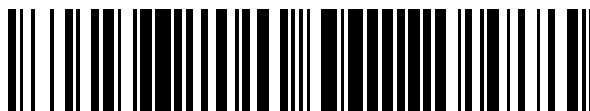


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 937**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2010** **E 10819470 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 2483392**

54 Título: **Células madre de revestimiento del cordón umbilical y métodos y material para aislar y cultivar las mismas**

30 Prioridad:

23.09.2009 US 245123 P

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

16.02.2016

73 Titular/es:

DAVINCI BIOSCIENCES LLC (100.0%)
1239 Victoria St. Suite 302
Costa Mesa, California 92627, US

72 Inventor/es:

SILVA, FRANCISCO J. y
GONZALEZ, RAFAEL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 559 937 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre de revestimiento del cordón umbilical y métodos y material para aislar y cultivar las mismas

CAMPO TÉCNICO

- 5 Esta invención se refiere a células madre de revestimiento del cordón umbilical (ULSCs) de seres humanos, y más particularmente a métodos y materiales para aislar, cultivar, expandir y caracterizar ULSCs.

ANTECEDENTES

El documento WO 2007/046775 A1 describe el aislamiento y cultivo de células progenitoras a partir de la membrana amniótica del cordón umbilical, que subsiguientemente pueden ser estimuladas para diferenciarse en fibroblastos y queratinocitos.

- 10 El documento WO 2006/019357 A1 describe el aislamiento de células progenitoras a partir de la membrana amniótica del cordón umbilical. Estas células se cultivan a continuación en condiciones que permitan la diferenciación de dichas células en células epiteliales y/o células mesenquimales.

- 15 Kita *et al.* informaron en *Stem Cells and Development* (abril 2010; 19(4):491-502) sobre la caracterización de las células madre del cordón umbilical con respecto a patrones de expresión de factores de transcripción y marcadores de la superficie celular.

SUMARIO

- 20 La presente invención se define por la reivindicación 1 independiente que describe un método para aislar células madre de revestimiento de un cordón umbilical a partir de cordón umbilical, y por la reivindicación 8 independiente que describe una población purificada de células madre de revestimiento de cordón umbilical. Las reivindicaciones dependientes describen realizaciones preferidas de la invención.

- 25 Esta invención se basa en el descubrimiento de una población de células del revestimiento del cordón umbilical, denominada células madre de revestimiento del cordón umbilical (ULSCs) y métodos y materiales para aislar este tipo de células. Las ULSCs son positivas para marcadores de la superficie celular CD73, CD90, CD105, CD106, SSEA-4 y STRO-1 y carecen de marcadores hematopoyéticos de la superficie celular CD34, CD45 y HLA-DR. Además, las ULSCs expresan marcadores pluripotentes Oct4 y Nanog. Las ULSCs se pueden propagar durante al menos 60 duplicaciones de población. Las ULSCs también tienen una amplia plasticidad y la capacidad de diferenciarse en células adipogénicas, osteogénicas, condrogénicas, neurogénicas y cardiogénicas. Los resultados descritos en esta memoria demuestran que las ULSCs se pueden obtener y expandir fácilmente en cultivo a números terapéuticamente relevantes en un corto período de tiempo. Además, las ULSCs se pueden crioconservar, haciendo a las células adecuadas para su almacenamiento en bancos de células para usos terapéuticos posteriores.

- 35 En un aspecto, este documento presenta un método para aislar ULSCs de un cordón umbilical. El método incluye obtener el revestimiento de un cordón umbilical, en donde el revestimiento está sustancialmente libre de sangre, tejido venoso y tejido arterial; y cultivar explantes del revestimiento sobre un sustrato sólido recubierto de fibronectina en presencia de un medio de crecimiento de bajo contenido en glucosa durante un período de tiempo suficiente para que las ULSCs se adhieran al sustrato sólido recubierto de fibronectina, en donde el medio de crecimiento incluye suero bovino fetal al 15%, un dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina, antibiótico (p. ej., gentamicina, o penicilina y estreptomycin), y un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor inhibidor de la leucemia (LIF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). El medio de crecimiento puede incluir, además, insulina, transferrina, selenio y piruvato sódico, y en algunas realizaciones, putrescina. En algunas realizaciones, el medio de crecimiento incluye bFGF, LIF y EGF. La superficie superior de cada uno de los explantes puede estar en contacto con un sustrato sólido (p. ej., cubreobjetos). El método puede incluir, además, el lavado de las células adheridas al sustrato sólido recubierto de fibronectina.

- 45 En otro aspecto, este documento presenta una composición para el cultivo de ULSCs. La composición incluye un medio de crecimiento con bajo contenido en glucosa; suero al 10% a 20%; 0,7 a 1,5% de un dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina; 1-100 ng/mL de un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en bFGF, LIF

y EGF; y de 1 a 3% de un antibiótico. La composición puede incluir, además, 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de insulina; 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de transferrina; 0,1 µg/mL a 100 µg/mL de selenio; y 0,5 a 1,5% de piruvato sódico. En algunas realizaciones, la composición incluye, además, 0,05 µg/mL a 100 µg/mL de putrescina y 1 ng/mL a 100 ng/mL de EGF. Por ejemplo, la composición puede incluir suero al 15% (p. ej., suero bovino fetal o suero humano); 1% del dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina; 10 ng/mL de bFGF; 10 ng/mL de LIF; 1% del antibiótico; 10 ng/mL de insulina; 0,55 mg/mL de transferrina; y 0,5 µg/mL de selenio y, opcionalmente, 10 µg/mL de putrescina y 10 ng/mL de EGF.

Este documento también presenta una composición que incluye una población purificada de ULSCs y un medio de cultivo, en donde el medio de cultivo incluye un medio de crecimiento con bajo contenido en glucosa; suero al 10% a 20%; 0,7 a 1,5% de un dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina; 1-100 ng/mL de un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en bFGF, LIF y EGF; y 1 a 3% de un antibiótico, en donde las ULSCs son positivas para CD105, CD106, CD90, CD73, SSEA-4 y STRO-1, y negativas para CD45, CD34, CD19 y HLA-DR. Las ULSCs expresan OCT4 y Nanog, y no expresan SOX2. El medio de cultivo puede incluir, además, 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de insulina; 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de transferrina; 0,1 µg/mL a 100 µg/mL de selenio; y 0,5 a 1,5% de piruvato sódico y, opcionalmente, 0,05 µg/mL a 100 µg/mL de putrescina y 1 ng/mL a 100 ng/mL de EGF. La composición puede incluir, además, un crioprotector.

En otro aspecto, este documento presenta una población purificada de ULSCs, en donde las células son positivas para CD105, CD106, CD90, CD73, SSEA-4 y STRO-1, negativas para CD45, CD34, CD19 y HLA-DR, expresan OCT4 y Nanog, y no expresan Sox2. Las células son capaces de diferenciarse en células de linaje mesodérmico (p. ej., células adipogénicas, células osteogénicas, células condrogénicas y cardiogénicas) o de linaje ectodérmico (p. ej., células neurogénicas). En algunas realizaciones, las células han sufrido al menos 50, 60, 70, 80 ó 90 duplicaciones en cultivo. Las células pueden incluir un ácido nucleico exógeno, p. ej., un ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido. Las células pueden estar alojadas dentro de un armazón. En algunas realizaciones, el armazón es biodegradable. Un armazón biodegradable puede estar compuesto de colágeno.

Este documento también presenta un método para cultivar una población de ULSCs. El método incluye obtener una población de ULSCs de cordón umbilical humano, en donde las ULSCs son positivas para CD105, CD106, CD90, CD73, SSEA-4 y STRO-1, negativas para CD45, CD34, CD 19 y HLA-DR, expresan OCT4 y Nanog, y no expresan Sox2; y cultivar las células en presencia de un medio de crecimiento con bajo contenido en glucosa, suero al 10% a 20%; 0,7 a 1,5% de un dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina; 1-100 ng/mL de un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en bFGF, LIF y EGF; y 1 a 3% de un antibiótico. El medio de crecimiento con bajo contenido en glucosa puede incluir, además, 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de insulina; 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de transferrina; 0,1 µg/mL a 100 µg/mL de selenio; y de 0,5 a 1,5% de piruvato sódico. En algunas realizaciones, el medio de crecimiento con bajo contenido en glucosa incluye, además, 0,05 µg/mL a 100 µg/mL de putrescina y 1 ng/mL a 100 ng/mL de EGF.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria para poner en práctica la invención, métodos y materiales adecuados se describen más adelante. En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 contiene histogramas de ULSCs prenatales (paneles de la izquierda) o adultas (paneles de la derecha) sometidos a FACS para los marcadores de superficie celular CD105, CD166, CD19, CD34, HLA-DR, LIN, CD106, CD117, CD133, CD73, CD44, CD45, CD90, HLA-ABC, SSEA-4 y STRO-1.

La FIG. 2 contiene una imagen representativa de un gel a partir del análisis RT-PCR de OCT-4, Nanog, SOX-2 y glucosa-6-fosfato en células control NT2 (pista 1), tejido gonadal (pista 2), tejido de cordón umbilical prenatal (pista 3), tejido de cordón umbilical adulto (pista 4), ULSCs prenatales pasaje 3 (pista 5); ULSCs prenatales pasaje 2 (pista 6), ULSCs prenatales pasaje 1 (pista 7), ULSCs adultas pasaje 1 (pista 8), ULSCs adultas pasaje 2 (pista 9), y ULSCs adultas pasaje 3 (pista 10).

