

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 463**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 35/51 (2015.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 04777235 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 1641916**

54 Título: **Regeneración y reparación de tejido neural usando células del postparto derivadas del cordón umbilical**

30 Prioridad:

27.06.2003 US 483264 P

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

29.04.2016

73 Titular/es:

**DEPUY SYNTHES PRODUCTS, INC. (100.0%)
325 Paramount Drive
Raynham, Massachusetts 02767-0350, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 568 463 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).

Regeneración y reparación de tejido neural usando células del postparto derivadas del cordón umbilical

Descripción

5

AREA DE LA INVENCION

10 Esta invención se relaciona con el campo de la terapia basada en células regenerativas en lo que se refiere a enfermedades o desórdenes neurológicos. En particular, la invención suministra composiciones, dispositivos y métodos farmacéuticos para la regeneración o reparación de tejido neural usando células derivadas de posparto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Enfermedades y otros desórdenes neurológicos del sistema nervioso central y periférico están entre las afecciones más debilitantes que un individuo puede sufrir, no sólo por sus efectos físicos, pero también por su permanencia. En el pasado, un paciente que sufría una lesión cerebral o de la médula espinal, o una condición neurodegenerativa del sistema nervioso central o periférico, tal como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer o esclerosis múltiple, sólo para nombrar algunos, tenían poca esperanza de recuperación o cura.

20 Los daños neurológicos y enfermedades neurodegenerativas eran consideradas irreversibles por la inhabilidad de las neuronas y otras células del sistema nervioso para crecer en un cuerpo adulto. Sin embargo, la reciente llegada de la terapia basada en células madre para la reparación y regeneración de tejidos facilita tratamientos prometedores para varias patologías neurodegenerativas y otros desórdenes neurológicos. Las células madres son capaces de auto renovarse y de diferenciarse para generar una variedad de linajes de células neurales maduras.

25 Trasplante de esas células puede ser utilizado como una herramienta clínica para reconstituir el tejido objetivo, restaurando de esa forma la funcionalidad psicológica y anatómica. La aplicación de tecnología de células madre tiene un amplio rango, incluyendo ingeniería de tejidos, entrega de terapia genética, y terapia celular, eso es, la entrega de agentes bioterapéuticos a la ubicación objetiva por medio de células vivientes o componentes celulares suministrados de una forma exógena que produzca o que contenga esos agentes (para una revisión, refiérase a Tresco, P.A. et al., 2000, *Advanced Drug Delivery Reviews* (Revisiones Avanzadas de Entrega de Drogas) 42: 2-37).

30 US 2003/032179 describe un método de extracción y recuperación de células madre tipo embrionarias.

35 Mitchell et al. (2003) *Stem Cells* (Células Madre) 21(1):50-60 describe a aquellas células matriciales provenientes de las neuronas y la glía en forma de gelatina de Wharton.

US 5.919.702 describe un método de producción de tejido de cartílago utilizando células aisladas de la gelatina de Wharton.

40 Woodbury et al. (2000) *Journal of Neuroscience Research* (Revista de Investigación Neuro - Científica) 61:364-370 describe células estromales de médula ósea de ratas y de humanos adultos que se diferencian en neuronas.

45 Weiss et al. (2003) *Experimental Neurology* (Neurología Experimental) 182(2):288-299 describe células madre porcinas derivadas del tejido conectivo mucoso del cordón umbilical.

WO 03/068937 describe células madre tipo embrionarias derivadas de la placenta de mamíferos post-parto.

US 2003/161818 describe cultivos, productos y métodos que utilizan a células madre.

50 WO 2004/072273 describe células progenitoras humanas que son extraídas de la gelatina de Wharton.

Lodie et al. (2002) *Tissue Engineering* (Ingeniería de Tejidos) 8(5):739-751 describe, según su informe, el análisis de diferentes poblaciones de células madre multipotentes derivadas de la médula ósea.

55 Tremain et al. (2001) *Stem Cells* (Células Madre) 19:408-418 describe un análisis microSAGE de 2353 genes expresados en una colonia derivada de una sola célula de células madre mesénquima humana no diferenciada.

60 Un obstáculo para lograr el potencial terapéutico de la tecnología de células madre ha sido la dificultad de obtener números suficientes de células madre. Una fuente de células madre es el tejido embrionario o fetal. Células madre y progenitoras embrionarias han sido aisladas de varias especies de mamíferos, incluyendo humanos y algunos tipos de células han mostrado ser capaces de autogeneración y expansión, así como de una diferenciación en todos los linajes de células neurológicas. Pero la derivación de células madre de fuentes embrionarias o fetales ha levantado mucha polémica ética y moral que sería preferible evitar al identificar otras fuentes de células multipotentes o pluripotentes.

65

Las células madres con potencia neural también han sido aisladas de tejidos adultos. Las células madres neurales existen en el cerebro en desarrollo y en el sistema adulto nervioso estas células pueden expandirse y se pueden diferenciar en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Sin embargo, las células madres neurales adultas son raras, y además sólo pueden obtenerse por medio de procedimientos invasivos, y pueden tener una habilidad más limitada para expandirse en cultivos que sus contrapartes embrionarias.

Otros tejidos adultos también pueden brindar células progenitoras útiles para terapias neurales que se basan en células. Por ejemplo, se ha reportado recientemente que células madre adultas derivadas de la médula ósea y de la piel pueden expandirse en cultivos y provocar múltiples linajes, incluyendo algunos linajes neurales.

Los tejidos posparto, tal como el cordón umbilical y la placenta, han generado interés como una fuente alterna de células madre. Por ejemplo, métodos para la recuperación de células madre por perfusión de la placenta o recaudación de la sangre o tejido del cordón umbilical han sido descritos. Una limitación de la facilitación de células madre por estos métodos ha sido el volumen inadecuado de sangre del cordón o de la cantidad de células obtenidas, así como heterogeneidad en, o la falta de caracterización de, las poblaciones de células obtenidas de estas fuentes.

Por lo tanto, fuentes alternas de suministros adecuados de células que tengan la habilidad de diferenciarse en una cama de linajes de células neurales tiene gran demanda. Un suministro confiable, bien caracterizado y abundante de poblaciones sustancialmente homogéneas de aquellas células significaría una gran ventaja en una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en lo que se refiere a reparación y regeneración neural, incluyendo ensayos de selección de drogas, soporte trófico ex vivo o in vitro de otras células neurales, y terapia in vivo basada en células.

RESUMEN DE LA INVENCION

Este invento suministra células que son obtenibles del tejido del cordón umbilical humano que son sustancialmente libres de sangre para su uso en el tratamiento de una condición neurodegenerativa, en la cual las células son capaces de auto renovarse y de expandirse en cultivos y que tienen potencial de diferenciarse en células de por lo menos un fenotipo natural, requieren valina L para su crecimiento, pueden crecer con un 5% a un 20% de oxígeno, son multipotentes y pluripotentes, y tienen las siguientes características:

- a. Tienen el potencial de experimentar por lo menos 40 doblajes en cultivos;
- b. Experimentan adherencia y expansión en portadores de cultivos de tejidos cubiertos o no cubiertos, donde el portador de cultivos de tejidos cubiertos comprende una cobertura de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina;
- c. Producen vimentina y actina de músculo liso alfa;
- d. Tienen la producción de cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, HLA-A,B,C, CD90, PD-L2 y PDGFr-alfa, tal como se puede detectar por citometría de flujo;
- e. Tienen una expresión incrementada de genes endógenos que codifican a la interleucina 8; al reticulon 1; al ligando 1 de la quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora de crecimiento de la melanoma alfa); al ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); el ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 3; y el factor de necrosis tumoral, la proteína 3 inducida por alfa relacionada con la expresión endógena en una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesénquima, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, tal como se puede analizar por un ensayo de oligonucleótidos;
- f. No produce CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, HLA-G, B7-H2 ni a HLA-DR,DP,DQ tal como se puede detectar por citometría de flujo;
- g. Una expresión reducida de los homeobox 2 de los genes de corta estatura; la proteína 2 de un golpe de calor de 27kDa; el ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (el factor 1 derivado de las células estromales); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox de mesénquimas 2; homólogo del homeobox 1 sine oculis; cristalina alfa B; activador asociado desaliñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a la neuralina 1; tetranectina; homología src tres (SH3 – src homology three) y el dominio rico en cisteína; el gen de translocación 1 de la célula B; 25- hidroxilasa de colesterol; factor 3 de transcripción relacionado al enanismo; proteína hipotética F1123191; receptor alfa de interleucina 11; mejorador de la endopeptidasa de procolágeno C; homólogo rizado 7; gen hipotético BC008967; colágeno alfa 1 tipo VIII; tenascina C; proteína 5 de homeobox iroqués; hefaestina; integrina beta 8; glicoproteína 2 de vesícula sináptica; fis de ADNc FLJ12280 del clon MAMMA1001744; factor 1 similar a un receptor de citoquinas; canal activado por un intermediador de potasio/una baja conducción del calcio, de la subfamilia N, el miembro 4; proteína DKFZP586L151; co-activador de transcripciones con un motivo que se enlaza con PDZ (TAZ); homólogo 2 del homeobox sine oculis; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento

- 5 temprano 3; homeobox 5 menos distal; proteína hipotética FLJ20373; miembro C3 de la familia de aldo-ceto reductasas 1 (deshidrogenasa hidroxisteroide alfa 3 tipo II); biglicano; fibronectina 1; proegkefalin; integrina 1 similar a beta (con dominios repetitivos similares a EGF); ADNc del clon EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptidos natriuréticos/ciclasa de guanilato C (receptor C de péptidos atriales - natriuréticos); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); la proteína 5 de la membrana asociada con la vesícula; proteína matricial extracelular 1 similar a la fibulina que contiene EGF; BCL2/proteína similar a la 3 que interactúa con el adenovirus EIB de 19kDa; proteína enlazadora de AE 1; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de oxidasa de citocromo c (músculo); neuroblastoma, supresión de carcinogénesis 1; y la proteína 2 que enlaza al factor de crecimiento similar a la insulina, 36kDa relativo a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesénquima, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, tal como se puede analizar por medio de un ensayo de oligonucleótidos;
- 10
- 15 h. Secretan MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO y TIMP1, tal como se puede determinar por ELISA; y
- i. No secretan SDF-1 alfa, TGF-beta2, ANG2, PDGFbb y VEGF, tal como se puede determinar por ELISA.
- 20 La invención también suministra una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una condición neurodegenerativa que comprende a un portador farmacéuticamente aceptable y las células del invento en un monto efectivo para tratar la condición neurodegenerativa, donde aquellas células son multipotentes o pluripotentes.
- 25 La invención también suministra el uso de las células del invento en la fabricación de un medicamento para tratamiento de una condición neurodegenerativa.
- 30 La invención suministra un botiquín para su uso en el tratamiento de una condición degenerativa, que comprende a las células del invento donde dichas células con multipotentes o pluripotentes, un portador farmacéuticamente aceptable e instrucciones para utilizar al botiquín en un método de tratamiento para el paciente.
- 35 La invención también suministra un método para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neural que comprende co-cultivar a las células de linaje neural con las células derivadas de tejidos de cordones umbilicales del invento bajo condiciones efectivas para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neural.
- 40 Esta invención también suministra un botiquín para su uso para el incremento de la supervivencia, del crecimiento o de la actividad de las células de linaje neural que comprende a las células derivadas de tejido de cordones umbilicales del invento e instrucciones para co-cultivar a las células de linaje neural con las células derivadas de tejidos de cordones umbilicales del invento bajo condiciones efectivas para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neural.
- 45 Esta invención suministra composiciones y divulga métodos aplicables para terapia que se basa en células o de tipo regenerativo para enfermedades o desórdenes neurológicos. En particular, la invención destaca composiciones y dispositivos farmacéuticos y divulga métodos para la regeneración o reparación de tejido neural usando células derivadas del posparto.
- 50 Un aspecto de las características de la presentación es que en una célula aislada derivada de posparto, proveniente de tejido de la placenta o del cordón umbilical humanos sustancialmente libre de sangre, en el cual la célula es capaz de auto renovarse y expandirse en cultivos y tiene el potencial de diferenciarse en una célula de un fenotipo neural; en la cual la célula requiere valina para crecer y es capaz de un crecimiento con por lo menos alrededor de 5% de oxígeno. Esta célula adicionalmente tiene una o más de las siguientes características:
- 55 (a) potencial para por lo menos 40 doblajes en cultivos; (b) adherencia y expansión en un recipiente de cultivo de tejido cubierto o no cubierto, en el cual el recipiente de cultivo de tejido cubierto incluye una cubierta de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectidina o fibronectina; (c) que produzca por lo menos un factor de tejido como vimentina y actina de músculo liso alfa; (d) producción de por lo menos uno de CD 10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C; (e) falta de producción por lo menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA- DR,DP,DQ, como se detecta en la citometría de flujo; (f) expresión de un gen, relacionado con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa por por lo menos una de las siguientes modificaciones genéticas: interleucina 8; reticulon 1; ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 1 (actividad estimulante de crecimiento melanoma, alfa); ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 6 (proteína quemotáctica granulocita 2); ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 3; factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3; miembro 2 de la super familia lectina tipo C; tumor Wilms 1; aldehído deshidrogenasa 1 miembro de la familia A2; renina; receptor oxidado de lipoproteína de baja densidad 1; Clon de homo sapiens IMAGEN:4179671; proteína quinasa Mζ; proteína hipotética DKFZp564F013; reducción en cáncer de ovarios 1; y el gen de homo sapiens del clon DKFZp547K1113; (g) expresión del gen, que está relacionado a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, a la que se le reduce por lo menos una codificación genética: homeobox de baja estatura 2;
- 60
- 65

5 proteína kDa 27 impacto de calor 2; ligando de quimoquina (motivo C-X-C) 12 (factor derivado de células estromáticas 1); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams – Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox mesénquima 2 (homeobox específico de aprehensión del crecimiento); homólogo homeobox sine oculis 1 (Drosophila); cristalina, alfa B, activador desalineado asociado con la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a la neuralina 1; tetranectina (proteína vinculadora de plasminógeno); homología src 3 (SH3 – src homology three) y dominio rico en cistatina; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador endopeptidasa C de procolágeno; homólogo rizado 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox iroquois 5; hephaestin; integrina, beta 8; glicoproteína de la vesícula sináptica 2; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína parecida a la insulina vinculadora del factor de crecimiento n, 36hSa; ADNc FLJ12280 fis de Homo sapiens, clon MAMMA1001744; factor parecido al receptor citoquina 1; canal activado por el calcio de conductancia intermedia / pequeña de potasio, sub-familia N, miembro 4; integrina, beta siete; co-activador transcripcional con motivo circulatorio PDZ (TAZ); homólogo homeobox sine oculis 2 (Drosophila); proteína KIAA1034, proteína de membrana asociada con la vesícula 5 (myobrevin); proteína de la matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF 1; respuesta temprana de crecimiento 3; homeobox menos distante 5; proteína hipotética FLJ20373; familia alcohol deshidrogenasa 1, miembro C3 (Hidroxiesteroide deshidrogenasa 3- α , tipo II); bilicano, co – activador transcripcional con motivo vinculante PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios que se repiten tipo EGF); clon de ADNc insertado completamente en el ARNm de Homo Sapiens EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de péptidos natriuréticos C / ciclasa guanilata C (receptor de péptidos atrionatriuréticos C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (de clon DKFZp564B222); BCL2 / similar a la proteína 3 que interactúa con el adenovirus E1B 19kDa; proteína vinculante de AE 1; polipéptido VIIa de la subunidad oxidasa c de citocromo 1 (músculo); similar a la neuralina 1; gen 1 de translocación de la célula B; proteína hipotética FLJ23191; y DKFZp586L151; (h) secreción de por lo menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES, y TIMP1; y (i) falta de secreción de por lo menos uno de TGF- β 2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, 1309, MDC, y VEGF, de acuerdo a como se ha detectado por ELISA.

30 La célula derivada del posparto en la invención es una célula derivada de tejido de cordón umbilical. En otras secciones del descubrimiento es una célula derivada de la placenta. En secciones específicas, la célula tiene todas las características identificantes de cualquiera de las siguientes: célula tipo PLA 071003 (P8) (ATCC Adhesión No. PTA-6074); célula tipo PLA 071003 (P11) (ATCC adhesión No. PTA-6075); célula tipo PLA 071003 (P16) (ATCC adhesión No. PTA-6079); de las células de la presentación; y célula tipo UMB 022803 (P7) (ATCC adhesión No. PTA-6067); o célula tipo UMB 022803 (P17) (ATCC adhesión No. PTA-6068) para las células de la invención.

35 En ciertas secciones, las células derivadas del posparto están aisladas en la presencia de una o más actividades enzimáticas incluyendo actividades metaloproteasas, actividades mucolíticas, y actividades de proteasas neutrales. Preferiblemente, las células tienen un cariotipo normal el cual es mantenido cuando las células se las pasa a un cultivo. Las células derivadas del posparto de la invención incluyen a cada una de las siguientes: CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr- α , y HLA-A,B,C y no incluye ninguna de las siguientes: CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR,DP,DQ, como se detecta en la citometría de flujo.

45 Otro aspecto de las características de la invención es una población de células conformada de células derivadas del posparto de la invención como se acaba de mencionar. Esta es una población sustancialmente homogénea de células derivadas del posparto. En sección específica, la población incluye una línea de células clónicas de las células derivadas de posparto. En otra sección de la presentación, la población es una población heterogénea que se conforma de células derivadas del posparto y por lo menos otro tipo de célula. En ciertas secciones la otra célula es un astrocito, oligodendrocito, una neurona, un progenitor neural, una célula madre neural u otra célula madre multi potente. En otras secciones, la población de las células es cultivada en contacto con uno o más factores que estimulan la diferenciación de las células madre hacia un linaje neural.

50 También se destaca de acuerdo a la siguiente presentación un lisado celular proveniente de células derivadas del posparto. El lisado celular puede ser separado en una fracción enriquecida con membranas y una fracción de células solubles. La presentación también destaca una matriz extracelular producida por células de posparto, así como un medio acondicionado en el cual las células han crecido.

55 Las células de la invención se destacan para su uso en un método de tratamiento a un paciente con condición neurodegenerativa, el método involucra el administrar al paciente células derivadas de posparto tal como se describió anteriormente, en un monto efectivo para tratar la condición neurodegenerativa. En ciertos cuerpos, la condición neurodegenerativas es aguda, como en el trauma cerebral, trauma de la médula espinal o trauma del nervio periférico. En otras secciones, es una condición neurodegenerativa crónica o progresiva, como en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, tumores, esclerosis múltiple o una lesión crónica del nervio periférico.

65 En una sección de la presentación, las células derivadas del posparto son inducidas in vitro para diferenciarse en células de linajes neurales antes de su administración. En otra sección, las células son diseñadas genéticamente para producir un producto genético que promueve el tratamiento de la condición neurodegenerativa.

- 5 En ciertos cuerpos, las células son administradas con por lo menos otro tipo de célula, como en el caso del astrocito, oligodendrocito, neurona, progenitor neural, célula madre neural, otras células madres multi potentes. En estas secciones, el otro tipo de célula puede ser administrado contrariamente con, o antes, o después, de las células derivadas de posparto. Asimismo, en estas u otras secciones, las células son administradas con por lo menos otro agente, tal como una droga para terapia neural, y otro agente complementario beneficioso tal como un agente antiinflamatorio, agentes anti aptotóticos, antioxidantes o factores de crecimiento. En estos cuerpos, el otro agente puede ser administrado simultáneamente con, o antes, o después, de la células derivadas de posparto.
- 10 En ciertas secciones, las células son administradas en un lugar predeterminado en el sistema nervioso central o periférico del paciente. Estas pueden ser administradas por inyección o infusión, o encapsuladas dentro de un dispositivo implantable, o por trasplante de una matriz o un conductor que contenga las células.
- 15 Otro aspecto de las características de la invención es una composición farmacéutica para tratar un paciente que tenga una condición neurodegenerativa, que involucra un transportador farmacéuticamente aceptable y las células derivadas de posparto de la invención que se acaban de describir. La condición neurodegenerativa a ser tratada podría ser aguda, o podría ser una condición crónica o progresiva.
- 20 En ciertas secciones de la presentación, la composición farmacéutica incluye células que han sido inducidas in vitro para diferenciarse en células de linaje neural previo a la formulación de la composición, o células que han sido diseñadas genéticamente para producir un producto genético que promueve el tratamiento de la condición neurodegenerativa.
- 25 En ciertas secciones, la composición farmacéutica incluye por lo menos otro tipo de célula, como el astrocito, oligodendrocito, célula madre neural u otra célula madre multipotente. En estos y otros cuerpos la composición farmacéutica Incluye por lo menos otro agente. Tal como una droga para terapia neural, u otro agente complementario beneficioso tal como un agente antiinflamatorio, agentes anti-apópticos, antioxidantes o factores de crecimiento.
- 30 En ciertas secciones, la composición farmacéutica es formulada para la administración por inyección o infusión. Alternamente, podría incluir un dispositivo implantable en el cual se encapsulan las células, o una matriz o un conducto que contiene las células.
- 35 De acuerdo a otro aspecto de la invención, un equipo es provisto para usarse en el tratamiento de un paciente que tiene una condición neurodegenerativa. El equipo incluye un portador farmacéuticamente aceptable, una población de células derivadas de posparto que se acabo de describir de la invención e instrucciones para usar el equipo en un método de tratamiento del paciente. El equipo también podría incluir por lo menos un reactivo e instrucciones para cultivar las células derivadas de posparto. También podría incluir una población de por lo menos otro tipo de célula, o por lo menos otro agente para el tratamiento de la condición neurodegenerativa.
- 40 De acuerdo a otro aspecto de la presentación, se suministra un método para el tratamiento de un paciente que tiene una condición neurodegenerativa, que comprende la administración al paciente de una preparación hecha a partir de las células derivadas de posparto que se describieron anteriormente. Una preparación como esa podría incluir un lisado de células (o una porción) de las células derivadas de posparto, una matriz extracelular de las células derivadas de posparto, o un medio acondicionado en el cual las células derivadas de posparto crecen. En otro aspecto de la presentación, se destaca una composición farmacéutica que incluye un portador farmacéuticamente aceptable y una preparación hecha de las células derivadas de posparto, que podría ser un lisado de células (o una porción) de las células derivadas de posparto, una matriz extracelular de la células derivadas de posparto o un medio acondicionado en el cual crecen las células derivadas de posparto. Éste podría incluir uno o más portadores farmacéuticamente aceptables u otro agente o reactivo o más lisados de célula o sus porciones, una matriz extracelular o un medio acondicionado de las células derivadas de posparto, e instrucciones para utilizar los componentes del equipo.
- 45 De acuerdo a otro aspecto de la invención destaca un método para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neurales. El método incluye el co - cultivo de las células de linaje neurales con células derivadas de posparto de la invención, bajo condiciones efectivas para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neurales. Un equipo para practicar el método será provisto. El equipo incluye células derivadas de posparto e instrucciones para co - cultivar las células de linaje neurales con las células derivadas de posparto bajo condiciones efectivas para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neurales.
- 50 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes por la descripción detallada y ejemplos a continuación.

65 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS SECCIONES ILUSTRATIVAS**

Definiciones

Se establecen a continuación varios términos usados a lo largo de las especificaciones y la presentación.

5 Células madre son células indiferenciadas definidas por la habilidad de que una sola célula pueda auto renovarse, y diferenciarse para producir células de progeñie, incluyendo progenitores autorenovables, progenitores no renovables, y células terminalmente diferenciadas. Las células madres también se caracterizan por su habilidad de diferenciarse in vitro en células funcionales de varios linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como su capacidad para hacer surgir tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante, y para contribuir sustancialmente a la mayoría, o a todos, los tejidos después de su inyección en blastocistos.

15 Las células madres están clasificadas de acuerdo a su potencial de desarrollo de la siguiente forma: (1) totipotentes; (2) pluripotentes; (3) multipotentes; (4) oligopotentes; y (5) unipotentes. Células totipotentes pueden hacer surgir todas las células de tipo embrionario y extra embrionario. Las células pluripotentes pueden hacer surgir todo tipo de células embrionarias. Las células multipotentes incluyen aquellas que pueden hacer surgir un subconjunto de linajes de células, pero todas dentro de un tejido en particular, órgano o sistema fisiológico (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC – hematopoietic stem cells) pueden producir progeñie que incluye HSC (de auto renovación), progenitores poligopotentes de células restringidas de la sangre, y todo tipo de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre). Las células oligopotentes pueden dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes de células que las células madre multipotentes; y las células unipotentes pueden dar lugar a sólo un linaje de células (por ejemplo, células madre espermatoogénicas).

25 Las células madres también se clasifican en forma a la fuente de donde se las obtuvo. Una célula madre adulta es generalmente una célula no diferenciada multipotente en un tejido que contiene múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre adulta puede renovarse así misma. Bajo circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir tipos especializados de células del tejido de donde se originó, y posiblemente de otros tipos de tejidos. Una célula madre embrionaria es una célula pluripotente de la masa interna de células de un embrión en etapa de blastocisto. Una célula madre fetal es una que se origina de tejidos o membranas fetales. Una célula madre posparto es una célula multipotente o pluripotente que se origina sustancialmente del tejido extra embrionario disponible después de nacimiento, llámese, la placenta y el cordón umbilical. Se ha descubierto que estas células poseen características de células madres pluripotentes, incluyendo una rápida proliferación y el potencial para diferenciarse en muchos linajes de células. Las células madre posparto podrían ser derivadas de la sangre (por ejemplo, como lo son aquellas obtenidas de la sangre del cordón umbilical) o no derivadas de la sangre (por ejemplo, como las obtenidas de los tejidos que no tienen sangre del cordón umbilical y de la placenta).

40 El tejido embrionario se define típicamente como el tejido que se origina de un embrión (que en los humanos se refiere al período desde la fertilización hasta alrededor de seis semanas de desarrollo. El tejido fetal, se refiere al tejido que se origina del feto, que en los humanos se refiere al período que va desde alrededor de seis semanas de desarrollo hasta el parto. El tejido extra embrionario es tejido asociado con, pero que no se origina de, el embrión o el feto. Los tejidos extra embrionarios incluyen membranas extra embrionarias (corion, amnios, saco vitelino y alantoides), el cordón umbilical y la placenta (que en sí se forma del corión y de la basal decidua 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, como una célula de nervio o una célula de músculo, por ejemplo. Una célula diferenciada es una que ha tomado una posición más especializada (“comprometida”) dentro del linaje de una célula. El término comprometida, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ya está en la ruta de diferenciación a un punto en el cual, bajo circunstancias normales, continuaría a diferenciarse a un tipo de célula específico o un subconjunto de tipos de células, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse a otro tipo de célula diferente o revertirse a un tipo de célula menos diferenciado. De - diferenciación se refiere al proceso por el cual una célula se revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se utiliza aquí, el linaje de una célula define la herencia de la célula, en otras palabras de que célula provino y que células puede generar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

55 En un sentido más amplio, una célula progenitora es una célula que tiene la capacidad de crear progeñies que son más diferenciadas que ella misma, y aún así retiene la capacidad de llenar la mancomunidad de progenitores. Bajo esta definición, las células madres en sí también son células progenitoras, tal como lo son los precursores inmediatos a células diferenciadas terminalmente. Cuando se hace referencia a las células en esta invención, como se describe en mayor detalle a continuación, esta amplia definición de célula progenitora podría ser utilizada. En un sentido menos amplio, una célula progenitora se la define a menudo como una célula que es intermediaria en su proceso de diferenciación, en otras palabras, surge de una célula madre y es intermedia en la producción de un tipo o subconjunto de tipos de células maduros. Este tipo de célula progenitora generalmente no puede autorenovarse. De esa forma, si se hace referencia a este tipo de células aquí, se las nombrará como una célula progenitora no renovable o como un progenitor intermedio o célula precursora.

Tal como se usa aquí, la frase diferenciarse en un linaje neural o fenotipo se refiere a una célula que se vuelve parcialmente o completamente comprometida a un fenotipo neural específico del CNS (Central Neural System – Sistema Nervioso Central) o PNS (Peripheral Nervous System – Sistema Nervioso Periférico), en otras palabras, una célula neuronal o glial, la segunda categoría incluye sin limitarse a astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y microglía.

Las células mencionadas aquí generalmente son referidas como células derivadas de posparto (o PPDCs - postpartum-derived cells). A veces también pueden ser referidas de una manera más específica como células derivadas del tejido del cordón umbilical de la invención o células derivadas de placenta de la presentación (UDCs o PDCs). El PPDC de la invención son células derivadas del tejido del cordón umbilical. Adicionalmente, las células podrían ser descritas como células madre o progenitoras, el segundo término siendo utilizado en sentido amplio. El término derivado es utilizado para indicar que las células han sido obtenidas de su fuente biológica y cultivadas o manipuladas de cualquier otra forma in vitro (por ejemplo, cultivadas en un medio de crecimiento para expandir la población y / o producir una línea de células). Las manipulaciones in vitro de células madre umbilicales y las características únicas de las células derivadas del tejido del cordón umbilical de esta invención se describen en más detalle a continuación.

Se usan varios términos para describir las células en cultivo. El término cultivo de células se refiere generalmente a las células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo condiciones controladas (“en cultivo” o “cultivada”). Un cultivo principal de células es un cultivo de células, tejidos, u órganos tomados directamente de un organismo antes del primer sub cultivo. Las células se expanden en cultivos cuando se las coloca en un medio de crecimiento bajo condiciones que facilitan el crecimiento y / o división celular, resultando en una población más grande de células. Cuando las células se expanden en cultivos, la tasa de proliferación de células se mide a veces por el monto de tiempo necesitado para que las células se doblen en número. A esto se denomina tiempo de doblaje.

Una línea de células es una población de células formadas por uno o más sub - cultivos de un cultivo primario de células. Cada ronda de sub cultivos es referida como un pase. Cuando las células son sub - cultivadas, se refiere a ellas como que han sido pasadas. Una población específica de células, o una línea de células, puede ser referida, o caracterizada por el número de veces que ha sido pasada. Por ejemplo, una población de células cultivadas que ha sido pasada 10 veces puede ser referida como un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células del tejido, se lo designa como P0. Después del primer sub cultivo, se describe a la células como un cultivo secundario (P1 o paso 1). Después de segundo sub cultivo, las células se vuelven un cultivo terciario (P2 o paso 2), y así progresivamente. Se entenderá por aquellos con experiencia en esta práctica que pueden existir muchos doblajes de población durante el período de los pasos; por lo tanto el número de doblajes de población de un cultivo es mayor que el número de pase. La expansión de las células (en otras palabras, el número de doblajes de población) durante el período entre pases depende de muchos factores, incluyendo pero sin limitarse a la densidad de la siembra, substrato, medio, condiciones de crecimiento, y el tiempo entre cada pase.

Un medio condicionado es aquel en el cual una célula específica o población de células ha sido cultivada, y después de eso removida. Cuando se cultivan células en el medio, estas podrían secretar factores celulares que podrían suministrar soporte trófico a las otras células. Aquellos factores tróficos incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citoquinas, mactrices extracelulares (ECM), proteínas, vesículos, anticuerpos, y gránulos. El medio que contiene factores celulares es un medio acondicionado.

Generalmente, un factor trófico se define como una sustancia que promueve la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y / o la maduración de una célula, o estimula la actividad incrementada de una célula. La interacción entre células por medio de factores tróficos podría ocurrir entre células de diferentes tipos. La interacción de células debido a factores tróficos se encuentra esencialmente en todos los tipos de células, y es un medio de comunicación particularmente importante entre tipos de células neurales. Los factores tróficos también pueden funcionar en una forma autocrina, es decir, una célula podría producir factores tróficos que afectan su propia supervivencia, crecimiento, diferenciación, proliferación y / o maduración.

