISA multiplexado SearchLight. Las quimiocinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, I309, TARC, eotaxina MDC, IL8), BDNF, y los factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF) se midieron mediante matrices de proteinoma SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteinoma son ensayos ELISA de tipo sándwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Las matrices se producen salpicando un patrón de 2 x 2, 3 x 3 ó 4 x 4 de cuatro a 16 anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento ELISA de tipo sándwich, se forma la imagen de toda la placa para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada mancha dentro de cada pocillo de la placa. La cantidad de señal generada en cada mancha es proporcional a la cantidad de proteína diana en la muestra o estándar original.

Resultados

Ensayo ELISA. MCP-1 e IL-6 fueron secretadas por las PPDC derivadas de la placenta y de cordón umbilical y fibroblastos dérmicos (Tabla 12-1). Las células derivadas de cordón umbilical secretaron cantidades de MCP-1 e IL-6 al menos 10 veces mayores que otras poblaciones celulares. GCP-2 e IL-8 fueron altamente expresadas por las PPDC derivadas de cordón umbilical. No pudo detectarse TGF-beta2. Se detectó VEGF en el medio de los fibroblastos.

La cantidad de HGF, FGF y BDNF secretada por las células derivadas de cordón umbilical fueron notablemente superiores a las de los fibroblastos y las células derivadas de la placenta (Tablas 12-2 y 12-3). Asimismo, TIMP1, TPO, HBEGF, MCP-1, TARC e IL-8 fueron mayores en las células derivadas de cordón umbilical que en otras poblaciones celulares (Tabla 12-3). No se detectaron ANG2 ni PDGF-bb.

Tabla 12-1. Resultados del ensayo ELISA

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1a	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
Fibroblasto	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Placenta (042303)	60±3	41±2	ND	ND	ND	ND	ND
Umbilical (022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
Placenta (071003)	125±16	10±1	ND	ND	ND	ND	ND
Umbilical (071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND
Placenta (101503)	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
BME							
Placenta (101503)	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND
O ₂ al 5%, sin BME							

Leyenda: ND: no detectado

Tabla 12-2. Resultados del ensayo ELISA multiplexado SearchLight

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
P1	24299,5	ND	ND	546,6	8,8	16,4	ND	ND	3,81,3	ND
U1	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
P3	14176,8	ND	ND	568,7	5,2	10,2	ND	ND	1,9	33,6

U3	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6
----	---------	----	----	--------	-----	-------	------	----	-----	-------

Leyenda: hFB (fibroblastos humanos), P1 (PPDC derivada de la placenta (042303)), U1 (PPDC derivada de cordón umbilical (022803)), P3 (PPDC derivada de la placenta (071003)), U3 (PPDC derivada de cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

Tabla 12-3. Resultados del ensayo ELISA multiplexado SearchLight

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxina	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
P1	79,5	ND	228,4	4,1	ND	3,8	12,2	ND	413,5
U1	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
P3	ND	ND	102,7	ND	ND	0,4	ND	ND	63,8
U3	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

Leyenda: hFB (fibroblastos humanos), P1 (PPDC derivada de la placenta (042303)), U1 (PPDC derivada de cordón umbilical (022803)), P3 (PPDC derivada de la placenta (071003)), U3 (PPDC derivada de cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

Resumen. Las células derivadas de cordón umbilical secretaron una cantidad significativamente mayor de factores tróficos que las células derivadas de la placenta y los fibroblastos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen papeles importantes en la regeneración neural. En estas condiciones, la expresión de algunos factores se limitó a las células derivadas de cordón umbilical, tales como MIP1b, Rantes, I309 y FGF.

Referencias

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

Rosen EM, Lamszus K, J Laterra, Polverini PJ, Rubin JS, Goldberg ID. (1.997) HGF/SF in angiogenesis. Ciba Found Symp. 212; 215-26.

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

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

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

Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP (2003) Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. Dev Bio1.258; 319-33.

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

EJEMPLO 13:

Ensayo de coagulación de plasma

La terapia celular puede inyectarse sistémicamente para determinadas aplicaciones en las que las células sean capaces de dirigirse al sitio de acción. Es importante que las células inyectadas no provoquen trombosis, que puede ser fatal. El factor tisular, una glicoproteína procoagulante unida a la membrana, es el iniciador de la cascada de coagulación extrínseca, que es la vía de coagulación predominante *in vivo*. El factor tisular también desempeña un papel importante en la formación de los vasos embrionarios, por ejemplo, en la formación de la pared vascular primitiva (Brodsky *et al.* (2002) Exp. Nephrol. 10:299-306). Para determinar el potencial de las PPDC para iniciar la coagulación, se evaluaron PPDC derivadas de cordón umbilical y de la placenta en cuanto a la expresión de factor tisular y su capacidad para iniciar la coagulación plasmática.

Métodos y material

Factor tisular humano. Se reconstituyó el factor tisular humano SIMPLASTIN (Organon Tekailca Corporation, Durham, NC) con 20 mililitros de agua destilada. Se realizaron diluciones en serie de la solución madre (1:2) en ocho tubos. Se descongeló plasma humano normal (George King Biomedical, Overland Park, KS) a 37°C en un baño de agua y, a continuación, se almacenó en hielo antes de su uso. Se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos 100 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 microlitros de Simplastin® diluido (excepto un pocillo testigo), 30 microlitros de cloruro cálcico 0,1 molar, y 100 microlitros de plasma humano normal. La placa se colocó inmediatamente en un lector de microplacas con temperatura controlada y se midió la absorbancia a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

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

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

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

Resultados

El análisis de citometría de flujo puso de manifiesto que las células posparto derivadas de la placenta y de cordón umbilical expresaban factor tisular. Un ensayo de coagulación de plasma demostró que el factor tisular era activo. Las células derivadas de la placenta y de cordón umbilical aumentaban la velocidad de coagulación como indica el tiempo hasta la mitad de la absorbancia máxima ($T_{1/2}$ a máx, **Tabla 13-1**). Se observó coagulación tanto con células tempranas (P5) como tardías (P18). La $T_{1/2}$ a máx es inversamente proporcional al número de células J82. La preincubación de las células umbilicales con CNTO 859, un anticuerpo contra el factor tisular, inhibe la reacción de coagulación, demostrando de ese modo que el factor tisular era responsable de la coagulación.

Tabla 13-1. Se evaluó el efecto del factor tisular humano (SIMPLASTIN), las células derivadas de la placenta (Pla) y las células derivadas de cordón umbilical (Umb) sobre la coagulación de plasma. Como unidad de medida se utilizó el tiempo hasta la mitad de absorbancia máxima ($T_{1/2}$ a máx) en la meseta en segundos.

Dilución de Simplastin®	$T_{1/2}$ a máx (segundos)
1:2	61
1:4	107
1:8	147
1:16	174
1:32	266
1:64	317
1:128	378
0 (control negativo)	1188
Células J-82	
100.000	122
50.000	172
25.000	275
Pla P5	
50.000	757
Umb P5	
50.000	833
Umb P18	
50.000	443

Resumen. Las PPDC derivadas de la placenta y de cordón umbilical expresan factor tisular, que puede inducir la coagulación. La adición de un anticuerpo contra el factor tisular puede inhibir el factor tisular. El factor tisular se encuentra normalmente en las células en una conformación que es inactiva, pero que se activa mediante estrés mecánico o químico (por ejemplo, LPS) (Sakariassen *et al.* (2001) *Thromb. Res.* 104:149-74; Engstad *et al.* (2002) *Int. Immunopharmacol.* 2:1585-1597). Por lo tanto, la minimización del estrés durante el proceso de preparación de las PPDC puede evitar la activación del factor tisular. Además de la actividad trombogénica, el factor tisular se ha asociado con la actividad angiogénica. Por lo tanto, la actividad del factor tisular puede ser beneficiosa cuando las PPDC derivadas de cordón umbilical o de la placenta se trasplantan en tejido, pero debe inhibirse cuando las PPDC se inyectan por vía intravenosa.

Referencias

Doshi y Marmur, *Critical Care Med.*, 30:5241-5250 (2002).
Moll y Ortel, *Ann. Intern. Med.*, 127:177-185 (1997).