Los símbolos de referencia iguales en los diversos dibujos indican elementos iguales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En general, este documento proporciona poblaciones purificadas de células madre de revestimiento del cordón umbilical (ULSCs) de cordón umbilical humano y métodos y materiales para la obtención de dichas células. Las ULSCs descritas en esta memoria tienen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse en células de diversos tipos de tejidos, incluyendo células adipogénicas, células osteogénicas, células condrogénicas, neurogénicas y células cardiogénicas. Los métodos y materiales descritos en esta memoria permiten aislar y expandir ULSCs a números terapéuticamente eficaces en menos de 3 semanas, haciendo que los métodos y las células sean particularmente útiles para la medicina regenerativa. Las ULSCs también se pueden modificar de manera que las células pueden producir uno o más polipéptidos u otros compuestos terapéuticos de interés.

Poblaciones y líneas clonales de ULSCs

Poblaciones purificadas de ULSCs pueden obtenerse a partir del revestimiento de un cordón umbilical humano. Tal como se utiliza en esta memoria, "purificadas" significa que al menos 90% (p. ej., 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99%) de las células dentro de la población son ULSCs. Tal como se utiliza en esta memoria, "ULSCs" se refiere a células humanas que son positivas para CD105, CD106, CD90, CD73, SSEA-4 y STRO-1, negativas para CD45, CD34, CD19 y HLA-DR, expresan OCT-4 y Nanog y no expresan Sox2. "Población de ULSC" se refiere al cultivo primario obtenido a partir de la muestra de cordón umbilical humano y la progenie no clonada de la misma. "Línea clonal" se refiere a una línea celular derivada de una sola célula. Tal como se utiliza en esta memoria, una "línea celular" es una población de células capaces de renovarse por sí mismas durante períodos prolongados de veces *in vitro* bajo condiciones de cultivo apropiadas. El término "línea", sin embargo, no indica que las células puedan propagarse indefinidamente.

Poblaciones de ULSC pueden aislarse a partir de cordones umbilicales obtenidos con consentimiento informado. Típicamente, después de obtener un cordón umbilical en un hospital o clínica, el cordón se coloca en una disolución de conservación hipotérmica tal como una disolución de FRS de Biolife Solutions (nº de catálogo HTS-FRS) y se almacena a 4°C. Para comenzar el aislamiento de ULSCs, la disolución de conservación hipotérmica puede separarse por lavado en un tampón, tal como una disolución de sal básica de Hank, que esté libre de Mg^{2+} , Ca^{2+} y libre de fenol. El cordón umbilical se puede cortar en secciones transversales en presencia de un tampón, y luego las secciones transversales se puede cortar longitudinalmente en dos trozos, evitando al mismo tiempo cualquier tejido venoso o arterial. Si se libera algo de sangre en el tampón durante el corte el cordón, el tampón contaminado es reemplazado por tampón reciente. Los trozos longitudinales de cordón pueden ser disecados para separar el tejido venoso y arterial de manera que el revestimiento de cordón resultante (es decir, el material de cordón gelatinoso) esté sustancialmente libre de tejido venoso y arterial. Tal como se utiliza en esta memoria, "sustancialmente libre de tejido venoso y arterial" indica que con una disección manual se ha separado lo más posible tejido venoso y arterial visible.

Las ULSCs se pueden obtener del revestimiento de cordón diseccionado mediante el cultivo de trozos longitudinales de revestimiento de cordón sobre un sustrato sólido recubierto de fibronectina (p. ej., un dispositivo de cultivo de plástico tal como un matraz de deslizamiento o de cultivo con cámaras). La superficie gelatinosa del revestimiento del cordón se puede colocar en contacto con el sustrato sólido recubierto de fibronectina, mientras que la superficie superior (es decir, la superficie no en contacto con el sustrato sólido recubierto de fibronectina) puede ser cubierta con un sustrato sólido, tal como un cubreobjetos. Se puede añadir medio de crecimiento con bajo contenido en glucosa (es decir, ≤ 1 g/L de glucosa) y el dispositivo de cultivo se puede incubar durante un tiempo suficiente para que las células migren desde el revestimiento del cable al sustrato sólido recubierto de fibronectina (p. ej., 7 a 10 días). A menos que se indique lo contrario, las células se cultivan a 37°C en una atmósfera estándar que incluye 5% de CO_2 . La humedad relativa se mantiene a aproximadamente 100%. Después de que las ULSCs se hayan adherido a la superficie del sustrato sólido recubierto de fibronectina, el cubreobjetos se puede retirar, y las células adheridas se pueden lavar en un tampón tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Un medio de crecimiento que puede utilizarse para el cultivo de ULSCs es medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) con bajo contenido en glucosa que contiene vitaminas (cloruro de colina, pantotenato de D-calcio, ácido fólico, nicotinamida, hidrocloreuro de piridoxal, riboflavina, hidrocloreuro de tiamina e i-inositol), y aminoácidos no esenciales (glicina, L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-prolina y L-serina). DMEM con bajo contenido en glucosa puede ser suplementado con suero al 10% a 20% (p. ej., suero bovino fetal (FBS) o suero humano), uno o más antibióticos (p. ej., gentamicina, penicilina o estreptomycinina) y la glutamina o un dipéptido

estabilizado de L alanil-L-glutamina (p. ej., GlutaMax de Invitrogen). En una realización, un medio de crecimiento puede incluir DMEM con bajo contenido en glucosa que contiene vitaminas y aminoácidos no esenciales, FBS al 15%, antibiótico al 1 a 3% (p. ej., gentamicina al 2% o 2X) y 0,7 a 1,5% (p. ej., 1%) de glutamina o un dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina. Un medio de crecimiento de este tipo se puede suplementar, además, con 1 a 100 ng/mL de un factor de crecimiento (p. ej., factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor inhibidor de la leucemia (LIF) o factor de crecimiento epidérmico (EGF).

En algunas realizaciones, un medio de crecimiento incluye, además, insulina, transferrina, selenio y piruvato sódico. Un medio de crecimiento particularmente útil puede incluir DMEM con bajo contenido en glucosa que contiene vitaminas y aminoácidos no esenciales, suero al 15%, antibiótico al 1 a 3% (p. ej., gentamicina al 2% o 2X) y 0,7 a 1,5% de glutamina o un dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina (p. ej., GlutaMax al 1% o 1X), 1 a 100 ng/mL de un factor de crecimiento (p. ej., 10 ng/mL de bFGF y 10 ng/mL de LIF), 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de insulina (10 mg/mL), 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de transferrina (p. ej., 0,55 mg/mL de transferrina), 0,1 µg/mL a 100 µg/mL de selenio (p. ej., 0,5 µg/mL de selenio) y 0,5 a 1,5% de piruvato sódico (p. ej., piruvato sódico al 1%). En algunas realizaciones, un medio de crecimiento de este tipo incluye, además, 0,05 µg/mL a 100 µg/mL de putrescina (p. ej., 10 µg/mL de putrescina) y 10 ng/mL de EGF. Para realizaciones en las que se desea un medio libre de animales, se puede utilizar suero humano (p. ej., suero humano al 15%) en lugar de suero bovino fetal.

Para subcultivar ULSCs, se puede utilizar TrypZean (Sigma Chemical Co.) para liberar células del sustrato sólido. La suspensión de células resultante se puede sedimentar y lavar con PBS, a continuación sembrar en matraces de cultivo celular en aproximadamente 1000 células/cm² en un medio de crecimiento.

Líneas clonales de ULSCs se pueden establecer mediante la siembra de células a una alta dilución y utilizando anillos de clonación (p. ej., de Sigma) para aislar colonias individuales procedentes de una sola célula. Las células se obtienen de dentro del anillo de clonación utilizando tripsina. Luego se vuelven a sembrar en un pocillo de una placa de múltiples pocillos (p. ej., una placa de 6 pocillos). Después de que las células hayan alcanzado > 60% de confluencia (p. ej., > 70% de confluencia), las células se pueden transferir a un matraz de cultivo mayor para una expansión adicional.

Las ULSCs se pueden evaluar en cuanto a la viabilidad, el potencial de proliferación y la longevidad utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la viabilidad se puede evaluar utilizando ensayos de exclusión con azul de tripano, ensayos de captación de diacetato de fluoresceína o ensayos de captación de yoduro de propidio. La proliferación puede evaluarse utilizando ensayos de captación de timidina o ensayos de proliferación celular MTT. La longevidad se puede evaluar mediante la determinación del número máximo de duplicaciones de la población de un cultivo extendido.

Las ULSCs pueden caracterizarse inmunofenotípicamente utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, las células se pueden fijar (p. ej., en paraformaldehído), permeabilizar y los sitios reactivos se pueden bloquear (p. ej., con albúmina de suero), a continuación, se pueden incubar con un anticuerpo que tiene afinidad de unión por un antígeno de la superficie celular tal como CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106, SSEA-4, STRO-1 y HLA-DR o cualquier otro antígeno de la superficie celular. El anticuerpo se puede marcar de forma detectable (p. ej., por fluorescencia o enzimáticamente) o se puede detectar utilizando un anticuerpo secundario que está marcado de forma detectable. En algunas realizaciones, los antígenos de la superficie celular en ULSCs se pueden caracterizar utilizando citometría de flujo y anticuerpos marcados por fluorescencia.