Cuando se hace referencia a células vertebrales cultivadas, el término senectud (también senectud replicativa o senectud celular) se refiere a una propiedad atribuible a cultivos de células finitas; llámese, su inhabilidad de crecer más allá que un número finito de doblajes de población (a veces referido como el límite de Hayflick). Aunque la senectud celular fue descrita primero utilizando células similares a fibroblastos, la mayoría de los tipos de células humanas que pueden desarrollarse exitosamente en un cultivo sufren senectud celular. El tiempo de vida in vitro de los diferentes tipos de célula varía, pero el máximo tiempo de vida es típicamente menos 100 doblajes de población (este es el número de doblajes para todas las células en el cultivo hasta que se alcancen la senectud y por lo tanto el cultivo ya no podrá dividirse). La senectud no depende del tiempo cronológico, pero en vez de eso se mide por el número de divisiones de células, o doblajes poblacionales, que ha atravesado el cultivo. Por lo tanto, las células que se vuelven inactivas al desaparecer los factores esenciales de crecimiento pueden reestablecer el crecimiento y la división cuando factores de crecimiento son reintroducidos, y desde ahí ejecutar el mismo número de doblajes equivalente a si las células hubiesen crecido continuamente. Similarmente, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de varios doblajes de población y ahí son descongeladas y cultivadas, estas tendrán sustancialmente el mismo número de doblajes como células que hubiesen sido mantenidas sin congelarse en un

cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; estas son realmente resistentes a la muerte programada de las células (apoptosis), y se han mantenido en su estado no divisorio hasta por tres años. Estas células están vivas y activas metabólicamente, pero no se dividen. El estado no divisorio de las células senescentes todavía no ha podido ser devuelto con ninguna agente biológico, químico o viral.

5 El término condición (o enfermedad) neurodegenerativa es un término inclusivo que comprende condiciones agudas y crónicas, enfermedades o desórdenes del sistema nervioso central o periférico. Una condición neurodegenerativa podría ser relacionada a la edad, o podría resultar de una lesión o trauma, o podría estar relacionada a una enfermedad o desorden específico. Condiciones neurodegenerativas agudas incluyen, pero no se limitan a, condiciones asociadas con la muerte o compromiso celular neuronal incluyendo insuficiencia cerebrovascular, trauma cerebral focal o difuso, daño cerebral difuso, lesión de la médula espinal o trauma del nervio periférico, por ejemplo, daños que resultan de quemaduras físicas o químicas, cortes profundos o separación de extremidades. Ejemplos de desórdenes neurodegenerativos agudos son: isquemia o infarto cerebral incluyendo oclusión embólica y oclusión trombótica, reperfusión después de una isquemia aguda, lesión hipóxicoisquémica perinatal, paro cardíaco, así como hemorragia intracraneal de cualquier tipo (tal como epidural, subdural, subaracnoide, intracerebral), y lesiones intracraneales e intravertebrales (tales como contusiones, penetraciones, rupturas, compresiones y laceraciones), así como latigazo y síndrome de infante sacudido. Las condiciones neurodegenerativas crónicas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de demencia de cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (síndrome Steel - Richardson), degeneración multisistémica (síndrome de Shy-Drager), condiciones epilépticas crónicas asociadas con neurodegeneración, enfermedades neurales motrices incluyendo esclerosis lateral amiotrófica, ataxia degenerativa, degeneración basal cortical, demencia ALS de Parkinson compleja de Guam, Panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías (incluyendo atrofia múltiple del sistema), afasia progresiva primaria, degeneración estriatonigral, enfermedad Machado - Joseph / ataxia espinocerebelosa tipo 3 y degeneraciones olivopontocerebelosas, enfermedad de Gilles De La Tourette, parálisis y pseudobulbar, atrofia muscular espinal y espinobulbar (enfermedad de Kennedy), esclerosis lateral primaria, paraplejia espástica familiar, enfermedad de Werdnig-Hoffmann, enfermedad de Kugelberg-Welander, enfermedad de Tay-Sach, enfermedad de Sandhoff, enfermedad espástica familiar, enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander, paraparesia espástica, Leucoencefalopatía multifocal progresiva, disautonomía familiar (síndrome Riley-Day), y enfermedades periódicas (incluyendo, pero sin limitarse a enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann- Sträussler-Scheinker, Disautonomía familiar Kuru y fatal), enfermedades y desórdenes de desmielinización incluyendo esclerosis múltiple y enfermedades hereditarias como las leucodistrofias.

35 Otras condiciones neurodegenerativas incluyen tumores y otras condiciones neoplásticas que afectan el CNS y el PNS. Aunque la enfermedad suscrita es considerada proliferativa (en vez de neurodegenerativa), los tejidos cercanos podrían estar comprometidos. Por lo tanto, la terapia de células podría ser utilizada para entregar moléculas apoptóticas u otras antineoplásticas al lugar del tumor, por ejemplo, por medio de una entrega de células modificadas genéticamente para producir esos agentes.

40 Otras condiciones neurodegenerativas incluyen varias neuropatías, tales como neuropatías multifocales, neuropatías sensoriales, neuropatías motrices, neuropatías sensoriales - motrices, neuropatías relacionadas a infecciones, neuropatías autonómicas, neuropatías sensoriales - autonómicas, neuropatías de Desmielinización (incluyendo, pero sin limitarse a, el síndrome Guillain-Barre y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, otras neuropatías inflamatorias e inmunes, neuropatías inducidas por drogas, neuropatías inducidas por tratamientos farmacológicos, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías traumáticas (incluyendo, pero sin limitarse a neuropatías por compresión, rompimiento, laceración y segmentación), neuropatías metabólicas, neuropatías endocrinas y paraneoplásticas, entre otras.

50 Otras condiciones neurodegenerativas incluyen demencias, sin importar su etiología subyacente, incluyendo demencia relacionada a la edad y otras demencias y condiciones, pérdida de memoria incluyendo demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, enfermedad de sustancia blanca difusa (enfermedad de Binswagner), demencia de origen endocrino o metabólico, demencia por un trauma de la cabeza y daño cerebral difuso, demencia pugilística y demencia fronto temporal.

55 El término tratar (o tratamiento de) una condición neurodegenerativa se refiere a mejorar los efectos de, o retrasar, interrumpir o revertir el progreso de, o retrasar o prevenir el comienzo de, una condición neurodegenerativa como se define aquí.

60 El término monto efectivo se refiere a una concentración o monto de un agente o composición reactiva o farmacéutica, tal como un factor de crecimiento, agente de diferenciación, factor trófico, población de células u otro agente, que es efectivo para producir un resultado deseado, incluyendo el crecimiento de células y / o diferenciación in vitro o in vivo, o el tratamiento de una condición neurodegenerativa como se describe aquí. En referencia a los factores de crecimiento, un monto efectivo podría variar desde alrededor de 1 nanogramo / mililitro a cerca de un microgramo / mililitro. En referencia a los PPDCs administrados a un paciente in vivo, un monto efectivo podría variar desde tan poco como algunos cientos o incluso menos hasta tantos como algunos millones o más. En secciones específicas, un monto efectivo podría variar desde 10³-10¹¹, más específicamente por lo menos 10⁴ células. Sería

conveniente que el número de células a ser administradas varíen dependiendo de las enfermedades específicas a ser tratadas, incluyendo pero sin limitarse al tamaño o volumen total / área de la superficie a ser tratada, así como la proximidad del sitio de administración a la ubicación de la región a ser tratada, entre otros factores familiares al biólogo medicinal.

5 Los términos período efectivo (o tiempo) y condiciones efectivas se refieren a un período de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos in vitro), necesarias o preferidas para un agente o composición farmacéutica para lograr el resultado deseado.

10 El término paciente o sujeto se refiere a animales, incluyendo mamíferos, preferiblemente humanos, quienes son tratados con las composiciones farmacéuticas de acuerdo a los métodos descritos aquí.

15 El término transporte (o medio) farmacéuticamente aceptable, que pudiese ser usado alternamente con el término portador o medio biológicamente compatible, se refiere a formas de reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y / o dosis que aparte de ser compatibles con las células y otros agentes a ser administrados terapéuticamente, también son, dentro del ámbito de un buen juicio médico, apropiado para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones excesivas conmesuradas con una tasa razonable de beneficio / riesgo. Tal como se describió en mayor detalle aquí, los portadores farmacéuticamente aceptables apropiados para su uso en esta invención incluyen materiales líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y sólidos (por ejemplo, conductores y matrices de células, tubos, láminas y otros materiales parecidos conocidos en la industria y la práctica y descritos en mayor detalle aquí). Estos materiales semisólidos y sólidos podrían ser diseñados para resistir su degradación dentro del cuerpo (no biodegradables) o podrían ser diseñados para ser degradados dentro del cuerpo (biodegradables, bioerosionable). Un material biodegradable incluso podría ser bioreabsorbible o bioabsorbible, en otras palabras, podría ser disuelto y absorbido en fluidos corporales (un ejemplo es los implantes solubles en agua), o degradados y finalmente eliminados del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o su descomposición y eliminación por medio de vías naturales.

25 Algunos términos se usan aquí en referencia a la terapia de reemplazo de células. Los términos transferencia autóloga, trasplante autólogo, autoinjerto y similares se refieren a los tratamientos indicados donde el donante de células también es el receptor de la terapia de reemplazo de células. Los términos transferencia alogénica, trasplante alogénico, aloinjerto y similares se refieren a tratamientos donde el donante de las células es de la misma especie que el receptor de la terapia de reemplazo de células, pero no es el mismo individuo. Una transferencia de células en la cual las células del donante han sido emparejadas es histocompatiblemente con un receptor se denomina a veces como transferencia singénica. Los términos xenoinjerto, xenotrasplante, xenoinjerto y parecidos se refieren a tratamientos donde el donante de células es de una especie diferente que el receptor de la terapia de reemplazo de células.

Descripción

40 Las condiciones neurodegenerativas, que abarcan desórdenes y enfermedades agudas, crónicas y progresivas que tienen una variedad diversa de causas, tienen como característica común la disfunción o pérdida de un grupo específico o vulnerable de células neurales. Esta similitud permite métodos terapéuticos parecidos para la reparación y regeneración de tejido neural vulnerable o dañado, una de las cuales es la terapia que se basan en células. En sus varias secciones descritas aquí, esta invención presenta métodos y suministra composiciones farmacéuticas para su uso en la reparación y regeneración neural que utiliza células progenitoras y poblaciones de células de la invención derivadas de tejidos posparto. La invención es aplicable a cualquier condición neurodegenerativa, pero se espera que sea particularmente adecuada para varios desórdenes neurales para los cuales el tratamiento y la cura han sido difíciles o no han existido. Estos incluyen, sin limitarse, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, ataques fulminantes, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, y lesiones del nervio periférico (por ejemplo, relacionada con neuropatía diabética).

55 Cómo acabamos de resumir, la invención es generalmente dirigida células aisladas derivadas del posparto (PPDCs - postpartum-derived cells), que son derivadas de tejidos del cordón umbilical libres de sangre. Los PPDCs son capaces de auto renovarse y de expandirse en cultivos y tienen el potencial de diferenciarse en células de fenotipo neurales. Ciertos cuerpos de la invención destacan poblaciones que poseen aquellas células, composiciones farmacéuticas que contienen las células y ciertas secciones del descubrimiento destacan componentes o productos relacionados, y métodos para utilizar las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de pacientes con condiciones neurodegenerativas agudas o crónicas. Las células derivadas de posparto han sido caracterizadas por sus propiedades de crecimiento en cultivos, por sus marcadores de superficie celulares, por su expresión genética, por su habilidad para producir ciertos factores tróficos bioquímicos, y por sus propiedades inmunológicas.

Preparación de PPDCs

65 De acuerdo a los métodos descritos aquí, una placenta de mamífero y un cordón umbilical son recuperados en el momento o un poco después de la finalización del término completo o pre-término de un embarazo, por ejemplo, después de la expulsión después del nacimiento. El tejido de posparto puede ser transportado desde el lugar de

5 nacimiento a un laboratorio en un contenedor estéril tal como un matraz, bazo, plato de cultivos, o una bolsa. El contenedor podría tener una solución o un medio, incluyendo pero sin limitarse a, una solución salina, tal como, por ejemplo algo similar a un medio de águila modificado de Dulbecco (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium) o tampón de fosfato salino (PBS - phosphate buffered saline), o cualquier solución utilizada para el transporte de
 10 órganos usados para trasplantes, tal como la solución de University of Wisconsin o una solución perfluorada. Uno o más agentes antibióticos y / o antimicóticos, tales como pero sin limitarse a penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina, y nistatina, podrían añadirse al medio o al tampón. El tejido posparto podría enjuagarse con una solución anticoagulante tal como una solución que contenga heparina. Es preferible mantener el tejido alrededor de 4-10 °C previo a la extracción de los PPDCs. Es aún mejor que el tejido no se congele antes de la extracción de los PPDCs.

15 El aislamiento de las PPDCs ocurre preferiblemente en entornos asépticos. El cordón umbilical podría separarse de la placenta por medios conocidos en la práctica. Alternamente, el cordón umbilical y la placenta son usados sin ser separados. Por ejemplo, el tejido de posparto podría lavarse con una solución de tampón, tal como pero sin limitarse al tampón fosfato salino. El enjuague de tampón también podría incluir uno o más agentes antimicóticos y / o antibióticos, tales como pero sin limitarse a penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

20 El tejido de posparto se lo separa con fuerza mecánica (fuerzas desmenuzadoras o esquilantes). En un cuerpo que es actualmente preferido, el procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. Muchas enzimas son conocidas en la práctica por su utilidad para el aislamiento de células individuales de matrices complejas de tejidos para facilitar su crecimiento en cultivos. Comercialmente existen varios tipos de enzimas, que varían desde enzimas poco digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutral, dispasa) a altamente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina). Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles con este proceso incluyen actividades enzimáticas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serin proteasas (tales como tripsina, quimotripsina, elastasa o), y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, las colagenasas son conocidas por su utilidad para aislar varias células de tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN
 25 monocatenada y pueden minimizar la aglutinación celular durante el aislamiento. Los métodos preferidos involucran tratamiento enzimático como por ejemplo colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa, y hialuronidasa, y aquellos métodos son provistos aquí en ciertas secciones, una mezcla de colagenasa y dispasa proteasa neutra son utilizadas en el paso disociante. Más preferidos aún son aquellos métodos que utilizan digestión en la presencia de por lo menos una colagenasa clostridium histolyticum, y cualquiera de las actividades proteasas, dispasas y termolisina. Aún más convenientes son los métodos que utilizan digestión con actividades de enzimas colagenasas y dispasas. Otros métodos preferidos que incluyen digestión con una actividad hialuronidasa adicionalmente a las actividades colagenasa y dispasa. El técnico experimentado apreciará que muchos tratamientos enzimáticos son conocidos en la práctica para aislar células de varias fuentes de tejidos. Por ejemplo, las series LIBERASE Blendzyme (Roche) de combinaciones de enzimas son apropiadas para su uso en métodos instantáneos. También se conocen otras fuentes de enzimas, y técnicos con experiencia también pueden obtener esas enzimas directamente de sus fuentes naturales. El técnico con experiencia también está bien equipado para evaluar nuevas o
 30 adicionales enzimas o combinaciones de enzimas por su utilidad para aislar las células de la invención. Los tratamientos preferidos de enzimas toman 0.5, 1, 1.5, o dos horas o más de duración. En otras secciones, el tejido se incuba a 37 °C durante el tratamiento enzimático del paso de disociación.

45 En ciertas secciones de la presentación el tejido de posparto es separado en porciones que incluyen varios aspectos del tejido, como son los aspectos neonatal, neonatal / maternal, y maternal de la placenta, por ejemplo. Las secciones separadas se disocian mecánicamente y / o enzimáticamente de acuerdo a los métodos descritos aquí. Las células de linajes neonatal o maternal pueden ser identificadas de cualquier forma conocida en la práctica, por ejemplo, por un análisis de cariotipos o una hibridación in situ para un cromosoma Y.

50 Las Células aisladas o tejido de posparto de los cuales crecen los PPDCs podrían ser utilizados para iniciar, o sembrar cultivos de células. Las células aisladas son transferidas a recipientes estériles de cultivos de tejidos ya sean descubiertos o cubiertos con matrices o ligandos extracelulares tales como laminina, colágeno (nativo, desnaturalizado o entrecruzado), gelatina, fibronectina, y otras proteínas de matriz extracelular. Se cultivan los PPDCs en cualquier medio de cultivo capaz de sostener crecimiento de células tales como, pero sin limitarse a,
 55 DMEM (de glucosa alta o baja), DMEM avanzada, DMEM/MCDB 201, medio de base de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), el medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio de crecimiento de células madre mesénquimas (MSCGM - Mesenchymal Stem Cell Growth Medium) DMEM/F12, RPMI 1640, y CELL-GRO-FREE. El medio de cultivo puede ser suplementado con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero fetal bovino (FBS - fetal bovine serum), preferiblemente alrededor de 2 - 15% (v/v); suero equino (ES - equine serum); suero humano (HS - human serum); β-mercaptoetanol (BME o 2-ME), preferiblemente alrededor de 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF - platelet-derived growth factor), factor de crecimiento epidérmico (EGF - epidermal growth factor), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF - fibroblast growth factor), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF - vascular endotelial growth factor), factor de crecimiento de tipo insulina -1 (IGF-1 - insulin-like growth factor-1) factor inhibidor del leucocito (LIF - leukocyte inhibitory factor) y eritropoyetina; aminoácidos, incluyendo valina; y uno o más agentes antibióticos y / o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G,
 65

sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina, y nistatina, ya sean solas o en combinación. El medio de cultivo comprende preferiblemente un medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa, suero, BME y un agente antibiótico).

5 Las células son sembradas en los portadores del cultivo a una densidad que permita el crecimiento de las células. En secciones específicas, las células son cultivada alrededor de un 0 a un 5% del volumen de CO₂ en el aire. En algunas secciones, las células se cultivan alrededor de 2 a 25% de O₂ en el aire, preferiblemente entre un 5 a 20% de O₂ en el aire. Las células son preferiblemente cultivadas desde 25 a 40 °C y más preferiblemente se las cultiva a 37 °C. Las células se las cultiva idoneamente en una incubadora. El medio en los envases de cultivo puede ser
10 estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Las PPDCs se las cultiva preferiblemente en bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, vitamina C, catalasa, vitamina E, Acetilcisteína). "Bajo estrés asociativo", como se utiliza aquí, se refiere a condiciones en las que el daño radical es inexistente o mínimo para las células cultivadas.

15 los métodos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación del medio, y técnicas de cultivo de células son bien conocidos en esta práctica y están descritos en diversas fuentes, incluyendo Doyle et al., (eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES (CULTIVOS DE CÉLULAS Y TEJIDOS: PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO), John Wiley & Sons, Chichester; and Ho and Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS (BIOREACTORES DE CÉLULAS DE ANIMALES), Butterworth-Heinemann, Boston.

20 Después de cultivar los fragmentos aislados de células o tejidos por un período suficientemente largo de tiempo, las PPDCs habrán crecido, ya sea por una migración desde el tejido de posparto o por una división de células, o ambos. En algunos segmentos de la invención, los PPDCs son pasados, o removidos a base de cultivo separado que contienen un medio fresco del mismo o diferente tipo al que fue usado inicialmente, donde la población de células
25 puede ser expandida en una forma mitótica. Las células de la invención pueden ser utilizadas en cualquier momento entre el pase cero y la senectud. Las células se pasan preferiblemente entre 3 a 25 veces, idóneamente son pasadas de 4 hasta 12 veces, e idealmente son pasadas de 10 u 11 veces. Clonar y / o sub clonar podría realizarse para confirmar que una población de clones de células han sido aisladas.

30 En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos de célula presentes en el tejidos de posparto se fraccionan en sus poblaciones de las cuales se pueden aislar a PPDCs. Esto puede lograrse usando técnicas estándar de separación de células incluyendo, pero no limitándose a, tratamiento enzimático para desasociar el tejido de posparto en sus varias células de sus componentes, seguido de una clonación y selección de tipos específicos de células, por ejemplo pero sin limitarse a la selección basándose en preparadores morfológicos y / o bioquímicos; el
35 crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación que se basa en aglutinamiento diferencial de las células en una población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soya; procedimientos de congelación y descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en poblaciones mixtas; filtraciones; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación en contra de la corriente); separación por unidades de gravedad; distribución contracorriente; electroforesis; Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS - fluorescence activated cell sorting). Para una revisión de las técnicas de selección clónica y de separación de células, refiérase a Freshney, 1994, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES (CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES: UN MANUAL DE TÉCNICAS BÁSICAS), 3rd Ed., Wiley-Liss, Inc., Nueva York.

45 El medio de cultivo será cambiado como sea necesario, por ejemplo, aspirando cuidadosamente el medio del plato, por ejemplo, con una pipeta, y llenando con un medio fresco. Se continúa con la incubación hasta que se acumulen en el plato un número o densidad suficiente de células. Las secciones originales de tejido extraídas podrían ser removidas y las células que queden podría ser tripnizadas usando técnicas estándar o usando un escurridor de células. Después de la tripnización, se recogen las células, se las remueve al medio fresco y se incuban como se
50 mencionó anteriormente. En algunas secciones, el medio se cambia por lo menos una vez cada 24 horas aproximadamente después de la tripnización para remover cualquier material flotante. Las células que quedan en el cultivo se consideran PPDCs.

Las PPDCs podrían conservarse criogénicamente. De esa misma forma, en una sección que se describe en mayor
55 detalle a continuación, las PPDCs para transferencias autólogas (ya sea para la madre o para el niño) podrían derivarse de tejidos posparto apropiados después del nacimiento de un niño, entonces podrían conservarse criogénicamente para que éstas estén disponibles por si acaso se las llegase a necesitar después para un trasplante.

60 **Características de las PPDCs**

Las PPDCs podrían caracterizarse, por ejemplo, por propiedades de crecimiento (por ejemplo, capacidad de doblaje de la población, tiempo de doblaje, pases para su senectud), análisis cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal, linaje maternal o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), Inmunohistoquímica y / o inmunocitoquímica
65 (por ejemplo, para la detección de epítomos), perfiles de expresión genética (por ejemplo, matrices de chip de ADN; reacción en cadena polimerasa (por ejemplo, PCR transcriptasa reversa, PCR en tiempo real, y PCR convencional)),

matrices de proteínas, secreciones proteínicas (por ejemplo, ensayo de plasma coagulado o análisis de medios condicionados de PDC, por ejemplo, por ensayo por Inmunoabsorción Ligada a Enzimas (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)), reacción de linfocitos mixtos (por ejemplo, como una medida de estimulación de PBMCs), y / u otros métodos conocidos en la práctica.

5 Ejemplos de PPDCs de la presentación derivadas de tejidos relacionados a la placenta se depositaron con la American Type Culture Collection (ATCC - Colección Americana de Tipos de Cultivo, Manassas, VA) y se les asignó números de acceso de ATCC de la siguiente forma: (1) designación de cepa PLA 071003 (P8) fue depositada el 15 de junio de 2004 y se le asignó el número de acceso PTA-6074; la designación de cepa PLA 071003 (P11) fue depositada el 15 de junio de 2004 y se le asignó el número de acceso PTA-6075; y (3) la designación de cepa PLA 071003 (P16) fue depositada el 16 de junio de 2004 y se le asignó el número de acceso PTA-6079. Ejemplos de las PPDCs de la invención derivadas de tejido umbilical fueron depositadas con la American Type Culture Collection el 10 de junio de 2004 y se les asignó números de acceso ATCC de la siguiente forma: (1) a la designación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el número de acceso PTA-6067; y (2) a la designación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el número de acceso No. PTA-6068.

En varias secciones, las PPDCs tienen una o más de las siguientes características de crecimiento (1) requieren valina para su crecimiento en cultivos; (2) son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno desde alrededor de 5% hasta por lo menos alrededor de un 20% (3) tienen el potencial de por lo menos 40 doblajes en cultivos antes de alcanzar la senectud; y (4) se adhieren y se expanden en un contenedor de cultivos de tejidos descubiertos, donde el contenedor de cultivos de tejidos cubiertos comprenden gelatina, laminina, colágeno, poliomitina, vitronectina, o fibronectina.

En ciertas secciones las PPDCs poseen cariotipo normal, que se mantiene mientras las células son pasadas. La práctica de los cariotipos es particularmente útil para identificar y distinguir las células neonatales de las células maternas que se derivan de la placenta. Métodos para analizar el cariotipo están disponibles y son conocidos en esta industria.

En otras secciones de la presentación, las PPDCs podrían caracterizarse por la producción de ciertas proteínas, incluyendo (1) la producción de por lo menos un de factor de tejido, vimentina, y actina de músculo liso alfa; y (2) la producción de por lo menos uno de los siguientes marcadores de superficie celular CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 and HLA-A,B,C como se detecta por citometría de flujo. En otras secciones, de esta presentación las PPDCs pueden ser caracterizadas por la falta de producción de al menos uno de los siguientes marcadores de superficie celular CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta por la citometría de flujo. Son particularmente preferidas las células que producen por lo menos dos factores de tejido, vimentina y actina de músculo liso alfa. Son aun más preferibles las células que producen los 3 factores de tejido proteínico, vimentina y actina de músculo liso alfa.

En otras secciones, las PPDCs podrían caracterizarse por expresiones genéticas, que en lo que se refiere a una célula humana eso es un fibroblasto, una célula madre mesénquima, o una célula de la médula ósea de la cresta iliaca, se incrementa para una codificación genética a por lo menos una de interleucina 8; retícula 1; ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 1 (actividad que estimula el crecimiento de melanoma, alfa); ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 6 (proteína quimiotáctica granulocita 2); ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 3; factor de necrosis tumoral, proteína inducida de alpha 3; miembro super familiar de lectina tipo C 2; tumor Wilms 1; miembro familiar 1 de aldehído deshidrogenasa A2; renina; receptor de lipoproteínas oxidadas de baja densidad 1; IMAGE:4179671 de clon de homo sapiens; quinasa proteínica C zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; reducción en cáncer de ovario 1; y gen de homo sapiens del clon DKFZp547k1113.

En otras secciones más, las PPDCs podría caracterizarse por expresiones genéticas, que en relación a la célula humana son fibroblastos, una célula madre mesénquima, o una célula de médula ósea de cresta iliaca, se reduce para una codificación genética de por lo menos uno de: homeobox de corta estatura 2; proteína kDa de golpe de calor 2; ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 12 (factor derivado de la célula estromática 1); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox mesénquima 2 (homeobox que específicamente detiene el crecimiento); homólogo de homeobox sine oculis 1 (Drosophila); cristalina, alfa B; activador asociado alborotado de morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralin 1; tetranectina (proteína que vincula el plasminógeno); árbol homológico src (SH3) y dominio rico en cisteína; hidroxilasa 25 de colesterol; factor de transcripción relacionado con la diferenciación de los osteoblastos (RUNX2) 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de endopeptidasa C de pro - colágeno, homólogo rizado 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alpha 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox iroquois 5; hephaestin; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de la vesícula sináptica; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína que vincula el factor de crecimiento parecida a la insulina 2, 36kDa; fis FLJ12280 de ADNc de homo sapiens, clon MAMMA1001744; factor parecido al receptor de citosina 1; canal activado por el calcio de conducción intermedia / pequeña de potasio, sub - familia N, miembro 4; integrina, beta 7; co - activador transcripcional con motivo vinculante de PDZ (TAZ); homólogo de homeobox sine oculis 2 (Drosophila); proteína KIAA1034; proteína de la membrana asociada con la vesícula 5 (myobrevin); proteína de matriz extracelular tipo fibulina 1 que contiene EGF; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox cercano 5;

5 proteína hipotética FLJ20373; Alcohol deshidrogenasa (NADP+), miembro C3 (hidroxiesteroide deshidrogenasa alfa 3, tipo II); biglicano; co - activador transcripcional con motivo que vincula el PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios que se repiten tipo EGF); EUROIMAGE 1968422 de clon ADNc con inserción completa de ARNm de homo sapiens; EphA3; proteína KIAA0367; receptor péptido natriurético C / ciclasa de guanilato C (receptor de péptidos atrio – natriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de homo sapiens; DKFZp564B222 de ADNc (del clon DKFZp564B222); proteína de interacción E1B 19kDa BCL2 / de adenovirus parecido a 3; proteína vinculadora AE 1; y péptido de la sub unidad VIIa de oxidasa de citocromo C 1 (músculo).

10 En otras secciones, las PPDCs de la presentación pueden caracterizarse por la secreción de por lo menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES, y TIMP1. En otras secciones, las PPDCs de la presentación podrían caracterizarse por no segregar por lo menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, 1309, MDC, y VEGF, tal como lo detectó ELISA

15 En secciones específicas, las células se conforman de dos o más de las características de crecimiento, de producción de marcadores de proteína / superficie, de expresiones genéticas o de secreción de sustancias tal como se listó anteriormente. Son más preferidas aquellas células que tienen tres, cuatro o cinco o más de estas características. Aún más conveniente son las PPDCs que tienen 6, 7, 8 o más características. Las más convenientes de todas las células son las que tienen todas las características mencionadas anteriormente.

20 Entre las células que son preferidas actualmente para su uso con la invención en diferentes de sus aspectos son las células de posparto que tienen las características descritas anteriormente y más específicamente aquellas donde las células tienen cariotipos normales y los mantienen mientras efectúan los pases, y más aún donde las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, y HLA-A,B,C, donde las células producen proteínas detectables inmunológicamente que corresponden a los marcadores listados y que
25 adicionalmente a lo que se acaba de mencionar no producen proteínas que corresponden a ninguno de los otros marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR,DP,DQ como se detecta con la citometría de flujo.

30 Ciertas células que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de las líneas que conllevan a varios fenotipos no son estables y por lo tanto podrían diferenciarse espontáneamente. Actualmente se prefiere para el de la invención a las células que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo a lo largo de líneas neurales. Las células preferidas, cuando crecen en un entorno de crecimiento, son sustancialmente estables en referencia a los marcadores de células producidos en su superficie, y en relación al patrón de expresión de varios genes, por ejemplo como se determina usando un CHIP GENÉTICO de Affymetrix. Las células se mantienen sustancialmente constantes, por
35 ejemplo en sus características de marcación de superficie en cada pase, durante múltiples doblajes de población.