EJEMPLO 14

Diferenciación de las PPDC a un fenotipo osteogénico

Las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea pueden diferenciarse a células tipo osteoblasto que mineralizan y expresan fosfatasa alcalina. También se han utilizado marcadores adicionales expresados por los osteoblastos, tales como la osteocalcina y la sialoproteína ósea, para demostrar la diferenciación a una célula tipo osteoblasto. Se realizó una determinación en cuanto a si las células derivadas posparto también pueden diferenciarse a un fenotipo osteogénico mediante cultivo en un medio osteogénico y en presencia de proteínas morfogénicas óseas (BMP) -2 (Rickard *et al.*, 1994) ó -4, y factor de crecimiento transformante beta 1.

Métodos y material

Cultivo celular. Antes del inicio de la osteogénesis, se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) en medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit (MSCGM, Cambrex, Walkerville, MD). Otras células se cultivaron en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), penicilina/estreptomicina (Gibco)), en un matraz T75 recubierto con gelatina y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Se cultivaron osteoblastos (9F1721; Cambrex) en medio de crecimiento para osteoblastos (Cambrex) y se extrajo el ARN como se describe más adelante.

Osteogénesis

Protocolo 1. Se sembraron células derivadas de la placenta, aislado 1, P3, células derivadas de la placenta, aislado 2, P4 (cariotipadas anteriormente y que demostraron ser principalmente células de origen neonatal), células derivadas de cordón umbilical, aislado 1, P4 y MSC en P3, a 5×10^3 células/cm² en placas de 24 pocillos y placas de 6 pocillos en Medio de crecimiento y se incubaron durante la noche. El medio se eliminó y se reemplazó con medio osteogénico (DMEM con bajo contenido de glucosa, suero bovino fetal al 10% (v/v), betaglicerofosfato 10 milimolar (Sigma), dexametasona 100 nanomolar (Sigma, St. Louis, MO), sal de ascorbato fosfato 50 micromolar (Sigma), fungizona (Gibco), penicilina y estreptomycin (Gibco)). El medio osteogénico se complementó con 20 nanogramos/mililitro de hTGF-beta1 (Sigma), 40 nanogramos/mililitro de hrBMP-2 (Sigma) ó 40 nanogramos/mililitro de hrBMP-4 (Sigma). Los cultivos se trataron durante un total de 14, 21 y 28 días, con cambios de medio cada 3-4 días.

Protocolo 2. Las células derivadas posparto se ensayaron para la capacidad de diferenciarse a un fenotipo osteogénico. Se sembraron células derivadas de cordón umbilical (aislado 1, P3 y aislado 2, P4) y células derivadas de la placenta (aislado 1; P4 y aislado 2, P4), a 30.000 células/pocillo en placas recubiertas con gelatina de 6 pocillos en Medio de crecimiento. También se sembraron células madre mesenquimales (MSC) (aislado 1; P3 y aislado 2; P4), fibroblastos (1F1853, P11) y células de médula ósea de cresta ilíaca (070203; P3; WO2003025149), a 30.000 células/pocillo en placas recubiertas con gelatina de 6 pocillos (recubiertas con gelatina) en medio de crecimiento para células madre mesenquimales (MSCGM, Cambrex) y Medio de crecimiento, respectivamente.

Se inició la inducción osteogénica eliminando el medio de siembra inicial (24 h) y sustituyéndolo con medio de inducción osteogénica (DMEM con bajo contenido de glucosa, suero bovino fetal al 10%, betaglicerofosfato 10 milimolar (Sigma), dexametasona 100 nanomolar (Sigma), sal de ascorbato fosfato 50 micromolar (Sigma), penicilina y estreptomycin (Gibco)). En algunos casos, el medio osteogénico se complementó con hrBMP-2 (20 nanogramos/mililitro) (Sigma), con hrBMP-4 (Sigma) o con hrBMP-2 (20 nanogramos/mililitro) y hrBMP-4 (20 nanogramos/mililitro) (Sigma). Los cultivos se trataron durante un total de 28 días, con cambios de medio cada 3-4 días.

Extracción de ARN y transcripción inversa. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) y se almacenaron a -80°C. Los lisados celulares se descongelaron y se extrajo el ARN según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento con 2,7 U/muestra de ADNasa (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. Se sometió al ARN a transcripción inversa utilizando 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.

Reacción en cadena de la polimerasa. Se realizó la PCR en muestras de ADNc mediante los productos de expresión génica Assays-on-Demand™: sialoproteína ósea (Hs00173720), osteocalcina (Hs00609452) GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA), y TaqMan Universal PCR Master Mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencias "ABI PRISM 7000 Sequence Detection System" con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del termociclador 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.

Tinción de von Kossa. Las células se fijaron con formalina tamponada neutra al 10% (v/v) (Richard-Allan, Kalamazoo, MI). Después de la fijación, las células se lavaron en agua desionizada y se incubaron en nitrato de plata al 5% (p/v) (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) durante una hora directamente a la luz del sol. A continuación, se lavaron las células en agua desionizada y se incubaron en tiosulfato sódico al 5% (p/v) (EM Sciences, Gibbstown, NJ) durante cinco minutos. Las células se lavaron en agua destilada y se examinaron con microscopía óptica.

Resultados

Protocolo 1. El ARN extraído de los osteoblastos se utilizó como control positivo para la expresión génica en tiempo real de la osteocalcina y la sialoproteína ósea. Los niveles de expresión de los osteoblastos con respecto a las células derivadas de la placenta cultivadas en Medio de crecimiento de osteocalcina y BSP fueron de 2,5 veces y 8.000 veces, respectivamente. Las MSC cultivadas en el medio osteogénico durante 28 días se mineralizaron y fueron positivas para la tinción de von Kossa. Se observó una amplia mineralización en un aislado de placenta que tenía predominantemente células de origen neonatal. Además, un aislado de placenta presentó inducción de los niveles de expresión de BSP en los medios osteogénicos y bajos niveles de inducción de osteocalcina.

La expresión de osteocalcina y BSP de las MSC estaba significativamente aumentada en el medio osteogénico a los 21 días. La adición de BMP-2 y -4 potenció la expresión de BSP pero no tuvo efecto sobre la expresión de osteocalcina. El TGF-beta1 no aumentó el efecto del medio de osteogénesis. Tanto BMP-4 como TGF-beta1 aumentaron la expresión de osteocalcina producida por un aislado de placenta.

Protocolo 2. Se observó diferenciación osteogénica, como se muestra mediante tinción de von Kossa positiva para la mineralización, con células derivadas de la placenta P4 e ICBM (070203) P3 incubadas con medio osteogénico complementado con BMP2 ó 4, y MSC (092903) P3 incubadas con medio osteogénico complementado con BMP 4 (Tabla 14-1). Ninguna de las demás células se diferenció al fenotipo osteogénico ni se tiñó con von Kossa. Para asegurar que la tinción de von Kossa se relacionaba con la célula y no con la matriz extracelular, se realizó la contratinción de las células con rojo nuclear rápido. Se observaron grandes gotitas de lípidos en algunas MSC, coherentes con un fenotipo de adipocito. Esto sugiere que las MSC no se diferencian específicamente a un fenotipo osteogénico en estas condiciones. Además, la adipogénesis aumentó cuando las MSC se incubaron en medio osteogénico complementado con BMP2 o con BMP4.

Tabla 14-1: Resultados de la diferenciación osteogénica mediante tinción de von Kossa para el Protocolo 2. Se cultivaron células derivadas de cordón umbilical (Umb), células derivadas de la placenta (Pla), células madre mesenquimales (MSC), fibroblastos (Fib) y células de médula ósea de cresta ilíaca (ICBM) en medio osteogénico (OM) solo o complementado con BMP2 o BMP2 y BMP4.