Las ULSCs también se pueden caracterizar sobre la base de la expresión de uno o más genes. Métodos para detectar la expresión del gen pueden incluir, por ejemplo, medir los niveles de ARNm o proteína de interés (p. ej., mediante transferencia Northern, PCR con transcriptasa inversa (RT), análisis de micro-matrices, transferencia Western, ELISA o la tinción inmunohistoquímica).

Tal como se describe en esta memoria, las ULSCs generalmente son positivas para los marcadores de la superficie celular CD105, CD106, CD90, CD73, SSEA-4 y STRO-1, y negativas para CD45, CD34, CD19 y HLA-DR, expresan OCT-4 y Nanog, y no expresan Sox2. Tal como se utiliza en esta memoria, la frase "no expresan" indica que el ARNm no se detectó en comparación con controles positivos y negativos adecuados procesados y analizados en condiciones similares. Este conjunto de marcadores de la superficie celular, incluyendo CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106, STRO-1, SSEA-4 y HLA-DR, y el perfil de expresión para Oct4, Nanog y Sox2 se puede utilizar para identificar ULSCs, y para distinguir ULSCs de otros tipos de células madre.

Las ULSCs se pueden crioconservar suspendiendo las células (p.ej., hasta 5×10^6 células/mL) en un crioconservante tal como dimetilsulfóxido (DMSO, típicamente al 10%). En algunas realizaciones, se utiliza un medio de congelación tal como CryoStor de Biolife solutions para crioconservar las células. Después de añadir crioconservante, las células pueden congelarse (p. ej., a -90°C). En algunas realizaciones, las células se congelan a una velocidad controlada (p. ej., se controlan electrónicamente o mediante la suspensión de las células en un baño de etanol al 70%) y se colocan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Cuando las células se enfrían bruscamente a -90°C , se pueden colocar en la fase líquida del tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo. La crioconservación puede permitir el almacenamiento a largo plazo de estas células para uso terapéutico.

10 *Diferenciación de ULSCs*

Las ULSCs son capaces de diferenciarse en una diversidad de células del linaje mesodermo, incluyendo células adipogénicas, células osteogénicas, células condrogénicas y células cardiogénicas, así como las células del linaje ectodermo (p. ej., células neurogénicas). Tal como se utiliza en esta memoria, "capaz de diferenciarse" significa que una célula dada, o su progenie, puede proceder a un fenotipo diferenciado en las condiciones de cultivo apropiadas. La diferenciación puede ser inducida utilizando uno o más agentes de diferenciación, incluyendo cualquier producto químico, citoquina, proteína, péptido o cualquier otra sustancia que sea capaz de inducir la diferenciación de una célula. Ejemplos de agentes de diferenciación no limitantes incluyen, sin limitación, Ca^{2+} , un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), un factor de crecimiento transformante (TGF), citoquinas tales como una interleucina, un interferón, o factor de necrosis tumoral, ácido retinoico, transferrina, hormonas (p. ej., andrógenos, estrógenos, insulina, prolactina, triyodotironina, hidrocortisona o dexametasona), butirato sódico, TPA, DMSO, NMF (N-metilformamida), DMF (dimetilformamida), o elementos de la matriz tales como colágeno, laminina sulfato de heparano.

La determinación de que las ULSCs se han diferenciado en un tipo de célula particular se puede evaluar utilizando métodos conocidos, incluyendo midiendo cambios en la morfología y marcadores de la superficie celular (p. ej., mediante citometría de flujo o inmunohistoquímica), examinando la morfología mediante microscopía óptica o confocal o midiendo los cambios en la expresión del gen utilizando técnicas tales como PCR o el perfilado de la expresión génica.

Por ejemplo, las ULSCs pueden ser inducidas a diferenciarse en células osteogénicas utilizando un medio de inducción (p. ej., medio de Diferenciación Osteogénica AdvanceSTEM™, n° de catálogo SH30881.02 de HyClone o medio de Diferenciación Osteogénica de Lonza, n° de catálogo PT-3002). Típicamente, los medios de inducción osteogénica contienen dexametasona, L-glutamina, ascorbato y β -glicerofosfato (Jaiswal *et al*, *J. Biol Chem* 64(2):295-312 (1997)) y en algunas realizaciones, antibióticos tales como penicilina y estreptomina. La diferenciación osteogénica se puede detectar mediante ensayos en cuanto a la presencia de marcadores osteogénicos que incluyen, pero no se limitan a osteopontina (OP), osteocalcina (OC), osteonectina (ON), sialoproteína ósea y Distal-less homeobox 5 (DLX5). La osteogénesis también se puede detectar utilizando la tinción de von Kossa (Jaiswal *et al*, *supra* y/o la tinción con rojo de alizarina (Wan *et al*, *Chin. J. Traumatol.* 5:374-379 (2002)), que detectan la presencia de depósitos de calcio.

Las ULSCs pueden ser inducidas a diferenciarse en células adipogénicas utilizando un medio de inducción (p. ej., Medio de Diferenciación Adipogénica AdvanceSTEM™ de HyClone, n° de catálogo SH30886.02; o Medio de Diferenciación Adipogénica, n° de catálogo PT-3004, de Lonza). Típicamente, los medios de diferenciación adipogénica contienen insulina humana, L-glutamina, dexametasona, indometacina y 3-isobutil-1-metil-xantina. Por ejemplo, las ULSCs pueden cultivarse en medio de Diferenciación de Adipogénesis durante 3 días (a 37°C , 5% de CO_2), seguido de 1 día de cultivo en Medio de Mantenimiento de Adipogénesis (n° de catálogo PT-3102A, de Lonza) que contiene insulina humana y L-glutamina. Después de 3 ciclos completos de inducción/mantenimiento, las células pueden ser cultivadas durante 7 días adicionales en Medio de Mantenimiento de Adipogénesis, reemplazando el medio cada 2-3 días.

Células adipogénicas contienen liposomas cargados de lípidos que pueden ser visualizados con la tinción Oil Red (Conget y Minguell, *J. Cellular Physiology* 181:67-73, (1999)). Células de este tipo también contienen triglicéridos que emiten fluorescencia verde con tinción de Rojo Nilo (Fowler y Greenspan, *Histochem. Cytochem.* 33:833-836 (1985)). La diferenciación adipogénica también se puede evaluar mediante el ensayo en cuanto a la presencia de factores de transcripción adipogénica PPAR γ 2 (receptor activado por proliferador de peroxisoma activado gamma)

y/o CEBP α (CCAAT/proteína alfa de unión al potenciador), o para la lipoproteína lipasa por métodos tales como inmunohistoquímica y RT-PCR.

Las ULSCs pueden ser inducidas a diferenciarse en células condrogénicas utilizando un medio de inducción (p. ej., Medio de Diferenciación Condrogénica AdvanceSTEM™ de HyClone, nº de catálogo SH30889.02, o Medio de Diferenciación Condrogénica de Lonza, nº de catálogo PT-3003). Típicamente, los medios de diferenciación condrogénica contienen dexametasona, ascorbato, piruvato sódico, prolina, L-glutamina y TGF- β 3. Células condrogénicas contienen sulfato proteoglicanos que pueden ser visualizados con tinción Azul de Alcian. Células de este tipo también contienen colágeno de Tipo II. La diferenciación condrogénica también se puede evaluar mediante el ensayo en cuanto a la presencia de agregano y/o proteína de enlace.

Las ULSCs pueden ser inducidas a diferenciarse en células neurogénicas utilizando un medio de inducción. Típicamente, los medios de diferenciación neurogénica contienen factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y EGF; o sonic hedgehog (SHH), FGF y bFGF; EGF o factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y factor neurotrófico derivado de glía (GDNF)). El ácido retinoico (RA) y ácido ascórbico también se pueden incluir en un medio de diferenciación neurogénica. Por ejemplo, las ULSCs pueden cultivarse en placas revestidas con fibronectina o Matrigel™ en presencia de medios que contienen putrescina y factores de crecimiento (bFGF y EGF, o SHH, FGF8 y bFGF) durante 12 días, en donde RA se añade a los cultivos de los días 10-12. Después de la incubación en dichos medios durante 12 días, los medios pueden ser reemplazados por medios que contienen EGF o BDNF, GDNF y ácido ascórbico, y las células se pueden incubar durante otros 14 días. La diferenciación neurogénica puede evaluarse mediante ensayo en cuanto a la presencia de nestina, beta-tubulina clase III (tubulina β -4), proteína de carácter ácido fibrilar glial (GFAP), enolasa neuro-específica (NSE), proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) o galactocerebrósido (GalC).

Las ULSCs pueden ser inducidas a diferenciarse en células cardiogénicas utilizando un medio de inducción. Típicamente, los medios de diferenciación cardiogénica contienen 5-AZA-2'-desoxicitidina (Aza). La diferenciación cardiogénica se puede evaluar mediante el ensayo en cuanto a la presencia de marcadores cardiacos tales como demin, troponina I, troponina T o factor natriurético atrial (ANF).

En algunas realizaciones, las ULSCs pueden cultivarse o sembrarse en armazones biocompatibles. Armazones de este tipo pueden actuar como un marco que soporta el crecimiento de las células en múltiples capas. Los armazones se pueden moldear en la forma deseada para facilitar el desarrollo de tipos de tejidos. Por ejemplo, las células pueden ser sembradas en un armazón y pueden ser inducidas a diferenciarse en células osteogénicas o células condrogénicas tal como se comentó anteriormente.