40 Sin embargo, una característica de las PPDCs podría inducirse deliberadamente para diferenciarse en fenotipos de linaje neural al someterlos a condiciones de inducción de diferenciación de cultivos celulares. Esto podría lograrse por uno o más métodos conocidos en la industria. Por ejemplo, como se muestra aquí, las PPDCs podrían ser chapadas en matraces cubiertos con laminina en un medio con Neurobasal - A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27 (suplemento B27, Invitrogen), L- glutamina y penicilina / estreptomycin, la combinación a la cual se refiere aquí como medio de Expansión Progenitor Neural (NPE - Neural Progenitor Expansion). Un Medio NPE podría ser suplementado aún más con bFGF y / o EGF. Alternamente, las PPDCs podrían inducirse a diferenciarse in vitro al (1) co - cultivar las PPDCs con células progenitoras neurales, o (2) producir las PPDCs en un medio acondicionado de células progenitoras neurales.
45

La diferenciación de las PPDCs podría demostrarse por una morfología de células bipolares con procesos extendidos. Las poblaciones de células inducidas podrían mostrarse positivas en la presencia de nestina. PPDCs diferenciadas podrían evaluarse por la detección de nestina, (Tubulina TuJ1), GFAP, hidroxilasa tirosina, GABA, 04 y / o MBP. En algunas secciones, las PPDCs han mostrado la habilidad de formar cuerpos tridimensionales, características de formaciones de las células madres neuronales de neuroesferas.
50

Poblaciones, modificaciones, componentes y productos de las PPDCs

Otro aspecto del invento presenta a poblaciones de las PPDCs descritas anteriormente. En algunas secciones, la población celular es heterogénea. Una población celular heterogénea del invento puede comprender a por lo menos alrededor de un 5%, un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, o un 95% de PPDCs del invento. Las poblaciones celulares heterogéneas del invento pueden comprender a células madres no embrionarias u otras células no embrionarias, tales como células progenitoras neurales, o puede comprender además células neurales diferenciadas. En algunas secciones, las poblaciones son sustancialmente homogéneas, es decir, comprende sustancialmente sólo a PPDCs (preferiblemente por lo menos a alrededor de un 96%, un 97%, un 98%, un 99% o más PPDCs). La homogeneidad de una población de células podría lograrse por cualquier método conocido en la industria, por ejemplo, organización de células (por ejemplo, citometría de flujo) o por expansión clónica de acuerdo a los métodos conocidos. Por lo tanto, las poblaciones preferidas de PPDCs homogéneas podrían incluir una línea de células clónicas de células derivadas del posparto. Aquellas poblaciones son particularmente útiles cuando un clon celular con alta funcionalidad deseable ha sido aislado.
65

Adicionalmente como se menciona aquí, existen poblaciones de células incubadas con la presencia de uno o más factores, o bajo condiciones, que estimulan la diferenciación de las células madre a lo largo de una ruta neurogénica. Aquellos factores son conocidos en la industria y el técnico con experiencia apreciará que aquella determinación de condiciones apropiadas de diferenciación se pueda lograr con experimentación de rutina. La optimización de aquellas condiciones puede ser lograda por diseño y análisis experimental estadístico, por ejemplo, la metodología de respuesta de superficie permite una optimización simultánea de múltiples variables, por ejemplo en un cultivo biológico. Actualmente los factores preferidos incluyen, pero no se limitan a factores tales como factores de crecimiento o tróficos, agentes que previenen la metilación, células de linaje neural con co - cultivos o cultivos en medios acondicionados para células de linaje neural, así como otras condiciones conocidas en la industria para estimular la diferenciación de células madres a lo largo de rutas o linajes neurogénicos (referirse a, por ejemplo, Lang, K.J.D. et al., 2004, J. Neurosci. Res. 76: 184-192; Johe, K.K. et al., 1996, Genes Devel. 10: 3129-3140; Gottlieb, D., 2002, Ann. Rev. Neurosci. 25: 381-407).

Las PPDCs también pueden modificarse genéticamente para producir productos genéticos neuro - terapéuticamente útiles, o para producir agentes antineoplásicos para el tratamiento de tumores, por ejemplo. La modificación genética se puede lograr usando cualquiera de una variedad de vectores que incluyen, pero no se limitan a, vectores de integración viral, por ejemplo, vector del retrovirus o vectores virales adenoasociados; vectores replicativos no integradores, por ejemplo, vectores del virus papiloma, vectores SV40, vectores adenovirales; o vectores virales de replicación defectuosa. Otros métodos de introducir ADN a células incluyen el uso de liposomas, Electroporación, una pistola de partículas, o inserción directa del ADN.

Las células huéspedes son transformadas, otras transfectadas preferiblemente con ADN controlado por o en asociación operativa con, uno o más elementos de control de expresión apropiados tales como secuencias promotoras o estimuladoras, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, entre otras, y marcadores seleccionables. Cualquier promotor podría ser usado para dirigir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan a, el promotor / incentivador CMV, SV 40, el virus del papiloma, el virus Epstein - Barr o el promotor del gen de elastina. En algunas secciones, los elementos de control utilizados para dirigir la expresión del gen de interés pueden permitir que se regule la expresión del gen para que el producto sea sintetizado solamente cuando se necesite hacerlo in vivo. Si se desea una expresión transitoria, se puede usar preferiblemente promotores constitutivos en un vector no integrador y / o de replicación defectuosa. Alternamente, promotores inducibles podrían ser utilizados para dirigir la expresión del gen insertado cuando fuese necesario. Promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados con las proteínas Metalotioneínas y de choque térmico.

Siguiendo la introducción de ADN foráneo, se podría dejar que crezcan las células diseñadas en un medio enriquecido y después cambiadas a un medio seleccionado. El marcador seleccionado en el ADN foráneo otorga resistencia a la selección y permite a las células integren establemente el ADN foráneo como, por ejemplo, en un plásmido, a sus cromosomas y que crezca para formar centros los cuales, a cambio, pueden ser clonados y expandidos en líneas celulares. Este método puede ser usado ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen el producto genético.

Las células de la invención podrían diseñarse genéticamente para “noquear” o “tumbar” factores de expresión que promueven la inflamación o el rechazo en el lugar del implante. Técnicas ovulatorias negativas para la reducción de niveles de expresión genéticos del objetivo o niveles de actividad de producción genética del objetivo se cubren más adelante. El término “modulación negativa”, tal como se usa aquí, se refiere a una reducción en el nivel y / o actividad del producto genético del objetivo en relación a la ausencia de un tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo a una célula neural o célula glial que puede reducirse o noquearse usando varias técnicas que incluyen, por ejemplo, inhibición de expresión al desactivar un gen utilizando la técnica de recombinación homóloga. Comúnmente, una codificación de exón de una importante región de la proteína (o un exón que está a 5' de esa región) se interrumpe por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, previniendo la producción de ARNm de aquel gen objetivo resultando en la desactivación de ese gen. También podría desactivarse un gen al crear una eliminación parcial de un gen o al borrar totalmente el gen. Al utilizar una construcción con dos regiones de homología para el gen objetivo que están muy separados en el genoma, las secuencias que intervienen en las dos regiones pueden ser eliminadas (Mombaerts et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 88:3084). Moléculas antisentido, enzimas de ADN, ribozimas, ARN pequeño que interfiere (siRNA - small interfering RNA) y otras que inhiben la expresión del gen objetivo también pueden ser usadas para reducir el nivel de actividad del gen objetivo. Por ejemplo, moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de complejos genéticos importantes de histocompatibilidad (HLA) han demostrado ser muy versátiles en relación a respuestas inmunológicas. Es más, moléculas de triple hélice pueden ser utilizadas para reducir el nivel de actividad de un gen objetivo. Estas técnicas se describen en mayor detalle por L.G. Davis et al. (eds), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (MÉTODOS BÁSICOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR), 2da ed., Appleton & Lange, Norwalk, CN.

En otros aspectos, la presentación suministra lisados de células y fracciones solubles de células preparadas a partir de PPDCs, y el invento suministra poblaciones de células heterogéneas u homogéneas que incluyen a PPDCs, así como a poblaciones que han sido genéticamente modificadas o que han sido estimuladas para diferenciarse a lo largo de una ruta neurogénica. Aquellos lisados y fracciones tienen muchos usos. El uso de fracciones solubles de

lisados PPDCs (por ejemplo, substancialmente libres de membranas) in vivo, por ejemplo, permiten que el medio intracelular beneficioso sea usado en forma de un alotransplante en un paciente sin introducir un monto considerable de proteínas de superficie de células que muy posiblemente activarían un rechazo, u otra respuesta biológica adversa. Los métodos para lisar células son muy conocidos en la industria e incluyen varios medios de ruptura mecánica, ruptura enzimática o ruptura química o una combinación de éstas. Aquellos lisados de células podrían prepararse de células directamente en su medio de crecimiento y por lo tanto contendrían factores de crecimiento secretados y parecidos, o podrían prepararse de células enjuagadas completamente del medio, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células enjuagadas podrían volver a suspenderse en concentraciones más grandes que la densidad poblacional original si es que se prefiriese.

En una sección, se prepara lisados completos de células, por ejemplo, al alterar células sin separarlas subsiguientemente de las fracciones de células. En otra sección, una fracción de membranas de células se separa de una fracción soluble de células por métodos rutinarios conocidos en la industria, por ejemplo, centrifugación, filtración o métodos similares.

Los lisados celulares o fracciones solubles celulares del descubrimiento preparados de poblaciones celulares derivadas de posparto podrían ser usadas tal como están, concentrándolas aún más, por ejemplo, por medio de ultrafiltración o liofilización, o hasta secadas, parcialmente purificadas, combinadas con portadores farmacéuticamente aceptables o diluyentes como se lo hace en la industria, o combinadas con otros componentes tales como agentes biológicos, por ejemplo composiciones proteínicas farmacéuticamente útiles. Estos lisados o fracciones de células podrían ser utilizadas in vitro o in vivo, solas o por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. Los lisados, si se introducen in vivo, podrían colocarse localmente en un lugar del tratamiento o remotamente para suministrar, por ejemplo los factores de crecimiento celular necesitados por un paciente.

En otra sección, las PPDCs pueden ser cultivados in vitro para crear productos biológicos abundantemente. Por ejemplo, aquellas células las cuales ya sea que produce naturalmente el producto biológico de interés (por ejemplo, un factor trófico), o han sido diseñadas genéticamente para crear un producto biológico, pueden ser expandidas crónicamente usando las técnicas de cultivo aquí descritas. Alternamente, las células se pueden expandir en un medio que induce diferenciación a un linaje neural. En cualquier caso, los productos biológicos creados por la célula y secretados al medio pueden ser aislados rápidamente del medio acondicionado usando técnicas estándar de separación, por ejemplo, tales como precipitaciones de proteínas diferenciales, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía, filtración de gel, electroforesis, y HPLC, sólo para nombrar algunos. Un "bio reactor" podría ser usado para tomar ventaja del método de flujo para alimentar a, por ejemplo, un cultivo tridimensional in vitro. Esencialmente, en la medida que se pasa un medio fresco a través de un cultivo triimensional, el producto biológico se enjuaga del cultivo y en ese momento podría ser aislado del flujo saliente, como se describió anteriormente.

Alternamente, un product biológico de interés podría permanecer dentro de la célula y, por lo tanto, su recaudación podría requerir que las células sean lisadas, como se describió anteriormente. El producto biológico puede entonces ser purificado usando una o más de las técnicas descritas anteriormente.

En otras secciones, la presentación suministra medios acondicionados de PPDCs cultivadas para su uso in vitro e in vivo como se describe a continuación. El uso del medio acondicionado de PPDC permite a los factores tróficos beneficiosos secretados por las PPDCs a ser usadas alogénicamente en forma de transplantes en un paciente sin introducir células intactas que podrían causar rechazo, u otras respuestas adversas inmunológicas. El medio acondicionado es preparado al cultivar células en un medio de cultivo, y después remover a las células del medio.

El medio acondicionado preparado de poblaciones de células derivadas de posparto podría ser usado tal como está, concentrado mayormente, por ejemplo, por medio de ultrafiltración y liofilización, o hasta secos, parcialmente purificados, combinados con portadores farmacéuticamente aceptables o diluyentes tal como se conoce en la industria, o combinados con otros componentes tales como biológicos, por ejemplo composiciones proteínicas farmacéuticamente útiles. Los medios acondicionados podrían ser utilizados in vitro o in vivo, solos o por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. El medio acondicionado, si fuese introducido in vivo, podría colocarse localmente en un sitio del tratamiento, o remotamente para suministrar, por ejemplo el crecimiento celular o factores tróficos necesarios para un paciente.

En otra sección, la presentación describe una matriz extracelular (ECM) producida al cultivar las PPDCs en sustratos líquidos, sólidos o semisólidos la cual es preparada y recaudada para usarse en la reparación y reemplazo de tejidos como una alternativa para implantar células vivas en un sujeto que necesite reparación o reemplazo de tejidos. Los PPDCs son cultivados in vitro, en marcos de trabajo tridimensionales como se describe aquí en otras secciones, bajo condiciones tales que monto deseado de ECM es secretado en el marco de trabajo. La conformación del nuevo tejido es removida, y el ECM es procesado para darle más uso, por ejemplo, en una preparación inyectable. Para lograr esto, se mata a las células en el área de trabajo y a cualquier vestigio celular se lo remueve de esa área de trabajo. Este proceso puede ser ejecutado en varias formas diferentes. Por ejemplo, el tejido viviente podría ser congelado rápidamente en nitrógeno líquido sin un conservador criogénico, o el tejido puede ser sumergido en agua destilada estéril para que las células irrumpa en respuesta a la presión osmótica.

Una vez que las células han muerto, las membranas celulares pueden ser perturbadas y los vestigios removidos por medio de un tratamiento con enjuague con detergente ligero tal como EDTA, CHAPS o un detergente zwitteriónico. Alternamente, el tejido puede ser digerido y / o extraído de forma enzimática con reactivos que descomponen las membranas celulares y permiten la remoción de contenidos celulares. Ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a hialuronidasas, dispasas, proteasas, nucleasas. Ejemplos de detergentes incluyen detergentes iónicos tales como, por ejemplo, alcohol poliéter alquilarilo (TRITON X-100), etanol – polietoxi octilfenoxi (Rohm y Haas, Filadelfia, PA), BRIJ-35, éter lauril polietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, CA), polisorbato 20 (TWEEN 20), un polietoxietanol monooleato laureado, (Rohm and Haas), lauril éter de polietileno (Rohm and Haas); y detergentes iónicos como, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio, alcoholes superiores alifáticos sulfatados, alcanos sulfonados y alkylarenes sulfonados que contengan 7 a 22 átomos de carbono en una cadena dividida o sin dividir.

La recaudación de los ECM puede ser lograda en varias formas, dependiendo, por ejemplo, si el tejido ha sido formado en un área de trabajo tridimensional que es biodegradable o no es biodegradable. Por ejemplo, si el área degradable no fuese biodegradable, el ECM puede ser removido al exponer al área de trabajo a Sonicación, Jet de agua de alta presión, raspado mecánico o un tratamiento ligero con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de las anteriores.

Si el área de trabajo es biodegradable, los ECM pueden ser recolectados, por ejemplo, al permitir que el área de trabajo se degrade o se disuelva en una solución. Alternamente, si el área de trabajo biodegradable se compone de un material que se puede inyectar asimismo junto con los ECM, el área de trabajo y los ECM pueden ser procesados en conjunto para su subsiguiente inyección. Alternamente, los ECM pueden ser removidos del área de trabajo biodegradable mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente para recolectar los ECM del área de trabajo que no sea biodegradable. Todos los procesos de recolección son diseñados preferiblemente para no desnaturalizar a los ECM.

Después de que han sido recolectados, los ECM podrían ser procesados aún más. Por ejemplo, los ECM pueden ser homogeneizados para afinar partículas usando técnicas que son conocidas en la industria como por medio de la sonicación, para que puedan pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes de los ECM pueden ser vinculados en forma cruzada, si se desease, por irradiación gamma. Preferiblemente, los ECM pueden ser irradiados con entre 0.25 a 2 megas rads para esterilizar y crear enlaces transversales en los ECM. Crear enlaces transversales químicos usando agentes que son tóxicos, tales como el glutaraldehído, es posible pero no generalmente conveniente.

Los montos y / tasas de proteínas, como los varios tipos de colágeno presentes en los ECM, podrían ajustarse al mezclar los ECM producidos por las células de la invención con los ECM de uno o más tipos de otras células. Adicionalmente, sustancias biológicamente activas tales como proteínas, factores de crecimiento y / o drogas, pueden incorporarse en los ECM. Idealmente las sustancias biológicamente activas incluyen factores de crecimiento de tejidos, tales como TGF - beta, y similares, que promueven la sanación y la reparación de tejidos en el lugar de la inyección. Tales agentes adicionales pueden ser utilizados en cualquiera de las secciones descritas aquí anteriormente, por ejemplo, con lisados de células completos de la presentación, fracciones de células solubles, o más aún, componentes y productos purificados de la presentación producidos por las PPDCs.

Composiciones Farmacéuticas que contienen PPDCs, Componentes o Productos PPDC

En otro aspecto, la invención suministra composiciones farmacéuticas que utilizan las PPDCs o poblaciones PPDC en varios métodos de tratamiento de condiciones neurodegenerativas. Se presentan las composiciones farmacéuticas que utilizan componentes y productos de las PPDCs en varios métodos para tratamiento de condiciones neurodegenerativas. Ciertos cuerpos de la invención abarcan composiciones farmacéuticas que se forman de células vivas (PPDCs por sí solas o mezcladas con otro tipo de células). Otros cuerpos del descubrimiento abarcan composiciones farmacéuticas conformadas de componentes celulares PPDC (por ejemplo lisado de células, fracciones de células solubles, medio acondicionado, ECM, o componentes con cualquiera de lo mencionado anteriormente) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por las PPDCs o por medio de modificación genética, medios acondicionados de cultivos PPDC). En cualquier caso, las composiciones farmacéuticas podrían comprender otros agentes activos adicionales, tales como agentes antiinflamatorios, agentes anti – apoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores neurotróficos o drogas neuro - regenerativas o neuro - protectivas conocidas en la industria.

Ejemplos de otros componentes que podrían ser agregados a composiciones farmacéuticas PPDC incluyen, pero no se limitan a: (1) otras drogas protectivas o beneficiosas desde el punto de vista neurológico; (2) componentes de matrices extracelulares seleccionadas, tales como uno o más tipos de colágenos conocidos en la industria, plasma rica en plaquetas, y drogas (alternamente, las PPDCs podrían ser diseñadas genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes anti-apoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), EPO mimético, trombotopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) -I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasas); (4) componentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidoras de quinasa p38 MAP, Inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, INFLIXIMAB, SIROLIMUS, y medicamentos Antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (como TEPOXALINA, TOLMETINA y

SUPROFENO); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como los inhibidores de la calcineurina, inhibidores de TORm, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) antioxidantes tales como probucol, vitaminas C y E, conenzyme Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; y (7) anestésicos locales, para nombrar unos pocos.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen a PPDCs formuladas con un portador o medio farmacéuticamente aceptable. Portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, soluciones salinas (tal como la solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, y carbohidratos, tales como la lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, y pirrolidina de polivinilo. Tales preparaciones se pueden esterilizar, y si se desease, se podrían mezclar con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, y colorantes. Portadores farmacéuticos adecuados para su uso en esta invención son conocidos en la industria, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas) (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y WO 96/05309.

10 15 Comúnmente, pero no exclusivamente, las composiciones farmacéuticas que incluyen componentes o productos PPDC, pero no las células vivas, se formulan como líquidos (o como tabletas sólidas, cápsulas y similares, cuando una entrada oral fuese apropiada). Estas pueden ser formuladas para su administración por cualquier ruta aceptable conocida en la industria para lograr una entrega de drogas y moléculas biológicas al tejido neural objetivo, incluyendo, pero sin limitarse a, vía oral, nasal, oftálmica y parenteral, incluyendo intravenosa. Las rutas específicas de administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, administraciones intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y / o rutas periespinales por medio de agujas intracraneales o intravertebrales y / o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

20 25 Las composiciones farmacéuticas compuestas de células vivas PPDC se formulan típicamente como líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, portadores y similares, tal como sea apropiado para el diseño del tejido neural). Las composiciones líquidas son formuladas para su administración por medio de cualquier ruta aceptable conocida en la industria para lograr una entrega de células vivas a los tejidos neurales objetivos. Comúnmente, éstas incluyen inyecciones o infusiones en el CNS o PNS, ya sea en una forma difusa o dirigida hacia el lugar de la enfermedad o aflicción neurológica, a través de una ruta de administración que incluye, pero no se limita a, rutas de administración intraoculares, intracerebrales, intraventriculares, intracerebroventriculares, intratecal, intracisternal, intraespinal y / o peri-espinal por una vía de entrega con agujas y / o catéteres intracraneales o intravertebrales con o sin dispositivos de bombeo.

30 35 40 45 Las composiciones farmacéuticas que se conforman de células vivas en un portador semisólido o sólido se formulan comúnmente para implantes quirúrgicos en el lugar del daño o afección neurológica. Sería útil que las composiciones líquidas pudiesen administrarse por procedimientos quirúrgicos. En algunas secciones, las composiciones farmacéuticas semisólidas o sólidas podrían incluir geles, enrejados, portadores e instrumentos similares semi - permeables, los cuales podrían ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en ciertos cuerpos, podría ser deseable o apropiado extraer células exógenas de sus alrededores, pero permitiendo que las células secreten y entreguen moléculas biológicas (por ejemplo, factores neuro - tróficos) a las células neurales de los alrededores. En estos cuerpos, las células podrían formularse como implantes autónomos compuestos de PPDCs o poblaciones de células que contienen PPDCs rodeadas por una barrera permeable selectiva no degradable que separe físicamente a las células trasplantadas del tejido huésped. Tales implantes son conocidos como "inmuno - protectores", puesto que tiene la capacidad de prevenir a las células y macromoléculas inmunológicas de matar a las células trasplantadas en la ausencia de una inmunosupresión inducida farmacéuticamente (para una revisión de aquellos dispositivos y métodos, referirse, por ejemplo, a P.A. Tresco et al., 2000, Adv. Drug Delivery (Entrega de Drogas) Rev. 42: 3-27).

50 55 En otras secciones, diferentes variedades de geles y redes degradables son utilizados para las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, materiales degradables particularmente apropiados para formulaciones de emisión sostenida incluyen polímeros biocompatibles, tales como poli (ácido láctico), poli (ácido láctico - co - glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y similares. La estructura, selección y uso de polímeros degradables en vehículos de entregas de drogas es revisado en algunas publicaciones, incluyendo, A. Domb et al., 1992, Polymers for Advanced Technologies (Polímeros y Tecnologías Avanzadas) 3:279.

60 65 En otras secciones, por ejemplo, para la reparación de grandes lesiones neurológicas, tal como una médula espinal dañada o partida o un cordón neural de una extremidad separada, podría ser deseable o apropiado el entregar las células en un portador o matriz biodegradable, preferiblemente bioreabsorbible o bioabsorbible. Estos bio - materiales tridimensionales típicos contienen a las células vivas adheridas al portador, dispersas dentro del portador, o incorporadas en una matriz extracelular atrapadas en el portador. Una vez implantadas en la región objetiva del cuerpo, estos implantes se integran con el tejido huésped, donde las células trasplantadas se establecen gradualmente (referirse, por ejemplo, a P.A. Tresco et al., 2000, supra; referirse también a D.W. Hutmacher, 2001, J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 12: 107-174).

5 Ejemplos de materiales portadores o matrices (a los cuales se los refiere algunas veces como “medio de trabajo”) que podrían ser usados en esta invención incluyen esterillas no tejidas, espumas porosas o péptidos autoensamblables. Las esterillas no tejidas, por ejemplo, podrían ser formadas usando fibras hechas de copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA / PLA), de la marca VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ),
 10 espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero poli (épsilon - caprolactona) / poli (ácido glicólico) (PCL / PGA), formados por procesos tales como Liofilización, o congelados - secados, como se explica en la patente de Estados Unidos número 6,355,699. Hidrogeles tales como péptidos autoensamblados (por ejemplo, RAD16) también pueden ser utilizados. Redes degradables que se forman in situ también son apropiadas para su uso en la invención (referirse a, por ejemplo, Anseth, K.S. et al., 2002, J. Controlled Release (Emisión Controlada) 78: 199-209; Wang, D. et al., 2003, Biomaterials (Bio - Materiales) 24: 3969-3980; patente de publicación de Estados Unidos 2002/0022676 a He et al.). Estos materiales se formulan como fluidos apropiados para su inyección, entonces se inducen por una variedad de formas (por ejemplo, cambios de temperatura, pH, exposición a la luz) para formar redes degradables de hidrogel in situ o in vivo.

15 En otra sección, el medio de trabajo es una cobertura, que puede ser compuesta de un hilo de varios filamentos hechos de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas PGA, PLA, PCL o ácido hialurónico. Se transforma el hilo en una cobertura usando técnicas estándar de procesamiento textil que consisten en prensar, cortar, cepillar y el uso de agujas. En otras secciones, las células se siembran en portadores de espuma que podrían ser estructuras compuestas.

20 En muchas de las secciones que se acabo de mencionar, el medio de trabajo podría ser moldeado en una forma útil, tal como el de la médula espinal con columnas segregadas para la reparación de las vías nerviosas, por ejemplo (Friedman JA et al., 2002, Neurosurgery (Neurocirugía) 51: 742-51). Es más, sería conveniente que las PPDCs se cultiven en dispositivos pre - formados, quirúrgicos o implantables no degradables, por ejemplo, en una forma que corresponda a aquella usada para preparar rollos GDC endovasculares que contengan fibroblastos, por ejemplo (Marx, W.F. et al., 2001, Am. J. Neuroradiol. 22: 323-333).

30 La matriz, portador o dispositivo podría tratarse antes de la inoculación de células para mejorar la adhesión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación, podrían tratarse matrices de nylon con 0.1 moles de ácido acético e incubadas en polilisina, PBS, y / o colágeno para cubrir el nylon. El poliestireno también puede tratarse similarmente usando ácido sulfúrico. Las superficies externas de un medio de trabajo también podrían modificarse para mejorar la adhesión o crecimiento de las células y la diferenciación de tejidos, como por ejemplo cubriendo de plasma al medio trabajo o añadiendo una o más proteínas (por ejemplo, colágeno, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, Condroitín - 4 - sulfato, Condroitín - 6 - sulfato, sulfato de dermatan, sulfato de queratina), una matriz celular, y / u otros materiales tales como, pero que no se limitan a, gelatina, alginatos, agaros, agarosa, y gomas vegetales, entre otras.

40 Los medios de trabajo que contienen PPDCs se preparan de acuerdo a los métodos conocidos en la industria. Por ejemplo, las células pueden cultivarse libremente en un contenedor de cultivo para que en sub - confluencia o confluencia, sean extraídos del cultivo e inoculados en el medio de trabajo. Se pueden agregar factores de crecimiento al medio de cultivo antes de, durante, o subsecuentemente a la inoculación de las células para activar la diferenciación y formación del cultivo, si se desease. Alternamente, los medios de trabajo en sí podrían ser modificados para que las células de crecimiento ahí establecidas se potencialicen, o para que se reduzca el riesgo de que se rechace el implante. Por lo tanto, se podría añadir al medio de trabajo para una emisión local, uno o más
 45 componentes biológicamente activos, incluyendo, pero sin limitarse a, factores anti - inflamatorios, inmunosupresores o de crecimiento.

Métodos para Usar PPDCs, Componentes PPDC o Productos PPDC

50 Las PPDC, o poblaciones celulares que contienen PPDCs, o componentes presentados de o productos producidos por PPDCs, podrían usarse de varias formas para apoyar o facilitar la reparación y regeneración de células y tejidos neurales. Aquellos usos son cubiertos por métodos in vitro, ex vivo e in vivo.

Métodos In vitro y ex vivo:

55 En una sección de esta presentación, las PPDCs pueden ser utilizadas in vitro para filtrar una amplia variedad de componentes para su efectividad y citotoxicidad de activos farmacéuticos, factores de crecimiento, factores regulatorios, y similares. Por ejemplo, aquella examinación podría realizarse en poblaciones sustancialmente homogéneas de PPDCs para evaluar la eficacia o toxicidad de los componentes candidatos con los que se va a formular, o con los que se va a administrar, las PPDCs, para el tratamiento de una condición neurodegenerativa.
 60 Alternamente, aquella examinación puede ser realizada en PPDCs que han sido estimuladas para diferenciarse en células neurales o células progenitoras neurales, con el objetivo de evaluar la eficacia de nuevas opciones de drogas farmacéuticas. En esta sección, las PPDCs se mantienen in vitro y se exponen al componente a ser probado. La actividad de componente potencialmente citotóxico puede ser medida por su habilidad de dañar o matar las células en el cultivo. Esto podría ser evaluado rápidamente con técnicas esenciales de coloración. El efecto de factores de crecimiento o regulatorios podría evaluarse al analizar el número o la robustez de las células cultivadas, en
 65

comparación de las células que no fueron expuestas a los factores. Esto podría lograrse usando técnicas citológicas e / o histológicas estándar, incluyendo el uso de técnicas inmunocitoquímicas usando anticuerpos para definir los anti - genes celulares de tipo específico.

5 En otra sección de la presentación, como se menciona anteriormente, las PPDCs pueden ser cultivadas in vitro para producir productos biológicos que sean producidos naturalmente por las células, o producidos por las células cuando éstas sean inducidas para diferenciarse en linajes neurales, o producidas por las células por medio de modificaciones genéticas. Por ejemplo, se descubrió que TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC, y IL-8 fueron secretadas de células derivadas del tejido del cordón umbilical
10 que fueron cultivadas en un medio de crecimiento. Se descubrió que TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC, Eotaxin, y IL-8 fueron secretadas de PPDCs derivadas de la placenta cultivadas en medio de crecimiento (refiérase a los ejemplos). Algunos de estos factores tróficos, tales como el BDNF e IL-6, tienen roles importantes en la regeneración neural. Otros factores tróficos, que todavía no se han detectado o examinado, para su uso en la reparación y regeneración neural, es posible que sean producidos por PPDCs y
15 posiblemente secretados al medio.

En este sentido, otra sección de la presentación destaca el uso de las PPDCs para la producción de medios acondicionados, ya sea desde PPDCs no diferenciadas o de PPDCs incubadas bajo condiciones que estimulan la
20 diferenciación a linaje neural. Tales medios acondicionados se contemplan para su uso en cultivos vitro o ex vivo de células precursoras neurogénicas, o in vivo para dar apoyo a células trasplantadas que están conformadas de poblaciones homogéneas de PPDCs o poblaciones heterogéneas conformadas de PPDCs o progenitores neurales, por ejemplo.

25 Otra sección de la presentación involucra el uso de lisados de células PPDC, fracciones de células solubles o sus componentes, o ECM o sus componentes, para una variedad de propósitos. Como se mencionó anteriormente, algunos de estos componentes podrían utilizarse en composiciones farmacéuticas. En otras secciones, un lisado celular o un ECM se utiliza para cubrir o tratar de otra forma sustancias o dispositivos a ser usados quirúrgicamente, o para implantación, o para propósitos ex vivo, para promover la curación o supervivencia de células o tejidos que se
30 contacten en el curso de esos tratamientos.

Como se describe en los ejemplos 13 y 15, las PPDCs han demostrado la habilidad de dar apoyo a la supervivencia, crecimiento y diferenciación de células progenitoras neurales adultas cuando se las produce en co - cultivos con aquellas células. De esa misma forma, en otra sección, las PPDCs se usan con muchas ventajas en co – cultivos in
35 vitro para suministrar soporte trófico a otras células, en particular a células neurales y progenitores neurales. Para co - cultivos, podría ser conveniente para las PPDCs y para las otras células deseadas el ser co - cultivadas bajo condiciones en las cuales los dos tipos de células estén en contacto. Esto puede lograrse, por ejemplo, al sembrar las células como una población heterogénea de células en un medio de cultivo o en un sustrato apropiado de cultivo. Alternamente, las PPDCs pueden ser cultivadas para que eventualmente tengan una confluencia, y entonces
40 funcionen como un sustrato para el segundo tipo deseado de células en el cultivo. En esta otra sección, las células pueden dividirse aún más físicamente, por ejemplo, por medio de una membrana o un dispositivo similar, de tal forma que el otro tipo de células pueda ser removido y usarse separadamente, después del periodo de co - cultivo. El uso de PPDCs en co - cultivos para promover expansión y diferenciación de tipos de células neurales podría encontrar aplicabilidad en las áreas de investigación y clínicas / terapéuticas. Por ejemplo, un co – cultivo PPDC
45 podría utilizarse para facilitar el crecimiento y diferenciación de células neurales en un cultivo, para propósitos básicos de investigación o el uso de ensayos de examinación de drogas, por ejemplo. Los co – cultivos PPDC también pueden ser utilizados para la expansión ex vivo de progenitores neurales para su posterior administración para propósitos terapéuticos. Por ejemplo, células progenitoras neurales podrían obtenerse de un individuo, expandirse ex vivo en co - cultivos con PPDCs, y después ser retornadas al individuo (transferencia autóloga) u otro
50 individuo (transferencia singeneica o alogeneica). En estos cuerpos, será conveniente que, después de la expansión ex vivo, la población mixta de células que tiene las PPDCs y progenitores neurales pudiesen administrarse a un paciente que necesite el tratamiento. Alternamente, en situaciones donde es apropiada o deseable una transferencia autóloga, las poblaciones co - cultivadas celulares podrían separarse físicamente en el cultivo, permitiendo la remoción de los progenitores neurales autólogos para administrarlos al paciente.