Número	Línea celular	Condiciones	von Kossa	Comentarios
1	Umb 071003 O1P3	Medio osteogénico (OM)	Neg	
2	Umb 071003 O1P3	OM, BMP2	Neg	
3	Umb 071003 O1P3	OM, BMP4	Neg	
4	ICBM 070203 O1P3	Medio osteogénico (OM)	Neg	Normal 02
5	ICBM 070203 O1P3	OM, BMP2	Pos	Normal 03
6	ICBM 070203 O1P3	OM, BMP4	Pos	Normal 04
7	MSC 092903	Medio osteogénico (OM)	Neg	mucha grasa
8	MSC 092903	OM, BMP2	Neg	mucha grasa
9	MSC 092903	OM, BMP4	Pos	mucha grasa
10	Pla 101603 O1P4	Medio osteogénico (OM)	Neg	
11	Pla 101603 O1P4	OM, BMP2	Pos	
12	Pla 101603 O1P4	OM, BMP4	Pos	
13	MSC 012104 O1P4	Medio osteogénico (OM)	Neg	Grasa
14	MSC 012104 O1P4	OM, BMP2	Neg	Grasa
15	MSC 012104 O1P4	OM, BMP2, BMP4	Neg	Grasa
16	Umb 022803 O1P4	Medio osteogénico (OM)	Neg	
17	Umb 022803 O1P4	OM, BMP2	Neg	
18	Umb 022803 O1P4	OM, BMP2, BMP4	Neg	
19	Pla 100703 O1P4	Medio osteogénico (OM)	Neg	
20	Pla 100703 O1P4	OM, BMP2	Neg	
21	Pla 100703 O1P4	OM, BMP2, BMP4	Neg	
22	Fib 1F1853 O1P11	Medio osteogénico (OM)	Neg	
23	Fib 1F1853 O1P11	OM, BMP2	Neg	
24	Fib 1F1853 O1P11	OM, BMP2, BMP4	Neg	

Resumen. Se ha demostrado que las MSC derivadas de la médula ósea (Kadiyala *et al.*, 1997) así como células derivadas de otros tejidos tales como el adiposo (Halvorsen *et al.*, 2001) se diferencian a células tipo osteoblasto. Las MSC también han demostrado diferenciarse a adipocitos o a osteoblastos en respuesta a las BMP (Chen *et al.*, 1998) debido a las diferentes funciones del receptor tipo IB y IA de la proteína morfogenética ósea (BMP).

Las MSC y células derivadas de la placenta de origen neonatal presentaron mineralización así como inducción de osteocalcina y sialoproteína ósea. En las condiciones utilizadas, las células derivadas de cordón umbilical no presentaron mineralización ni inducción de genes de osteoblasto. Las células derivadas de la placenta maternas pueden necesitar la adición de BMP-4 o TGF al medio osteogénico para que se produzca la mineralización. La edad gestacional de la muestra también puede ser un factor en la capacidad de las células derivadas de tejidos posparto para diferenciarse.

Referencias:

Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. (1997) Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*.6:125-34.

Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE. (1998) Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol*. 142:295-305.

Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimple JM (2001) Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng*. 7:729-41.

Richard DJ *et al.*, (1994) Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161:218-228

WO2003025149 A2 HO, Tony, W.; KOPEN, Gene, C.; RIGHTER, William, F.; RUTKOWSKI, J., Lynn; HERRING, W., Joseph; RAGAGLIA, Vanessa; WAGNER, Joseph. CELL POPULATIONS WHICH CO-EXPRESS CD49C AND CD90, NEURONYX, INC. Solicitud N° PCT/US02/29971 US, presentada el 20.09.2002, A2 publicada el 27.03.2003, A3 publicada el 18.12.2003.

EJEMPLO 15

Diferenciación condrogénica de células derivadas posparto

Las lesiones y defectos del cartílago conducen a aproximadamente 600.000 procedimientos quirúrgicos cada año en los Estados Unidos solamente (1). Se han desarrollado varias estrategias para tratar estas afecciones, pero éstas han tenido un éxito limitado. Un enfoque, Cartecel (Genzyme), utiliza condrocitos autólogos que se recogen de un paciente y se hacen proliferar *in vitro* y, a continuación, se implantan en el paciente (1). Este enfoque tiene la desventaja de que se recolecta cartílago sano y que requiere un segundo procedimiento para implantar las células cultivadas. Una posibilidad novedosa es una terapia basada en células madre en la que las células se colocan en o cerca del sitio del defecto para sustituir directamente el tejido dañado. Las células pueden diferenciarse a condrocitos antes de la aplicación o pueden utilizarse células progenitoras que pueden diferenciarse *in situ*. Tales células trasplantadas reemplazarían los condrocitos perdidos en el defecto.

Las células candidatas para esta indicación deben evaluarse en cuanto a su capacidad para diferenciarse a condrocitos *in vitro*. Se han desarrollado varios protocolos para ensayar la capacidad de las células para diferenciarse y expresar genes marcadores de condrocitos. Se ensayaron células derivadas posparto en cuanto a su capacidad de diferenciación a condrocitos *in vitro* en dos sistemas de ensayo diferentes: el sistema de cultivo de ensayo de sedimento y los cultivos en gel de colágeno. El sistema de cultivo de sedimento se ha utilizado con éxito con lotes seleccionados de células madre mesenquimales humanas (MSC). Las MSC cultivadas en este ensayo y tratadas con factor de crecimiento transformante beta3 han demostrado diferenciarse a condrocitos (2). El sistema de gel de colágeno se ha utilizado para cultivar condrocitos *in vitro* (3). Los condrocitos cultivados en estas condiciones forman una estructura tipo cartílago.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Células derivadas de tejido posparto. Se recibieron cordones umbilicales y placenta humanos y se aislaron las células como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento (medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal al 15% (v/v) (Hyclone, Logan UT), penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA), y 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO)) en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. Para su uso en los experimentos, las células se encontraban entre los pases 4 y 12.

Condrocitos articulares humanos. Se adquirieron condrocitos articulares humanos de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en el mismo medio que las células derivadas posparto. Veinticuatro horas antes del experimento, el medio de cultivo se cambió a un medio que contenía FBS al 1%.

Células madre mesenquimales humanas (hMSC). Se adquirieron MSC de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Las células utilizadas para los experimentos se encontraban entre los pases 2 y 4.

Ensayos con gel de colágeno. Las células cultivadas se tripsinizaron para extraerse de la placa de cultivo. Las células se lavaron dos veces con centrifugación a 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se realizó su recuento. Las células se mezclaron con los siguientes componentes a las concentraciones finales indicadas. Colágeno de cola de rata (1 miligramo/mililitro, BD DiscoveryLabware, Bedford, MA), NaOH 0,01 N y medio condrogénico (DMEM, 100 U/100 microgramos de penicilina/estreptomicina, L-glutamina 2 milimolar, piruvato sódico 1 milimolar, L-prolina 0,35 milimolar, dexametasona 100 nanomolar, ácido L-ascórbico 0,17 milimolar, ITS (insulina, transferrina, selenio) al 1% (v/v) (todos los componentes de Sigma Chemical Company)). Las células se mezclaron suavemente con el medio. Las muestras se alicuotaron en los pocillos individuales de una placa de adherencia ultra baja ("ultra low cluster plate") de 24 pocillos (Corning, Corning, NY) a una concentración de 2 x 10⁵ por pocillo o de

5 x 10⁵ por pocillo. Los cultivos se colocaron en una incubadora y se dejaron reposar durante 24-48 horas. El medio se reemplazó con medio condrogénico recién preparado complementado con un factor de crecimiento apropiado cada 24-48 horas. Las muestras se dejaron en cultivo durante un máximo de 28 días, momento en el que se extrajeron y fijaron en formalina al 10% (v/v) (VWR Scientific, West Chester, PA) y se procesaron para su examen histológico. Las muestras se tiñeron con safranina O o hematoxilina/eosina para su evaluación.

Ensayos de cultivo de sedimento. Las células cultivadas se tripsinizaron para extraerlas de la placa de cultivo. Las células se lavaron dos veces con centrifugación a 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se realizó su recuento. Las células se resuspendieron en medio condrogénico recién preparado (descrito anteriormente) a una concentración de 5 x 10⁵ células por mililitro. Las células alicuotaron en nuevos tubos de polipropileno a 2,5 x 10⁵ células por tubo. A continuación, las muestras apropiadas se trataron con TGF-beta3 (10 nanogramos/mililitro, Sigma) o GDF-5 (100 nanogramos/mililitro; R&D Systems, Minneapolis, MN). A continuación, las células se centrifugaron a 150 x g durante 3 minutos. A continuación, los tubos se transfirieron a la incubadora y se dejaron reposar durante 24-48 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Se reemplazó el medio con medio celular para condrocitos recién preparado y factor de crecimiento, cuando procediese, cada 2-3 días. Las muestras se dejaron en cultivo durante un máximo de 28 días, momento en el que se extrajeron y fijaron, y se tiñeron como se ha descrito anteriormente.