Típicamente, el armazón se forma a partir de colágeno o un material polimérico. Armazones biodegradables son particularmente útiles, de manera que después de la implantación en un animal, el armazón puede ser absorbido en la materia animal con el tiempo. Armazones poliméricos adecuados se pueden formar a partir de monómeros tales como ácido glicólico, ácido láctico, fumarato de propilo, caprolactona, hialuronano, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos. Otros armazones pueden incluir proteínas, polisacáridos, ácidos polihidroxilados, poliortoésteres, polianhídridos, polifosfacenos, polímeros sintéticos (en particular, polímeros biodegradables) y combinaciones de los mismos. El armazón también puede incluir hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y morfógenos (p. ej., ácido retinoico), moléculas de la matriz extracelular deseadas (por ejemplo, fibronectina), u otros materiales (p. ej., ADN, virus, otros tipos de células, etc.). Véase, p. ej., la patente de EE.UU. Nº 7.470.537.

Las ULSCs se pueden cargar en el armazón empapando el armazón en una disolución o suspensión que contiene las ULSCs, o las ULSCs se pueden infundir o inyectar en el armazón. En otras realizaciones, se puede formar un hidrogel reticulando una suspensión que incluye el polímero deseado y las ULSCs, permitiendo que las ULSCs se dispersen por todo el armazón. Para dirigir el crecimiento y la diferenciación de la estructura deseada, el armazón que contiene las ULSCs puede cultivarse *ex vivo* en un biorreactor o incubadora, según sea apropiado. En otras realizaciones, el armazón que contiene las ULSCs puede ser implantado dentro de un animal huésped directamente en el sitio en el que se desea que crezca el tejido o la estructura. En todavía otra realización, el armazón que contiene las ULSCs puede ser injertado en un huésped (típicamente un animal tal como un cerdo), en donde puede crecer y madurar hasta que esté listo para su uso.

Poblaciones modificadas de ULSCs

Las ULSCs pueden ser modificadas de manera que las células puedan producir uno o más polipéptidos u otros compuestos terapéuticos de interés. Para modificar las células aisladas de tal manera que se produzca un

polipéptido u otro compuesto terapéutico de interés, el ácido nucleico exógeno apropiado debe ser suministrado a las células. En algunas realizaciones, las células son transfectadas de forma transitoria, lo que indica que el ácido nucleico exógeno es episomal (es decir, no está integrado en el ADN cromosómico). En otras realizaciones, las células son transfectadas de forma estable, es decir, el ácido nucleico exógeno está integrado en el ADN cromosómico de la célula huésped. El término "exógeno", tal como se utiliza en esta memoria con referencia a un ácido nucleico y, en particular, una célula, se refiere a cualquier ácido nucleico que no se origina a partir de esa célula particular tal como se encuentra en la naturaleza. Además, el término "exógeno" incluye un ácido nucleico que se produce de forma natural. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que es aislado a partir de una célula humana es un ácido nucleico exógeno con respecto a una segunda célula humana, una vez que el ácido nucleico se introduce en la segunda célula humana. El ácido nucleico exógeno que se suministra típicamente es parte de un vector en el que un elemento regulador tal como un promotor está unido operativamente al ácido nucleico de interés.

Las células pueden tratarse mediante ingeniería genética utilizando un vector viral tal como un vector de adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), retrovirus, lentivirus, virus vacuna, virus del sarampión, virus herpes o virus del papiloma bovino. Véase, Kay *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12744-12746 (1997) para una revisión de los vectores virales y no virales. Un vector también puede introducirse utilizando medios mecánicos tales como captación liposomal o mediada por compuestos químicos del ADN. Por ejemplo, un vector puede ser introducido en ULSCs por métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transfección, transformación, transducción, electroporación, infección, micro-inyección, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, liposomas, LIPOFECTIN™, fusión de lisosomas, lípidos catiónicos sintéticos, uso de una pistola de genes o un transportador de vectores de ADN.

Un vector puede incluir un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable. Ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables incluyen puromicina, adenosina desaminasa (ADA), aminoglicósido fosfotransferasa (neo, G418, APH), dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa, timidina quinasa (TK) y xantina fosforribosiltransferasa (XGPRT). Marcadores de este tipo son útiles para la selección de transformantes estables en cultivo.

Las ULSCs también pueden tener una modificación de genes dirigida. Métodos de recombinación homóloga para introducir modificaciones de genes específicos son conocidos en la técnica. Para crear ULSCs homólogas recombinantes, se puede preparar un vector de recombinación homóloga en el que un gen de interés está flanqueado en sus extremos 5' y 3' por secuencias de genes que son endógenas al genoma de la célula diana, para permitir que se produzca una recombinación homóloga entre el gen de interés portado por el vector y el gen endógeno en el genoma de la célula diana. Las secuencias de ácidos nucleicos flanqueantes adicionales son de longitud suficiente para una recombinación homóloga con éxito con el gen endógeno en el genoma de la célula diana. Típicamente, varias kilobases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como 3') se incluyen en el vector. Métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos a partir de células madre recombinantes se conocen comúnmente en la técnica (véase, p. ej., Thomas y Capecchi, *Cel* 51:503(1987); Bradley, *Curr. Opin. Bio/Technol.* 2:823-29 (91); y Publicaciones PCT N°s. WO 90/11354, WO 91/01140 y WO 93/04169.

Composiciones y Artículos de Manufactura

Este documento también presenta composiciones y artículos de manufactura que contienen poblaciones purificadas de ULSCs o líneas clonales de ULSCs. En algunas realizaciones, la población purificada de ULSCs o línea clonal está alojada dentro de un recipiente (p. ej., un vial o bolsa). En otras realizaciones, un medio de cultivo (p. ej., medio de crecimiento libre de animales) está incluido en la composición o artículo de manufactura. En todavía otras realizaciones, la composición o artículo de manufactura puede incluir uno o más crioprotectores. En algunas realizaciones, las ULSCs o líneas clonales se pueden formular como composiciones farmacéuticas.

Generalmente, una composición farmacéutica incluye un soporte, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable y se formula para un modo de suministro previsto, p. ej., intravenoso, subcutáneo o intramuscular, o cualquier otra vía de administración descrita en esta memoria. Por ejemplo, una composición farmacéutica para la administración intravenosa puede incluir una solución fisiológica, tal como solución salina fisiológica y agua, lactato de Ringer, dextrosa en agua, solución salina equilibrada de Hank (HBSS), Isolyte S, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio celular exento de suero (p. ej., RPMI). Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir, p. ej., agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil-parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como

acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH de una composición se puede ajustar con ácidos o bases tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico.

Las composiciones farmacéuticas deberían ser estables bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento y deben preservarse contra la contaminación potencial por microorganismos tales como bacterias y hongos. Una prevención de la contaminación por microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, p. ej., antibióticos tales como aminoglucósidos (p. ej., kanamicina, neomicina, estreptomycin y gentamicina), ansaínas (ansamícinas) y quinalonas.

La composición farmacéutica puede formularse para que incluya uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, una composición se puede formular para que incluya uno o más factores de crecimiento y/o uno o más agentes anti-inflamatorios, incluyendo fármacos no esteroideos anti-inflamatorios, dexametasona u otros tipos esteroideos glucocorticoides, PDGF, EGF, factor de crecimiento de fibroblastos 2, factor de células madre, una proteína morfogenética ósea (BMP) tal como BMP-2 o BMP-7, metilsulfonilmetano (MSM), glucosamina o sulfato de condroitina.

Poblaciones purificadas de ULSCs o líneas clonales de ULSC se pueden combinar con material de envasado y venderse como un kit. El material de envasado incluido en un kit contiene típicamente instrucciones o una etiqueta que describe cómo se pueden cultivar, diferenciar o utilizar las poblaciones purificadas de ULSCs o líneas clonales. Componentes y métodos para producir este tipo de kits son bien conocidos.

Un artículo de manufactura o kit también puede incluir uno o más reactivos para la caracterización de una población de ULSCs o una línea clonal de ULSC. Por ejemplo, un reactivo puede ser una sonda o cebador de ácido nucleico para detectar la expresión de un gen tal como Oct4, Nanog o Sox2. Una sonda o cebador de ácido nucleico de este tipo puede ser marcado (p. ej., por fluorescencia o con un radioisótopo) para facilitar la detección. Un reactivo también puede ser un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica para un marcador de la superficie celular tal como CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106, STRO-1, SSEA-4 o HLA-DR. Un anticuerpo se puede marcar de forma detectable (p. ej., por fluorescencia o enzimáticamente). Otros componentes tales como un armazón (p. ej., un armazón compuesto de colágeno) también pueden ser incluidos en una composición o artículo de manufactura. El armazón puede sembrarse con ULSCs tal como se describe anteriormente.

Métodos de Uso de ULSCs

Poblaciones de ULSCs o líneas clonales de ULSCs se pueden utilizar para tratar sujetos que tienen una diversidad de trastornos o lesiones. Las ULSCs o líneas clonales se pueden suministrar a un sujeto de diversas maneras según sea apropiado para suministrar células madre, incluyendo, pero no limitadas a las vías de administración oral o parenteral tales como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intratecal, intraarterial o nasal. En algunas realizaciones, se pueden utilizar dos o más vías de administración para suministrar las células madre. En otras realizaciones, las células se suministran a un sitio de la lesión.