55 *Métodos In vivo:*

Como se establece en los ejemplos 16 y 17, las PPDCs han demostrado ser efectivas cuando se las transplanta al cuerpo, y en el momento de suministrar funciones neurales perdidas en un modelo animal el cual es aceptado por su
60 predictibilidad en los seres humanos. Estos resultados apoyan la sección preferida de la invención, donde las PPDCs son utilizadas en terapia de células para tratar una condición neurodegenerativa. Una vez que se ha trasplantado las PPDCs en la ubicación neural objetiva del cuerpo, estas podrán diferenciarse en uno o más fenotipos neurales, o podrá suministrar soporte trófico para progenitores neurales y células neurales in situ, o podrá ejercer un efecto beneficioso en estas dos formas, entre otras.

65

Estas PPDCs podrían administrarse solas (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o añadidas y mezcladas con otras células. Como se describió anteriormente, las PPDCs podrían administrarse en una manera formulada en una preparación farmacéutica con una matriz o portador, o con dispositivos convencionales farmacéuticamente aceptables. En casos en los que las PPDCs se administran con otras células, estas pueden ser administradas simultáneamente o secuencialmente con las otras células (ya sea antes o después de las otras células). Las células que pueden ser administradas en conjunto con las PPDCs incluyen, pero no se limitan a, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células progenitoras neuronales, células madre neurales y / u otras células madre multipotentes. Las células de diferentes tipos pueden ser añadidas y mezcladas con las PPDCs en ese mismo instante o un poco después de su administración, o podrían ser co - cultivadas juntas por un período de tiempo antes de su administración.

Las PPDCs podrían ser administradas con otras drogas o moléculas biológicas neurales beneficiosas, u otros agentes activos, tales como agentes anti inflamatorios, agentes anti apoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores neuro - tróficos o drogas neuro - protectoras que son conocidas en la industria. Cuando las PPDCs se administran con otros agentes, podrían ser administradas juntas en una sola composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultáneamente o secuencialmente con los otros agentes (ya sea antes o después de la administración de los otros agentes).

Ejemplos de otros componentes que podrían ser administrados con las PPDCs incluyen, pero no se limitan a: (1) otras drogas neuro - protectoras o neuro - beneficiosas; (2) componentes seleccionados de matrices extracelulares, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la industria, y / o factores de crecimiento, plasma rica en plaquetas, y drogas (alternamente, las PPDCs pueden ser diseñadas genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes anti apoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimeti - cuerpo EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) -I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasas); (4) componentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de quinasa p38 MAP, Inhibidores de TGF-beta, estatinas, IL-6 e inhibidores de IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, y medicamentos anti - inflamatorios no esteroideos (AINE) (como TEPOXALINA, TOLMETINA y SUPROFENO); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como los inhibidores de la calcineurina, inhibidores de TORm, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) antioxidantes tales como probucol, vitaminas C y E, conenzyme Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; y (7) anestésicos locales, para nombrar unos pocos.

En un cuerpo, las PPDCs se administran como células no diferenciadas, es decir, como cultivadas en un medio de crecimiento. Alternamente, las PPDCs podrían administrarse después de exponerlas en el cultivo a condiciones que simulan la diferenciación hacia un fenotipo neural deseado, por ejemplo, astrocito, oligodendrocito, o neurona, y más específicamente neuronas serotoninérgicas, dopamina - érgicas, colinérgicas, gabaérgicas o glutamatérgicas (referirse, por ejemplo, a Isacson, O., 2003. *The Lancet (Neurology) 2 - La Lanceta (Neurología) 2: 417-424*).

Las células de la invención pueden ser implantadas quirúrgicamente, inyectadas, entregadas (por ejemplo, por medio de un catéter o una jeringa), o administrados de otra forma directa o indirectamente al lugar del daño o la afección neurológica. Las rutas de administración de las células o sus composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, rutas de administración intravenosas, intramusculares, subcutáneas, intranasales, intracerebrales, intraventriculares, intracerebroventriculares, intratecales, intracisternales, intraespinales y / o periespinales por medio de agujas y / o cáteres intracraneales o intravertebrales con o sin dispositivos de bombeo.

Cuando se administran las células en dispositivos semisólidos o sólidos, el implante quirúrgico en una ubicación precisa del cuerpo es comúnmente un medio adecuado de administración. Las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas, sin embargo, podrían ser administradas en una ubicación más general en el CNS o PNS (por ejemplo, a lo largo de un área afectada difusamente, como sería el caso de la enfermedad de Parkinson o una lesión isquémica difusa, por ejemplo), en la medida en que las células neurales progenitoras han demostrado ser capaces de una forma grande de migración desde un punto de entrada al sistema nervioso hacia una ubicación específica, por ejemplo, al seguir la glía radial o respondiendo a señales químicas.

En efecto, esta habilidad migratoria de células madres neurales ha abierto una nueva puerta para el tratamiento de tumores cerebrales malignos, en otras palabras, el uso de células progenitoras para la entrega de productos terapéuticos genéticos para el tratamiento de estos tumores migratorios. Por ejemplo, se ha reportado que células madres neurales, cuando se implantan in vivo en gliomas intracraneales en roedores adultos, estas se distribuyen rápidamente y extensivamente a lo largo de donde está ubicado el tumor y migran en yuxtaposición a las células que están expandiéndose y avanzando del tumor, mientras continúan a expresar establemente un gen foráneo (Aboody, K. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 12846-12851*). También se espera que las PPDCs sean adecuadas para este tipo de uso, en otras palabras, las PPDCs modificadas genéticamente para producir un agente apoptótico u otro agente antineoplástico, por ejemplo, IL-12 (Ehtesham, M. et al., 2002, *Cancer Research (Investigación del Cáncer) 62: 5657-5663*) o ligando que induce a la apoptosis relacionada con el factor de necrosis de tumores (Ehtesham, M. et al., 2002, *Cancer Research (Investigación del Cáncer) 62: 7170-7174*) podrían inyectarse o administrarse de otra forma en un lugar general de un tumor maligno (por ejemplo, la glioblastoma), desde donde las PPDCs pueden migrar a las células del tumor para una entrega local del agente terapéutico.

Otras secciones de la presentación cubren métodos de tratamiento de condiciones neurodegenerativas al administrar composiciones farmacéuticas que contienen componentes celulares PPDC (por ejemplo, lisados de células o sus componentes) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por las PPDCs o por medio de modificación genética, medios acondicionados de cultivos PPDC). Otra vez, estos métodos podrían incluir la administración de otros agentes activos, tales como factores de crecimiento, factores neuro - tróficos o drogas neuro - regeneradoras o neuro - protectoras conocidas en la industria.

Las formas de dosis y regímenes para administrar las PPDCs o cualquier otra composición farmacéutica descrita aquí se desarrolla de acuerdo a la buena práctica médica, tomando en cuenta la condición individual del paciente, por ejemplo, la naturaleza y la medida de la condición neurodegenerativa, edad, sexo, peso del cuerpo y la condición médica general, y otros factores conocidos por los médicos practicantes. Por lo tanto, el monto efectivo de una composición farmacéutica a ser administrada a un paciente se determina por estas consideraciones que son conocidas en la práctica.

Puesto que el CNS es un tejido algo inmuno privilegiado, podría no ser necesario o deseable el suprimir inmunológicamente a un paciente antes de la iniciación de la terapia de células con PPDCs. Adicionalmente, como se establece en el Ejemplo 11, las PPDCs han mostrado no estimular a PBMCs alogénicos en una reacción mixta de linfocitos. De esa misma forma, trasplantes con PPDCs alogénicas, o incluso xenogénicas, podría ser tolerados en algunas instancias.

Sin embargo, en otras instancias podría ser deseable o apropiado suprimir inmunológicamente por medio de farmacéuticos a un paciente antes de iniciar la terapia de células. Esto se puede lograr por medio del uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o podría lograrse al entregar las células en un dispositivo encapsulado, como se describió anteriormente. Éste y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunológica a las células trasplantadas son conocidas en la práctica. Como una alternativa, las PPDCs pueden ser modificadas genéticamente para reducir su Inmunogenicidad, tal como se describe anteriormente.

La supervivencia de las PPDCs trasplantadas a un paciente vivo se puede determinar por medio del uso de una variedad de técnicas de escaneo, por ejemplo, tomografía axial computarizada (CAT - computerized axial tomography o CT), imágenes de resonancia magnética (MRI - magnetic resonance imaging) o tomografía de emisión de positrones (PET - positron emission tomography). Determinar la supervivencia de los trasplantes también se puede lograr post mortem al remover el tejido neural, y examinarlo visualmente o por medio de un microscopio. Alternamente, las células pueden ser tratadas con colorantes que son específicos para las células neurales o sus productos, por ejemplo, neurotransmisores. Las células trasplantadas también pueden ser identificadas por la incorporación previa de colorantes de trazabilidad tales como rodamina- o microesferas marcadas con fluoresceína, azul rápido, micropartículas férricas, bisbenzamida o productos de genes reporteros introducidos genéticamente, como la beta - galactosidasa o beta - glucuronidasa.

La integración funcional de las PPDCs trasplantadas al tejido neural es un tema que puede ser evaluado al examinar la restauración funcional que fue dañada o que estuvo enferma. Aquellas funciones incluyen, pero no se limitan a funciones motrices, cognitivas, sensoriales y endocrinas, de acuerdo con los procedimientos bien conocidos por los neurobiólogos y médicos.

Equipos y Bancos que Contienen PPDCs, Componentes PPDC o Productos PPDC

En otro aspecto, la invención suministra equipos que utilizan las PPDCs y poblaciones PPDC en varios métodos para la regeneración y reparación neural tal como se describió anteriormente. Ya sea que se utiliza para su tratamiento en condiciones neurodegenerativas u otro tratamiento programado, los equipos incluyen una o más poblaciones de células, incluyendo por lo menos PPDCs y un portador farmacéuticamente aceptable (líquido, semisólido o sólido). Los equipos también podrían incluir opcionalmente un medio para administrar las células, por ejemplo por medio de una inyección. Estos equipos también podrían incluir instrucciones para el uso de las células. Los equipos preparados para el uso en hospitales en el campo, tales como para uso militar podrían contener suplementos completos para procedimientos incluyendo matrices de tejidos, suturas quirúrgicas, y similares, donde las células se usarán en conjunto con la reparación de lesiones agudas. Los equipos de la presentación para ensayos y métodos in vitro como se describe aquí pueden contener uno o más de (1) PPDCs o componentes o productos de PPDCs, (2) reactivos para la práctica del método in vitro, (3) otras células o poblaciones de células, tal como sea apropiado, e (4) instrucciones para realizar el método in vitro.

En otro aspecto, la invención también suministra la información para la administración de bancos de tejidos, células y poblaciones de células de la invención. Como se menciona tenuemente, las células se pueden conservar en una forma criogénica fácilmente. La presentación por lo tanto suministra métodos para conservar criogénicamente las células en un banco, donde se almacenen congeladas y se asocien con una caracterización completa de las células basándose en sus propiedades inmunológicas, bioquímicas y genéticas. Las células congeladas podrán ser descongeladas y expandidas o usadas directamente para terapia autóloga, singénica o alogénica, dependiendo en

los requerimientos del procedimiento y las necesidades del paciente. Preferiblemente, la información de cada muestra conservada criogénicamente es almacenada en una computadora, donde puede ser encontrada basándose en los requerimientos del cirujano, procedimiento y paciente emparejando adecuadamente las condiciones basándose en la caracterización de las células o poblaciones. Preferiblemente, las células de la invención son cultivadas y expandidas hasta una cantidad deseable de células y se preparan las composiciones terapéuticas de células ya sea por separado o en co - cultivos, en la presencia o ausencia de una matriz o soporte. Mientras para algunas aplicaciones podría ser preferible el uso de células preparadas y frescas, el resto podría ser conservado criogénicamente y almacenado congelando las células e ingresando la información en la computadora para asociar el registro informático con las muestras. Aún cuando no fuese necesario el emparejar una fuente o un donante con un receptor de aquellas células, para propósitos inmunológicos, el sistema de banco hará que sea fácil el emparejar, por ejemplo, propiedades bioquímicas o genéticas deseables de las células almacenadas para las necesidades terapéuticas. Cuando se empareje las propiedades deseadas con una muestra almacenada, la muestra se recuperará y preparará para su uso terapéutico. Los lisados de células, componentes ECM o celulares preparados tal como se describe aquí podrían ser conservados criogénicamente o de otra forma (por ejemplo, por medio de liofilización) y almacenados de acuerdo con esta presentación.

Se suministran los siguientes ejemplos para describir la invención en mayor detalle. Su objetivo es ilustrar, y no el limitar a la invención.

Tal como se utiliza en los siguientes ejemplos y en otras partes de la especificación, el término "medio de crecimiento" generalmente se refiere a un medio suficiente para el cultivo de las PPDCs. En particular, un medio actualmente preferido para el cultivo de células de la invención se conforma del Medio Esencial Modificado de Dulbecco (también abreviado DMEM - Dulbecco's Modified Essential Media). Particularmente se prefiere un DMEM de baja glucosa (low glucose) (también DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DMEM de baja glucosa es suplementado preferiblemente con un 15% (v/v) de suero fetal bovino (por ejemplo, definido suero fetal bovino, Hyclone, Logan UT), antibióticos / antimicóticos ((preferiblemente 50 - 100 Unidades / mililitro estreptomycin, y 0 - 0.25 microgramos / mililitro anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)), y 0.001% (v/v) 2-Mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). Tal como se utiliza en los ejemplos a continuación, el medio de crecimiento se refiere a DMEM - de baja glucosa con un 15% de suero fetal bovino y antibióticos / antimicóticos (donde se incluye penicilina / estreptomycin, es preferible 50 unidades / mililitro y 50 µg / mililitro respectivamente; cuando la penicilina / estreptomycin / anfotericina B son usadas, es preferible a 100 unidades / mililitro, 100 µg / mililitro y. 25 µg / mililitro, respectivamente). En algunos casos se utilizan diferentes medios de crecimiento, o diferentes suplementaciones, y en estos se indican normalmente en el texto como suplementaciones del medio de crecimiento.

También en relación a los siguientes ejemplos y utilizado en otras partes de la especificación, condiciones estándar de crecimiento se refieren a cultivos de células a 37 °C, en una atmósfera estándar que se conforma de 5% de CO₂. Mientras lo que se acaba de mencionar acerca de las condiciones es útil para los cultivos, se debe entender que tales condiciones podrían variarse por técnicos habilidosos quienes apreciarán las opciones disponibles en la práctica de cultivos de células.

Las siguientes abreviaciones podrían aparecer en los ejemplos y en otras partes de la especificación y declaraciones: ANG2 (o Ang2) para angiopoyetina 2; APC de las células que contienen antígenos; BDNF para el factor neurotrófico derivado del cerebro (brain-derived neurotrophic factor); bFGF para el factor de crecimiento de fibroblastos básico (basic fibroblast growth factor); bid (BID) para "bis in die" ("bis en dado") (dos veces al día); CK18 para citoqueratina 18 (cytokeratin 18); CNS para el sistema nervioso central (central nervous system); ligando CXC 3 para el ligando del receptor de quimioquinas 3; DMEM para el medio esencial mínimo de Dulbecco; DMEM: Ig (o DMEM: Lg, DMEM: LG) para DMEM con bajo nivel de glucosa; EDTA para ácido etilendiaminotetraacético (ethylene diamine tetraacetic acid); EGF (o E) para el factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor); FACS para clasificación fluorescente de células activadas (fluorescent activated cell sorting); FBS para el suero fetal bovino (fetal bovine serum); FGF (o F) para el factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor); GCP-2 para la quimiotaxis de granulocitos proteína-2 (granulocyte chemotactic protein-2); GFAP para la proteína ácida glial fibrilar (glial fibrillary acidic protein); HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) para el factor de crecimiento epidérmico de unión de heparina; HCAEC (Human coronary artery endothelial cells) para las células endoteliales de arteria coronaria de Humanos; HGF (hepatocyte growth factor) para el factor de crecimiento de hepatocitos; hMSC (Human mesenchymal stem cells) para las células madre mesenquimáticas humanas; HNF-1 alfa para el factor de transcripción específico de hepatocitos 1 alfa (hepatocyte-specific transcription factor 1 alpha); HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) para las células endoteliales de la vena umbilical humana; 1309 para una quimioquina y el ligando para el receptor CCR8; IGF-1 (insulin-like growth factor) para el factor de crecimiento similar a la insulina 1; IL-6 para la interleucina-6; IL-8 para la interleucina 8; K19 (keratin 19) para la queratina 19; K8 (keratin 8) para la queratina 8; KGF (keratinocyte growth factor) para el factor de crecimiento de queratinocitos; LIF (leukemia inhibitory factor) para el factor inhibidor de la leucemia; MBP (myelin basic protein) para la proteína básica de la mielina; MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) para la proteína quimiotáctica de monocitos 1; MDC para quimioquina derivada de macrófagos (macrophage-derived chemokine); MIP1alpha para la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (macrophage inflammatory protein 1 alpha); MIP1beta para la proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (macrophage inflammatory protein 1 beta); MMP de metaloproteasas de la matriz (matrix metalloprotease) (MMP); MSC (mesenchymal stem cells) para células madre mesenquimáticas; NHDF para fibroblastos ver micos

normales Humanos (Normal Human Dermal Fibroblasts); NPE para medios de expansión progenitores neurales (Neural Progenitor Expansion); 04 de oligodendrocitos o marcador glial de diferenciación 04; PBMC de células mononucleares de sangre periférica (Peripheral blood mononuclear cell); PBS para Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline); PDGFbb para factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet derived growth factor); PO de "per os" (por la boca); PNS para el sistema nervioso periférico (peripheral nervous system); Rantes (o RANTES) para regulación de la activación, expresión y secreción de células T normales (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted); rhGDF-5 para el crecimiento humano recombinante y factor de diferenciación 5 (recombinant human growth and differentiation factor 5); SC para vía subcutánea; SDF-1 alfa para el factor derivado de estromal 1 alfa (stromal-derived factor 1 alpha); SHH para Sonic hedgehog; SOP para el el procedimiento operativo estándar (standard operating procedure); TARC para quimioquinas de activación y timo reguladas (thymus and activation-regulated chemokine) y; TCP para el tejido plástico de cultivo (Tissue culture plastic); TCPS para cultivo de tejidos de poliestireno (tissue culture polystyrene); TGFbeta2 de factor de crecimiento transformante beta 2 (transforming growth factor beta2); TGF beta-3 para factorbeta-3 de crecimiento transformante (transforming growth factorbeta-3); TIMP1 para inhibidor de tejido de metaloproteinases de la matriz 1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase); TPO para trombopoyetina; TuJ1 para BIII tubulina; VEGF para el factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor); vWF para el factor de von Willebrand (von Willebrand factor); y alphaFP de alfa-fetoproteína (alpha-fetoprotein).

EJEMPLO 1

Derivación de las células de tejido posparto

Este ejemplo describe la preparación de células derivadas de posparto de tejidos de placenta y de cordón umbilical. Los cordones umbilicales y placentas de posparto fueron obtenidos en el momento del nacimiento de embarazos completos o embarazos que no alcanzaron el término completo. Las células fueron obtenidas de cinco donantes diferentes de tejido umbilical y placental. Se probaron diferentes métodos de aislamiento de células debido a su habilidad de producir células con: 1) el potencial para diferenciarse a células con diferentes fenotipos, una característica común de las células madre, o 2) el potencial de suministrar factores tróficos útiles para otras células y tejidos.

Métodos y Materiales

Aislamiento de Células Umbilicales. Los cordones umbilicales fueron obtenidos del National Disease Research Interchange (Intercambio Nacional de Investigación de Enfermedades) (NDRI, Philadelphia, PA). El protocolo de aislamiento de células fue realizado asépticamente en una campana de flujo laminar. Para remover la sangre y los vestigios, el cordón fue lavado en tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) con la presencia de antimicóticos y antibióticos (100 unidades / mililitro penicilina, 100 µg / mililitro estreptomycin, 0.25 microgramos / mililitro anfotericina B). Los tejidos fueron entonces segregados mecánicamente en platos de cultivos de tejidos de 150 cm² en la presencia de 50 ml del medio (DMEM - de baja glucosa o DMEM - de alta glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido se desmenuce en una pulpa fina. Los tejidos picados fueron transferidos a tubos cónicos de 50 ml (aproximadamente 5 g de tejidos por tubo). El tejido fue entonces digerido ya sea en un medio DMEM - de baja glucosa o en un medio DMEM - de alta glucosa, con antimicóticos o antibióticos como se describió anteriormente. En algunos experimentos, se utilizó una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C:D;" colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 Unidades / mililitro; y dispasa (Invitrogen), 50 Unidades / mililitro en un medio DMEM - de baja glucosa). En otros experimentos se usó una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:D:H") (colagenasa, 500 Unidades / mililitro; dispasa, 50 Unidades / mililitro; y hialuronidasa (Sigma), 5 Unidades / mililitro, en DMEM:- de baja glucosa). Los tubos cónicos que contienen el tejido, el medio y las enzimas de digestión fueron incubados a 37 °C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 revoluciones por minuto durante dos horas.

Después de la digestión, los tejidos fueron centrifugados a 150 x g durante 5 minutos, los materiales flotantes fueron aspirados. La pellet fue re - suspendida a 20 mm del medio de crecimiento (DMEM: de baja glucosa (Invitrogen), 15% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; suero bovino definido; Lot#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0.001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), 1 ml por cada 100 ml de antibiótico / antimicótico como se describió anteriormente. La suspensión de células se depuró a través de un filtro de células de 70 µm (BD Biosciences). Unos 5 ml adicionales de rince conformados de medio de crecimiento se pasó a través del filtro. La suspensión de células se pasó entonces a través de un filtro de células de nylon de 40 µm (BD Biosciences) y se purificó aún más con un rince adicional de 50 ml de medio de crecimiento.

La filtración fue re-suspendida en un medio de crecimiento (volumen total de 50 ml) y centrifugada a 150 X g por cinco minutos. Los materiales flotantes se aspiraron y las células fueron re - suspendidas en 50 ml de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

En el momento que terminó la centrifugación, se realizó la centrifugación final, los materiales flotantes fueron aspirados y la pildora de células fue re - suspendida en 5 ml de medio de crecimiento fresco. El número de células viables fue determinado usando coloración de tripano azul. Las células se cultivaron entonces bajo condiciones estándar.

5 Las células que se aislaron de cordones umbilicales fueron sembradas a 5000 células / centímetro cuadrado en
matraces cubiertos de gelatina T- de 75 cm² (Corning Inc., Corning, NY) en un medio de crecimiento con antibióticos
/ antimicóticos como se describió anteriormente. Después de dos días (en varios experimentos, las células se
10 incubaron de dos a cuatro días), el medio gastado fue aspirado de los matraces. Las células se lavaron con PBS tres
veces para remover los vestigios y las células derivadas de sangre. Entonces las células se reabastecieron con un
medio de crecimiento y se les permitió crecer confluencia (alrededor de 10 días desde el pase cero) al pase uno. En
pases subsiguientes (desde el pase uno al dos y así sucesivamente), las células alcanzaron la sub - confluencia (de
75 a 85% de confluencia) en cuatro a cinco días. Para estos pases subsiguientes, las células fueron sembradas a
15 5000 células / centímetro cuadrado. Las células se cultivaron en un incubador humidificado con un 5% de dióxido de
carbono y oxígeno atmosférico a 37 °C.

15 **Aislamiento de células placentarias.** El tejido placentario fue obtenido de NDRI (Filadelfia, PA). Los tejidos fueron
de un embarazo y fueron obtenidos en el momento de una entrega quirúrgica normal. Las células placentarias fueron
aisladas como se describió para una aislación de células umbilicales.

El siguiente ejemplo aplica al aislamiento de poblaciones separadas de células derivadas maternas y derivadas
neonatales de tejidos placentarios.

20 El protocolo de aislamiento de células fue realizado asépticamente en una campana de flujo laminar. El tejido
placentario se lavó en tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en la presencia de antimicóticos y
antibióticos (como se acaba de describir) para remover sangre y vestigios. El tejido placentario se dividió en tres
secciones: la línea - superior (el lado o aspecto neonatal), la línea - del - medio (aislamiento de células mixto
neonatales y maternas) y la línea inferior (lado o aspecto maternal).

25 Las secciones separadas se lavaron individualmente varias veces en PBS con antibióticos / antimicóticos para
remover aún más la sangre e impurezas. Cada sección se disoció mecánicamente en platos de cultivos de tejido de
150 cm² en la presencia de 50 ml de DMEM / de baja glucosa, a una pulpa fina. La pulpa se transfirió a tubos
cónicos de 50 ml. Cada tubo contuvo aproximadamente 50 g de tejido. El tejido se digirió ya sea en medios DMEM -
30 de baja glucosa o DMEM - de alta glucosa que contenía antimicóticos y antibióticos (penicilina de 100 unidades por
mililitro, estreptomycin de 100 µg por mililitro, anfotericina B de 0.25 microgramos por mililitro) y enzimas de
digestión. En algunos experimentos una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C:D") se utilizó conteniendo
colagenasa (Sigma, St Louis, MO) 500 unidades por mililitro de dispasa (Invitrogen) a 50 unidades por mililitro en un
medio DMEM - de baja glucosa. En otros experimentos se uso una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa
35 (C:D:H) (colagenasa, 500 unidades por mililitro, dispasa, 50 unidades por mililitro, y hialuronidasa (Sigma), 5
unidades por mililitro en un DMEM - de baja glucosa. Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las
enzimas de digestión fueron incubados durante dos horas a 37 °C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a
225 revoluciones por minuto.

40 Después de la digestión, los tejidos fueron centrifugados a 150 x g por cinco minutos, los materiales flotantes
resultantes fueron aspirados. El pellet fue re - suspendido en 20 ml de medio de crecimiento con penicilina /
estreptomycin / anfotericina B. La suspensión de células fue depurada a través de un filtro de nylon de 70 µm (BD
Biosciences), expulsada por un enjuague con 5 ml adicionales de medio de crecimiento. La suspensión de células
total fue pasada a través de un filtro de células de nylon de 40 µm (BD Biosciences) y después con un medio de
45 crecimiento adicional de 5 ml como un enjuague.

El filtro fue re - suspendido en un medio de crecimiento (volumen total de 50 ml) y centrifugado a 150 X g durante
cinco minutos. El material flotante fue aspirado y el pellet de células fue re - suspendido en 50 ml de un medio de
50 crecimiento fresco. El proceso se repitió dos veces más. Después de la centrifugación final, los materiales flotantes
fueron aspirados y el pellet de células fue re - suspendido en 5 ml de un medio de crecimiento fresco. El conteo de
células fue determinado usando la prueba de exclusión de tripano azul. Las células se cultivaron entonces en
condiciones estándar.

55 **Aislamiento de células LIBERASE.** Las células de los tejidos umbilicales fueron aisladas en medios DMEM - de
baja glucosa con LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) (2.5 miligramos por mililitro, Blendzyme
3; Roche Applied Sciences (Ciencias Aplicadas de Roche), Indianapolis, IN) e hialuronidasa) 5 unidades por
mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue descrito anteriormente para otras
60 digestiones de proteasas, usando la mezcla de LIBERASE / hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C:D o
C:D:H. La digestión del tejido con LIBERASE resultó en el aislamiento de poblaciones de células de tejidos de
posparto que se expandieron fácilmente.

Aislamiento de células usando otras combinaciones de enzimas. Los procedimientos fueron comparados para
el aislamiento de células desde el cordón umbilical usando varias combinaciones de enzimas. Las enzimas
comparadas para la digestión incluyeron: i) colagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla de colagenasa:
65 distancia (C:D); v (mezcla de colagenasa: hialuronidasa (C:H); vi) mezcla de dispasa: hialuronidasa (D:H); y vii)

mezcla de colagenasa: dispasa: hialuronidasa(C:D:H). Las diferencias en aislamiento de células utilizando estas condiciones de digestión de diferentes enzimas se observaron (Tabla 1-1).

Tabla 1-1: El aislamiento de células de tejido del cordón umbilical usando varias combinaciones de enzimas

Enzimas De Digestión	Células aisladas	Expansión de células
Colagenasa	X	X
Dispasa	+ (>10 h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa : Dispasa	++ (< 3 h)	++
Colagenasa : Hialuronidasa	++ (< 3 h)	+
Dispasa : Hialuronidasa	+ (>10 h)	+
Colagenasa : Dispasa : Hialuronidasa	+++ (< 3 h)	+++
Clave: + = buena, ++ = muy buena, +++ = excelente, X = no hubo éxito bajo las condiciones probadas		

Aislamiento de células de sangre residual en los cordones. Otros intentos fueron hechos para aislar agrupaciones de células de cordones umbilicales por diferentes métodos. En una ocasión un cordón umbilical fue cortado y lavado con un medio de crecimiento para desalojar los coágulos de sangre y el material gelatinoso. La mezcla de sangre, material gelatinoso y el medio de crecimiento fueron recoletados y centrifugados a 150 X g. El pellet fue re - suspendido y sembrado en matraces cubiertos de gelatina en un medio de crecimiento. De estos experimentos una población de células fue aislada y se expandió rápidamente.

Aislamiento de células de la sangre del cordón. También se aislaron células de las muestras de la sangre del cordón del NDRI. El protocolo de aislamiento usado aquí fue el de la aplicación internacional de patente PCT/US02/29971 por Ho et al (Ho, T. W. et al., WO2003025149 A2). Las muestras (50 ml y 10.5 mililitros, respectivamente) de sangre de cordón umbilical (NDRI, Filadelfia, PA) se mezclaron con tampón de lisis (155 mM de cloruro de amonio filtrado - esterilizado, 10,000 mmol de bicarbonato de potasio, 0.1 milimoles de EDTA taponado a pH 7.2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células fueron revisadas a una tasa de 1:20 sangre de cordón por taponado lisado. La suspensión de células resultantes fue agitada vorticialmente por cinco segundos, e incubada por dos minutos a temperatura ambiente. El lisado fue centrifugado (10 minutos a 200 x g). El pellet de células fue re - suspendido en un medio completo esencial mínimo (Gibco, Carlsbad CA) que contenía 10% de suero fetal bovino (Hyclone, Logan UT), 4 mmol de glutamina (Mediatech Herndon, VA), 100 unidades de penicilina por 100 ml y 100 µg de estreptomycin por 100 ml (Gibco, Carlsbad, CA). Las células re - suspendidas fueron centrifugadas (10 minutos a 200 X g), los materiales flotantes fueron aspirados, y el pellet de células fue lavado en un medio completo. Las células fueron sembradas directamente en matraces T75 (Corning, NY), matraces cubiertos de laminina T75, o matraces cubiertos de fibro lectina T175 (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

Aislamiento de células usando diferentes combinaciones de enzimas y diferentes condiciones de crecimiento. Para determinar si es que las poblaciones de células podrían ser aisladas bajo diferentes condiciones y expandidas bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células fueron digeridas en medios de crecimiento con o sin 0.001% (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), usando la combinación de enzimas de C:D:H, de acuerdo a los procedimientos suministrados anteriormente. Las células derivadas de la placenta que se aislaron de esa forma fueron sembradas bajo una variedad de condiciones. Todas las células fueron producidas en presencia de penicilina / estreptomycin. (Tabla 1-2).