Resultados

Se prepararon sedimentos y se cultivaron como se describe en el apartado de Métodos. Los sedimentos se cultivaron en medio (Control) o se completaron con TGF-beta3 (10 nanogramos/mililitro) o GDF-5 (100 nanogramos/mililitro), que se reemplazó cada 2-3 días. Los sedimentos se recogieron al cabo de 21 días de cultivo y se tiñeron con safranina O para detectar la presencia de glicosaminoglicanos. Los sedimentos tratados con TGFbeta3 y GDF-5 presentaron algo de tinción positiva para safranina O en comparación con las células control. La morfología de las células de cordón umbilical presentó cierta morfología tipo condrocito limitada.

Las tinciones con safranina O de los sedimentos celulares de células de la placenta presentaron una expresión de glicosaminoglicano similar en comparación con las células de cordón umbilical. La morfología de las células también presentó cierta morfología tipo condrocito limitada.

Resumen. Los resultados de este estudio demuestran que las células derivadas posparto se diferenciaban parcialmente a condrocitos *in vitro* en los sistemas de ensayo de cultivo de sedimento y de gel de colágeno. Las células derivadas posparto presentaron algunos indicios de expresión de glicosaminoglicanos por las células. La morfología presentó una similitud limitada con tejido cartilaginoso.

REFERENCIAS

1. U.S. Markets for Current and Emerging Orthopedic Biomaterials Products and Technologies. Medtech Insight L.L.C. 2002.
2. Johnstone, B, T. M. Hering, A.I. Caplan, V.M. Goldberg y J.U. Yoo. In Vitro Chondrogenesis of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. 1998. Exp. Cell Res. 238:265-272.
3. Gosiewska, A., A. Rezaia, S. Dhanaraj, M. Vyakarnam, J. Zhou, D. Burtis, L. Brown, W. Kong, M. Zimmerman y J. Geesin. Development of a Three-Dimensional Transmigration Assay for Testing Cell-Polymer Interactions for Tissue Engineering Applications. 2001 Tissue Eng. 7:267-277.

EJEMPLO 16

Evaluación del potencial condrogénico de las células derivadas de tejido posparto en un ensayo basado en cultivo de sedimento *in vitro*

Este ejemplo describe la evaluación del potencial condrogénico de las células derivadas de tejido placentario o umbilical mediante ensayos basados en cultivo de sedimento *in vitro*. Se utilizaron células de cordón umbilical y de la placenta en un pase temprano (P3) y un pase tardío (P12). El potencial condrogénico de las células se evaluó en ensayos de cultivo de sedimento, en condiciones de inducción condrogénica, en medio complementado con factor de crecimiento transformante beta-3 (TGFbeta-3), GDF-5 (factor 5 de crecimiento y diferenciación humano recombinante), o una combinación de ambos.

Materiales y métodos

Reactivos. Se obtuvieron medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomycin de Invitrogen, Carlsbad, CA. Se obtuvo suero de ternera fetal (FCS) de Hyclone (Logan, UT). Se obtuvieron medio de crecimiento para células madre mesenquimales (MSCGM) y medio hMSC Chondrogenic Differentiation BulletKit de Biowhittaker, Walkersville, MD. Se obtuvo TGFbeta-3 de Oncogene Research Products, San Diego, CA. Se obtuvo GDF-5 de Biopharm, Heidelberg, Alemania (W09601316 A1, US5994094 A).

Células. Se obtuvieron células madre mesenquimales humanas (lote nº 2F1656) de Biowhittaker, Walkersville, MD y se cultivaron en MSCGM según las instrucciones del fabricante. Este lote se ha ensayado con anterioridad, y ha demostrado ser positivo en los ensayos de condrogénesis. Se obtuvieron fibroblastos adultos y neonatales humanos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA y se cultivaron en medio de crecimiento (esencial modificado de Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 15% (v/v), penicilina/estreptomicina (100 U/100 miligramos, respectivamente) y 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO) en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Se utilizaron células derivadas de tejido posparto, aisladas de cordones umbilicales humanos (lote nº 022703Umb) y placenta (lote nº 071003Plac) como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento de manera similar a los fibroblastos. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban en los pases 3 y 12.

Ensayo de cultivo de sedimento. Para los cultivos de sedimento, se colocaron $0,25 \times 10^6$ células en un tubo cónico de 15 mililitros y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para formar un sedimento esférico según el protocolo para el ensayo condrogénico de Biowhittaker. Los sedimentos se cultivaron en medio de inducción condrogénica que contenía TGFbeta-3 (10 nanogramos/mililitro), GDF-5 (500 nanogramos/mililitro), o una combinación de TGFbeta-3 (10 nanogramos/mililitro) y GDF-5 (500 nanogramos/mililitro) durante tres semanas. Los controles no tratados se cultivaron en medio de crecimiento. Durante el cultivo, los sedimentos se realimentaron con medio recién preparado cada dos días. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

Grupo de tratamiento

- A. Pase temprano de células derivadas de la placenta (P EP) + GDF-5
- B. Pase tardío de células derivadas de la placenta (P LP) + GDF-5
- C. Pase temprano de células derivadas de cordón umbilical (U EP) + GDF-5
- D. Pase tardío de células derivadas de cordón umbilical (U LP) + GDF-5, n = 2
- E. Células madre mesenquimales humanas (HMSC) + GDF-5
- F. Fibroblastos adultos humanos (HAF) + GDF-5
- G. Pase temprano de células derivadas de la placenta (P EP) + TGFbeta-3
- H. Pase tardío de células derivadas de la placenta (P LP) + TGFbeta-3
- I. Pase temprano de células derivadas de cordón umbilical (U EP) + TGFbeta-3
- J. Pase tardío de células derivadas de cordón umbilical (U LP) + TGFbeta-3, n = 2
- K. Células madre mesenquimales humanas (HMSC) + TGFbeta-3
- L. Fibroblastos adultos humanos (HAF) + TGFbeta-3
- M. Pase temprano de células derivadas de la placenta (P EP) + GDF-5 + TGFbeta-3, n = 1
- N. Pase tardío de células derivadas de la placenta (P LP) + GDF-5 + TGFbeta-3
- O. Pase temprano de células derivadas de cordón umbilical (U EP) + GDF-5 + TGFbeta-3
- P. Pase tardío de células derivadas de cordón umbilical (U LP) + GDF-5 + TGFbeta-3, n = 2
- Q. Células madre mesenquimales humanas (HMSC) + GDF-5 + TGFbeta-3
- R. Fibroblastos adultos humanos (HAF) + GDF-5 + TGFbeta-3
- S. Fibroblastos neonatales humanos (HNF) + GDF-5 + TGFbeta-3
- T. Pase temprano de células derivadas de la placenta (P EP)
- U. Pase tardío de células derivadas de la placenta (P LP)
- V. Pase temprano de células derivadas de cordón umbilical (U EP)
- W. Pase tardío de células derivadas de cordón umbilical (U LP)
- X. Células madre mesenquimales humanas (HMSC)
- Y. Fibroblastos adultos humanos (HAF)

Histología de las muestras *in vitro*. Al final del periodo de cultivo, los sedimentos se fijaron en formalina tamponada al 10% y se enviaron al MPI Research (Mattawan, MI) para la inclusión en parafina, el corte y la tinción con hematoxilina/eosina (H/E) y safranina O (SO).

Resultados

Las células derivadas de la placenta y de cordón umbilical, las MSC y los fibroblastos formaron sedimentos celulares en medio de inducción condrogénica con los diferentes factores de crecimiento. El tamaño de los sedimentos al final del período de cultivo varió entre los diferentes tipos celulares. Los sedimentos formados con células derivadas de la placenta tenían un tamaño similar, o ligeramente superior, al de los formados por las MSC y los fibroblastos. Los sedimentos formados con las células derivadas de cordón umbilical tendían a ser más grandes y estar más sueltos que los demás grupos. Los sedimentos formados con todos los tipos celulares y cultivados en medio de control fueron más pequeños que los sedimentos cultivados en medio de inducción condrogénica.

El examen de las secciones transversales de los sedimentos teñidos con hematoxilina/eosina y safranina-O demostró que las células derivadas de cordón umbilical en pase temprano tenían el potencial de experimentar diferenciación condrogénica. Se observó condrogénesis, evaluada mediante condensación celular, morfología

celular y tinción positiva con safranina O de la matriz, en los sedimentos de células umbilicales cultivadas en medio de inducción condrogénica complementado con TGFbeta-3, GDF-5, o ambos. La condrogénesis en los sedimentos fue similar para TGFbeta-3, GDF-5, y los tratamientos combinados. Los sedimentos de control cultivados en medio de crecimiento no dieron muestras de condrogénesis. El potencial condrogénico de las células derivadas de cordón umbilical fue ligeramente inferior a la observada con las MSC obtenidas de Biowhittaker.