Cantidades eficaces de ULSCs o líneas clonales se pueden determinar por un médico, teniendo en cuenta diversos factores tales como estado general de la salud, peso corporal, sexo, dieta, tiempo y vía de administración, otras medicaciones y cualesquiera otros factores clínicos relevantes. En algunas realizaciones, entre 500.000 y 2.000.000 (p. ej., 500.000 a 1.000.000; 500.000 a 750.000; 750.000 a 1.000.000; 750.000 a 2.000.000; 750.000 a 1.500.000; 1.000.000 a 2.000.000; 1.000.000 a 1.500.000; o 1.500.000 a 2.000.000) células madre/kg de peso del sujeto se pueden suministrar al sujeto en total. En algunas realizaciones, aproximadamente $1,2 \times 10^6$ ULSCs/kg de peso del sujeto se suministran al sujeto.

En algunas realizaciones, entre 500.000 y 500.000.000 (p. ej., 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 ó 5×10^8) ULSCs/kg de peso del sujeto se pueden suministrar al sujeto en total.

En algunas realizaciones, las ULSCs se suministran al sujeto sólo una vez. En algunas realizaciones, se realizan múltiples (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 20 o más) suministros. Por ejemplo, se pueden realizar múltiples suministros de ULSCs en el transcurso de varios (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 14, 21, 28 ó 31 o más) días consecutivos (p. ej., un suministro cada día durante

siete días o un suministro cada dos días durante siete días). Las ULSCs se pueden suministrar a un sujeto durante varios meses (p. ej., un suministro al mes durante seis meses, o un suministro por semana durante dos meses).

Las ULSCs se pueden suministrar a un sujeto en diversos momentos después de un diagnóstico de lesión o enfermedad. Por ejemplo, las células pueden ser suministradas inmediatamente después de una lesión (p. ej., de 1 a 8 tal como 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 u 8 horas después de que se produzca la lesión). Las células se pueden suministrar a un sujeto menos de 10 (p. ej., 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1) días después de que se produzca una lesión. Las células se pueden suministrar a un sujeto menos de 6 (p. ej., 5, 4, 3, 2 ó 1) semanas después de que se produzca una lesión. En algunas realizaciones, las ULSCs se pueden suministrar a un sujeto hasta 10 (p. ej., 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1) años después de que se produzca una lesión. Las composiciones y los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar en cualquier momento después de una lesión o durante el curso de una lesión crónica.

Se entiende que, independientemente del sitio, de la combinación de sitios, de la vía de administración, de la combinación de vías, se suministra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de ULSCs (o una composición que incluye las ULSCs). Tal como se utiliza en esta memoria, una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición o ULSCs es la cantidad que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se suministran la composición o las células. La cantidad eficaz puede ser la cantidad eficaz para conseguir una tasa de supervivencia mejorada, una recuperación más rápida, una mejora en la calidad de vida, o una mejora o eliminación de uno o más síntomas asociados con el estado de un sujeto.

La eficacia de un tratamiento dado en el tratamiento de un trastorno particular o una lesión se puede definir como una mejora de uno o más síntomas del trastorno o lesión en al menos 5% (p. ej., al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65% o más). En algunos casos, la eficacia de un tratamiento con ULSCs puede determinarse a partir de la estabilización de uno o más síntomas asociados con el empeoramiento de la lesión (es decir, los tratamientos reducen el empeoramiento de uno o más síntomas de la lesión). ULSCs o composiciones farmacéuticas que contienen ULSCs se pueden administrar a un sujeto en combinación con otro tratamiento, p. ej., un tratamiento para una lesión de hueso. Por ejemplo, al sujeto se puede administrar uno o más agentes adicionales que proporcionan un beneficio terapéutico al sujeto que tiene una lesión de hueso. Agentes terapéuticos adicionales incluyen, p. ej., factores de crecimiento y/o agentes anti-inflamatorios (p. ej., fármacos anti-inflamatorios no esteroides, dexametasona u otros tipos de esteroides glucocorticoides, PDGF, EGF, factor de crecimiento de fibroblastos 2, factor de células madre, un proteína morfogenética ósea (BMP) tal como BMP-2 o BMP-7, metilsulfonilmetano (MSM), glucosamina o sulfato de condroitina. Las ULSCs o composiciones farmacéuticas y el uno o más agentes adicionales se pueden administrar al mismo tiempo o secuencialmente.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Composiciones para el Cultivo y la Expansión de ULSCs

Las siguientes composiciones se prepararon para su uso en el cultivo y expansión de ULSCs:

Composición 1 (Medio de Crecimiento de ULSC):

DMEM, bajo contenido en glucosa y libre de fenol (nº de catálogo 11054-020, Invitrogen)
Suero Bovino Fetal (FBS) al 15% que se caracteriza o es de selección suprema (nº de catálogo SH30611.02, HyClone)

GlutaMAX 1X o al 1% (nº de catálogo 35050-061, Invitrogen)

Gentamicina 2X o al 2% (sulfato de gentamicina 60, 80 ó 100 mg, nº de catálogo 0409-3400-01, 0409-3401-01, 0409-3402-01 o, respectivamente, de Hospira; o cultivo celular de gentamicina 50 mg, nº de catálogo 15750-060, Invitrogen)

Disolución de vitamina MEM 1X o al 1% (nº de catálogo 11120-052, Invitrogen)

NEAA (aminoácidos no esenciales) de MEM 1X o al 1% (nº de catálogo 11140-050, Invitrogen).

Composición 2:

DMEM, bajo contenido en glucosa (libre de fenol)

Suero Bovino Fetal (FBS) al 15% que se caracteriza o es de selección suprema

GlutaMAX 1X o al 1%

Gentamicina 2X o al 2%

5 Disolución de vitamina MEM 1X o al 1%

NEAA de MEM 1X o al 1%

10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (nº de catálogo 1008, CellGenix, bFGF recombinante humano)

10 ng/mL de factor inhibidor de la leucemia (LIF) (nº de catálogo L5283, Sigma, LIF recombinante humano).

10 Composición 3:

DMEM bajo contenido en glucosa (libre de fenol)

Suero Humano A/B (HS-A/B) al 15% (HS-A/B, obtenido de Sigma, nº de catálogo H4522; Atlanta Biologicals, nº de catálogo S40110, o Gemini BioProducts, nº de catálogo 100-512)

GlutaMAX 1X o al 1%

15 Gentamicina 2X o al 2%

Disolución de vitamina MEM 1X o al 1%

NEAA de MEM 1X o al 1%

1,0 mg/mL de insulina (insulina humana, recombinante de *S. cerevisiae*, nº de catálogo 19278, Sigma; insulina humana, recombinante de *E. coli*, nº de catálogo Huminilin N, Eli Lilly and Co.; o nº de catálogo 12585-014,

20 Invitrogen, 4 mg/mL de disolución de insulina humana recombinante)

0,55 mg/mL de transferrina (holo-transferrina humana, Mebiopharm Co., Ltd.)

0,5 µg/mL de selenio (selenita de sodio, nº de catálogo S9133, Sigma)

Piruvato sódico 1X o al 1% (hybrid-Max, nº de catálogo P3662-100G, Sigma; o disolución 100 mM, nº de catálogo S8636-100ML, Sigma)

25 10 ng/mL de bFGF

10 ng/mL de LIF.

Composición 4:

DMEM bajo contenido en glucosa (libre de fenol)

Suero humano A/B al 15%

30 GlutaMAX 1X o al 1%

Gentamicina 2X o al 2%

Disolución de vitamina MEM 1X o al 1%

NEAA de MEM 1X o al 1%

1,0 mg/mL de insulina

35 0,55 µg/mL de transferrina

0,5 µg/mL de selenio

Piruvato sódico 1X o al 1%

10 µg/mL de putrescina (nº de catálogo P6024, Sigma)

10 ng/mL de bFGF

40 10 ng/mL de LIF.

10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (nº de catálogo E9644, Sigma, EGF recombinante humano)

Ejemplo 2 - Obtención, Cultivo y Expansión de ULSCs

Cordones umbilicales (UCs) se obtuvieron a través de un protocolo aprobado por IRB con el consentimiento informado adecuado en una clínica u hospital. En la preparación para el cultivo de explantes de UCs, 1 ml de fibronectina humana (1 µg/mL, nº de catálogo F0895, Sigma) se añade a cada uno de los pocillos de una placa de 6 pocillos (nº de catálogo 140675, Nunc). La placa recubierta se mantiene durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente o hasta que los explantes están listos para el cultivo. Otros matraces de cultivo celular se utilizaron en los experimentos descritos más adelante, incluyendo matraces T25, T75 y T225 (nº de catálogo 353109, 353136 y 353139, respectivamente, BD Falcon); HYPERFlask 1700 cm² (nº de catálogo 10024, Corning); pila de células,

45

sencillo o múltiple (nº de catálogo 3268, Corning); y placa de cultivo celular de 10 cm (nº de catálogo 150350, Nunc). En algunos experimentos, se utilizaron bolsas de cultivo celular (catálogo PL325, OriGen Biomedical).