Tabla 1-2: Aislamiento y expansion de los cultivos de células de postparto bajo varias condiciones

Condición	Medio	15% FBS	B M E	Gelatina	20% O2	Factores de crecimiento
1	DMEM-Lg	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-Lg	Y	Y	Y	N (5%)	N
3	DMEM-Lg	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-Lg	Y	Y	N	N (5%)	N
5	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/mL)
6	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Laminina)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/mL)
7	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Fibrone)	Y	PDGF/VEGF
8	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (Fibrone)	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 (Fibrone)	Y	PDGF/VEGF
16	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (Fibrone)	N (5%)	PDGF/VEGF

Aislamiento de células utilizando diferentes combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento. En todas las condiciones las células se adhirieron y expandieron bien entre los pases 0 y 1 (Tabla 1-2). Se demostró que las células en condiciones 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta cuatro pases después de la siembra, momento en el cual se conservaron criogénicamente y se almacenaron.

Resultados

Aislamiento de células utilizando diferentes combinaciones enzimáticas. La combinación de C:D:H, suministró la mejor producción de células después del aislamiento, y las células generadas se expandieron por muchas generaciones más en cultivos que las otras condiciones (Tabla 1). Una población expandible de células no fue lograda utilizando exclusivamente colágeno o hialuronidasa. No se hizo un intento de determinar si este resultado es específico al colágeno que fue probado

Aislamiento de células utilizando diferentes combinaciones enzimáticas y condiciones de crecimiento. Las células se adhirieron y expandieron bien entre los pases 0 y 1 bajo todas las condiciones probadas de digestión enzimática y crecimiento (Tabla 2). Las células en condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el cual fueron conservadas criogénicamente. Todas las células fueron almacenadas para mayor investigación.

Aislamiento de células de la sangre residual en los cordones. Las células nucleadas se adjuntaron y crecieron rápidamente. Estas células fueron analizadas con citometría de flujo y fueron similares a las obtenidas por medio de digestión de enzimas.

Aislamiento de células de sangre del cordón. La preparación contenía células de sangre roja y plaquetas. Ninguna célula nucleada se adjuntó y vivió durante las primeras tres semanas. El medio se cambiaba cada tres semanas después de sembrarse y no se observó que ninguna célula se haya adherido y haya crecido.

Resumen. Las poblaciones de células pueden derivarse del cordón umbilical y del tejido placentario eficientemente usando la combinación de enzimas de collagenasa (una metaloproteasa matricial), dispasa (una proteasa neutra) hialuronidasa (una enzima mucolíticos a que se descompone en ácido hialurónico). LIBERASE, que es una

Blendzyme 3, que es colagenasa (4 unidades deseadas / g) y termolisina (1714 unidades de caseína / g) también se usó junto con hialuronidasa para aislar células. Estas células se expandieron rápidamente por muchos pases cuando se las cultivó en el medio de crecimiento en plástico cubierto con gelatina.

5 Las células también se aislaron de sangre residual en los cordones, pero no en la sangre del cordón. La presencia de células en los cuábulos de sangre que se enjuagaron del tejido, que se adhiere y crece bajo las condiciones utilizadas, podría deberse a que las células se liberan durante el proceso de disección.

10 EJEMPLO 2

Características de crecimiento de las células derivadas de posparto

15 El potencial de expansión celular de las células derivadas de posparto (PPDCs) se comparó con las otras poblaciones de células madres aisladas. El proceso de expansión celular hasta la senectud es referido al límite de Hayflick (Hayflick L. 1974a, 1974b). Las células derivadas de posparto son muy apropiadas para su uso terapéutico porque ellas pueden expandirse fácilmente a suficientes números de células.

Materiales y Métodos

20 **Matraces cubiertos de gelatina.** Matraces de plástico para cultivos de tejidos fueron cubiertos al añadir 20 ml con 2% (w/v) de gelatina porcina (tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a un matraz T75 (Corning, Corning, NY) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto. Después de remover la solución gelatinosa, se agregó 10 ml de tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA)

25 **Comparación del potencial de expansión de las PPDCs con otras poblaciones de células.** Para comparar el potencial de expansión de crecimiento se utilizaron las siguientes poblaciones de células: i) células madres mesénquimas (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de adiposa (número de patente de Estados Unidos 6555374 B1; aplicación de patente de Estados Unidos US20040058412); iii) fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lot # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); iv) células derivadas umbilicales; y v) células derivadas de la placenta. Las células se sembraron inicialmente a 5000 células por centímetro cuadrado en matraces T75 cubiertos con gelatina en medios de crecimiento con penicilina / estreptomycin / anfotericina B. Para pases subsiguientes, los cultivos de células fueron tratados de la siguiente forma. Después de su tripnización, se contaron las células viables después de colorarlas con tripano azul. La suspensión de células (50 μ l) fue combinada con el tripano azul (50 ml, Sigma, St. Louis MO). Los números de células viables fueron estimados usando un hemocitómetro.

35 Después del conteo, las células fueron sembradas a 5000 células por centímetro cuadrado en matraces T 75 cubiertos con gelatina en 25 ml de un medio de crecimiento fresco. Las células crecieron bajo condiciones estándar a 37 °C. El medio de crecimiento fue cambiado dos veces a la semana. Cuando las células alcanzaron alrededor del 85% de confluencia fueron pasadas; este proceso fue repetido hasta que las células alcanzaron la senectud.

40 En cada pase, las células fueron tripnizadas y contadas. La producción de células viables, doblajes de población [en (células finales / células iniciales) / en dos] y el tiempo de doblaje (tiempo en el cultivo (h) / doblajes de población) fueron calculados. Para propósitos de determinar la expansión celular óptima, se determinó la producción celular total por cada pase al multiplicar la producción total del pase previo por el factor de expansión para cada pase (en otras palabras, factor de expansión = células finales / células iniciales).

45 **Potencial de expansión de bancos de células a poca densidad.** El potencial de expansión de las células almacenadas en el pase 10 también se probó, utilizando un conjunto diferente de condiciones. Se hicieron pruebas con Fibroblastos de piel dérmica normal (cc-2509 lot # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas umbilicales, y células derivadas de la placenta. Estas poblaciones celulares habían sido almacenadas previamente en el pase 10, y habían sido cultivadas a 5000 células por centímetro cuadrado y éstas habían crecido hasta confluencia en cada pase hasta ese punto. Se determinó el efecto de la densidad celular en las poblaciones de células después de haberlas descongelado en el pase 10. Las células fueron descongeladas bajo condiciones estándar y contadas usando coloración azul de tripano. Las células descongeladas fueron sembradas entonces a 1000 células por centímetro cuadrado en un medio de crecimiento DMEM: de baja glucosa con antibiótico / antimicótico como ya se ha mencionado antes. Las células crecieron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento fue cambiado dos veces a la semana y las células fueron pasadas cuando alcanzaron alrededor del 85% de confluencia. Las células fueron pasadas subsiguientemente hasta la senectud, en otras palabras, hasta que ya no pudieran expandirse más. Las células se tripnizaron y contaron en cada pase. La producción celular, el doblajes de población (En (células finales / células iniciales) / En 2) y tiempo de doblaje (tiempo en el cultivo (h) / doblajes de población). La producción celular total por pase fue determinada al multiplicar la producción total del pase previo por el factor de expansión para cada pase (en otras palabras, el factor de expansión = células finales / células iniciales).

65

Expansión de las PPDCs a baja densidad desde la siembra inicial celular. Se probó el potencial de expansión de las PPDCs aisladas frescas bajo condiciones de siembra celular baja. Las PPDCs se prepararon como se describió aquí. Las células se sembraron a 1000 células por centímetro cuadrado y se pasaron como se describió anteriormente hasta la senectud. Las células crecieron bajo condiciones atmosféricas estándar a 37 °C. El medio de crecimiento fue cambiado dos veces por semana. Las células fueron pasadas cuando alcanzaron alrededor del 85% de confluencia en cada pase, las células fueron tripnizadas y contadas con coloración de tripano azul. La producción de células, doblajes de población (En (células finales / células iniciales) / en 2) y tiempo de doblaje (tiempo en el cultivo (h) / doblajes de población) se calcularon para cada pase. La producción celular total por pase fue determinada al multiplicar la producción total del pase previo por el factor de expansión para cada pase (en otras palabras, el factor de expansión = células finales / células iniciales). Las células fueron cultivadas en matraces cubiertos con gelatina y sin gelatina.

Expansión de las células derivadas de la placenta neonatales clónicas. Se utilizó la clonación para expandir una población de células neonatales de tejidos placentarios. Después del aislamiento de tres poblaciones celulares diferenciales de la placenta (como se describe aquí), se expandieron estas poblaciones celulares bajo las condiciones de crecimiento estándar y después fueron cariotipadas para revelar la identidad de las poblaciones celulares aisladas. Puesto que las células fueron aisladas de una madre que tuvo un hijo, fue simple el distinguir entre cromosomas masculinos y femeninos al realizar diferenciales metastásicos. Estos experimentos demostraron que las células con aspectos fetales demostraron una positividad de cariotipos para los fenotipos neonatales, las células de la capa media mostraron positividad de cariotipos para los fenotipos neonatales y maternos y las células con aspectos maternos mostraron positividad de cariotipos para las células maternas.

Expansión de células en condiciones de cultivos con bajo oxígeno. Se ha demostrado que condiciones de cultivos de células en bajo oxígeno pueden mejorar la expansión celular en ciertas circunstancias (US20040005704). Para determinar si la expansión celular de las PPDCs puede ser mejorada al alterar las condiciones de cultivos celulares, cultivos de células derivadas umbilicales fueron producidos en condiciones de bajo oxígeno. Las células fueron sembradas a 5000 células por centímetro cuadrado en medios de crecimiento en matraces cubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente bajo condiciones atmosféricas estándar hasta el quinto pase, momento en el cual se transfirieron a condiciones de cultivos con bajo oxígeno (5% de O₂).

Otras condiciones de crecimiento. En otros protocolos, las células se expandieron en platos sin cobertura, cubiertos de colágeno, cubiertos de fibrolectina, cubiertos de laminina y cubiertos con proteína matricial extracelular. Se demostró que los cultivos se expanden bien en todas estas matrices.

Resultados

Comparación del potencial de expansión de las PPDCs con otras poblaciones de células madre y células no madre. Las células derivadas umbilicales y derivadas de la placenta se expandieron por más de 40 pases generando producciones de células de > 1E17 células en 60 días. En contraste, las MSCs y fibroblastos alcanzaron la senectud después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque las células derivadas de adiposas se expandieron por casi 60 días estas generaron producciones celulares totales de 4.5E12. Por lo tanto, cuando se sembraron a 5000 células por centímetro cuadrado bajo las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas de posparto se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células cultivados bajo las mismas condiciones (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Características de crecimiento para diferentes cultivos de poblaciones de células hasta la senectud

Tipo de Célula	Senectud	Doblajes de Población Totales	Producción Celular Total
MSC	24 d	8	4.72 E7
Adiposa	57 d	24	4.5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2.82 E13
Umbilical	65 d	42	6.15 E17
Placenta	80 d	46	2.49 E19

Potencial de expansión de bancos de células a una densidad baja. Las células derivadas umbilicales, de la placenta y fibroblastos se expandieron por más de 10 pases generando producciones de células de > 1E11 células en 60 días (Tabla 2-2). Después de 60 días bajo estas condiciones los fibroblastos alcanzaron la senectud mientras que las poblaciones de células derivadas umbilicales y de la placenta alcanzaron la senectud después de 80 días, completando doblajes superiores a 50 y 40 respectivamente.

Tabla 2- 2: Características de crecimiento para diferentes poblaciones celulares usando expansión de crecimiento de baja densidad desde el pase 10 hasta la senectud

Tipo de célula	Senectud	Doblajes de población totales	Producción celular total
Fibroblasto (P10)	80 d	43.68	2.59 E11
Umbilical (P10)	80 d	53.6	1.25 E14
Placenta (P10)	60 d	32.96	6.09 E12

Expansión de las PPDCs a baja densidad desde su siembra inicial. Las PPDCs se expandieron a baja densidad (1000 células por centímetro cuadrado) en platos o matraces cubiertos con gelatina y sin cobertura de gelatina. El potencial de crecimiento de estas células bajo estas condiciones fue buena. Las células expandieron rápidamente en un crecimiento logarítmico por fases. La tasa de expansión celular fue similar a la observada cuando las células derivadas de la placenta fueron sembradas a 5000 células por centímetro cuadrado en matraces cubiertos con gelatina en un medio de crecimiento. No existieron diferencias en la expansión potencial de células entre cultivos ya sea en matraces sin cobertura o matraces con cobertura de gelatina. Sin embargo, las células tuvieron una apariencia fenotípica más pequeña en los matraces cubiertos con gelatina y fenotipos celulares muchos más grandes fueron observados en los matraces sin cobertura.

Expansión de células neonatales o maternas clónicas o derivadas de la placenta. Una población de células neonatales o maternas clónicas pueden expandirse de células derivadas de la placenta aisladas de un aspecto neonatal o de un aspecto materno, respectivamente, de la placenta. Las células se diluyeron en serie y entonces se sembraron en platos cubiertos con gelatina en medios de crecimiento para su expansión a 1 célula por pozo en platos cubiertos de gelatina de 96 pozos. Desde este clonaje inicial, se identificaron, triplicaron, y se re - sembraron en platos cubiertos de gelatina de 12 pozos en un medio de crecimiento y subsiguientemente se pasaron a matraces cubiertos de gelatina T 25 a 5000 células por centímetro cuadrado en el medio de crecimiento. Se realizó un sub - clonaje para asegurar que una población clonada de células se haya identificado. Para experimentos de sub - clonaje, las células se triplicaron y se re - sembraron a 0.5 células por pozo. Los sub - clones que crecen bien se expanden en matraces T 25 cubiertos con gelatina a 5000 células por centímetro cuadrado. Las células pasan a 5000 células por centímetro cuadrado a matraces T 75. Las características de crecimiento de un clon pueden ser graficadas para demostrar la expansión celular. Un análisis de cariotipos puede confirmar que el clon es neonatal o materno.

Expansión de las células en condiciones de cultivos de bajo oxígeno. Las células se expandieron bien bajo las condiciones de oxígeno reducido, sin embargo, el cultivar en condiciones de bajo oxígeno no pareció tener un efecto significativo en la expansión de las células PPDCs con las condiciones.

Resumen. Las condiciones de expansión celular que involucran el crecimiento aislado de células derivadas del posparto a densidades de alrededor de 5000 células por centímetro cuadrado, en un medio de crecimiento en matraces cubiertos con gelatina o no cubiertos con gelatina, con un oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar un número abundante de células en el pase 11. Aún más, los datos sugieren que las células pueden ser expandidas fácilmente usando condiciones de cultivos de baja densidad (por ejemplo, 1000 células por centímetro cuadrado). La expansión de células derivadas de post parto en condiciones de bajo oxígeno también facilita la expansión, aunque no se ha observado que exista una mejora incremental en la potencialidad de expansión cuando se utilizan estas condiciones de crecimiento. Actualmente, es preferible el cultivar las células derivadas de posparto bajo condiciones atmosféricas estándar para generar grandes reservas de células. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo se alteran, la expansión de células derivadas de posparto también puede alterarse. Esta estrategia podría ser utilizada para impulsar la capacidad proliferativa y diferenciativa de estas poblaciones de células.

Bajo las condiciones utilizadas, aunque el potencial de expansión de las MSC y de las células derivadas de adiposa es limitado, las células derivadas de posparto se expanden fácilmente en grandes números.

Referencias para el Ejemplo 2

- 1) Hayflick L. 1974a. J Am Geriatr Soc. 22:1-12.
- 2) Hayflick L. 1974b. Gerontologist. 14:37-45.
- 3) Publicación de patente de Estados Unidos US20040058412
- 4) Publicación de patente de Estados Unidos US20040048372
- 5) Publicación de patente de Estados Unidos US20040005704.

EJEMPLO 3

Evaluación del medio de crecimiento para células derivadas de la placenta

Se evaluaron algunos medios de cultivos de células debido a su habilidad para dar apoyo al crecimiento de las células derivadas de la placenta. El crecimiento de las células derivadas de la placenta con un nivel normal de oxígeno (20%) y un nivel bajo (5%) fue evaluado durante 3 días usando ensayos colorimétricos MTS.

5 **Métodos y Materiales**

10 Las células derivadas de la placenta en el pase ocho (P8) fueron sembradas a 1X 10³ células por pozo 96 platos de pozos en medios de crecimiento con penicilina / estreptomina. Después de ocho horas el medio se cambió como se describe a continuación y las células se incubaron con niveles de oxígeno normal (atmosférico) o bajo 5%, (volumen / volumen) a 37 °C, 5% de ese CO₂ x 48 horas. Se agregó MTS al medio de cultivo (CellTiter 96 AQueous, una solución para Ensayos de proliferación celular, Promega, Madison, WI) durante tres horas y la absorción midió 490 nanómetros (Molecular Devices - Dispositivos Moleculares, Sunnyvale CA).

15 **Tabla 3-1. Medio de cultivo**

Medio de cultivo	Proveedor	Suero bovino fetal agregado % (volumen / volumen)
DMEM de baja glucosa	Gibco Carlsbad CA	0.21
DMEM de alta glucosa	Gibco	0.21
RPMI 1640	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0.21
Célula libre de gro (libre de sueros, libre de proteínas)	Mediatech, Inc.	-
F10 de Ham	Mediatech, Inc.	0.21
MSCGM (completa con suero)	Cambrex, Walkersville, MD	0.21
Suero completo libre de w / albúmina	Mediatech, Inc.	-
Medio de crecimiento	NA	-
F12 de Ham	Mediatech, Inc.	0.21
Iscove's	Mediatech, Inc.	0.21
Medio basal de águila	Mediatech, Inc.	
DMEM / F12 (1:1)	Mediatech, Inc.	0.21

20 **Resultados**

40 Las curvas estándar de los ensayos MTS establecieron una correlación lineal entre un incremento en absorción y un incremento en número celular. Los valores de absorción obtenidos fueron convertidos en números celulares estimados y el cambio (%) relativo al la siembra inicial fue calculado. Los valores de absorción obtenidos fueron convertidos a números estimados de células y el cambio (%) relata vivo a la siembra inicial fueron calculados.

45 **El efecto del suero.** La adición del suero al medio en condiciones de oxígeno normales resultó en un incremento de dependencia de la dosis reproducible en la absorción y por lo tanto del número de células viables. La adición del suero para completar el MSCGM resultó en una reducción de la dependencia de la dosis en la absorción. En el medio sin agregar suero, las células sólo crecieron aplicablemente en los medios Libre de CELLGRO, F10 de Ham y DMEM.

50 **El efecto del oxígeno.** Niveles bajos de oxígeno parecieron incrementar la tasa de crecimiento de las células en los medios de crecimiento, F10 de Ham y MSCGM. En orden decreciente de crecimiento, los medios que dieron los mejores resultados de crecimiento para las células fueron los medios de crecimiento >MSCGM> Iscove's+10% FBS = DMEM-H +10% FBS = Ham's F12 +10% FBS = RPMI 1640 +10% FBS.

55 **Resumen.** Las células derivadas de la placenta pueden ser producidas en varios medios de cultivos con niveles de oxígeno normales y bajos. El crecimiento a corto plazo de las células derivadas de la placenta fue determinado en 12 medios basales con 0, 2 y 10% (volumen / volumen) de suero en un nivel de oxígeno del 5% o a niveles atmosféricos. En general, las células que se derivan de la placenta no crecieron tan bien como en condiciones libres de suero con la excepción de los medios F10 de Ham y Libre de CELLGRO, los cuales están libres de proteínas. El crecimiento en estos medios libres de suero fue alrededor de 25 - 33% del máximo crecimiento observado en medios que contenían un 15% de suero.

60 **EJEMPLO 4**

65 **Crecimiento de células derivadas de posparto en medios que contienen valina**

Se ha reportado que los medios contienen valina en vez de la isoforma de valina normal pueden ser usados selectivamente para inhibir el crecimiento de células similares a fibroblastos en cultivos (Hongpaisan, 2000; Sordillo et al., 1988). No se conocía previamente si las células derivadas de postparto podrían crecer en medios que contienen valina.

5

Métodos y Materiales

Las células privadas de la placenta (P3), fibroblastos (P9) y células derivadas umbilicales (P5) fueron sembradas a 5 X 10³ células por centímetro cuadrado en matraces de 75 cubiertos de gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 10 24 horas el medio se removió y las células se lavaron con tampón de fosfato salino (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para remover el medio residual. El medio se reemplazó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con valina (orden especial de Gibco), 15% (volumen / volumen) de suero bovino fetal dializado (Hyclone, Logan, UT), 0.001% (volumen / volumen) de betamercaptoetanol (Sigma), penicilina / estreptomina (Gibco)).

Resultados

Las células derivadas de la placenta, derivadas umbilicales, y fibroblastos que se sembraron en medios que contenían valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medios de crecimiento que tenían suero dializado. Las células fibroblastos cambiaron morfológicamente, incrementando su tamaño y cambiando forma. 20 Todas las células murieron y eventualmente se separaron de la superficie del matraz después de cuatro semanas. Estos resultados indican que el medio que contiene valina no es apto guiado para el crecimiento selectivo de células derivadas de posparto.

Referencias para el ejemplo 4

25

- 1) Hongpaisan J. 2000. Cell Biol Int. 24:1-7.
- 2) Sordillo LM, Oliver SP, Akers RM. 1988). Cell Biol Int Rep. 12:355-64.

EJEMPLO 5

30

Medios de conservación criogénica para células derivadas de la placenta

Los medios de conservación criogénica para la preservación de las células derivadas de placenta fueron evaluados.

Métodos y materiales

35

Las células derivadas de la placenta cultivadas en un medio de crecimiento en matraces de 75 cubiertos con gelatina fueron lavados con PBS y Tripsinizados usando 1 ml de tripsina / EDTA (Gibco). La tripsinización fue detenida al agregar 10 ml del medio de crecimiento. Las células pro centrifugadas a 150 x g, se removieron los materiales flotantes, y el LED de células fue re - suspendido en 1 ml de medio de crecimiento. Una parte de la suspensión de células, 60 µl, fue removida y se añadió 60 µl de tripano azul (Sigma). El número viable de células fue estimado usando un hectocitómetro. La suspensión de células se dividió en cuatro partes iguales que contenía cada una 88 x 10⁴ células. La suspensión de células fue centrifugado y re - suspendido en 1 ml de cada uno de los siguientes medios y transferido a crioviales (Nalgene).

45

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

50

Las células fueron enfriadas aproximadamente a -1 °C por minuto durante la noche en un congelador a -80° C utilizando un contenedor de congelación "Mr. Frosty" de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los viales de células fueron transferidos a nitrógeno líquido por dos días antes de descongelarlos rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Se agregaron las células a 10 ml de medio de crecimiento y se centrifugaron antes de que el número de células y la viabilidad se estimasen. Las células fueron sembradas en matraces cubiertos de gelatina a 5000 células por centímetro cuadrado para determinar si las células se adherirían y proliferarían.

55

Resultados

La viabilidad inicial de las células a ser conservadas criogénicamente se evaluó con una coloración de tripano azul a ser 100%. La viabilidad inicial de las células a ser conservadas criogénicamente se evaluó con una coloración de tipoano azul a ser 100%.

60

Hubo una reducción conmesurada en el número de células con viabilidad para C6295 debido a lisado de células. Las células viables se conservaron criogénicamente en todas las cuatro soluciones asentadas, divididas y producidas en

65

una monocapa confluyente en tres días. No se observó ninguna diferencia distinguible en la tasa de crecimiento estimado.

5 **Resumen.** La conservación criogénica de células es un procedimiento disponible para la preparación de un banco de células o un producto de células. Cuatro mezclas de conservación criogénica fueron comparadas por su habilidad de proteger a las células derivadas de placenta humana del daño del congelamiento. El medio de modificado de Dulbecco de Eagle (DMEM) y el 10% (volumen / volumen) de dimetilsulfóxido (DMSO) es el medio preferido de aquellos comparados para la conservación criogénica de las células derivadas de la placenta.

10 **EJEMPLO 6**

Análisis de cariotipos de las células derivadas de posparto

15 Las líneas celulares usadas en terapias celulares son preferiblemente homogéneas y libres de cualquier hipo de célula contaminante. Las células usadas en la terapia celular deberán tener números de cromosomas (46) y estructura normales. Para identificar las líneas celulares derivadas de la placenta e umbilicales que son homogéneas y que están libres de células de origen no posparto, se hicieron análisis de cariotipos de muestras celulares.

20 **Materiales y métodos**

25 Las PPDCs de tejidos de posparto de neonato masculino fueron cultivados en medios de crecimiento que contenían penicilina / estreptomina. El tejido de posparto de neonato masculino (XY) fue seleccionado para permitir la distinción entre células derivadas neonatales y células derivadas maternas (XX). Las células fueron sembradas a 5000 células por centímetro cuadrado en un medio de crecimiento en un matraz T 25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron a un 80% de confluencia. Un matraz T 25 que contenía células fue llenado hasta el cuello con medio de crecimiento. Las muestras fueron entregadas a un laboratorio clínico de citogenética por correo (un transporte estimado de laboratorio a laboratorio con un período estimado de una hora). Las células fueron analizadas durante la metafase cuando los cromosomas se podían visualizar mejor. De 20 células contadas en la metafase, cinco fueron analizadas para un número de cariotipos homogéneos normales (dos). Una muestra celular se caracterizó como homogénea si dos cariotipos estaban presentes. Una muestra celular se caracterizaba como heterogénea si más de dos cariotipos estaban presentes. Células de metafases adicionales fueron contadas y analizadas cuando un número de cariotipo heterogéneo (cuatro) era identificado.

35 **Resultados**

40 Se interpretó que todas las muestras celulares enviadas para su análisis cromosómico exhibían una apariencia normal. Tres de las 16 líneas de células analizadas mostraban un fenotipo heterogéneo (XX y XY) indicando la presencia de células derivadas de orígenes neonatal y maternal (Tabla 6-1). Las células derivadas del tejido placenta-N fueron aisladas del aspecto neonatal de la placenta. En el pase cero, esta línea celular parecía homogénea XY. Sin embargo, en el pase 9, la línea celular era heterogénea (XX / XY), indicando una presencia previamente no detectada de células de origen maternal.

45

50

55

60

65

Tabla 6-1. Resultados del análisis de cariotipos de las PPDCs

Tejido	Pase	Células contadas en la metafase	Células analizadas en la metafase	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

Clave: N-aspecto neonatal; V-región con vellosidades; M-aspecto maternal; C-clon

Resumen. El análisis cromosómico identificó células derivadas de la placenta y umbilicales cuyos cariotipos parecían normales tal como se interpretó por un laboratorio clínico citogenético. El análisis de cariotipos también identificó líneas de células libres de células maternas, como se determinó por cariotipos homogéneos.

EJEMPLO 7

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

La caracterización de las proteínas o “marcadores” de la superficie de las células con citometría de flujo puede utilizarse para determinar la identidad de una línea celular. La consistencia de expresión puede determinarse de donadores múltiples, y en células expuestas a diferentes condiciones de proceso y de cultivo. Las líneas aisladas de células derivadas de posparto (PPDC) de la placenta y umbilicales se caracterizaron (por citometría de flujo), suministrando un perfil para la identificación de estas líneas.

Materiales y Métodos

Medios y recipientes de cultivos. Las células fueron cultivadas en medios de crecimiento (Gibco Carlsbad, CA) con penicilina / estreptomina. Las células se cultivaron en matraces de cultivos de tejidos T 75, T 150 y T 225 (Corning, Corning, NY) que fueron tratados con plasma hasta su confluencia. Las superficies de crecimiento de los matraces se cubrieron con gelatina al incubar el 2% (masa / volumen) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a la temperatura del cuarto.

[0198] Análisis de coloración de anticuerpos y citometría de flujo. Las células adherentes en los matraces fueron lavadas en PBS y separadas con tripsina / EDTA. Las células fueron cosechadas, centrifugadas y re-suspendidas en 3% (volumen / volumen) FBS en PBS con una concentración de células de 1x10⁷ por mililitro. De acuerdo a las especificaciones del fabricante, se aumento un anticuerpo al marcador de la superficie de la célula de interés (ver más adelante) a 100 µl de suspensión de células y la mezcla fue incubada en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se analizaron con una citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo fue realizado con un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos como marcadores de superficie de células.

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

20 **Comparación entre la placenta y el cordón umbilical.** Se comparó las células derivadas de la placenta con las células derivadas umbilicales en el pase ocho.

Comparación pase a pase. Se analizaron las células derivadas de la placenta y umbilicales en los pases 8,15 y 20.

25 **Comparación donante a donante.** Para comparar las diferencias entre donantes, se compararon entre sí las células derivadas de la placenta de diferentes donantes, y las células derivadas umbilicales de diferentes donantes también se compararon entre sí.

30 **Comparación de cobertura de la superficie.** Los cultivos de células derivadas de la placenta en matraces cubiertos de gelatina fueron comparados a células derivadas de la placenta cultivadas en matraces sin cobertura. Cultivos de células derivadas umbilicales en matraces cubiertos con gelatina fueron comparados a células derivadas umbilicales cultivadas en matraces sin cobertura.

35 **Comparación de enzimas digestivas.** Se utilizaron cuatro tratamientos para el aislamiento y preparación de las células los cuales fueron comparados. Se compararon las células aisladas de la placenta con el tratamiento de 1) colagenasa; 2) colagenasa / dispasa; 3) colagenasa / hialuronidasa; y 4) colagenasa / hialuronidasa / dispasa.

Comparación de capas placentarias. Las células derivadas del aspecto maternal del tejido placentario se compararon a las células derivadas de la región de vellosa del tejido placentario y a las células derivadas del aspecto neonatal de la placenta.

40 **Resultados**

45 **Comparación placenta versus cordón umbilical.** Las células derivadas de la placenta y umbilicales fueron analizadas con citometría de flujo y mostraron una expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr- α y HLA-A, B, C, indicado por el aumento en los valores de fluorescencia relativa al control IgG. Estas células fueron negativas para una expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicado por los valores de fluorescencia comparables al control IgG. Las variaciones en los valores de fluorescencia de las curvas positivas fueron tomadas en cuenta. La media (en otras palabras CD13) y el rango (en otras palabras CD90) de las curvas positivas mostraron más variación, pero las curvas parecieron normales, confirmando una población homogénea. Ambas curvas exhibieron individualmente valores mayores que los del control IgG.

50 **Comparación pase a pase - células derivadas de la placenta.** Se analizaron por citometría de flujo a las células derivadas de la placenta en los pases 8,15, y 20 y todos fueron positivos para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr- α y HLA-A, B, C, tal como se reflejó en un aumento en el valor de fluorescencia relativa a la del control IgG. Las células tuvieron una expresión negativa de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ teniendo valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

60 **Comparación pase a pase - células derivadas umbilicales.** Las células derivadas umbilicales en los pases 8, 15 y 20 fueron analizadas con citometría de flujo y todas expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr- α y HLA-A, B, C, indicado por un incremento en la fluorescencia en relación al control IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicado por los valores de fluorescencia consistentes con el control IgG.

65 **Comparación donante a donante - células derivadas de la placenta.** Las células derivadas de la placenta aisladas de donantes diferentes fueron analizadas con citometría de flujo y cada una expresó CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr- α y HLA-A, B, C, con valores incrementados de fluorescencia relativa a la del control IgG.

Las células fueron negativas en la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ tal como se indicó con un valor de fluorescencia consistente con el del control IgG.