Las células derivadas de cordón umbilical en pase tardío y las células derivadas de la placenta no demostraron un potencial condrogénico tan marcado como hicieron las células derivadas de cordón umbilical en pase temprano. Sin embargo, esto puede deberse al hecho de que las condiciones de inducción condrogénica se optimizaron para las MSC, no para las células derivadas posparto. Sin embargo, se observaron poblaciones celulares diferenciadas en las células derivadas de la placenta en ambos pases situadas apicalmente o centralmente. Se observó cierta condensación celular con los fibroblastos, pero no se asoció con la tinción de safranina O.

EJEMPLO 17

Ensayo de formación de red endotelial

La angiogénesis, o formación de nueva vasculatura, es necesaria para el crecimiento de tejido nuevo. La inducción de la angiogénesis es un importante objetivo terapéutico en muchos estados patológicos. El presente estudio tuvo como objetivo identificar la posible actividad angiogénica de las células derivadas posparto en ensayos *in vitro*. El estudio siguió un método bien establecido de siembra de células endoteliales en una placa de cultivo recubierta con MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA), un extracto de membrana basal (Nicosia y Ottinetti (1990) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26(2):119-28). El tratamiento de las células endoteliales en MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) con factores angiogénicos estimula a las células a formar una red que es similar a los capilares. Este es un ensayo común *in vitro* para ensayar estimuladores e inhibidores de la formación de vasos sanguíneos (Ito *et al.* (1996) *Int. J. Cancer* 67(1):148-52). Los estudios de la presente invención hicieron uso de un sistema de cocultivo con las células derivadas posparto sembradas sobre insertos de pocillo de cultivo. Estos insertos permeables permiten el intercambio pasivo de los componentes del medio entre los medios de cultivo de las células derivadas posparto y endoteliales.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Células derivadas de tejido posparto. Se recibieron cordones umbilicales y placenta humanos y se aislaron las células como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en Medio de crecimiento (medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (Hyclone, Logan UT), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO)) en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban entre los pases 4 y 12.

Se tripsinizaron células posparto en crecimiento activo, se realizó su recuento y se sembraron en insertos de cultivo tisular de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48-72 horas en Medio de crecimiento a 37°C en condiciones de crecimiento normales.

Células madre mesenquimales humanas (hMSC). Se adquirieron hMSC de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Los cultivos se incubaron en condiciones de crecimiento normales.

Se tripsinizaron MSC en crecimiento activo y se realizó su recuento, y se sembraron sobre insertos de cultivo tisular de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48-72 horas en Medio de crecimiento en condiciones de crecimiento normales.

Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Se obtuvieron HUVEC de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separados, en EBM o en medio para células endoteliales EGM (Cambrex). Las células se cultivaron en plástico de cultivo tisular convencional en condiciones de crecimiento normales. Las células utilizadas en el ensayo se encontraban entre los pases 4 y 10.

Células endoteliales de la arteria coronaria humana (HCAEC). Se adquirieron HCAEC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Estas células también se mantuvieron en cultivos separados, en las formulaciones de medio EGM o EBM. Las células se cultivaron en plástico de cultivo tisular convencional en condiciones de crecimiento normales. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban entre los pases 4 y 8.

Ensayos de formación de red endotelial (MATRIGEL). Las placas de cultivo se recubrieron con MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) según las especificaciones del fabricante. En resumen, se descongeló MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA) a 4°C y se alicutaron aproximadamente 250 microlitros, y se distribuyeron de manera uniforme sobre cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos enfriada (Corning). A continuación, se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos para permitir que el material solidificase. Se tripsinizaron cultivos de células endoteliales en crecimiento activo y se realizó su recuento. Las células se lavaron dos veces en Medio de crecimiento con FBS al 2% mediante centrifugación, resuspensión, y aspiración del sobrenadante. Las células se sembraron en los pocillos recubiertos a 20.000 células por pocillo en aproximadamente 0,5 mililitros de Medio de crecimiento con FBS al 2% (v/v). A continuación, las células se incubaron durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células se asentaran.

A continuación, los cultivos de células endoteliales se trataron con bFGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o VEGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) para que hicieran de control positivo para la respuesta de las células endoteliales. Se añadieron insertos Transwell sembrados con células derivadas posparto a los pocillos apropiados con Medio de crecimiento con FBS al 2% en la cámara del inserto. Los cultivos se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante aproximadamente 24 horas. La placa de pocillos se sacó de la incubadora, y se recogieron imágenes de los cultivos de células endoteliales con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

Resultados

En un sistema de cocultivo con células derivadas de la placenta o con células derivadas de cordón umbilical, las HUVEC forman redes celulares (datos no mostrados). Las células HUVEC forman redes celulares limitadas en experimentos de cocultivo con hMSC y con bFGF 10 nanomolar (datos no mostrados). Las células HUVEC sin ningún tratamiento presentaron escasa o nula formación de redes (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las células derivadas posparto liberan factores angiogénicos que estimulan a las HUVEC.

En un sistema de cocultivo con células derivadas de la placenta o con células derivadas de cordón umbilical, las CAEC forman redes celulares (datos no mostrados).

La Tabla 17-1 muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células derivadas posparto en el Medio de crecimiento. Se sembraron células derivadas posparto en insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 37°C en oxígeno atmosférico durante 48 horas en los insertos y, a continuación, se cambiaron a un medio con FBS al 2% y se devolvieron a 37°C durante 24 horas. El medio se eliminó, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C, y se analizó mediante el ensayo ELISA multiplexado SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son los promedios de las mediciones por duplicado. Los resultados demuestran que las células derivadas posparto no liberan niveles detectables de factor de crecimiento plaquetario bb (PDGF-bb) ni factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF). Las células sí liberan cantidades mensurables de inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Tabla 17-1. Posibles factores angiogénicos liberados a partir de células derivadas posparto. Las células derivadas posparto se cultivaron en 24 horas en medio con FBS al 2% en oxígeno atmosférico. El medio se extrajo y se ensayó mediante ensayo ELISA multiplexado SearchLight (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son las concentraciones en el medio presentadas en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF-bb (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	91655,3	175,5	<2,0	275,5	3,0	58,3	7,5	644,6	<1,2
Plac (P11)	1592832,4	28,1	<2,0	1273,1	193,3	5960,3	34,8	12361,1	1,7
Cord umb (P4)	81831,7	<9,8	<2,0	365,9	14,1	200,2	5,8	<4,0	<1,2
Medio solo	<9,8	25,1	<2,0	<6,4	<2,0	<3,2	<5,4	<4,0	<1,2

Plac: células derivadas de la placenta; Cord umb: células derivadas de cordón umbilical

La **Tabla 17-2** muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células derivadas posparto. Se sembraron células derivadas posparto en insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en Medio de crecimiento con oxígeno al 5% durante 48 horas en los insertos y, a continuación, se cambiaron a un medio con FBS al 2% y se devolvieron a incubación con O₂ al 5% durante 24 horas. El medio se

eliminó, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C, y se analizó mediante el ensayo ELISA multiplexado SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son los promedios de las mediciones por duplicado. Los resultados demuestran que las células derivadas posparto no liberan niveles detectables de factor de crecimiento plaquetario bb (PDGF-bb) ni factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF). Las células sí liberan cantidades mensurables de inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Tabla 17-2. Posibles factores angiogénicos liberados a partir de células derivadas posparto. Las células derivadas posparto se cultivaron en 24 horas en medio con FBS al 2% en oxígeno al 5%. El medio se extrajo y se ensayó mediante el ensayo ELISA multiplexado SearchLight (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son las concentraciones en los medios presentadas en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF-bb (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	72972,5	253,6	<2,0	743,1	2,5	30,2	15,1	1495,1	<1,2
Plac (P11)	458023,1	55,1	<2,0	2562,2	114,2	2138,0	295,1	7521,3	1,8
Cord umb (P4)	50244,7	<9,8	<2,0	403,3	10,7	156,8	5,7	<4,0	<1,2
Medio solo	<9,8	25,1	<2,0	<6,4	<2,0	<3,2	<5,4	<4,0	<1,2

Plac: células derivadas de la placenta; Cord umb: células derivadas de cordón umbilical

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

EJEMPLO 18

Trasplante de PPDC

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

Métodos y materiales

Cultivo celular. Se cultivaron células derivadas de la placenta y células derivadas de cordón umbilical en Medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad CA), suero bovino fetal al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001 % (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)) en matraces recubiertos con gelatina.