Aproximadamente se obtienen 7 cm de UC, se colocan en un tubo de 50 mL con disolución estéril de FRS (nº de catálogo HTS-FRS, Bioline Solutions) a 4°C y se transportan al laboratorio. Tras su llegada al laboratorio, se retira la disolución de FRS y el UC se lava con disolución de sal básica 3X Hank (HBSS) que es Mg^{2+} , Ca^{2+} , y libre de fenol (nº de catálogo SH30588, HyClone). El UC se coloca entonces en una disolución de betadine al 10% con HBSS durante 1 minutos, seguido de tres lavados en HBSS o hasta que se haya eliminado toda la betadine. El UC se coloca en una placa de 10 cm con HBSS. El tejido se corta en secciones transversales de 0,5-1 cm utilizando un bisturí con cuchilla de número de 10 u 11 (nº de catálogo 371619, BD). Las secciones transversales se colocan en una nueva placa de 10 cm con HBSS reciente y se cortan longitudinalmente, evitando al mismo tiempo la vena y las dos arterias. Si no se libera sangre en la placa durante el corte del tejido, la HBSS contaminada se reemplaza por HBSS reciente. Los dos trozos longitudinales se colocan en una nueva placa de 10 cm con HBSS reciente, asegurándose de conocer la ubicación del material gelatinoso (revestimiento del cordón). Con unas pinzas finas, se diseccionan y se desechan la vena y las dos arterias. Se tiene cuidado de separar la mayor cantidad de tejido venoso y arterial, dado que este tejido contaminará el cultivo con células endoteliales.

El revestimiento del cordón diseccionado se coloca en HBSS reciente. Se obtienen cubreobjetos estériles (22 mm x 22 mm, nº de catálogo 12-565-28, Nunc), pinzas (nº de catálogo 12576-934, VWR) y placas de 6 pocillos para la siembra de los explantes. Un trozo longitudinal de tejido se corta en 3-4 tiras con la parte gelatinosa en la cara superior. Cada una de las tiras se levanta con una pinza fina y se coloca en un pocillo de una placa de seis pocillos revestida con fibronectina, gelatinosa cara abajo, en donde la fibronectina humana es aspirada antes de colocar los explantes en el pocillo. De tres a cuatro tiras se colocan en un solo pocillo. Cubreobjetos estériles se colocan cuidadosamente en la parte superior del revestimiento del cordón y 2 mL de medio de crecimiento se colocan en el pocillo. La placa de seis pocillos se incuba a 5% de CO_2 y 37°C inmediatamente después de colocar todos los explantes.

Para establecer las ULSCs, se realiza un cambio de la mitad del medio cada dos días, teniendo cuidado de no perturbar el cubreobjetos ni los explantes. El día 7 después del comienzo del cultivo (y no más de 10 días) se visualiza la zona alrededor de los explantes en cuanto a la migración celular. Si existe una cantidad sustancial de células que migran fuera de los explantes, el cubreobjetos y los explantes se retiran, teniendo cuidado de no molestar a las células adheridas. Después de retirar los cubreobjetos y los explantes, las células se lavan en PBS (Mg^{2+} , Ca^{2+} , libre de fenol, nº de catálogo SH30256, HyClone) y se alimentan con 2 mL de medio reciente a 37°C. Las células se cultivan hasta que la placa sea aproximadamente 60% confluyente.

Para subcultivar las ULSCs, los reactivos, incluyendo el medio, PBS, suero humano de tipo A/B (HS-A/B, obtenido de Sigma, nº de catálogo H4522; Atlanta Biologicals, nº de catálogo S40110; o Gemini Bioproducts, nº de catálogo 100-512) y TrypZean (nº de catálogo T349-500 mL, Sigma) se precalientan antes de usar. Además, los frascos de cultivo celular se preparan añadiendo fibronectina humana al matraz un mínimo de 0,5 horas antes de su uso. Se aspira medio de las células que se subcultivan, y las células se lavan con PBS. Después de retirar la PBS, TrypZean se añade a cada uno de los pocillos y se incuba el matraz en una incubadora con 5% de CO_2 a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Las células se verifican luego bajo un microscopio para asegurar que las células se levanten. La suspensión de células se retira y se coloca en un tubo de 50 mL. PBS se añade al matraz para lavar y el resto de las células se coloca a continuación en el mismo tubo de 50 mL que contenía la suspensión de células. Para detener la reacción de TrypZean, FBS (nº de catálogo SH30611.02, HyClone) o HS-A/B se añaden a 10% de la disolución y se arremolinan para la mezcladura. La suspensión de células se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos a 4°C para sedimentar las células, que luego se resuspenden en 5 mL de medio. Fibronectina humana se retira del matraz de cultivo y luego las células se siembran a razón de 1000 células/cm² en los medios 1, 2, 3 ó 4. El resto de las células (~ 10 x 10⁶ células) se puede congelar a 2,5 x 10⁶ células/mL en cuatro viales separados.

Las ULSCs se congelan usando no más de 5x10⁶ células/mL de medio de congelación (CryoStor CS-10, catálogo CS-10, Bioline Solutions). La suspensión de células se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos a 4°C y luego se añade gota a gota medio de congelación CS-10. Después de añadir la cantidad apropiada de CS-10, las células se dividen en partes alícuotas en crioviales, que se colocan en un congelador control de la frecuencia para comenzar la crioconservación. Para el almacenamiento a largo plazo, las células se transfieren a un matraz de vacío con nitrógeno líquido (LN₂).

Cuando se descongelan las ULSCs, el medio se precalienta y la fibronectina humana se reviste en matraces de cultivo celular durante al menos 0,5 horas antes del cultivo. Los crioviales se liberan rápidamente de LN₂, colocado

en un baño de agua a 37°C y se agitan vigorosamente. La suspensión de células se retira del criovial y se coloca en un tubo de 15 mL. Se añade gota a gota medio pre-calentado a un caudal de 1 mL por minuto para el lavado de las células. La suspensión de células se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos a 4°C y el medio se aspira. El sedimento celular se resuspende en medio y se recuentan las células. Las células se siembran a razón de 1000 células/cm² en frascos de cultivo celular después de la separación de fibronectina humana del matraz.

Ejemplo 3 - Caracterización de ULSCs

Se obtuvieron cordones umbilicales y se cultivaron como explantes en placas de 6 pocillos revestidas según se describe en el Ejemplo 2. Todas las placas fueron tratadas con fibronectina humana (1 µg/ml), a menos que se indique lo contrario. En síntesis, una vez que las placas de 6 pocillos se volvieron 60-70% confluentes, las células madre de revestimiento del cordón umbilical (ULSCs) se separaron enzimáticamente y se hicieron pasar a un matraz T225 a una densidad de 1000 células por cm² utilizando medio de crecimiento de ULSC (DMEM con bajo contenido en glucosa (libre de fenol), FBS al 15% que se caracteriza o es de selección suprema, Glutamax (1X o al 1%), Gentamicina (2x o al 2%), Disolución de Vitamina MEM (1x o al 1%), y NEAA de MEM (1x o al 1%)). En el pasaje 3, aproximadamente 8,0 x 10⁶ células se obtuvieron para FACS y se tiñeron en 8 tubos diferentes para el análisis utilizando 16 marcadores diferentes (CD105, CD166, CD19, CD34, HLA-DR, LIN, CD106, CD117, CD133, CD73, CD44, CD45, CD90, HLA-ABC, SSEA-4 y STRO-1). Tal como se muestra en la FIG. 1, las ULSCs eran positivas para CD105, CD166, LIN, CD106, CD73, CD44, CD90, HLA-ABC, SSEA-4 y STRO-1, y negativas para CD19, CD34, CD45, CD117 y CD133. En ULSCs adultas hay una regulación ascendente del marcador STRO-1 que es un marcador de células madre mesenquimales definido. También hay un aumento despreciable en el marcador de leucocitos CD45. La expresión de OCT-4, Nanog, SOX-2 y glucosa-6-fosfato se evaluó mediante RT-PCT en células de control NT2, células gonadales, tejido del cordón umbilical prenatal (es decir, el tejido del cordón umbilical obtenido a partir de abortos espontáneos) y tejido del cordón umbilical adulto (es decir, el tejido del cordón umbilical obtenido después de la entrega del bebé sin complicaciones). Las células de sangre de cordón umbilical prenatal o adulto expresaron OCT-4 y Nanog, pero no Sox2. Véase la FIG. 2. El análisis FACS de ambos tipos de cordón demuestra ligeros cambios en la expresión del marcador.

En el pasaje 3, las células se separaron y se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo para el ensayo de la diferenciación cardíaca, la diferenciación neuronal, la diferenciación adiposa, la diferenciación osteogénica, la diferenciación de los condrocitos y de la unidad formadora de colonias. En cada uno de los pasajes y para cada una de las diferenciaciones, se tomó una parte alícuota de las células para el análisis de ARN de diferentes estados. Controles apropiados se incluyeron en cada uno de los estados de diferenciación. Los medios utilizados son los medios de crecimiento de ULSCs descritos anteriormente.

Diferenciación Cardíaca – Se sembraron células utilizando medio de crecimiento ULSCs y al día siguiente se añadió 5-azacitidina 10 µM para la incubación durante 24 horas. Al día siguiente se añadió medio de crecimiento de ULSCs reciente. En 1 semana, las células se trataron de nuevo con 5-azacitidina 10 µM durante 24 horas tal como se describió arriba. A los 21 días siguientes al primer tratamiento de 5-azacitidina, algunos pocillos se recogieron para el análisis de ARN y el resto se utilizó para la ICC. La diferenciación cardíaca fue confirmada mediante tinción de la cadena pesada de miosina, troponina I, actina sarcomérica, desmina y conexina 43.