5 **Comparación donante a donante - células derivadas umbilicales.** Las células derivadas umbilicales aisladas de diferentes donantes fueron analizadas por citometría de flujo y cada una mostró una expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejados en los valores incrementados de fluorescencia relativa en comparación de la del control IgG. Estas células fueron negativas en expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

10 **El efecto de cubrir la superficie con gelatina en las células derivadas de la placenta.** Las células derivadas de la placenta se expandieron ya sea en matraces cubiertos con gelatina o sin cobertura se analizaron con citometría de flujo y todas expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejados en los valores incrementados de fluorescencia relativa a la del control IgG. Estas células fueron negativas en expresiones de CD31, CD34, CD45, CD 117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ tal como se indicó por los valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

15 **El efecto de cubrir la superficie con gelatina en las células derivadas umbilicales.** Las células derivadas umbilicales expandidas en matraces con gelatina y sin cobertura se analizaron con citometría de flujo y todas mostraron expresiones positivas de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con valores incrementados de fluorescencia relativa al control IgG. Estas células fueron negativas en cuanto a expresiones de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

20 **Efectos del procedimiento de digestión enzimática utilizada para la preparación de las células para el perfil del marcador de superficie celular.** Las células derivadas de la placenta aisladas utilizando varias enzimas digestivas analizadas por citometría de flujo expresaron en su totalidad CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se indicó por los valores incrementados de fluorescencia relativa en comparación del control IgG. Estas células fueron negativas en expresiones de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ como se indicó por los valores de fluorescencia consistentes con los del control IgG.

25 **Comparación de las capas placentarias.** Las células aisladas de las capas maternal, vellida y neonatal de la placenta, respectivamente, analizadas por citometría de flujo mostraron expresiones positivas de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, como se indica por los valores incrementados de fluorescencia relativa en comparación con el control IgG. Estas células fueron negativas en la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ como se indicó por los valores consistentes de fluorescencia en comparación con el control IgG.

30 **Resumen.** Un análisis de las células derivadas de la placenta y umbilicales con citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Las células derivadas de la placenta y umbilicales son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-A,B,C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad fue consistente entre variaciones en variables incluyendo al donante, el pase, la cobertura de la superficie del envase del cultivo, a las enzimas digestivas y la capa placentaria. Se observaron algunas variaciones en valores fluorescentes individuales de la curva del histograma, medias y rangos, pero todas las curvas positivas bajo todas las condiciones probadas fueron normales y los valores expresados de fluorescencia fueron mayores que en el control IgG, confirmando que las células tienen una población homogénea que tiene una expresión positiva de los marcadores.

EJEMPLO 8

50 **Caracterización e inmunohistoquímica de los fenotipos de tejidos de posparto**

Los fenotipos de las células encontrados dentro de los tejidos de posparto humanos, específicamente en el cordón umbilical y la placenta, fueron analizados por inmunohistoquímica.

55 **Materiales y Métodos**

Preparación de los tejidos. Los tejidos humanos del cordón umbilical y de la placenta fueron cultivados y se fijaron en una inmersión en un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído durante la noche a 4 °C. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos en contra de los siguientes epítomos: vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150, generado contra conejo; Sigma; o 1: 300, generado contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), actina alfa de músculo liso (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (CD34 humano de Clase III; 1: 100; Dako, Carpintería, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores: GROalpha anti-humano - PE (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-humana GCP-2 (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor de LDL oxidada anti-humano 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGO-A anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech). Muestras fijadas fueron recortadas con un bisturí y se colocaron dentro del compuesto de adhesión OCT (Tissue-Tek PTU; Sakura,

Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. Los bloques congelados fueron seccionados (10 micras de espesor) usando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se entró en portaobjetos de vidrio para su coloración.

5 Inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica se realizó similarmente de estudios previos (por ejemplo, Messina, et al., 2003, Exper. Neurol. 184: 816-829). Las secciones de tejidos fueron lavadas con tampón salino de fosfato (PBS) y expuestas a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS en un 4% (volumen / volumen) suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 por ciento (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma) por una hora para acceder a antígenos intracelulares. En instancias cuando el epítipo de interés estuviese ubicado en la
10 superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el tritón en todos los pasos del procedimiento para prevenir una pérdida de epítipo. Es más, en instancias cuando el anticuerpo principal era generado en contra de la cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), 3% (volumen / volumen) se utilizó suero de burro en vez del suero de cabra durante el procedimiento. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, fueron aplicados en dosis a las secciones por un período de cuatro horas a la temperatura del cuarto. Estas soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas, y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de soluciones secundarias de anti cuerpos (una hora a la temperatura del cuarto) que contenía bloqueos. Con IgG de cabra anti ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares), Eugene, O) y / o IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares)) o IgG de burro anti cabra - FITC (1:150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos fueron pagados, y se aplicó 10 μ mol DAPI (Molecular Probes - Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo
20 celular.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epifluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Una coloración positiva era representada por una señal fluorescente sobre la coloración del control. Se capturaron imágenes representativas usando una
25 videocámara digital color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras triplemente tinturadas, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. Montajes en capas fueron entonces preparados usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

30 **Caracterización del cordón umbilical. Los marcadores vimentina**, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 se expresaron en un subconjunto de células encontrado dentro de un cordón umbilical. La expresión de vWF y CD34 en específico estuvieron restringidas a envases de sangre contenida dentro del cordón. Células CD34+ estaban en la capa más profunda (lado del lumen). Se encontró una expresión vimentina a lo largo de los compartimientos de la matriz y de sangre en el cordón. Los SMA se limitaron a la matriz y a las paredes externas de la arteria y la vena, pero no se encontraba en los vasos sanguíneos en sí. Se encontraron CK18 y desmina dentro de los vasos exclusivamente, estando la desmina restringida a las capas medias y externas.

40 **Caracterización de la placenta.** Se observó vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 dentro de la placenta y específicamente en ciertas regiones.

Expresiones de tejidos GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1, y NOGO-A. Ninguno de estos marcadores se observaron dentro de los tejidos de cordón umbilical o de placenta.

45 **Resumen.** Vimentina, desmina, actina de músculo liso-alfa, citoqueratina 18, von Willebrand Factor, y CD 34 se encontraron en las células dentro del cordón umbilical y placenta humanos.

EJEMPLO 9

Análisis de células derivadas de tejido posparto utilizando ensayos oligonucleótidos

Se utilizaron ensayos con GENECHIP de Affymetrix para comparar Perfiles de expresión genética de células derivadas umbilicales y de la placenta con fibroblastos, células madre mesénquimas humanas, y otras líneas celulares de médula ósea humana. Éste análisis suministró una caracterización de las células derivadas de posparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.
55

Materiales y Métodos

60 **Aislamiento y cultivos de células.** Se obtuvieron cordones umbilicales y placentas humanas del National Disease Research Interchange (NDRI - Intercambio Nacional de Investigación de Enfermedades, Filadelfia, PA) de partos de embarazos a término normal completo con el consentimiento de los pacientes. Los tejidos fueron recibidos y las células fueron aisladas tal como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en un medio de crecimiento (usando DMEM-LG) en matraces plásticos de cultivos de tejidos cubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37° C con un 5% o de CO₂.

65

Se compraron fibroblastos dérmicos humanos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Número de Lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Estas dos líneas fueron cultivadas en el medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con un 10% (volumen / volumen) de suero bovino fetal (Hyclone) y penicilina / estreptomina (Invitrogen). Las células crecieron en plástico tratado para tejidos estándar.

Se compraron células madres mesénquimas humanas (hMSC - Human mesenchymal stem cells) de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante en el medio MSCGM (Cambrex). Las células crecieron en un plástico cultivado de tejidos estándar a 37 °C con un 5% de CO₂.

Se recibió médula ósea de cresta ilíaca humana de NDRI con el consentimiento del paciente. La médula fue procesada de acuerdo al método señalado por Ho, et al. (WO03/025149). La médula fue mezclada con un tampón lisado (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, y 0.1 mM EDTA, pH 7.2) a una tasa de 1 parte de médula ósea a 20 partes de tampón lisado. La suspensión de células fue procesada con un agitador vortex, incubada por 2 minutos a temperatura ambiente, y centrifugada durante 10 minutos a 500 x g. Los materiales flotantes fueron descartados y el pellet de células fue re - suspendido en el Medio - alfa Esencial Mínimo (Invitrogen) suplementado con un 10% (volumen / volumen) de suero bovino fetal y 4mM de glutamina. Las células se centrifugaron nuevamente y la pellet de células fue re - suspendido en un medio fresco. Las células viables mononucleares fueron contadas usando exclusión de tripano - azul (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares fueron sembradas en matraces de plástico con cultivos de tejido a 5 x 10⁴ células / cm². Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ ya sea a O₂ atmosférico o a 5%. Las células fueron cultivadas durante 5 días sin un cambio de medio. El medio y las células no adheridas se removieron después de 5 días del cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en el cultivo.

Aislamiento de ARNm y Análisis con GENCHIP (CHIPGENÉTICO). Cultivos de células que crecen activamente fueron removidos de los matraces con un raspador de células en un PBS frío. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Los materiales flotantes fueron removidos y las células fueron re - suspendidas en PBS fresco y centrifugadas nuevamente. Se removieron los materiales flotantes y el pellet de células fue congelado inmediatamente y almacenado a -80 ° C. Se extrajo ARNm y se transcribió en al ADNc, que fue transcrito entonces a un ARNc y etiquetado como biotina. El ARNc etiquetado biotina fue hibridado con una agrupación de oligonucleótidos HG-U133A GENECHIP (Affymetrix, Santa Clara CA). La hibridación y la recaudación de datos fueron realizadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los análisis fueron realizados usando el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM - "Análisis de Importancia de Microgrupos") versión 1.21 (Stanford University; Tusher, V.G. et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 5116-5121).

Resultados

Catorce poblaciones de células diferentes fueron analizadas. Las células junto con su información de pases, sub-estrato de cultivo, y medio de cultivo se muestran en la Tabla 9-1.

Tabla 9-1. Las células analizadas por el estudio de microgrupos. Las líneas celulares se listan por código de identificación junto con el momento del análisis, crecimiento celular del sub - estrato y crecimiento del medio.

Población de Células	Pase	Sub - Estrato	Medio
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
ICBM (070203) (5% 02)	3	Plástico	MEM, 10% FBS
ICBM (062703) (std. 02)	5	Plástico	MEM, 10% FBS
ICBM (062703) (5% 02)	5	Plástico	MEM, 10% FBS
hMSC (Lot 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F 1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS

La información evaluada por un Análisis de Componentes de Principio, analizando 290 genes que fueron diferencialmente expresados en las células. Este análisis permite una comparación relativa de similitudes entre las poblaciones. La Tabla 9-2 muestra las distancias euclidianas que fueron calculadas para la comparación de parejas de células. Las distancias Euclidianas se basaron en la comparación de células basadas en 290 genes que fueron diferencialmente expresados en los diferentes tipos de células. La distancia Euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes (en otras palabras, entre más grande sea la distancia, existirá menor similitud).

Table 9-2. Las distancias Euclidianas de parejas de células

Pareja 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 9-3, 9-4 y 9-5 muestran que la expresión de genes se incrementó en las células derivadas de la placenta (Tabla 9-3), se incrementó en las células derivadas umbilicales (Tabla 9-4), y se redujo en células derivadas umbilicales y de la placenta (Tabla 9-5). La columna titulada "Identificación del Conjunto de Sondas" se refiere al código de identificación del fabricante para los conjuntos de sondas oligonucleótidas ubicadas en un lugar específico en el chip, que se hibridizan con el gen mencionado (columna "Nombre del Gen"), incluyendo una secuencia que puede encontrarse en la base de datos NCBI (GenBank – BancoGenético) en el número específico de acceso (columna "Número de Acceso NCBI").

Tabla 9 – 3. Los genes demuestran haber incrementado específicamente su expresión en las células derivadas de la placenta en comparación a los otros ensayos de líneas celulares

Genes se incrementados en las células derivadas de la placenta		
Identificación del Grupo de Sondas	Nombre del Gen	Número de Acceso NCBI
209732_at	Lectina tipo C (dominio de reconocimiento de carbohidratos dependientes del calcio), miembro 2 de la superfamilia (inducido a la activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	Familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	Receptor 1 (tipo lectina) de lipoproteína oxidada de baja densidad	AF035776
214993_at	Cds parciales, ARNm, IMAGE:4179671 de clon, Homo sapiens,	AF070642
202178_at	Proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	Proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	Reducido en cancer de ovario 1	NM_014890
213542_at	ARNm de homo sapiens; cADN DKFZp547K1113 del clon DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 9-4. Los genes muestran haber incrementado específicamente la expresión en las células derivadas umbilicales en comparación con las líneas celulares de otros ensayos

Genes que se incrementaron en las células derivadas umbilicales		
Identificación del Grupo de Sondas	Nombre del Gen	Número de Acceso NCBI
202859_x_at	Interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	Interleucina 8	AF043337
210222_s_at	Reticulon 1	BC000314
204470_at	Ligando 1 de quimioquina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de la melanoma)	NM_001511
206336_at	Ligando 6 de quimioquina (motivo C-X-C) (proteína quimiotáctica de granulocitos 2)	NM_002993
207850_at	Ligando 3 de quimioquina (motivo C-X-C)	NM_002090
203485_at	Reticulon 1	NM_021136
202644_s_at	Factor de necrosis de tumores, proteína inducida por alpha 3	NM_006290

Tabla 9-5. Los genes mostraron una reducción de expresión en las células derivadas umbilicales y placentarias en comparación con los ensayos de las otras líneas celulares

Genes Reducidos en las Células Derivadas Umbilicales y Placentarias		
Identificación del Grupo de Sondas	Nombre del gen	Número de Acceso NCBI
210135_s_at	Homeobox 2 de corta estatura	AF022654.1
205824_at	Proteína 27kDa golpe de calor 2	NM_001541.1
209687_at	Ligando 12 de quimioquina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales)	U19495.1
203666_at	Ligando 12 de quimioquina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales)	NM_000609.1
212670_at	Elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm de homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	Homeo box 2 de mesénquima (homeo box específico que detiene el crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	Homólogo homeobox sine oculis 1 (Drosophila)	NM_005982.1
209283_at	Cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	Activador asociado no organizado de morfogénesis 2	BF513244
213488_at	Proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	Similar a la neuralina 1	AL049176
205200_at	Tetranectina (proteína de unión de plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	Homología src 3 (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1

ES 2 568 463 T3

(Continuación)

Genes Reducidos en las Células Derivadas Umbilicales y Placentarias		
Identificación del Grupo de Sondas	Nombre del Gen	Número de Acceso NCBI
5 200921_s_at	Gen de translocación de células B 1, anti-proliferativo	NM_001731.1
10 206932_at	Hidroxilasa 25 de colesterol	NM_003956.1
204198_s_at	Factor de transcripción 3 relacionado con enanismo	AA541630
15 219747_at	Proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	Receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
202465_at	Potenciador de endopeptidasa C de pro - colágeno	NM_002593.2
20 203706_s_at	Homólogo enrollado 7 (Drosophila)	NM_003507.1
212736_at	Gen hipotético BC008967	BE299456
214587_at	Colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
25 201645_at	Tenascina C (hexabrachion)	NM_002160.1
210239_at	Proteína homeobox iroquois 5	U90304.1
203903_s_at	Hephaestina	NM_014799.1
30 205816_at	Integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	Glicoproteína sináptica de la vesícula 2	NM_014849.1
35 213909_at	Fis FLJ12280 de ADNc de homo sapiens, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	Factor similar al receptor de citoquina 1	NM_004750.1
40 204401_at	Canal activado por la conducción del calcio intermedia / pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
216331_at	Integrina, alfa 7	AK022548.1
209663_s_at	Integrina, alfa 7	AF072132.1
45 213125_at	Proteína DKFZP586L151	AW007573
202133_at	Coactivador transcripcional con el motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
50 206511_s_at	Homólogo de homeobox de oculis sine 2 (Drosophila)	NM_016932.1
213435_at	Proteína KIAA1034	AB028957.1
206115_at	Respuesta temprana de crecimiento 3	NM_004430.1
55 213707_s_at	Homeo box cercano 5	NM_005221.3
218181_s_at	Proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
60 209160_at	familia aldo-ceto reductasa 1, miembro C3 (hidroxiesteroide deshidrogenasa 3-alfa, tipo II)	AB018580.1
213905_x_at	Biblicano	AA845258
65 201261_x_at	Biblicano	BC002416.1

(Continuación)

Genes Reducidos en las Células Derivadas Umbilicales y Placentarias		
Identificación del Grupo de Sondas	Nombre del gen	Número de Acceso NCBI
202132_at	Co – activador transcripcional con motivo vinculante de PDZ (TAZ)	AA081084
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
213791_at	proencefalina	NM_006211.1
205422_s_at	integrina, similar a beta-1 (con dominios que se repiten similares a EGF)	NM_004791.1
214927_at	ANDc de clon EUROIMAGE 1968422 insertado completamente en ARNm de homo sapiens	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	Proteína KIAA0367	AB002365.1
219789_at	Ciclase de guanilato C de péptidos natriuréticos (receptor de péptidos natriurético C)	AI628360
219054_at	Proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	ARNc de homo sapiens, ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	Proteína de membrana asociada a la vesícula 5 (myobrevin)	NM_006634.1
201843_s_at	Proteína de matriz extracelular similar a la fibulina que contiene EGF 1	NM_004105.2
221478_at	Proteína similar a la 3 que interactúa con BCL2 / adenovirus EB 19kDa	AL132665.1
201792_at	Proteína vinculante de AE 1	NM_001129.2
204570_at	Polipéptido VIIa de oxidase c de citocromo un (músculo)	NM_001864.1
201621_at	Neuroblastoma, supresión de tumorosidad 1	NM_005380.1
202718_at	Proteína vinculante del factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36kDa	NM_000597.1

Las Tablas 9-6, 9-7, y 9-8 muestran las expresiones de genes que se incrementaron en fibroblastos humanos (Tabla 9-6), células ICBM (Tabla 9 - 7), y MSCs (Tabla 9 – 8).

Tabla 9-6. Genes que demostraron tener una expresión incrementada de fibroblastos cuando se compararon con otros ensayos de líneas de células.

Genes que se incrementaron en los fibroblastos	
	Fosfatasa de especificidad dual
	Proteína KIAA0527
	ADNc de homo sapiens: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	ankyrina 3, nodo de Ranvier (ankyrina G)
	inhibina, beta A (activina A, polipéptido alpha AB de actividad)
	pirofosfatasa ectonucleotide / fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	Proteína KIAA1053
	Proteína asociada con microtúbulos 1A

(Continuación)

Genes que se incrementaron en los fibroblastos	
5	ADNc de homo sapiens: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	ankyrina 3, nodo de Ranvier (ankyrina G)
10	inhibina, beta A (activina A, polipéptido alpha AB de actividad)
	pirofosfatasa ectonucleotida / fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	Proteína KIAA1053
15	Proteína asociada con microtúbulos 1A
	Proteína dedo zinc 41
	Proteína HSPC019
20	ADNc de homo sapiens: FLJ23564 fis, clon LNG10773
	ARNm de homo sapiens; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	Proteína LIM (similar a la proteína enigmática de la rata quinasa C)
25	Inhibidor del potenciador de genes polipéptidos de luz kappa en células B, proteína asociada con complejo de quinasa
	Proteína hipotética FLJ22004
30	Secuencia ARNm de humano (clon CTG-A4)
	ESTs, similares moderadamente al factor similar al receptor de citosina 2; precursor CRL2 del receptor de citosina [homo sapiens]
	Factor de crecimiento transformante, beta 2
35	Proteína hipotética MGC29643
	Antigen identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2
40	Proteína putativa de retinopatía ligada al cromosoma X

Tabla 9-7. Los genes que mostraron un incremento en la expresión en las células derivadas del ICBM en comparación con ensayos de otras líneas celulares.

Genes incrementados en las células ICBM	
45	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína que se repite en la ankyrina cardíaca • ORF de la region I clase MHC
50	<ul style="list-style-type: none"> • integrina, alfa 10 • proteína hipotética FLJ22362 • galactosamina-D-alfa-acetil-N-UDP: acetilgalactosaminiltransferasa-N de polipéptido os 3 (GalNAc-T3) • proteína inducida por interferón-44 • SRY (región de Y que determina el sexo)-box 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica) • proteína asociada con la queratina 1-1
55	<ul style="list-style-type: none"> • similar a hippocalcin 1 • dentado 1 (síndrome de Alagille) • proteoglicano 1, gránulo secretor

60

65

Tabla 9 – 8. Genes que demostraron haber incrementado la expresión en células MSC cuando se compararon con otros ensayos de líneas celulares.

Genes incrementados en células MSC	
5	• Interleucina 26
	• maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
10	• subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
	• Homólogo oncogénico viral de osteosarcoma murino v-fos FBJ
	• Proteína hipotética DC42
15	• subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
	• Homólogo B oncogénico viral de osteosarcoma murino FBJ
	• Proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1
	• Secuencia transformable derivada de la línea celular MCF.2
	• Canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
20	• Homeo - proteína de clase emparejada del cartílago 1
	• ADNc FLJ12232 fis de homo sapiens, clon MAMMA1001206
	• ADNc FLJ34668 fis de homo sapiens, clon LIVER2000775
	• proto-oncogén jun B
25	• CLL de células B / linfoma 6 (proteína de dedo de cinc 51)
	• Proteína 36 de dedo de cinc, tipo C3H, homólogo (ratón)

Resumen. Ésta examinación fue realizada para suministrar una caracterización molecular de las células de posparto derivadas del cordón umbilical y de la placenta. Este análisis incluyó células derivadas de tres cordones umbilicales y tres placentas diferentes. La examinación también incluyó dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesénquimas, y tres líneas celulares de médula ósea de cresta ilíaca. La ARNm que fue expresada por estas células se analizó en un ensayo oleiconucleótido que contenía sondas para 2200 genes. Los resultados mostraron que 290 genes se habían expresado diferencialmente en estos cinco tipos diferentes de células. Estos genes incluyeron 10 genes que se incrementaron específicamente en las células derivadas de la placenta y siete genes que se incrementaron específicamente en las células derivadas del cordón umbilical. Se encontraron 54 genes que tuvieron unos niveles de expresión específicamente más bajos en la placenta y el cordón umbilical, cuando se compararon con otros tipos de célula. La expresión de los genes seleccionados ha sido confirmada usando PCR (ver el ejemplo que sigue). Estos resultados demuestran que las células derivadas de posparto tienen un perfil de expresión genético diferente, por ejemplo, si son comparadas con las células y fibroblastos derivados de la médula ósea.

EJEMPLO 10

Marcadores de células en las células derivadas de posparto

En el ejemplo anterior, se evaluaron similitudes y diferencias en las células derivadas de la placenta humana y del cordón umbilical humano al comparar sus perfiles de expresión genética con aquellas células derivadas de otras fuentes (usando un ensayo oligonucleótido). Seis genes "identificadores" fueron reconocidos: receptor LDL oxidado 1, interleucina-ocho, renina, reticulon, ligando de receptor de quimioquina 3 (ligando CXC 3), y proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes "identificadores" se expresaron en altos niveles relativos en las células derivadas de posparto.

Los procedimientos descritos en este ejemplo fueron realizados para verificar la información de micro matrices y encontrar concordancia / inconformidad entre los genes y las expresiones proteínicas, así como para establecer una serie de ensayos confiables para la detección de identificadores únicos de las células derivadas de la placenta y umbilicales.

Métodos y Materiales

Células. Células derivadas de la placenta (tres aislamientos, incluyendo uno predominantemente neonatal como se identificó con el análisis de cariotipos), células derivadas umbilicales (cuatro aislamientos), y fibroblastos dérmicos normales humanos (NHDF; neonatales y adultos) cultivados en medios de crecimiento con penicilina / estreptomycin en un matraz T 75 cubierto con gelatina. Células madres mesénquimas (MSCs) se cultivaron en un medio de crecimiento de células madres mesénquima de un equipo Bullet (MSCGM - Mesenchymal Stem Cell Growth Medium; Cambrex, Walkerville, MD).

Para el protocolo IL-8, las células fueron descongeladas del nitrógeno líquido y puestas en platos en matraces cubiertos con gelatina a 5000 células por centímetro cuadrado, cultivadas durante 48 horas en el medio de crecimiento y entonces cultivadas durante ocho horas más en 10 ml de medio de privación de suero [DMEM -de baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina / estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA) y 0.1% (masa / volumen) de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. Después de este tratamiento el ARN fue extraído y el material flotante fue centrifugado a 150 x g durante cinco minutos para remover los vestigios celulares. El material flotante fue congelado entonces a -80 °C para un análisis ELISA.

Cultivo de células para el ensayo ELISA. Las células de post parto derivadas de la placenta y umbilicales, así como los fibroblastos humanos derivados de prepucios neonatales humanos se cultivaron en un medio de crecimiento en matraces T 75 cubiertos de gelatina. Las células se congelaron en el paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifugación de 15 ml. Después de la centrifugación a 150 x g durante cinco minutos, el material flotante fue descartado. Las células fueron re - suspendidas en un medio de cultivo de 4 ml y entonces contadas. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² que contenía 15 ml del medio de crecimiento a 375,000 células por frasco durante 24 horas. El medio fue cambiado a un medio de vibración de suero por ocho horas. El medio de privación de suero fue recolectado al final de la incubación, centrifugado a 14.000 x g durante cinco minutos (y almacenado a -20 °C).

Para estimar el número de células en cada frasco, se agregó 2 ml de tripsina / EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) a cada frasco. Después de las células se separa del frasco, la actividad de la tripsina se realizó con 8 ml del medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifugación de 15 ml 150 x g durante cinco minutos. El material flotante fue removido y se agregó 1 ml de medio de crecimiento a cada tubo para re-suspender las células. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

Ensayo ELISA. El monto de IL-8 secretado por las células al medio de privación de suero fue analizado usando ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos fueron probados de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante.

Aislamiento total ARN. Se extrajo el ARN de las células derivadas de posparto y fibroblastos que eran confluentes para la expresión IL-8 de las células tratadas como se describió anteriormente. Las células fueron revisadas con 350 µl de tampón RLT que contenían mercaptoetanol beta (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit (botiquín); Qiagen, Valencia, CA). Se extrajo el RM de acuerdo a las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit (botiquín); Qiagen, Valencia, CA) y sujeto al tratamiento DNase (2.7 unidades por muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN fue eluido con 50 µl de agua tratada con DEPC y almacenada a -80 °C.

Transcripción reversa. También se extrajo ARN de placenta y tejido umbilical humano. El tejido (30 mg) fue suspendido en 700 µl de tampón RLT que contenían 2- mercaptoetanol. Las muestras se homogenizaron mecánicamente y el ARN fue extraído de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se extrajo el ARN con 50 µl de agua tratada con DEPC y almacenada a -80° C. El ARN fue transcrito en reversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción en reversa de 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 fueron almacenadas a -20 °C

Los genes identificados por los micro ensayos ADNc como regulados solamente en las células de posparto (genes de identificación - incluyendo receptores LDL oxidados, interleucina -8, renina y reticulon), fueron investigados en mayor detalle usando PCR en tiempo real y convencional.

PCR en tiempo real. Se realizó PCRs de muestras ADNc usando productos de expresión genética Assays-on-DemandTM (Ensayos-cuando éstos sean Requeridos): se mezcló el receptor LDL oxidado (Hs00174103); y GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) con ADNc y la mezcla maestra TaqMan Universal PCR de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencia 7000 con un software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones térmicas del ciclo fueron inicialmente 50° C durante dos minutos y 95° C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos y 60° C durante un minuto. La información PCR fue analizada de acuerdo a las especificaciones del fabricante (boletín del usuario número dos de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700).

PCR convencional. Se realizó un PCR convencional usando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Massachusetts, EE.UU.) para confirmar los resultados del PCR en tiempo real. El PCR fue realizado usando 2 µl de solución de ADNc, 1 x tampón de reacción PCR mixta universal AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) y una desnaturalización inicial a 94° C durante cinco minutos. La amplificación fue optimizada para cada primer conjunto. Para IL-8, ligando CXC 3, y el reticulon (94° C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72° C durante 30 segundos durante los 30 ciclos); para la renina (94° C durante 15 segundos, 53 °C durante 15 segundos y 72° C durante 30 segundos para 30 ciclos); para la renina (94° C durante 15 segundos, 53° C durante 15 segundos y 72° C durante 30 segundos por 38 ciclos); para el receptor LDL oxidado y GAPDH ((94° C durante 15 segundos, 53° C durante 15 segundos y 72° C durante 30 segundos por 33 ciclos). Los cebos utilizados para la amplificación se listan en la tabla 1. La concentración de cebo en la reacción PCR final fue 1

5 μmol excepto para GAPDH, que fue de 0.5 micromoles. Los cebos de GAPDH fueron los mismos que para la reacción PCR en tiempo real, excepto que la sonda del fabricante de TaqMan no se agregó a la reacción final PCR. Se corrieron muestras en 2% (masa / volumen) de gel agarosa y tinturado con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes fueron capturadas utilizando un rollo de película 667 Universal Twinpack (Paquete Gemelo Universal) (VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara Polaroid de longitud focal (VWR International, South Plainfield, NJ).

Tabla 10-1: Cebos utilizados

10	Nombre del Cebo	Cebos
	Receptor LDL oxidado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:1) A: 5'-AGAATGGAAAAGTGGAAATAGG-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:2)
	Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:4)
15	Reticulon	S: 5'- TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:5) A: 5'- AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:6)
	nterleucina-8	S: 5'- TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:7) A: 5'-CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC- 3' (NUM. DE ID DE SEQ.:8)
20	Ligando de quimioquina (CXC) 3	S: 5'- CCCACGCCACGCTCTCC-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:9) A: 5'-TCCTGTCTAGTTGGTCTCC-3' (NUM. DE ID DE SEQ.:10)

25 **Inmunofluorescencia.** Las PPDCs fueron fijadas con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. Se utilizó un aislamiento de células derivadas umbilicales y otro de células derivadas de la placenta en el pase 0 (P0) (directamente después de su aislamiento o) y en el pase 11 (P 11) (dos aislamientos de células derivadas de la placenta y dos aislamientos de células derivadas umbilicales) y fibroblastos (P 11). La inmunocitoquímica se realizó usando los anticuerpos dirigidos en contra de los siguientes epítopes: vimentina (1:500, Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma -generado en contra del conejo; o 1:300; Chemicon, Temecula, CA -generado en contra del ratón,), actina de músculo liso alpha (SMA; 1:400; Sigma Citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma), y CD34 (CD34 humano clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Adicionalmente, se probaron los siguientes marcadores en las células pos parto del pase 11: GRO alpha - PE anti humano (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti humano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor LDL oxidado anti humano 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y NOGA-A anti humano (1:100; Santa Cruz, Biotech).

35 Los cultivos fueron lavados con tampón fosfato salino (PBS) y fueron expuestos a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4% (volumen / volumen) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 % (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. En los lugares donde se ubicaba el epítope de interés en la superficie celular (CD34,ox-LDL R1) se omitía el Tritón X-100 en todos los pasos del procedimiento para prevenir una pérdida de epítope. Es más, en 40 instancias donde el anticuerpo principal fue generado en contra de la cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizaba un 3% (volumen / volumen) de suero de burro en lugar del suero de cabra durante ese proceso. Los anticuerpos principales, diluidos en la solución de bloqueo, se aplicaron entonces a los cultivos por un período de una hora a la temperatura del cuarto. Las principales soluciones de anticuerpos se removieron y los cultivos fueron lavados con PBS antes de la creación de soluciones secundarias de anticuerpos (una hora a la temperatura del 45 cuarto) que contenía bloqueos junto con IgG de cabra anti ratón Texas Red (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares), Eugene, O) y / o IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes - Sondas Moleculares) o IgG burro anti cabra - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). Los cultivos fueron lavados y se aplicó 10 μmol de DAPI (Molecular Probes - Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo de la célula.