Preparación de la matriz. Se preparó un andamiaje de no tejido utilizando una técnica de punzonado tradicional como se describe más adelante. Las fibras, compuestas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), comercializado con el nombre comercial VICRYL se obtuvieron de Ethicon, Inc. (Somerville, NJ). Las fibras eran filamentos de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro. A continuación, las fibras se cortaron y rizaron en longitudes uniformes de 2 pulgadas para formar una fibra discontinua de 2 pulgadas. A continuación, se preparó una matriz no tejida punzonada tendida en seco utilizando las fibras discontinuas VICRYL. Las fibras discontinuas se abrieron y se cardaron en una maquinaria para no tejidos convencional. El fieltro resultante estaba en forma de fibras discontinuas en banda. Las fibras discontinuas en banda se punzonaron para formar el andamiaje de no tejido punzonado tendido en seco. El andamiaje de no tejido se aclaró en agua, seguido de otra incubación en etanol para eliminar cualquier residuo químico o coadyuvante de procesamiento utilizado durante el proceso de fabricación.

Las espumas, compuestas por copolímero 35/65 de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (35/65 PCL/PGA), se formaron mediante el proceso de liofilizado, como se analiza en la patente de Estados Unidos Nº 6.355.699.

Preparación de la muestra. Se sembraron un millón de células viables en 15 microlitros de Medio de crecimiento sobre andamiajes de no tejido VICRYL de 2,25 milímetros de espesor y 5 milímetros de diámetro, (64,33 miligramos/centímetro cúbico; lote nº 3547-47-1) o espuma 35/65 PCL/PGA de 5 milímetros de diámetro (lote nº 3415-53). Se dejó que las células se fijaran durante dos horas antes de añadir más Medio de crecimiento para cubrir los andamiajes. Las células se cultivaron en los andamiajes durante la noche. También se incubaron en el medio andamiajes sin células.

Se obtuvieron péptidos de autoensamblaje RAD16 (3D Matrix, Cambridge, MA en virtud de un acuerdo de transferencia de materiales) como una solución estéril al 1% (p/v) en agua, que se mezcló 1:1 con 1×10^6 células en sacarosa al 10% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO), HEPES 10 milimolar en medio modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) inmediatamente antes de utilizarse. La concentración final de células en el hidrogel RAD16 fue de 1×10^6 células/100 microlitros.

MATERIAL DE ENSAYO (N = 4/Rx)

1. No tejido VICRYL + 1×10^6 células derivadas de cordón umbilical
2. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas de cordón umbilical
3. Péptido de autoensamblaje RAD 16 + 1×10^6 células derivadas de cordón umbilical
4. No tejido VICRYL + 1×10^6 células derivadas de la placenta
5. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas de la placenta
6. Péptido de autoensamblaje RAD 16 + 1×10^6 células derivadas de la placenta
7. Espuma 35/65 PCL/PGA
8. No tejido VICRYL

Preparación de los animales. Los animales utilizados en este estudio se manejaron y mantuvieron según los requisitos actuales de la Ley de Bienestar Animal (Animal Welfare Act). El cumplimiento de las Leyes Públicas anteriormente indicadas se llevó a cabo acatando las normas de bienestar animal (9 CFR) y sometiéndose a las normas vigentes promulgadas en el documento "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", 7ª edición.

Ratones (*Mus musculus*)/Fox Chase SCID/macho (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianápolis, Indiana), de 5 semanas de edad. Todas las manipulaciones de los ratones SCID tuvieron lugar bajo una campana. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramo de KETASET (clorhidrato de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) y 10 miligramos/kilogramo de ROMPUN (xilazina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de inducir la anestesia, se cortó el pelo de toda la parte posterior del animal desde la zona cervical dorsal hasta la zona lumbosacra dorsal con una esquiladora eléctrica. A continuación, la zona se limpió con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se untó con una solución acuosa de yodóforo del 1% de yodo disponible. Se aplicó a los ojos una pomada oftálmica para evitar que se secase el tejido durante el período de anestesia.

Técnica de implantación subcutánea. Se realizaron cuatro incisiones cutáneas sobre el dorso de los ratones, cada una de aproximadamente 1,0 cm de longitud. Se situaron transversalmente dos sitios del cráneo sobre la región torácica lateral dorsal, aproximadamente 5 mm en dirección caudal al borde inferior de la escápula palpado, uno a la izquierda y otro a la derecha de la columna vertebral. Otros dos se situaron transversalmente sobre la zona del músculo del glúteo a nivel sacro-lumbar caudal, aproximadamente 5 mm en dirección caudal a la cresta ilíaca palpada, uno a cada lado de la línea media. Los implantes se colocaron al azar en estos sitios. La piel se separó del tejido conectivo subyacente para crear un pequeño bolsillo y se colocó el implante (o se inyectó para RAD16) aproximadamente 1 cm en dirección caudal a la incisión. El material de ensayo apropiado se implantó en el espacio subcutáneo. La incisión cutánea se cerró con grapas metálicas.

Alojamiento de los animales. Los ratones se alojaron individualmente en jaulas Micro-Isolator durante todo el estudio dentro de un intervalo de temperaturas de 64°F - 79°F y una humedad relativa del 30% al 70%, y se mantuvieron en un ciclo aproximado de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. La temperatura y la humedad relativa se mantuvieron dentro de los intervalos indicados en la mayor medida posible. La dieta consistió en pienso para roedores Irradiated Pico Mouse Chow 5058 (Purina Co.) y agua, suministrados a discreción.

Se sacrificó a los ratones en sus intervalos establecidos mediante inhalación de dióxido de carbono. Se extirparon los sitios de implantación subcutánea con su piel suprayacente y se congelaron para la histología.

Histología. La piel extirpada con el implante se fijó con formalina tamponada neutra al 10% (Richard Allan-Kalamazoo, MI). Las muestras con el tejido suprayacente y adyacente se bisecaron centralmente, se procesaron en parafina y se embebieron en la superficie de corte utilizando métodos de rutina. Se obtuvieron secciones de tejido de cinco micrómetros mediante microtomo y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Poly Scientific Bay Shore, NY) utilizando métodos de rutina.

Resultados

Hubo una increscencia mínima de tejido en las espumas implantadas subcutáneamente en los ratones SCID al cabo de 30 días (datos no mostrados). Por el contrario, hubo un extenso relleno de tejido en las espumas implantadas con células derivadas de cordón umbilical o de células derivadas de la placenta (datos no mostrados).

Hubo cierta increscencia de tejido en los andamiajes de no tejido VICRYL. Los andamiajes de no tejido sembrados con células derivadas de cordón umbilical o de la placenta presentaron un aumento de deposición de matriz y de vasos sanguíneos maduros (datos no mostrados).

Resumen. El fin de este estudio fue determinar el tipo de tejido formado por las células derivadas de placenta o de cordón umbilical humanos en los andamiajes en ratones inmunodeficientes. Se sembraron discos de no tejido/espuma absorbibles sintéticos (5,0 milímetros de diámetro x 1,0 milímetros de espesor) o hidrogel de péptidos de autoensamblaje con células derivadas de cordón umbilical o de la placenta humanos y se implantaron subcutáneamente de forma bilateral en la región dorsal de la columna de los ratones SCID. El presente estudio demuestra que las células derivadas posparto pueden aumentar drásticamente la formación de tejido de buena calidad en andamiajes biodegradables.

EJEMPLO 19

Potencial condrogénico y osteogénico de las células derivadas posparto al implantarse en ratones SCID

Se evaluó el potencial condrogénico de las células derivadas de tejido de cordón umbilical o de la placenta después de la siembra en andamiajes biorreabsorbibles cargados con factor de crecimiento y su implantación en ratones SCID.

Materiales y métodos

Reactivos. Se obtuvieron medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomycin de Invitrogen, Carlsbad, CA. Se obtuvo suero de ternera fetal (FCS) de Hyclone (Logan, UT). Se obtuvo medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM) de Biowhittaker, Walkersville, MD. Se obtuvo TGFbeta-3 de Oncogene Research Products, San Diego, CA. Se obtuvo GDF-5 de Biopharm, Heidelberg, Alemania (publicación PCT internacional N° WO96/01316 A1, patente de Estados Unidos N° 5.994.094A). El medio de crecimiento de condrocitos comprendía DMEM con alto contenido de glucosa complementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS), HEPES 10 milimolar, aminoácidos no esenciales 0,1 milimolar, 20 microgramos/mililitro de L-prolina, 50 microgramos/mililitro de ácido ascórbico, 100 Unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B. Se obtuvo fibrinógeno bovino de Calbiochem.