Diferenciación Neural- Se sembraron células utilizando una mezcla 50/50 de medio de crecimiento de ULSCs y un medio de diferenciación neural compuesto de KO DMEM (DMEM KnockOut™, n° de catálogo 10829-018, Invitrogen), suero al 10% de reemplazo, vitaminas 1x MEM, NEAA, Pen Strep, glutaMAX, N2 y premezcla ITS. Todas las células se sembraron en placas revestidas de Matrigel. Los factores de crecimiento añadidos a los medios neurales eran bFGF y EGF a 20 ng/ml o SHH (sonic hedgehog) (100 ng/ml), FGF8 (100 ng/ml) y bFGF (20 ng/ml). Después de 24 horas, las células se lavaron y alimentaron con 100% de medios neurales. A los 7 días se añadió ácido retinoico (RA) 3uM durante 3 días consecutivos directamente a los medios. Al 3^{er} día, el 50% de los medios se cambió a DMEM:F12 (n° de catálogo 10565, Gibco) con los mismos suplementos que KO DMEM descrito anteriormente. Al día siguiente, se utilizó 100% de medio de crecimiento neural DMEM:F12 y los factores de crecimiento se cambiaron para la diferenciación terminal de la siguiente manera. Las células en SHH, FGF8 y bFGF se cambiaron a GDNF (20 ng/ml), BDNF (20 ng/ml) y Ácido Ascórbico (200 µM). Para las células en bFGF + EGF, sólo el bFGF se separó para la diferenciación terminal. Las células se dejaron durante la diferenciación terminal durante un período adicional de 10-14 días, al tiempo que se alimentaban cada 3-4 días. Algunos pocillos se tomaron para el análisis de ARN y los restos fueron fijadas para ICC. La diferenciación a células neuronales fue confirmada mediante tinción con nestina, A2B5, O4 y β-tubulina III.

Diferenciación en Adiposa- Después de sembrar las células, se dejaron que se volvieran 90% confluentes, en cuyo momento se cambiaron a medio de diferenciación adipogénica de Lonza de acuerdo con el protocolo del fabricante. 3 días inducidas y 2 días mantenidas durante 21 días en total. La diferenciación en adiposa fue confirmada mediante tinción con Oil Red O de vacuolas de grasa.

5 Diferenciación osteogénica - Después de la siembra, se dejó que las células se convirtieran 90% confluentes, en cuyo momento se cambiaron a medio de diferenciación Osteogénica de Hyclone de acuerdo con el protocolo del fabricante durante 21 días. La diferenciación en células osteogénicas se confirmó utilizando rojo S de alizarina, que tiñe los depósitos de calcio.

10 Diferenciación condro- Las células se sedimentaron a razón de 500.000 células por tubo cónico de 15 ml y se alimentaron con medio de diferenciación condrogénica de Hyclone de acuerdo con el protocolo del fabricante durante 28 días. La diferenciación de condrocitos se confirmó utilizando azul alcian al 1% que tiñe proteoglicanos sulfatados.

15 Ensayo de la Unidad Formadora de Colonias: Se obtuvo una parte alícuota de 20.000 células y se utilizaron 20 mL de medio de crecimiento de ULSC para resuspender las células. Una parte alícuota de 10 mL se añadió a una placa de 10 cm pre-revestida y se marcó como control, 10.000 células. Una parte alícuota de 500 μ L (500 células) se colocó en 49,5 mL de medio. Las células se resuspendieron y se sembraron (10 mL) en placas de 5-10 cm. Cada una de las placas de 10 cm se marcó como 100 células por placa. A los 14 días, las placas se retiraron de la incubadora, las células se lavaron con PBS y se añadió cristal violeta al 3%. No se requirió un cambio de medios durante la incubación. La eficiencia de clonación se estimó como el porcentaje de células que generó clones a partir del número total de células/placa.

20

OTRAS REALIZACIONES

Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada y ejemplos anteriores, la descripción y los ejemplos anteriores están destinados a ilustrar y no a limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para aislar células madre de revestimiento del cordón umbilical (ULSCs) de un cordón umbilical, comprendiendo dicho método
 - a) obtener el revestimiento de un cordón umbilical, en donde el revestimiento está sustancialmente libre de sangre, tejido venoso y tejido arterial; y
 - b) cultivar explantes de dicho revestimiento sobre un sustrato sólido recubierto de fibronectina en presencia de un medio de crecimiento de bajo contenido en glucosa durante un período de tiempo suficiente para que las ULSCs se adhieran a dicho sustrato sólido recubierto de fibronectina, comprendiendo dicho medio de crecimiento suero bovino fetal al 15%, un dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina, antibiótico y un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor inhibidor de la leucemia (LIF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF).
2. El método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho medio de crecimiento, además, insulina, transferrina, selenio y piruvato sódico, comprendiendo dicho medio de crecimiento, además, putrescina, y comprendiendo dicho medio de crecimiento bFGF, LIF y EGF.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho antibiótico es gentamicina.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho antibiótico es penicilina y estreptomicina.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la superficie superior de cada uno de dichos explantes está en contacto con un sustrato sólido.
6. El método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método, además, lavar dichas células adheridas a dicho sustrato sólido revestido con fibronectina.
7. Una población purificada de células madre de revestimiento del cordón umbilical, en donde dichas células son positivas para CD105, CD106, CD90, CD73, SSEA-4 y STRO-1, negativas para CD45, CD34, CD19 y HLA-DR, expresan OCT4 y Nanog y no expresan Sox2, en donde dicha población purificada de células se puede obtener mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. La población purificada de ULSCs de la reivindicación 7, en donde dichas células son capaces de diferenciarse en células de linaje mesodérmico, en donde dichas células son capaces de diferenciarse en células adipogénicas, células osteogénicas, células condrogénicas y cardiogénicas.
9. La población purificada de ULSCs de la reivindicación 7, en donde dichas células han sido sometidas a al menos 60 duplicaciones en cultivo, al menos 70 duplicaciones en cultivo o al menos 90 duplicaciones en cultivo.
10. La población purificada de ULSCs de la reivindicación 7, en donde dichas células comprenden un ácido nucleico exógeno, y en donde dicho ácido nucleico exógeno codifica un polipéptido.
11. La población purificada de ULSCs de la reivindicación 7, en donde dichas células están alojadas dentro de un armazón, en donde dicho armazón es biodegradable, y en donde dicho armazón biodegradable está compuesto de colágeno.
12. La población purificada de ULSCs de la reivindicación 7, en donde dichas células son capaces de diferenciarse en células de linaje ectodérmico, y en donde dichas células son capaces de diferenciarse en células neurogénicas.
13. Un método de cultivar una población de ULSCs, comprendiendo dicho método obtener una población de ULSCs de cordón umbilical humano de acuerdo con el método de las reivindicaciones 1-6, en donde dichas ULSCs son positivas para CD105, CD106, CD90, CD73, SSEA-4 y STRO-1, negativas para CD45, CD34, CD19 y HLA-DR, expresan OCT4 y Nanog y no expresan Sox2; y cultivar dichas células en presencia de un medio con bajo contenido en glucosa que contiene suero al 10% a 20%; 0,7 a 1,5% de un dipéptido estabilizado de L-alanil-L-glutamina; 1 a 100 ng/mL de un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en bFGF, LIF y EGF; y 1 a 3% de un antibiótico.
14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho medio con bajo contenido en glucosa comprende, además, 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de insulina; 0,1 mg/mL a 100 mg/mL de transferrina; 0,1 µg/mL a 100 µg/mL de selenio; y 0,5 a

1,5% de piruvato sódico, en el que dicho medio comprende, además, 0,05 µg/mL a 100 µg/mL de putrescina y 1 ng/mL a 100 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico.