50 Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando un filtro apropiado de fluorescencia en un histeroscopia fluorescente – epi invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, una coloración positiva representaba una señal de fluorescencia por sobre el tinte de control mientras se seguía completamente el seguimiento señalado anteriormente con excepción de la aplicación de una solución primaria de anticuerpos. Se capturaron imágenes representativas usando una videocámara a color digital y por medio del software ImagePro 55 (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras con tres colores, cada imagen fue tomada usando sólo un filtro de emisión a la vez. Las capas de montajes fueron preparadas posteriormente usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

60 Preparación de células para análisis FACS. Las células adheridas en los matraces fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y separadas con tripsina / EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células fueron cosechadas, centrifugadas, y re-suspendidas con un 3% (volumen / volumen) de FBS en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se entregaron dosis de 100 μl a tubos cónicos. Las células tinturadas para antígenos intracelulares fueron permeabilizadas con el tampón Perm / Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se agregaron anticuerpos a las dosis de cuerdo a las especificaciones de los fabricantes y las células fueron 65 incubadas en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS

y centrifugadas para remover los anticuerpos que estaban en exceso. Las células que requerían un anticuerpo secundario fueron re-suspendidas en 100 µl de un 3% de FBS. Se añadió el anticuerpo secundario de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes y las células fueron incubadas en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas para remover el exceso de anticuerpos secundarios. Las células lavadas fueron re-suspendidas en 0.5 mililitros de PBS y analizadas por citometría de flujo. Los siguientes fueron los anticuerpos utilizados: receptor LDL oxidado 1(sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 de ratón kappa, (P-4685 y M-5284; Sigma), IgG burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.). Se realizó el análisis de citometría de flujo con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

Resultados

Los resultados PCR en tiempo real para los genes “identificadores” seleccionados realizados en el ADNc de células derivadas de placenta humana, fibroblastos adultos y neonatales y las células madre mesénquimas (MSCs) indican que el receptor LDL oxidado y la renina fueron expresados a un nivel más alto en las células derivadas de la placenta en comparación con las otras células. La información obtenida del PCR en tiempo real fue analizada por el método ΔΔCT y se expresó en una escala logarítmicas. Los niveles de expresión del reticulon y del receptor LDL oxidado fueron más altos en células derivadas umbilicales cuando se compararon con otras células. No existía diferencia significativa en la expresión de los niveles de ligando CXC 3 y GPC-2 entre las células derivadas de post parto y los controles. Los resultados del PCR en tiempo real fueron confirmados por los PCR convencionales. La secuenciación de productos PCR dieron mayor validez a estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de ligando CXC 3 entre las células derivadas de postparto y los controles usando los cebos ligando CXC 3 PCR listados anteriormente.

La producción de citoquina, IL-8 en posparto o fue elevada en las células derivadas de postparto cultivadas en los medios de crecimiento y las que fueron privadas de sueros. Todos los datos PCR en tiempo real fueron validados con PCR convencionales y con secuenciación de productos PCR.

Cuando los materiales antes de células que crecieron en el medio libre de sueros se examinaron para determinar la presencia de IL-8, los montos más altos fueron detectados en medios derivados de células umbilicales y en algunos aislamientos de células placentarias (Tabla 10-1) no se detectó ningún IL-8 en medios derivados de fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 10-1: Montos de la proteína IL-8 medidos por ELISA

Tipo de Célula	IL-8
hFibro	ND
Aislamiento de placenta 1	ND
Aislamiento umbilical 1	2058.42 ± 144.67
Aislamiento de placenta 2	ND
Aislamiento umbilical 2	2368.86 ± 22.73
Aislamiento de placenta 3 (normal O ₂)	17.27 ± 8.63
Aislamiento de placenta 3 (lowO ₂ , W/O BME)	264.92 ± 9.88
Los resultados del ensayo ELISA para interleucina-8 (IL-8) realizado en las células derivadas de la placenta y umbilicales así como en fibroblastos de piel humana. Los valores presentados aquí son picogramos / millones de células, n = 2, sem.	
ND: No Detectado	

Las células derivadas de la placenta también se examinaron para detectar la producción del receptor LDL oxidado, GCP-2 y GROalfa por medio de un análisis FACS. Las células fueron positivas para GCP-2. El receptor LDL oxidado y el GRO no fueron detectados por este método.

Las células derivadas de la base también fueron examinadas para detectar la producción de ciertas proteínas por el análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase cero), las células derivadas de la placenta humana fueron fijadas con 4% de paraformaldehído y se expusieron a anticuerpos para analizar seis proteínas: el factor von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de músculo liso alfa y vimentina. Las células marcaron positivo para actina de músculo liso alfa y vimentina. Esta tendencia se preservó hasta el pase 11. Sólo unas pocas células (menos del 5%) en el pase cero marcaron positivo para citoqueratina 18

Las células derivadas del cordón umbilical humano en el pase cero fueron analizadas para detectar la producción de ciertas proteínas con un análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase cero), las células fueron fijadas con un 4% de paraformaldehído y expuestas a anticuerpos para analizar seis proteínas: factor von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de músculo liso alfa, and vimentina. Las células derivadas umbilicales fueron positivas para actina de músculo liso alpha y vimentina, con la tendencia de coloración consistente hasta el pase 11.

Resumen. Se estableció Concordancia entre los niveles de expresión genética medidos por micro matrices y PCR (ambas en tiempo real y convencional) para cuatro genes: receptor LDL oxidado 1, rennina, reticulon, y IL-8. La expresión de estos genes fue regulada diferencialmente a nivel de ARNm en los PPDCs, con IL-8 también regulado diferencialmente a nivel proteínico. La presencia del receptor LDL oxidado no fue detectada a nivel proteínico por el análisis FACS en las células derivadas de la placenta. La expresión diferencial de GCP-2 y del ligando CXC 3 no fue confirmada a nivel de ARNm, sin embargo se detectó GCP-2 a nivel proteínico por el análisis FACS en las células derivadas de la placenta. Aunque este resultado no se refleja por los datos obtenidos originalmente del experimento de micromatrices, esto puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

Inmediatamente después del aislamiento (pase cero), las células derivadas de la placenta humana marcaron positivas para actina de músculo en liso alfa y vimentina. Esta tendencia también se observó en las células en el pase 11. Estos resultados sugieren que la expresión de vimentina y de actina de músculo liso alfa pueden preservarse en células con pases, en el medio de crecimiento y bajo las condiciones utilizadas en estos procedimientos. Las células derivadas del cordón umbilical humano en el pase cero fueron sondeadas por expresiones de actina de músculo liso alfa y vimentina y ambas marcaron positivo. La tendencia de marcación fue preservada hasta el pase 11

EJEMPLO 11

Evaluación inmunológica in vitro de las células derivadas de posparto

Las células derivadas de posparto (PPDCs) fueron evaluadas in vitro por sus características inmunológicas como un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica, si existiese, que estas células provocarían después de un trasplante in vivo. Las PPDCs fueron ensayadas con simetría de flujo por la presencia de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2. Estas proteínas se expresan por células que presentan antígenos (APC) y son requeridas para la estimulación directa a de células nativas CD4*^T (Abbas & Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, INMUNOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR) 5ta Ed. (2003) Saunders, Filadelfia, pg. 171). Las líneas celulares también fueron analizadas por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas & Lichtman, 2003, supra), CD 178 (Coumans, et al., (1999) Journal of Immunological Methods (Diario de Métodos Inmunológicos) 224, 185-196), y PD-L2 (Abbas & Lichtman, 2003, supra; Brown, et. al. (2003) The Journal of Immunology (El Diario de Inmunología) 170, 1257-1266). Se piensa que la expresión de estas proteínas por las células que residen en los tejidos placentarios median el estatus inmunoprivilegiado de los tejidos en los radios en el útero. Para predecir la medida en la cual las líneas celulares derivadas de la placenta y umbilicales provocan una respuesta in vivo, las células fueron probadas en una reacción en una sola reacción mixta de linfocitos (MLR).

Materiales y Métodos

Cultivo celular. Las células fueron cultivadas hasta la confluencia en medios de crecimiento con penicilina / estreptomycin en matraces T 75 (Corning, Corning, NY) cubiertos con 2% de gelatina (Sigma, St. Louis, MO).

Tinturación de cuerpos. Las células fueron lavadas en tanpón fosfato salino (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y fueron separados con tripsina / EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Las células fueron cultivadas, centrifugadas y re-suspendidas en un 3% (volumen / volumen) de FBS en PBS a una concentración celular de 1x10⁷ por mililitro. Se añadieron anticuerpos (Tabla 11-1) a 100 µl de suspensión celular de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4° C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para remover anticuerpos no unidos. Las células fueron re-suspendidas en 500 µl de PBS y analizadas con citometría de flujo usando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 11-1. Anticuerpos

	Anticuerpo	Fabricante	Número de Catálogo
5	HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
	CD80	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557227
	CD86	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555665
	B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	552502
	HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
	CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
10	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

15 Reacción Mixta de Linfocitos. Matrices conservados criogénicamente en del pase 10 de células derivadas umbilicales marcadas como línea celular A y de pase 11 de células derivadas de la placenta marcadas como línea celular B fueron enviadas en hielo seco a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción mixta de linfocitos usando CTBR SOP No. CAC-031. Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs - Peripheral blood mononuclear cells) fueron recolectadas de varios donantes Bonn varios masculinos y femeninos. Los estimuladores (donadores) alogénicos PBMC, autologos PBMC, y líneas celulares de postparto fueron tratadas con mitomicina C. 20 Las células autólogas y estimuladoras tratadas con mitomicina C fueron agregadas las PBMCs respondedoras (recipientes) y cultivadas durante 4 días. Después de la incubación se agregó [3H]timidina a cada muestra y se cultivaron por 18 horas. Después de cocechar las células, ADN radiomarcado fue extraído, y se midió la incorporación de [3H]-timidina usando un contador de tinturación.

25 El índice de estimulación de los donantes alogénicos (SIAD - stimulation index for the allogeneic donor) se calculó como la proliferación media del destinatario más el donante alogénico tratado con mitomicina C dividido para la proliferación de la línea base del destinatario. El índice de estimulación de las PPDCs se calculó como la proliferación media del destinatario más la línea celular de postparto tratada con mitomicina C dividida para la proliferación de la línea base del receptor.

30 **Resultados**

35 **Reacción mixta de linfocitos - células derivadas de la placenta.** Siete donantes humanos de sangre voluntarios fueron estudiados para identificar a un sólo donante que exhibiese una respuesta robusta de proliferación en una reacción mixta de linfocitos con los otros seis donantes. Este donante fue seleccionado como el donante alogénico positivo de control. Los otros seis donadores de sangre fueron seleccionados como destinatarios. El donante alogénico positivo de control y las líneas celulares derivadas de la placenta fueron tratados con mitoglicina C y cultivados en una reacción mixta de linfocitos con los seis receptores alogénicos individuales. Las reacciones fueron realizadas por triplicado usando dos platos de cultivos celulares con tres receptores por plato (Tabla 11-2). El índice de estimulación promedio varió desde 1.3 (plato 2) hasta 3 (plato 1) y los controles alogénicos del donante positivo variaron desde 46.25 (plato 2) hasta 279 (plato 1) (Tabla 11-3).

45

50

55

60

65

Tabla 11-2. Datos de la reacción mixta de linfocitos - línea celular B (placenta)

DPM para ensayo de proliferación										
		Identificación del Plato: Plato 1								
	Analítico	Cultivo	Réplicas							
	Número	Sistema	1	2	3		Media	SD	cv	
	IM03-7769	Proliferación de la línea base 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 alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitomicina C)	23971	22352	20921		22414.7	1525.97	6.8	
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con itomicina C)	664	559	1090		771.0	281.21	36.5	
	SI (donante)						200			
	SI (línea celular)						7			
	IM03-7770	Proliferación de la línea base 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 alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitomicina C)	45005	43729	44071		44268.3	660.49	1.5	
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	533	2582	2376		1830.3	1128.24	61.6	
	SI (donante)						221			
	SI (línea celular)						9			

(Continuación)

5	Analitico	Cultivo	Replicas					
	Número	Sistema	1	2	3	Media	SD	cv
10	IM03-7771	Proliferación de la línea base del receptor	157	87	128	124.0	35.17	28.4
15		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	293	138	508	313.0	185.81	59.4
20		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitocina C)	24497	34348	31388	30077.7	5054.53	16.8
25		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	601	643	a	622.0	29.70	4.8
	SI(donante)					243		
	SI (línea celular)					5		
30	IM03-7772	Proliferación de la línea base del receptor	56	98	51	68.3	25.81	37.8
35		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	133	120	213	155.3	50.36	32.4
40		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitocina C)	14222	20076	22168	18822.0	4118.75	21.9
45		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a
	SI(donante)					275		
	SI (línea celular)					a		
50	IM03-7768	Proliferación de la línea base del receptor	84	242	208	178.0	83.16	46.7
55	(Donante alogénico)	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	361	617	304	427.3	166.71	39.0
60	Línea celular tipo B	Proliferación de la línea base del receptor	126	124	143	131.0	10.44	8.0
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	822	1075	487	794.7	294.95	37.1

65

ES 2 568 463 T3

Identificación del Plato: Plato 2								
5	Número analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
			1	2	3			
10	IM03-7773	Proliferación de la línea base del receptor	908	181	330	473.0	384.02	81.2
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	269	405	572	415.3	151.76	36.5
		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitocina C)	29151	28691	28315	28719.0	418.70	1.5
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	567	732	905	734.7	169.02	23.0
20	SI (donante) SI (línea celular)					61 2		
25	IM03-7774	Proliferación de la línea base 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
		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitocina C)	53101	42839	48283	48074.3	5134.18	10.7
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	515	789	294	532.7	247.97	46.6
35	SI (donante) SI (línea celular)					59 1		
40	IM03-7775	Proliferación de la línea base 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
		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitocina C)	23554	10523	28965	21014.0	9479.74	45.1
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	768	924	563	751.7	181.05	24.1
50	SI (donante) SI (línea celular)					30 1		
55	IM03-7776	Proliferación de la línea base 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
		Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratado con mitocina C)	28893	32493	34746	32044.0	2952.22	9.2
		MLR con línea celular (celula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a
65	SI(donante)					35		

(Continuación)

Identificación del Plato: Plato 2							
Analítico	Número de sistema de cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
		1	2	3			
SI (línea celular)							
					a		

Tabla 11-3. Índice de estimulación promedio de las células de la placenta y de un donante alogénico en una reacción mezclada de linfocitos con seis receptores alogénicos

Índice promedio de estimulación		
	Receptor	Placenta
Plato 1 (Receptores 1-3)	279	3
Plato 2 (Receptores 4-6)	46.25	1.3

Reacción mixta de linfocitos - células derivadas umbilicales. Se examinaron a seis donantes de sangre humanos para identificar a un solo donante alogénico que exhibiese una respuesta robusta de proliferación en una reacción mixta de linfocitos en comparación de los otros cinco donadores de sangre. Este donador fue seleccionado como el donante alogénico positivo de control. Los otros cinco donantes de sangre fueron seleccionados como receptores. El donante alogénico positivo de control y las líneas celulares de placenta fueron tratadas con mitomicina C y cultivadas en una reacción mezclada de linfocitos con los cinco receptores alogénicos. Las reacciones fueron realizadas en triplicado usando dos platos de cultivos celulares con tres receptores por plato (Tabla 11-4). El índice de estimulación promedio varió entre 6.5 (plato 1) a 9 (plato 2) y los controles alogénicos del donante positivo variaron de 42.75 (plato 1) a 70 (plato 2) (Tabla 11-5).

Tabla 11-4. Datos de la Reacción Mixta de Linfocitos – Línea Celular A (Umbilical)

DPM para el Ensayo de Proliferación							
Identificación del Plato: Plato 1							
Analítico	Número Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
		1	2	3			
	Proliferación de la línea base 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
IM04-2478	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitocina C)	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7
	MLR con línea celular (celula tipo A tratada con mitomicina C)	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3
	SI (donante)				70		
	SI (línea celular)				8		

(continuación)

DPM para el Ensayo de Proliferación									
Identificación del Plato: Plato 1									
Número Analítico	Sistema de Cultivo	Réplicas			Media	SD	CV		
		1	2	3					
5 10 15 20	Proliferación de la línea base 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 MLR IM04-2477 (tratado con mitocina C)	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1		
	MLR con línea celular (celula tipo A tratada con mitomicina C)	5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3		
25	SI (donante)				47				
	SI (línea celular)				7				
30 35 40	Proliferación de la línea base 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 MLR IM04-2477 (tratado con mitocina C)	25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7		
	MLR con línea celular (celula tipo A tratada con mitomicina C)	2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1		
45	SI (donante)				23				
	SI (línea celular)				3				
50 55 60	Proliferación de la línea base 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 MLR IM04-2477 (tratado con mitocina C)	13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8		
	MLR con línea celular (celula tipo A tratada con mitomicina C)	4495	3671	4674	4280.0	534.95	12.5		
65	SI (donante)				31				
	SI (línea celular)				8				

(continuación)

Identificación del Plato: Plato 2									
Número Analítico	Sistema de cultivo	Réplicas			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM04-2482	Proliferación de la línea base 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 MLR IM04-2477 (tratado con mitocina C)	24286	30823	31346	28818.3	3933.82	13.7		
	MLR con línea celular (celula tipo A tratada con mitomicina C)	2762	1502	6723	3662.3	2724.46	74.4		
SI (donante)					70				
SI (línea celular)					9				
IM04-2477 (Donador alogénico)	Proliferación de la línea base del receptor	312	419	349	360.0	54.34	15.1		
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	567	604	374	515.0	123.50	24.0		
Línea celular tipo A	Proliferación de la línea base del receptor	5101	3735	2973	3936.3	1078.19	27.4		
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1924	4570	2153	2882.3	1466.04	50.9		

Tabla 11-5. Índice de estimulación promedio de las células derivadas umbilicales y un donante alogénico en una reacción mixta de linfocitos con cinco receptores individuales alogénicos

Índice Promedio de Estimulación		
	Receptor	Umbilical
Plato 1 (receptores 1-4)	42.75	6.5
Plato 2 (receptor 5)	70	9

Antígenos que presentan marcadores celulares - células derivadas de la placenta. Histogramas de las de células derivadas de la placenta analizados por citometría de flujo muestran una expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se nota por el valor de fluorescencia consistente con el IgG de control, indicando que las líneas celulares placentarias no tenían las moléculas de superficie celular requeridas para estimular directamente las células CD4+ T.

Marcadores inmunomoduladores - células derivadas de la placenta. Los histogramas de las células derivadas de la placenta analizados por citometría de flujo muestran una expresión positiva de PD-L2, como se nota lo por el

valor incrementado de fluorescencia relativo al IgG de control, y expresión negativa de CD 178 y HLA-G, como se nota con los valores de fluorescencia consistentes con el control IgG.

- 5 Antígenos que presentan marcadores celulares - células derivadas umbilicales. Los histogramas de células derivadas umbilicales que fueron analizados por citometría de flujo muestran expresiones negativas de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se nota lo por el valor de fluorescencia consistente con el del control IgG, indicando que las líneas celulares umbilicales no tienen las moléculas de superficie celular requeridas para estimular directamente las células CD4+ T.
- 10 **Marcadores celulares inmunomoduladores - células derivadas umbilicales.** Los histogramas de las células derivadas umbilicales analizados por citometría de flujo muestran una expresión positiva de PD-L2, tal como se nota por el valor incrementado de la fluorescencia relativa a la del control IgG, y una expresión negativa de CD 178 y HLA-G, como se nota por el valor de fluorescencia consistente con el control IgG.
- 15 **Resumen.** Para las reacciones mixtas de linfocitos conducidas con las líneas celulares derivadas de placentas, el índice promedio de estimulación varió desde 1.3 a 3, y aquel de los controles alogénico positivos variaron desde 46.5 hasta 279. En las reacciones mixtas de linfocitos conducidas con las líneas celulares derivadas umbilicales el índice promedio de estimulación varió desde 6.5 hasta 9, y aquel del control alogénico positivo varió desde 42.75 hasta 70. Las líneas derivadas de la placenta y umbilicales fueron negativas para la expresión de las proteínas estimuladoras HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se midió por la citometría de flujo. Las líneas celulares derivadas de la placenta y umbilicales fueron negativas para la expresión de proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD 178 y positivas para la expresión de PD-L2, como se midió por la citometría de flujo. PBMCs donantes alogénicas contienen células con antígenos que expresan HLA-DR, DQ, CD8, CD86, y B7-H2, permitiendo por lo tanto la estimulación de células naïve CD4+ T. Las líneas celulares derivadas de la placenta y umbilicales fueron negativas para la expresión de proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD 178 y positivas para la expresión de PD-L2, como se midió por la citometría de flujo. Las PBMCs del donante alogénico, contenían células antígenas que presentaban expresiones de HLA-DR, DQ, CD8, CD86, y B7-H2, por lo tanto permitiendo la estimulación de células CD4+ T. La ausencia de moléculas de superficie celular que tengan antígenos en las células derivadas de la placenta y umbilicales requeridas para una estimulación directa de las células naïve CD4+ T y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, podría explicar el bajo índice de estimulación exhibido por estas células en un MLR en comparación de los controles alogénicos.
- 20
- 25
- 30

EJEMPLO 12

35 **Secreción de factores tróficos por las células derivadas de post parto**

- Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de células derivadas de la placenta y umbilicales. Los factores seleccionados a detectarse incluyeron: (1) aquellos que se sabe que tienen actividad angiogénica, tal como el factor de crecimiento hepatocito (HGF) (Rosen et al. (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1 - monocyte chemotactic protein) (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 - keratinocyte growth factor), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF - basic fibroblast growth factor), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor) (Hughes et al. (2004) Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), metaloproteinasas matriciales 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB - platelet derived growth factor), trombo - poietin (TPO), el factor de crecimiento epidérmico de vinculación a heparina (HB-EGF - heparin-binding epidermal growth factor), factor derivado estromal-1 alfa (SDF-1 alfa - stromal-derived factor 1 alpha); (2) aquellos conocidos por tener actividad neurotrófica / neuroprotectora, tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF - brain-derived neurotrophic factor) (Cheng et al (2003) Dev Biol 258:... 319-33), la interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos -2 (GCP-2 - granulocyte chemotactic protein-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2 - transforming growth factor beta2); y (3) aquellos conocidos por tener actividad de quimioquinas, tales como la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a - macrophage inflammatory protein 1 alpha), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b - macrophage inflammatory protein 1beta), monocitos quimioatrayentes-1 (MCP-1 - monocyte chemoattractant-1), Rantes (reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas), 1309, el timo y la quimioquina regulada en su activación (TARC - thymus and activation-regulated chemokine), eotaxina, quimioquina derivada de macrófagos (MDC - macrophage-derived chemokine), IL-8).
- 40
- 45
- 50
- 55

Métodos y Materiales

- 60 **Cultivo celular.** Las PPDCs de la placenta y umbilicales así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano fueron cultivados en un medio de Crecimiento con penicilina / estreptomina en Matrazas T75 cubiertos de gelatina. Las células fueron crio - conservadas en el pase 11 y almacenadas en nitrógeno líquido. Después de descongelar las células, se agregó un medio de crecimiento a las células seguido de su transferencia a un tubo centrífugo de 15 ml donde se procesaron las células a 150 x g durante cinco minutos. Los elementos flotantes fueron descartados, el pellet de células fue re - suspendido en 4 ml de medio de crecimiento, y las células fueron contadas. Las células se sembraron a 375,000 células por cada Matraza de 75 cm² que contenían 15 ml de medio de crecimiento y fueron cultivados durante 24
- 65

horas. El medio fue cambiado a un medio libre de sueros (DMEM - bajo el glucocosa (Gibco), 0.1% (masa / volumen) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina / estreptomycin (Gibco)) durante ocho horas. El medio acondicionado sin sueros fue recolectado al final de la incubación por medio de centrifugación a 14.000 x g durante cinco minutos y almacenado a -20 grados centígrados para estimar el número de células en cada Matraza, las células fueron lavadas con PBS y separadas usando 2 ml de tripsina / EDTA. La actividad de la tripsina fue inhibida al aumentar 8 ml de medio de crecimiento. Las células fueron centrifugadas a 150 x g durante cinco minutos. El material flotante fue removido, y las células fueron re-suspendidas en 1 ml de medio de crecimiento. El número de células se estimó utilizando hemocitómetro.

Ensayo ELISA. Las células fueron producidas a 37° C en 5% de dióxido de carbono y oxígeno atmosférico. Las células derivadas de la placenta (lote 101503) también crecieron con 5% de oxígeno o beta-mercaptoetanol (BME). El monto de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, GCP-2, IL-8, y TGF-beta 2 producido por cada muestra de células fue medido por un ensayo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

Ensayo ELISA múltiple de SearchLight. Se midieron quimioquinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, 1309, TARC, Eotaxin, MDC, IL8), BDNF, y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF) fueron medidos utilizando los ensayos Proteomas de SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Los ensayos de Proteomas son emparejados múltiples de ELISA para la medida cuantitativa de dos a 16 proteínas por poro. Los ensayos se producen al colocar un patrón de 2 x 2, 3 x 3, o 4 x 4 de cuatro a 16 diferentes anticuerpos capturados en cada uno de los pozos de un plato de 96 poros. Después del procedimiento de emparejamiento de ELISA, se captura una imagen de todo el plato para captar una señal químico luminista ente generada en cada lugar dentro de cada poro del plato. El monto que se genera de señal en cada lugar es proporcional al monto de la proteína objetivo en el estándar o muestra original.

Resultados

Ensayos ELISA. Las células derivadas de la placenta y umbilicales y los fibroblastos dérmicos secretaron MCP-1 e IL-6 (Tabla 12-1). SDF-1alfa fue secretado por células derivadas de la placenta cultivadas en un 5 % de O₂ y fibroblastos. GCP-2 e IL- 8 fueron segregados por células derivadas umbilicales y por células derivadas de la placenta cultivadas en la presencia de BME o 5% O₂. También se secretó GCP-2 por fibroblastos humanos. TGF-beta2 no fue detectable por el ensayo de ELISA.

Tabla 12-1. Resultados del ensayo de ELISA

(valores presentados en picogramos / mililitros / millones de células (n=2, sem))							
	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1α	GCP-2	IL-8	TGF-β2
Fibroblastos	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) BME	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
Placenta (101503) 5% O ₂ , W/O BME	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND

Clave: ND: No Detectado.

Ensayo ELISA múltiple de SearchLight. TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC, e IL-8 fueron secretadas de células derivadas umbilicales (Tablas 12-2 y 12-3). TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC, Eotaxin, e IL-8 fueron secretados de las células derivadas de la placenta (Tablas 12-2 y 12-3). No se detectaron Ang2, VEGF, o PDGF-bb.

Tabla 12-2. Resultados del ensayo ELISA múltiple de SearchLight

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306.3	ND	ND	230.5	5.0	ND	ND	27.9	1.3	ND
P1	24299.5	ND	ND	546.6	8.8	16.4	ND	ND	3.81.3	ND
U1	57718.4	ND	ND	1240.0	5.8	559.3	148.7	ND	9.3	165.7
P3	14176.8	ND	ND	568.7	5.2	10.2	ND	ND	1.9	33.6
U3	21850.0	ND	ND	1134.5	9.0	195.6	30.8	ND	5.4	388.6

Clave: hFB (fibroblastos humanos), P1 (células derivadas de la placenta (042303)), U1 (células derivadas umbilicales (022803)), P3 (células derivadas de la placenta (071003)), U3 (células derivadas umbilicales (071003)). ND: No Detectado.

Tabla 12-3. Resultados del ensayo ELISA múltiple de SearchLight

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	1309	TARC	Eotaxin	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

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

Resumen. Las células derivadas umbilicales y de la placenta secretaron varios factores tróficos. Algunos de estos factores, tales como HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, juegan roles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen importantes roles en la regeneración neural.

EJEMPLO 13

Diferenciación neural a corto plazo de las Células Derivadas de Posparto

se examinó la habilidad de las células derivadas de la placenta y umbilicales (colectivamente de células derivadas de posparto o PPDCs - postpartum-derived cells) para diferenciarse en células de linaje neural.

Materiales y métodos

Aislamiento y expansión de las células de posparto. Las PPDCs de tejidos placentarios y umbilicales se aislaron y se expandieron de acuerdo a como se describió en el ejemplo uno.

Protocolo modificado de Woodbury-Black

(A) Este ensayo fue adaptado de otro que fue originalmente realizado para probar la sesión neural potencial de las células estromales de médula ósea (1). Las células derivadas umbilicales (022803) P4 y las células derivadas de la placenta (042203) P3 fueron descongeladas y expandidas en cultivos en medios de crecimiento a 5000 células por centímetro cuadrado hasta alcanzar su sub-confluencia (75%). Después las células fueron triplicadas y sembradas a 6000 células por pozo en un porta objetos de vidrio Tissue Culture (TC) (VWR International, Bristol, CT). Como controles, se sembraron bajo las mismas condiciones células madres mesénquimas (P3; 1F2155; Cambrex, Walkersville, MD), osteoblastos (P5; CC2538; Cambrex), células derivadas de adiposas (Artecel, US6555374 B1) (P6; donador 2) y fibroblastos dérmicos humanos neonatales (P6; CC2509; Cambrex).

Todas las células fueron expandidas inicialmente durante cuatro días en un medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 15% (volumen / volumen) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan, UT), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF; 20 nanogramos / mililitros; Pepro-tech, Rocky Hill, NJ), factor de crecimiento epidérmico (EGF; 20 nanogramos / mililitros; Peprotech) y penicilina / estreptomycin (Invitrogen). Después de cuatro días, las células fueron enjuagadas en tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen) y fueron

5 cultivadas subsiguientemente en un medio DMEM/F12 + 20% (volumen / volumen) FBS + penicilina / estreptomycin durante 24 horas. Después de 24 horas, las células fueron enjuagadas con PBS. Las células fueron cultivadas entonces durante una a seis horas en un medio de inducción que contenía DMEM/F12 (sin suero) con 200 mM de hidroxianisol butilado, 10 µM de cloruro de potasio, 5 miligramos / mililitro de insulina, 10 µM de forskolina, 4 µM de ácido valproico, y 2 µM hidrocortisona (todos los productos químicos de Sigma, St. Louis, MO). Las células fueron fijadas en 100% de metanol enfriado con hielo y se realizó inmunocitoquímica (referirse a los métodos a continuación) para evaluar la expresión de la proteína nestina humana.

10 (B) las PPDCs (umbilicales (022803) P11; placentarias (042203) P11) y fibroblastos dérmicos humanos adultos (1F1853, P11) fueron descongelados y los cultivos fueron expandidos en medios de crecimiento a 5000 células por centímetro cuadrado hasta que se alcanzó la sub-confluencia (75%). Las células fueron entonces tripnizadas y sembradas a una densidad similar como en (a), pero en (1) en platos de 24 posos de tejido de cultivo tratado (TCP, Falcon brand, VWR International), (2) posos TCP + 2% (masa / volumen) de gelatina absorbida durante de una hora a la temperatura del cuarto, o (3) posos TCP + 20 µg / mililitro absorbidos de laminina de ratón (absorbidos durante un mínimo de dos horas a 37 °C; Invitrogen).