Células. Se obtuvieron células madre mesenquimales humanas (hMSC, lote n° 2F1656) de Biowhittaker, Walkersville, MD y se cultivaron en MSCGM según las instrucciones del fabricante. Este lote se ensayó en el laboratorio previamente en experimentos *in vitro* y demostró ser positivo en los ensayos de condrogénesis. Se obtuvieron fibroblastos humanos adultos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA y se cultivaron en Medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Se prepararon células derivadas posparto aisladas de cordones umbilicales humanos (lote n° 022703Umb) y placenta (lote n° 071003Plac) como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en Medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos celulares se incubaron en condiciones de crecimiento normales. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban en los pases 5 y 14.

Andamiaje. Se obtuvieron andamiajes de espuma de ácido poliglicólico (PGA)/policaprolactona (PCL) 65/35 [4x5 centímetros, 1 milímetro de espesor, esterilizado con óxido de etileno (ETO)] reforzados con malla de polidioxanona (PDS) (espuma de PGA/PCL-malla de PDS) del Center for Biomaterials and Advanced Technologies (CBAT, Somerville, NJ). Se cargaron recortes ("punches") (3,5 milímetros) hechos a partir de los andamiajes con GDF-5 (3,4 microgramos/andamiaje), TGFbeta-3 (10 nanogramos/andamiaje), una combinación de GDF-5 y TGFbeta-3, o medio de control, y se liofilizaron.

Siembra de células en los andamiajes. Se tripsinizaron células derivadas de la placenta y de cordón umbilical, y se determinó el número y la viabilidad de las células. Se resuspendieron $0,75 \times 10^6$ células en 15 microlitros de Medio de Crecimiento y se sembraron sobre los recortes de andamiaje de 3,5 milímetros en una placa de cultivo celular. El andamiaje sembrado con las células se incubó en una incubadora de cultivo celular en atmósfera normal con CO₂ al 5% a 37°C durante 2 horas, tras lo cual se colocan dentro de anillos de explante de cartílago.

Explantos de cartílago bovino. Se generaron explantes de cartílago de 5 milímetros de diámetro a partir de cartílago obtenido de la espaldilla de un bovino joven. Se extirparon recortes (3 milímetros) del centro del explante y se reemplazaron con un andamiaje reabsorbible de 3,5 milímetros sembrado con células. Los andamiajes con células se mantuvieron dentro de los explantes mediante adhesivo de fibrina (60 microlitros de fibrinógeno bovino, 3 miligramos/mililitro). Las muestras se mantuvieron en medio de crecimiento de condrocitos durante la noche, se aclararon en solución salina tamponada con fosfato al día siguiente, y se implantaron en ratones SCID.

Animales. Se obtuvieron ratones SCID (*Mus musculus*)/Fox Chase SCID/macho), de 5 semanas de edad, de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianápolis, Indiana) y Charles River Laboratories (Portage, Michigan). Los animales utilizados en el estudio se seleccionaron sin ningún sesgo sistemático aparente. Se colocó una etiqueta en cada jaula individual que indicaba el número de registro, la técnica de implantación, el número de animal, la especie/cepa, la fecha de la cirugía, el periodo *in vivo*, y la fecha de la eutanasia. Los animales se identificaron mediante números secuenciales marcados en la oreja con un rotulador de tinta indeleble.

Diseño experimental. Se ensayó un total de 42 ratones. Se implantaron subcutáneamente dos andamiajes en cada ratón como se describe más adelante; 42 ratones para la implantación subcutánea; 28 tratamientos con un valor n de 3 por tratamiento. El estudio corresponde al número de aprobación del IACUC: Skillman IACUC 01-037. El estudio duró seis semanas.

Implantación de SCID.

A. Pesos corporales

Se pesó cada animal antes de ser anestesiado y en el momento de la necropsia.

B. Anestesia y preparación quirúrgica:

Todas las manipulaciones de los ratones SCID tuvieron lugar bajo una campana. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de KETASET (clorhidrato de ketamina [60 miligramos/kilogramo]), ROMPUN (xilazina [10 miligramos/kilogramo]) y solución salina.

Después de inducir la anestesia, se cortó el pelo de toda la parte posterior del animal desde la zona cervical dorsal hasta la zona lumbosacra dorsal con una esquiladora eléctrica. Se limpió la zona con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó y se untó con una solución acuosa de yodóforo del 1% de yodo disponible. Se aplicó a los ojos una pomada oftálmica para evitar que se secase el tejido durante el período de anestesia. El animal anestesiado y preparado quirúrgicamente se colocó en el decúbito deseado.

C. Técnica de implantación subcutánea:

Se realizó una incisión cutánea de aproximadamente 2 cm justo lateral a la columna torácica paralela a la columna vertebral. La piel se separó del tejido conectivo subyacente mediante disección roma. Cada ratón SCID recibió 2 tratamientos que se colocaron en bolsillos subcutáneos creados mediante disección roma en cada hemitórax a través de una incisión cutánea. Se utilizaron suturas temporales de ETHIBOND EXCEL 5-0 (poliéster) para unir temporalmente la piel a la musculatura alrededor de cada andamiaje para evitar la migración subcutánea. Los andamiajes se implantaron durante 6 semanas y, a continuación, se recogieron. El diseño experimental se esboza en la Tabla 19-1.

Tabla 19-1. Diseño experimental: Tratamiento (N = 3 por tratamiento)

- A. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, TGFbeta3
- B. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5
- C. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5+TGFbeta3
- D. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, EP, control
- E. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, TGFbeta3
- F. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5
- G. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5+TGFbeta3
- H. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de la placenta, LP, control
- I. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, TGFbeta3
- J. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, rhGDF-5
- K. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, rhGDF-5+TGFbeta3
- L. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, control
- M. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, TGFbeta3
- N. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, rhGDF-5
- O. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, rhGDF-5+TGFbeta3
- P. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, control
- Q. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con hMSC, TGFbeta3
- R. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con hMSC, rhGDF-5
- S. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con hMSC, rhGDF-5+TGFbeta3
- T. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con hMSC, control

- U. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con fibroblastos, Adulto, TGFbeta3
- V. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con fibroblastos, Adulto, rhGDF-5
- W. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con fibroblastos, Adulto, rhGDF-5+TGFbeta
- X. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS cultivada con fibroblastos, Adulto, control
- 5 Y. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS, TGFbeta3
- Z. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS, rhGDF-5
- AA. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS, rhGDF-5+TGFbeta3
- BB. Espuma de PGA/PCL 65/35 + malla de PDS, control

10 *D. Necropsia y preparación histológica*

Se realizó un examen macroscópico en todos los animales que murieron durante el estudio o que se sacrificaron en estado moribundo. Los tejidos seleccionados se guardaron a criterio del patólogo y/o del director del estudio.

15 Se sacrificó a los ratones por inhalación de CO₂ en sus intervalos establecidos. Se registraron las observaciones macroscópicas de los sitios implantados. Se extirparon las muestras de los sitios de implantación subcutánea con su piel suprayacente y se fijaron en formalina tamponada al 10%. Cada implante se dividió en dos mitades, y una mitad se envió al MPI Research (Mattawan, MI) para la inclusión en parafina, el corte y la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y safranina O (SO).

Los datos obtenidos de este estudio no se analizaron estadísticamente.

25 **Resultados**

Se observó formación de nuevo cartílago y hueso en la mayoría de las muestras, incluidos los andamiajes sembrados con células cargados con factor de crecimiento, los andamiajes de control sembrados con células, y los andamiajes cargados con factor de crecimiento solamente. El grado de formación de nuevo cartílago y hueso varió dentro de los grupos de tratamiento y control.

30 Los andamiajes sembrados con células derivadas de la placenta de pase temprano y tardío presentaron formación de nuevo cartílago y hueso dentro de los andamiajes. No se observaron diferencias obvias en la formación de nuevo cartílago y hueso entre los diferentes andamiajes sembrados con células cargados con factor de crecimiento y los andamiajes sembrados con células solamente. En comparación con los andamiajes de control (sin factores de crecimiento y sin células), parecía que había un mayor grado de formación de cartílago nuevo en los andamiajes sembrados con células con y sin factores de crecimiento y en los andamiajes cargados con factor de crecimiento solamente. La formación de cartílago nuevo con andamiajes sembrados con células derivadas de la placenta fue similar a los andamiajes sembrados con MSC y los sembrados con fibroblastos.