ULSCs PRENATALES

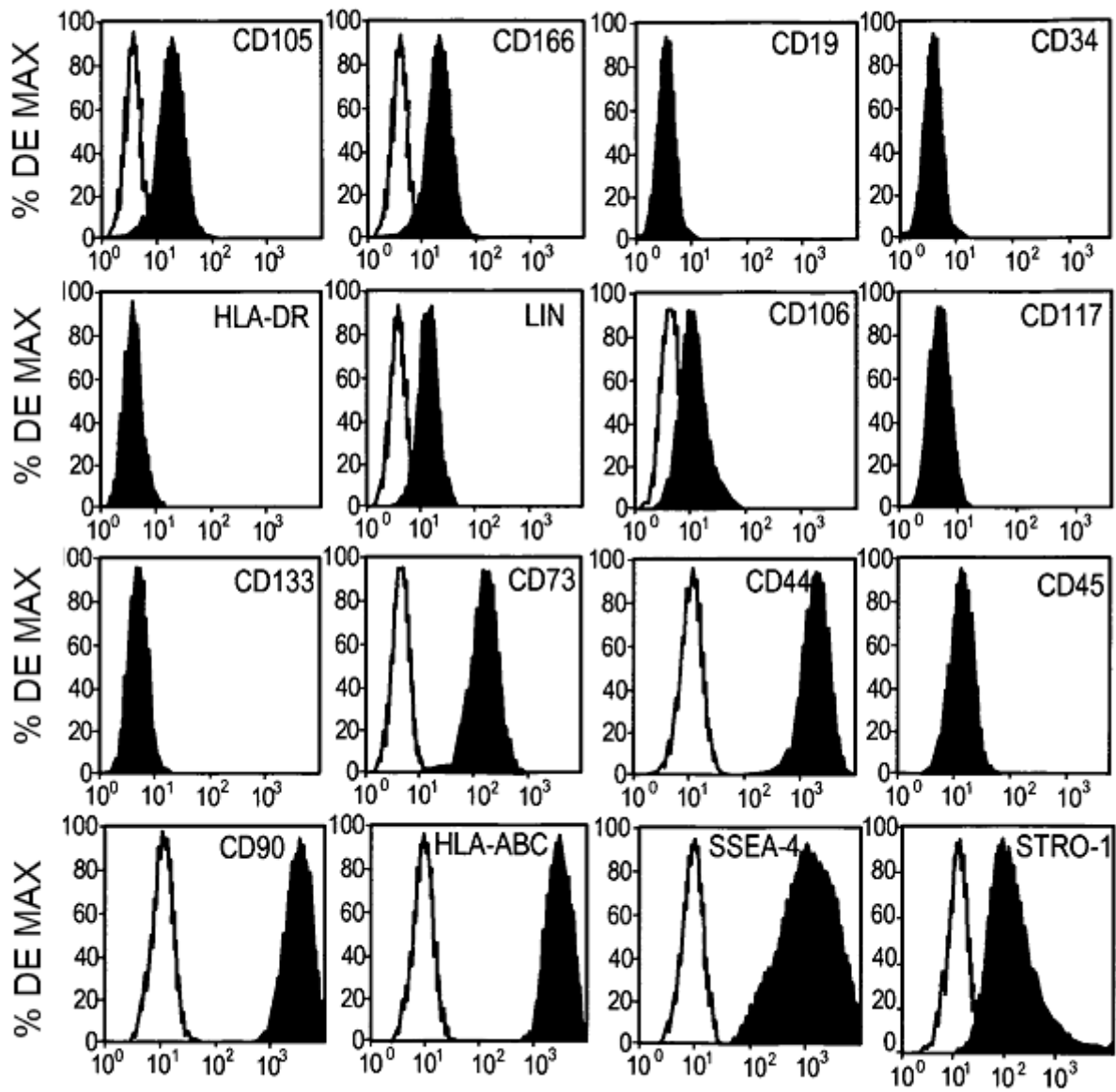


FIG. 1

ULSCs ADULTAS

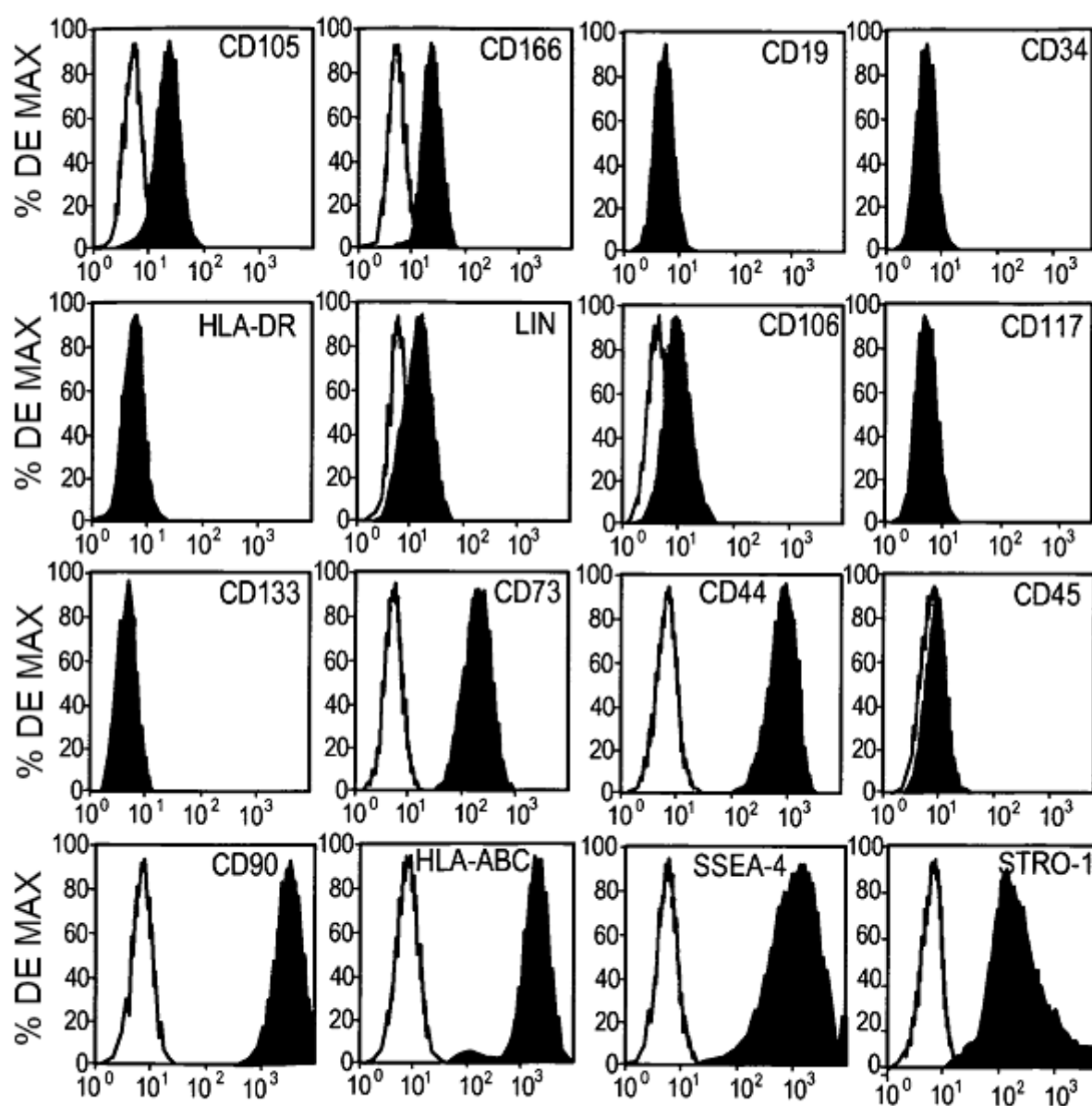


FIG. 1 (CONTINÚA)

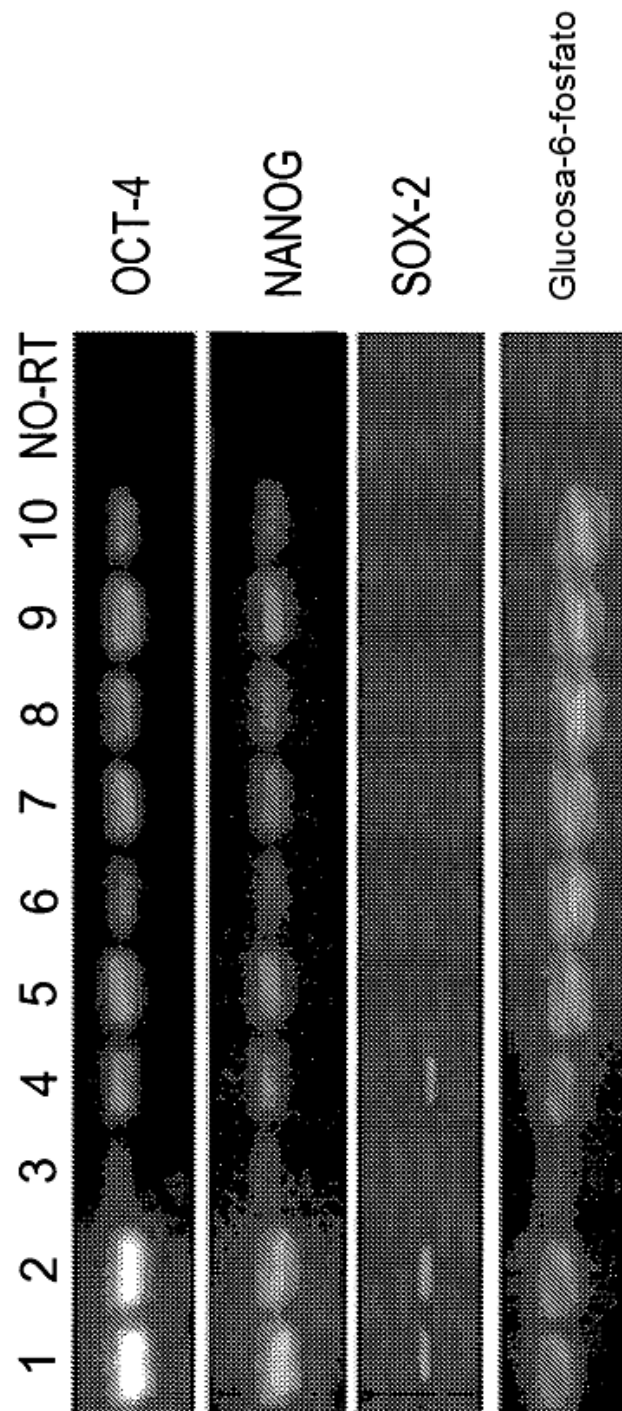


FIG. 2