40 En los andamiajes tratados con factor y de control sembrados con células derivadas de cordón umbilical en pases temprano y tardío, se observó formación de nuevo cartílago y hueso. El grado de formación de cartílago parecía ser menor que el observado con las células derivadas de la placenta. Ninguna muestra presentó formación de cartílago extensa como se observaba con las células derivadas de la placenta. La formación de hueso parecía ser mayor en los andamiajes sembrados con células derivadas de cordón umbilical que en los andamiajes que contenían TGFbeta-3 y rhGDF-5.

45 Los andamiajes cargados con hMSC también presentaron formación de nuevo cartílago y hueso. El grado de formación de nuevo cartílago y hueso fue similar para todos los grupos de tratamiento con hMSC. Los andamiajes sembrados con fibroblastos humanos adultos también demostraron formación de nuevo cartílago y hueso. Los resultados fueron similares a los obtenidos con las células derivadas de la placenta y las hMSC

50 En el grupo control, en el que los andamiajes cargados con factor de crecimiento o andamio solo se colocaron en anillos de cartílago y se implantaron, también se observó formación de nuevo cartílago y hueso. No es de extrañar que el grado de formación de cartílago nuevo fuese mayor en los andamiajes con factor de crecimiento que en los andamiajes sin factor de crecimiento. Hubo aumento de la formación de hueso en el control con la combinación de los dos factores de crecimiento ensayados.

55 Se observó formación de cartílago nuevo adyacente a los anillos de explante de cartílago, así como dentro de los andamiajes. La formación de cartílago nuevo dentro de los andamiajes adyacentes a los anillos de cartílago podría ser el resultado de la migración de condrocitos. La formación de cartílago observada como islas dentro de los andamiajes puede ser el resultado de la migración de condrocitos dentro de los andamiajes, de la diferenciación de las células sembradas o de la diferenciación de células progenitoras de ratón endógenas. Esta observación se deriva del hecho de que en los andamiajes cargados con factor de crecimiento de control sin células sembradas, se observaron islas de diferenciación condrogénica. Se observó formación de hueso nuevo dentro de los andamiajes de forma independiente y también asociada con condrocitos. La formación de hueso puede haber surgido de la diferenciación de osteoblastos, así como la osificación endocondral.

Es difícil separar la formación de nuevo cartílago y hueso asociada con condrocitos que migraron frente a la de cualquier diferenciación condrogénica y osteogénica de las células sembradas que pueda haber ocurrido. La tinción de secciones con anticuerpos humanos específicos puede distinguir la contribución de las células sembradas a la condrogénesis y osteogénesis observadas. También es posible que las células derivadas de la placenta y las células derivadas de cordón umbilical estimulasen la migración de condrocitos.

Se observó abundancia de nuevos vasos sanguíneos con los andamiajes cargados con células derivadas de la placenta y células derivadas de cordón umbilical. Los vasos sanguíneos fueron abundantes en las zonas de formación de hueso. También se observaron nuevos vasos sanguíneos en los andamiajes sembrados con hMSC y sembrados con fibroblastos asociados con la formación de hueso nuevo.

No se pueden descartar los efectos sistémicos del andamio adyacente (con factor de crecimiento (GF)) en los andamiajes de control (sin GF, sin células) en la promoción de la formación de nuevo cartílago y hueso. El análisis de la formación de nuevo cartílago y hueso en los andamiajes, tomando en consideración los andamiajes implantados adyacentes a los mismos en ratones SCID, no presentó ningún patrón claro de efecto sistémico del factor de crecimiento del andamio adyacente.

Resumen. Los resultados demostraron que se observaba formación de nuevo cartílago y hueso en los andamiajes con factor de crecimiento y de control sembrados con células derivadas de la placenta y de cordón umbilical. Los resultados con células derivadas de la placenta fueron similares a los observados con células madre mesenquimales humanas, mientras que el grado de formación de tejido tipo cartílago nuevo fue ligeramente menos pronunciado en las células derivadas de cordón umbilical. Los andamiajes cargados con factor de crecimiento implantados sin células también demostraron formación de nuevo cartílago y hueso. Estos datos indican que la formación de cartílago nuevo dentro de los andamiajes puede surgir a partir de condrocitos que migraron desde los explantes bovinos, a partir de la diferenciación condrogénica de células progenitoras endógenas, y a partir de la diferenciación condrogénica de las células sembradas.

Estos resultados sugieren que las células derivadas de la placenta y de cordón umbilical experimentan diferenciación condrogénica y osteogénica. Estos resultados también sugieren que las células derivadas de la placenta y de cordón umbilical pueden promover la migración de los condrocitos desde el explante de cartílago hasta los andamiajes. También se observaron abundantes vasos sanguíneos nuevos en los andamiajes especialmente asociados con la formación de hueso nuevo.

Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las formas de realización actualmente preferentes, se entiende que la invención no está limitada a las formas de realización específicamente descritas y ejemplificadas en el presente documento. Pueden realizarse numerosos cambios y modificaciones a la forma de realización preferente de la invención, y tales cambios y modificaciones pueden realizarse sin alejarse del alcance de la invención tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ETHICON, INCORPORATED

<120> REPARACIÓN Y REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO Y HUESO UTILIZANDO CÉLULAS DERIVADAS POSPARTO

<130> P055848EP

<150> EP 04809466.8

<151> 25-06-2004

<150> PCT/US2004/020958

<151> 25-06-2004

<150> US 60/483264

<151> 27-06-2003

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
5	<400> 1 gagaaatcca aagagcaaat gg	22	
	<210> 2 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
15	<400> 2 agaatggaaa actggaatag g	21	
20	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
	<400> 3 tcttcgatgc ttcggattcc	20	
30	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
	<400> 4 gaattctcgg aatctctgtt g	21	
40	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
50	<400> 5 ttacaagcag tgcagaaaac c	21	
55	<210> 6 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
60	<400> 6 agtaaacatt gaaaccacag cc	22	
65	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
5	<400> 7		
	tctgcagctc tgtgtgaagg	20	
	<210> 8		
	<211> 22		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
15	<400> 8		
	cttcaaaaac ttctccacaa cc	22	
	<210> 9		
	<211> 17		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
25	<400> 9		
	cccacgccac gctctcc	17	
	<210> 10		
	<211> 19		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético		
35	<400> 10		
	tcctgtcagt tgggtctcc	19	
40			
45			
50			
55			
60			
65			

Reivindicaciones

- 5 1. Población homogénea aislada de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, para su uso en el tratamiento de una afección ósea o cartilaginosa, en la que dicha población celular puede obtenerse mediante digestión enzimática de tejido de cordón umbilical humano exento de sangre con una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica, y en la que dicha población celular es capaz de autorrenovación y de proliferación en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse a células de otros fenotipos, y en la que la población de células:
 - 10 a) produce cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, según se detecta mediante citometría de flujo; y
 - b) no produce ninguno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, según se detecta mediante citometría de flujo.
- 15 2. Población celular para el uso según la reivindicación 1, en la que las células tienen un número de cromosomas y una estructura normales según se identifica mediante el análisis del cariotipo.
- 20 3. Población celular para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho tratamiento comprende administrar dichas células con al menos un factor bioactivo.
- 25 4. Población celular para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se obtienen mediante digestión enzimática con colagenasa, dispasa y hialuronidasa.
- 30 5. Población celular para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se administran en forma de mezclas con otras células.
- 35 6. Población celular para el uso según la reivindicación 5, en la que las otras células son células multipotentes, condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento óseo o células de médula ósea.
- 40 7. Población celular para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se administran con una molécula biológica o un fármaco adicionales.
- 45 8. Población celular para el uso según la reivindicación 7, en la que las células se administran con la molécula biológica o el fármaco adicional juntos en una composición farmacéutica única o en composiciones farmacéuticas separadas, simultáneamente o secuencialmente.
- 50 9. Población celular para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se siembran sobre o dentro de un andamiaje tridimensional antes de la implantación.
- 55 10. Población celular para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células se administran después de exponerse en cultivo a condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo deseado.