15 Exactly como en (A), las células se expandieron inicialmente y se cambió el medio de acuerdo a los tiempos antes mencionados. Un conjunto de cultivos se mantuvo fijo, como antes, durante cinco días y seis horas, este tiempo con 4% (masa / volumen) de paraformaldehído helado (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. En el segundo conjunto de cultivos, el medio se removió y se cambió un medio de Expansión Progenitor Neural (NPE - Neural Progenitor Expansion) que consistió de un medio neurobasal-A (Invitrogen) que contenía B27 (suplemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 mM), y penicilina / estreptomycin (Invitrogen). El medio NPE fue suplementado adicionalmente con ácido retinoico (RA; 1 µM; Sigma). Este medio fue removido cuatro días después y se fijaron los cultivos con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído helado (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto, y se coloreó para detectar la expresión de las proteínas de nestina, GFAP, y TuJ1 (ver la Tabla N1-1).

Tabla 13-1. Resumen de los anticuerpos primarios usados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Rata 401 (destina)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
Destina humana	1:100	Chemicon
TuJ1 (BIII Tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Tirosina hidroxilasa (TH - Tyrosine hydroxylase)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
Desmina (ratón)	1:300	Chemicon
Actina de músculo esquelético-alfa-alfa	1:400	Sigma
Proteína nuclear humana (hNuc)	1:150	Chemicon

30 **Protocolo de diferenciación de dos etapas.** Las PPDCs (umbilicales (042203) P11, placentarias (022803) P11), fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11; 1F1853; Cambrex) fueron descongelados y los cultivos fueron expandidos en un medio de crecimiento a 5000 células por centímetro cuadrado hasta alcanzar su sub-confluencia (75%). Las células fueron tripnizadas y sembradas a 2000 células por centímetro cuadrado, pero en platos de 24 posos cubiertos con laminina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en la presencia de un medio NPE suplementado con bFGF (20 nanogramos /mililitros; Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos /mililitro; Peprotech) [toda la composición del medio referida a continuación como NPE + F + E]. Al mismo tiempo, se aislaron del hipocampo progenitores neurales de rata adulta también se pusieron en platos de 24 posos cubiertos con laminina en un medio NPE + F + E. Todos los cultivos se mantuvieron en esas condiciones por un período de seis días (las células fueron alimentadas una vez durante ese tiempo) en donde se cambió el medio a las condiciones de diferenciación listadas en la Tabla N1-2 por un período adicional de siete días. Los cultivos se fijaron con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído helado (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto, y se coloreó para detectar expresiones proteínicas de destina de rata, GFAP, y TuJ1.

Tabla 13-2. Resumen de las condiciones para el protocolo de diferenciación de dos etapas

	A		B
# DE COND.	PRE-DIFERENCIACIÓN		DIFERENCIA DE LA 2nd ETAPA
1	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		NPE + SHH (200 ng/ml) + F8 (100 ng/ml)
2	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		NPE + SHH (200 ng/ml) + F8 (100 ng/ml) + RA (1 microM)
3	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		NPE + RA (1 microM)
4	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)
5	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Medio de Crecimiento
6	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 1B + MP52 (20 ng/ml)
7	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 1B + BMP7 (20 ng/ml)
8	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 1B + GDNF (20 ng/ml)
9	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 2B + MP52 (20 ng/ml)
10	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 2B + BMP7 (20 ng/ml)
11	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 2B + GDNF (20 ng/ml)
12	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 3B + MP52 (20 ng/ml)
13	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 3B + BMP7 (20 ng/ml)
14	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		Condición 3B + GDNF (20 ng/ml)
15	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		NPE + MP52 (20 ng/ml)
16	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		NPE + BMP7 (20 ng/ml)
17	NPE + F (20 ng / ml) + E (20 ng / ml)		NPE + GDNF (20 ng/ml)

Protocolo de múltiples factores de crecimiento. Las células derivadas umbilicales (P11; (042203)) fueron descongeladas y expandidas en cultivos en un medio de crecimiento a 5000 células por centímetro cuadrado hasta alcanzar la sub-confluencia (75%). Las células fueron entonces tripnizadas y sembradas a 2000 células por centímetro cuadrado en platos cubiertos con laminina de 24 posos (BD Biosciences) en la presencia de NPE + F (20 nanogramos / mililitro) + E (20 nanogramos / mililitro). Adicionalmente, algunos pozos tuvieron NPE + F + E + 2% FBS o 10% FBS. Después de cuatro días de condiciones de "pre-diferenciación", se removió todo el medio y las muestras fueron colocadas en un medio NPE suplementado con Sonic hedgehog (SHH; 200 nanogramos / mililitro; Sigma, St. Louis, MO), FGF8 (100 nanogramos / mililitro; Peprotech), BDNF (40 nanogramos / mililitro; Sigma), GDNF (20 nanogramos / mililitro; Sigma), y ácido retinoico (1µM; Sigma). Siete días después del cambio del medio, se fijaron los cultivos con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto, y se coloreó para detectar expresiones de nestina humana, GFAP, TuJ1, desmina y actina de músculo esquelético alfa.

Protocolo de co-cultivo progenitor neural. Se plantaron como neuroesferas o como células individuales (10,000 células por pozo) a progenitores de hipocampo de rata adulta (062603) a discos de 24 posos cubiertos con laminina (BD Biosciences) en NPE + F (20 nanogramos / mililitro) + E (20 nanogramos / mililitro).

Se descongelaron por separado células derivadas umbilicales (042203) P11 y células derivadas de la placenta (022803) P11 y se expandieron en cultivos NPE + F (20 nanogramos / mililitro) + E (20 nanogramos / mililitro) a 5000 células por centímetro cuadrado durante un período de 48 horas. Las células fueron entonces tripnizadas y sembradas a 2500 células por pozo en cultivos existentes de progenitores neurales. En ese momento, el medio existente fue cambiado por un medio fresco. Después de cuatro días, los cultivos se fijaron con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído helado (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto, y se coloreó para detectar proteínas nucleares humanas (hNuc; Chemicon) (Tabla NU1-1 mostrada anteriormente) para identificar a las PPDCs.

Inmunocitoquímica. Se realizó inmunohistoquímica usando los anticuerpos listados en la Tabla NU1-1. Los cultivos fueron lavados con tan un fosfato salino (PBS) y expuestos a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4% (volumen / volumen) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 por ciento (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para ganar acceso a antígenos intracelulares. Anticuerpos binarios, que fueron diluidos en la solución de bloqueo, se aplicaron entonces a los cultivos durante un período de una hora a la temperatura del cuarto. Después, las soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas y los cultivos fueron lavados con PBS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpos secundarios (una hora a la temperatura del cuarto) que contenían soluciones de bloqueo junto con IgG de cabra anti ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares), Eugene, O) e IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes (Sondas

Moleculares)). Los cultivos se lavaron entonces y se aplicaron 10 μ mol DAPI (Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo de la célula.

5 Después de inmunotinturar, se visualizó la fosforescencia usando el filtro de fosforescencia apropiado en un microscopio fosforescente - epi invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, una mancha positiva represento una señal de fosforescencia superior a la mancha de control donde todo el procedimiento señalado anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpos primarios. Imágenes representativas fueron capturadas usando una vídeo cámara digital a color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras que fueron tinturadas en forma triple, cada imagen fue tomada usando sólo un filtro de emisión a la vez. Los montajes en capas fueron preparados utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Resultados

15 **Protocolo Woodbury-Black** (A) En el momento de la incubación en esta composición de inducción neural, todos los tipos de células se transformaron en células con morfologías bipolares y procesos extendidos. También se observaron otras morfologías importantes no bipolares. Es más, las poblaciones celulares lucidas tuvieron coloración positiva en lo que se refiere a nestina, un marcador de células madre neurales multipotentes y de células progenitoras.

20 (B) Cuando esto se repitió en platos plásticos de cultivos de tejido (TCP), la expresión de nestina no se observó a menos que laminina haya sido pre - absorbida en la superficie del cultivo. Para evaluar en una mayor forma si las células que expresan nestina podrían ir entonces a generar neuronas maduras, las PPDCs y fibroblastos fueron expuestos a NPE + RA (1 μ M), una composición de medio conocido por inducir la diferenciación de células madre neurales y células progenitoras en aquellas células (2, 3, 4). Las células fueron tinturadas para detectar TuJ1, un marcador de neuronas inmaduras y maduras, GFAP, un marcador de astrocitos, y nestina. Bajo ninguna condición se detectó a TuJ1 ni se observaron células con morfología neural, sugiriendo que ninguna neurona fue generada en el corto plazo. Más aún, la nestina y GFAP ya estaban expresadas en las PPDCs tal como se determinó por la inmunocitoquímica.

30 **Diferenciación de dos etapas.** Los aislamientos PPDC umbilicales y placentarios (así como fibroblastos humanos y progenitores neurales de roedores como tipos de célula de control negativo y positivo, respectivamente) fueron colocados en platos con laminina (promoción neural) y expuestos a 13 condiciones de crecimiento diferentes (y dos condiciones de control) conocidas por promover la diferenciación de progenitores neurales a neuronas y astrocitos. Adicionalmente, dos condiciones fueron añadidas para examinar la influencia de GDF5, y BMP7 en la diferenciación PPDC. Generalmente, se tomó un método de diferenciación de dos pasos, en el cual las células primero se colocaban en condiciones de expansión progenitora neural durante un período de seis días, seguido por condiciones completas de diferenciación durante siete días. Desde el punto de vista morfológico, ambas células derivadas umbilicales y de la placenta exhibieron cambios fundamentales en su morfología celular al pasar del tiempo de este procedimiento. Sin embargo, no se observaron células con forma neural o de astrocitos a excepción de las que estaban en el grupo de control, bajo condiciones en platos para progenitores neurales. Una inmunocitoquímica negativa de nestina humana, TuJ1, y GFAP confirmó las observaciones morfológicas.

45 **Factores de crecimiento múltiple.** Después de una semana de la exposición a varios agentes de diferenciación neural, las células fueron tinturadas para identificar marcadores indicativos de progenitores neurales (nestina humana), neuronas (TuJ1), y astrocitos (GFAP). Las células que crecieron en la primera etapa en un medio que no contenía ningún suero tenían morfología es diferente es que aquí ellas células en un medio que contenía suero (2% o 10%), indicando una diferenciación neural potencial. Específicamente, siguiendo un procedimiento de dos pasos para exponer las células derivadas umbilicales a EGF y bFGF seguido de SHH, FGF8, GDNF, BDNF, y ácido retinoico, las células mostraron procesos largos similares a la morfología de astrocitos cultivados. Cuando se incluyó FBS del 2% del 10% en la primera etapa de diferenciación, el número de células se incrementó y la morfología celular no cambio en comparación con los cultivos de control a alta densidad. No se evidenció ninguna diferenciación neural esencial con el análisis inmuno citoquímico para nestina humana, TuJ1, o GFAP.

55 **Progenitor neural y co – cultivos PPDC.** Las PPDCs fueron chapadas en otros cultivos de progenitores neurales de rata sembrados dos días antes en condiciones de expansión neural (NPE + F + E). Mientras una confirmación visual de las PPDCs chapadas probaron que estas células fueron chapadas como células individuales, una tinción nuclear específica humana (hNuc) cuatro días después del chapeo (seis días entro al) mostró que estas tendían a acumularse y evitar contacto con los progenitores neurales. Es más, en los lugares en los que las PPDCs se adherían, estas células se dispersaban y parecían inervadas por las neuronas diferenciadas de origen de rata, sugiriendo que las PPDCs pueden haberse diferenciado en células de músculo. Esta observación se basó en la morfología bajo la fase de contraste con un microscopio. Otra observación fue que cuerpos celulares típicamente grandes (más grandes que los editores neurales) tenían morfologías similares a progenitores neurales, con procesos delgados que se extendían en múltiples direcciones. Tinturación hNuc (encontrada en la mitad de los núcleos de las células) sugirió que en algunos casos estas células humanas pueden haberse fusionado con las progenitoras de rata y pueden haber asumido su fenotipo. Pozos de control que contenían solamente progenitores neurales tenían menos progenitores en total y menos células diferenciadas que las que tenían los pozos co -cultivados correspondientes a las PPDCs umbilicales o de placenta, indicando que ambas células derivadas umbilicales y de la placenta influenciaron la diferenciación y el

comportamiento de los progenitores neurales, ya sea por la liberación de quimioquinas y citoquinas, o por efectos del contacto mantenido.

5 **Resumen.** Se realizaron varios protocolos para determinar el potencial a corto plazo de las PPDCs para diferenciarse en células de linaje neural. Estos incluyeron contraste de imágenes por fases de la morfología en combinación con inmunocitoquímica para nestina, TuJ1, y GFAP, proteínas asociadas con células madre neurales multipotentes y progenitoras, neuronas inmaduras y maduras, y astrocitos, respectivamente. Se observó evidencia que sugiere que la diferenciación neural ocurrió en ciertas instancias en estos protocolos a corto plazo.

10 Algunas observaciones notables se hicieron en co – cultivos de PPDCs. Este método, usando PPDCs humanas con tipos de célula xenogéneas permitieron una determinación absoluta del origen de cada célula en estos cultivos. Primero, algunas de las células en estos cultivos mostraron un citoplasma celular agrandado, con procesos similares a neuritas alejándose del cuerpo celular, sin embargo sólo la mitad del cuerpo estaba marcado con proteína hNuc. Aquellas células pudieron haber sido PPDCs humanas que se diferenciaron en células de linaje neural o pueden haber sido PPDCs que se fusionaron con progenitores neurales. Segundo, aparentemente los progenitores neurales extendieron neuritas a las PPDCs en una forma que indica que los progenitores se diferenciaron en neuronas e inervaron las PPDCs. Tercero, cultivos de progenitores neurales y PPDCs tenían más células de origen de rata y montos más grandes de diferenciación que los cultivos de control que contenían sólo progenitoras neurales, indicando en mayor forma que las PPDCs chapeadas suministraron factores solubles y/o mecanismos que dependen del contacto que estimularon la supervivencia, proliferación, y/o diferenciación de los progenitores neurales.

Referencias para el Ejemplo 13

- 25 (1) Woodbury, D. et al. (2000). J Neurosci. Research. (Investigación) 61(4): 364-70.
 (2) Jang, Y.K. et al. (2004). J. Neurosci. Research. (Investigación) 75(4): 573-84.
 (3) Jones-Villeneuve, E.M. et al. (1983). Mol Cel Biol. 3(12): 2271-9.
 (4) Mayer-Proschel, M. et al. (1997). Neuron (Neurona). 19(4): 773-85.

EJEMPLO 14

30

Diferenciación neural a largo plazo de células derivadas del posparto

La habilidad de las células derivadas umbilicales y de la placenta (colectivamente células derivadas de post parto o PPDCs) para experimentar diferenciación a largo plazo a células de linaje neural fue evaluada.

35

Materiales y Métodos

Aislamiento y expansión de las PPDCs. Las PPDCs fueron aisladas y expandidas tal como se describió en los previos ejemplos.

40

Descongelamiento y chapado de las células PPDC. Porciones congeladas de las PPDCs (umbilical (022803) P11; (042203) P11; (071003) P12; placentario (101503) P7) que habían crecido previamente en medios de crecimiento fueron descongeladas y chapadas a 5000 células por centímetro cuadrado en Matracas T-75 cubiertos con laminina (BD, Franklin Lakes, NJ) en un medio neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27 (suplemento B27, Invitrogen), L-glutamina (4 mM), y penicilina / estreptomycin (10 mililitros), la combinación a la cual se denomina aquí como medio de expansión de progenitores neurales (NPE - Neural Progenitor Expansion). El medio NPE fue suplementado adicionalmente con bFGF (20 nanogramos / mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos / mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ), aquí referido como NPE + bFGF + EGF.

45

50 **Chapeo de las células de control.** Adicionalmente, los fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11, Cambrex, Walkersville, MD) y las células madres mesénquimas (P5, Cambrex) fueron descongeladas y chapadas a la misma densidad de siembra celular en Matracas T-75 cubiertos con laminina en NPE + bFGF + EGF. Para incrementar el control, las PPDCs fibroblastos, umbilicales y de placenta fueron cultivados en un medio de crecimiento durante el período especificado para todos los cultivos.

55

Expansión de células. Los medios de todos los cultivos se reemplazaron con medios frescos una vez a la semana y se observaba a las células para ver si presentaban expansión. En general, cada cultivo se pasaba una vez durante un período de un mes por el crecimiento limitado en NPE + bFGF + EGF.

60

Inmunocitoquímica. Después de un periodo de un mes, todos los Matracas se fijaban con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído frío (Sigma) durante 10 minutos a la temperatura del cuarto. La inmunocitoquímica se realizaba usando anticuerpos dirigidos en contra de TuJ1 (BIII Tubulina; 1:500; Sigma, St. Louis, MO) y GFAP (proteína ácida glial fibrilar; 1:2000; DakoCytomation, Carpinteria, CA). Brevemente, los cultivos se lavaban con tampón fosfato salino (PBS) y se exponían a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4% (volumen / volumen) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 por ciento (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para ganar acceso a antígenos intracelulares. Anticuerpos primarios, diluidos en la solución de bloqueo, fueron aplicados

65

entonces a los cultivos durante un período de una hora a la temperatura del cuarto. Después, las soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpos secundarios (una hora a la temperatura del cuarto) que contenían bloqueos junto con el IgG de cabra anti ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes (Sondas Moleculares), Eugene, O) e IgG cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes - sondas moleculares). Los cultivos fueron lavados entonces y se aplicaron 10 µmol DAPI (Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo de la célula.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fosforescencia utilizando el filtro de fosforescencia apropiado en un microscopio fosforescente - epi invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, una tinturación positiva representaba una señal de fosforescencia por sobre la tinturación del control donde todo el procedimiento que se señaló anteriormente fue seguido a excepción de la aplicación de la solución de anticuerpos primarios. Curadas utilizando una videocámara digital a color y el software ImagePro software (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras que tenían tres coloraciones, cada imagen fue tomada usando sólo filtro de emisión a la vez. Montajes de capas se prepararon entonces usando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Tabla 14-1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
TuJ1 (BIII Tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA

Resultados

El medio NPE + bFGF + EGF retarda la proliferación de las PPDCs y altera su morfología. Inmediatamente después del chapado, un subconjunto de PPDCs se adjuntó a los Matraces de cultivos cubiertos con laminina. Esto pudo deberse a la muerte celular como una función del proceso de congelamiento / descongelamiento o por las nuevas condiciones de crecimiento. Las células que se adhirieron adquirieron morfologías diferentes a aquellas observadas en el medio de crecimiento.

En el momento de confluencia, los cultivos fueron pasados y observados para determinar su crecimiento. Muy poca expansión ocurrió de aquellas células que sobrevivieron el pase. En este punto, células muy pequeñas sin ninguna propagación morfológica y con características de fase brillante empezaron a aparecer en los cultivos de las células derivadas umbilicales. Estas áreas de los Matraces fueron observadas durante algún tiempo. De estas células pequeñas, procesos bifurcantes emergieron con varicosidades en todo su largo, características muy similares a lo descrito previamente de los progenitores neurales PSA-NCAM+ y neuronas inmaduras TuJ1+ derivadas del cerebro y de la médula espinal (1, 2). Con el tiempo, estas células se volvieron más numerosas, pero sólo se encontraron en clones.

Clones de células derivadas umbilicales expresan proteínas neurales. Los cultivos se fijaron un mes después de su descongelamiento / chapado y tinturado para detectar la proteína neural TuJ1 y GFAP, filamento intermedio encontrado en astrocitos. Mientras todos los cultivos de control cultivados en medios de crecimiento y fibroblastos humanos y MSCs cultivados en medios NPE + bFGF + EGF, TuJ1-/GFAP-, se detectó TuJ1 en las PPDCs umbilicales y de la placenta. Se observó esa expresión en células con y sin morfologías tipo neural. No se observó ninguna expresión GFAP en ningún cultivo. El porcentaje de células que expresaron TuJ1, morfologías similares a las neurales fue menos o igual al 1% to de la población total (n = 3 aislamientos de células derivadas umbilicales probadas) aunque no fue cuantificado, el porcentaje de células TuJ1+ sin morfologías neurales fue más alto en los cultivos celulares derivados umbilicales que en los cultivos celulares derivados de la placenta. Estos resultados parecían específicos en relación a los controles que emparejan la edad en medios de crecimiento que no expresaban TuJ1.

Resumen. Se desarrollaron métodos para generar neuronas diferenciadas (basándose en la expresión TuJ1 y la morfología neuronal) de células derivadas umbilicales. Aunque las expresiones de TuJ1 no fueron examinadas antes de un mes in vitro, es claro que por lo menos una población pequeña de las células derivadas umbilicales pueden dar paso a neuronas ya sea por medio de una diferenciación estándar o por medio de una inducción a largo plazo después de un mes de exposición a medios mínimos suplementados con L- glutamina, FGF básica, y EGF.

Referencias para el Ejemplo 14

(1) Mayer-Proschel, M. et al. (1997). Neuron (Neurona). 19(4): 773-85.
 (2) Yang, H. et al. (2000). PNAS. 97(24): 13366-71.

EJEMPLO 15

Factores tróficos PPDC para el soporte de progenitores neurales

Se examinó la influencia de células derivadas umbilicales y de la placenta (en conjunto células derivadas de posparto o PPDCs) en la supervivencia y diferenciación de células madres y progenitoras neurales adultas por medio de mecanismos dependientes (tróficos) sin contacto.

5 **Materiales y Métodos**

10 **Aislamiento de células madre y progenitoras neurales adultas.** Ratas adultas Fisher 344 fueron sacrificadas mediante asfixia usando CO₂ seguido por una dislocación cervical todo el cerebro fue removido intacto usando pinzas óseas y tejido hipocampo diseccionado basándose en incisiones coronales posteriores a las regiones motrices y somatosensoriales del cerebro (Paxinos, G. & Watson, C. 1997. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - El Cerebro de la Rata en Coordenadas Estereotáxicas). El tejido se lavó en un medio Neurobasal – A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía B27 (suplemento B27; Invitrogen), L- glutamina (4mM; Invitrogen), y penicilina / estreptomycin (Invitrogen), la combinación a la cual se denomina aquí como medio de expansión progenitor a neural (NPE). El medio NPE fue suplemento dado adicionalmente con bFGF (20 nanogramos / mililitros, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos / mililitros, Pepro-tech, Rocky Hill, NJ), denominados aquí como NPE + bFGF + EGF.

20 Después de lavado, se retiraron las meninges superpuestas, y se desmenuzó el tejido con un bisturí. El tejido desmenuzado fue recolectado y se agregó tripsina / EDTA (Invitrogen) como el 75% del volumen total. También se agregó seADN (100 µl por 8 ml del volumen total, Sigma, St. Louis, MO). Después, el tejido / medio fue pasado secuencialmente de a través de una aguja de medición 18, una aguja de medición 20 y finalmente de una aguja de medición 25 una vez por cada una (todas las agujas de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La mezcla fue centrifugada durante tres minutos a 250 g. El material flotante fue removido, se agregó NPE + bFGF + EGF fresco y el pellet fue re-suspendido. La suspensión celular resultante fue pasada a través de un filtro celular de 40 µm (Becton Dickinson), chapados en Matraces T-75 cubiertos con laminina (Becton Dickinson) o platos de 24 pozos de bajas agrupaciones (Becton Dickinson), y cultivados en medios NPE + bFGF + EGF hasta obtenerse suficientes números celulares para los estudios señalados.

30 **Chapado de PPDCs.** Las células derivadas de posparto (umbilicales (022803) P12, (042103) P12, (071003) P12; placenta (042203) P12) previamente cultivadas en medios de crecimiento fueron chapadas a 5000 células por inserción Transwell (tamaño diseñado para un plato de 20:04 pozos) y cultivado durante un período de una semana en medios de crecimiento en inserciones para lograr su confluencia.

35 **Chapado de progenitores neurales adultos.** Los progenitores neurales cultivados como neuroesferas o como células individuales, se sembraron en platos de 24 pozos cubiertos con laminina a una densidad aproximada de 2000 células por pozo en NPE + bFGF + EGF durante un período de un día para promover su adherencia celular. Un día después, inserciones transwell que contenían células posparto fueron añadidas de acuerdo al siguiente esquema:

- 40 (1) Transwell (células derivadas umbilicales en medio de crecimiento, 200 µl) + progenitores neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
 (2) Transwell (células derivadas de la placenta la en medio de crecimiento, 200 µl) + progenitores neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
 (3) Transwell (fibroblastos dérmicos humanos adultos [1F1853; Cambrex, Walkersville, MD] P12 en medio de crecimiento, 200 µl) + progenitores neurales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
 45 (4) Control: progenitores neurales individuales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)
 (5) control: progenitores neurales individuales (solamente NPE, 1 ml)

50 **Inmunocitoquímica.** Después de siete días en co - cultivo, todas las condiciones se fijaron con un 4% (masa / volumen) de paraformaldehído (Sigma) durante un período de 10 minutos en temperatura del cuarto. Se realizó la inmunocitoquímica usando anticuerpos dirigidos en contra de los epitopes listados en la Tabla 15-1. Brevemente, se lavaron los cultivos con tampón fosfato salino (PBS) y se los expuso a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, 4% (volumen / volumen) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0.3 por ciento (volumen / volumen) de Tritón (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para ganar acceso a antígenos intracelulares. Entonces se aplicaron anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, a los cultivos durante un periodo de una hora a la temperatura del cuarto. Después, se removieron los anticuerpos primarios y se lavaron los cultivos con PBS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpos secundarios (una hora a la temperatura del cuarto) que contenían una solución de bloqueo junto con IgG de cabra anti ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, (Sondas Moleculares) Eugene, O) e IgG de cabra anti conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes - Sondas Moleculares). Los cultivos fueron lavados entonces y se aplicaron 10 µmol de DAPI (Sondas Moleculares) durante 10 minutos para visualizar el núcleo celular.

60 Después de la inmunotinción, se visualizó fosforescencia utilizando el filtro de fosforescencia apropiado en un microscopio fosforescente - epi invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, una tinción positiva representaba una señal de fosforescencia por sobre la tinción de control donde todo el procedimiento señalado anteriormente fue seguido con la excepción de la canción de una solución de anticuerpos primaria. Las imágenes representativas fueron capturadas utilizando una videocámara a color digital y software ImagePro (Media Cybernetics,

65

Carlsbad, CA). Para muestras con tres tinciones, cada imagen era tomada usando solamente de filtro de emisión a la vez. Montajes en capas fueron preparados entonces utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Tabla 15-1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

5

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Rata 401 (nestina)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
TuJ1 (BIII Tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Tirosina hidroxilas (TH)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Proteína básica mielina (MBP)	1:400	Chemicon

10

15

Análisis cuantitativo de diferenciación progenitor neural. Se examinó la cuantificación de la diferenciación progenitora neural de hipocampos. Se contaron un mínimo de 1000 células por condición o menos, el número total de células en esa condición. Se evaluó el porcentaje de células positivas de una tinción específica al dividir el número de células positivas para el número total de células como se determinó por la tinción DAPI (nuclear).

20

Análisis de espectrometría de masa y electroforesis con gel 2D. Para identificar factores únicos secretados como resultado de co - cultivo, se tomaron muestras de medios acondicionados antes de que la fijación de los cultivos fuese congelada a -80 °C durante la noche. Las muestras fueron aplicadas entonces a dispositivos de ultrafiltración por medio de centrifugación (MW cutoff 30 kD). Se aplicó lo retenido a cromatografía de inmunoafinidad (albúmina – anti - Hu: IgY) (la inmunoafinidad no removió la albúmina de las muestras). El filtrado fue analizado por MALDI. Lo que pasó fue aplicado a la cromatografía de inmunoafinidad Cibachron Blue. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y electroforesis con gel 2D.

25

Resultados

30

El co – cultivo PPDC estimula la diferenciación progenitora neural. Después del cultivo con células derivadas umbilicales o de la placenta, las células progenitoras neurales co - cultivadas de hipocampo de rata adulta exhibieron una diferenciación significativa en los tres linajes importantes en el sistema nervioso central. Éste efecto fue observado claramente después de cinco días en co - cultivo, con numerosas células que elaboraban procesos, complejos y perdían sus propiedades características brillantes de la fase de dividirse en células progenitoras. Por otro lado, las progenitoras neurales que se cultivaron solas en la ausencia de bFGF y EGF no parecían saludables y su supervivencia fue limitada.

35

40

Después de completar el procedimiento, los cultivos fueron tintados para detectar marcadores indicativos de células madres y progenitoras no diferenciadas (nestina), neuronas inmaduras y maduras (TuJ1), astrocitos (GFAP), y oligodendrocitos maduros (MBP). Se confirmó la diferenciación en los tres linajes mientras que las condiciones de control no mostraron una diferenciación significativa tal como se evidenció por la retención de la tinción positiva de nestina en la mayoría de células. Aunque las células derivadas umbilicales y de la placenta impusieron diferenciación de células, el grado de diferenciación para los tres linajes fue menos en co -cultivos con células derivadas de la placenta que en los co -cultivos de células derivadas umbilicales.

45

El porcentaje de progenitores neurales diferenciados después de un co -cultivo con células derivadas umbilicales se cuantificó (Tabla 15-2). Las células derivadas umbilicales impulsaron significativamente el número de oligodendrocitos maduros (MBP) (24.0% vs 0% en ambas condiciones). Adicionalmente, el co – cultivo incremento to el número de astrocitos GFAP+ y neuronas TuJ1+ en el cultivo (47.2% y 8.7% respectivamente). Estos resultados fueron confirmados por la tinción de nestina indicando que el estado progenitor fue perdido después del co – cultivo (13.4% vs 71.4% bajo la condición de control 4).

50

55

Aunque la diferenciación también pareció ser influenciada por fibroblastos humanos adultos, aquellas células no pudieron promover la diferenciación de oligodendrocitos maduros ni pudieron generar una cantidad apreciable de neuronas. Aunque no fue cuantificado, los fibroblastos, sin embargo, parecieron mejorar la supervivencia de los editores neurales.

Tabla 15-2. Cuantificación de la diferenciación progenitora en co - cultivos de control vs. transwell con células derivadas umbilicales.
(E=EGF, F=bFGF)

60

Anticuerpo	F+E / Umb [Cond.1]	F+E/F+E [Cond. 4]	F+E/removido [Cond. 5]
TuJ	18.7 %	2.3 %	3.6 %
GFAP	47.2 %	30.2 %	10.9 %
MBP	23.0 %	0 %	0 %
Nestina	13.4 %	71.4 %	39.4 %

Identificación de compuestos únicos. Medios acondicionados de co – cultivos derivados umbilicales y de la placenta, junto con los controles apropiados (medio NPE \pm 1.7 % de suero, medio de co – cultivos con fibroblastos), fueron examinados para detectar diferencias. Componentes potencialmente únicos fueron identificados y extirpados de sus geles 2D respectivos.

5 **Resumen.** Co - cultivos de células progenitoras neurales adultas con PPDCs umbilicales o de placenta resultaron en la diferenciación de aquellas células. Los resultados presentados en este ejemplo indican que la diferenciación de células progenitoras neurales adultas después de su co- cultivo con células derivadas umbilicales es particularmente efectivo. Específicamente, un porcentaje significativo de oligodendrocito es maduros fue generado en co - cultivos de células derivadas umbilicales. En vista de la falta de contacto entre las células derivadas umbilicales y los progenitores neurales, este resultado parece estar en función de factores solubles liberados de las células derivadas umbilicales (efecto trófico).

10 También se realizaron otras observaciones. Primero, hubieron muy pocas células en la condición de control donde EGF y bFGF fueron removidos. La mayoría de células murieron y en promedio, hubieron alrededor de 100 células o menos por pozo. Segundo, se espera que exista muy poca diferenciación en la condición de control donde se retenga a EGF y bFGF en el medio, puesto que normalmente es un medio de expansión. Aunque aproximadamente el 70% de las células re tuvo su estado progenitor (nestina+), alrededor del 30% fueron GFAP+ (indicativo de astrocitos). Esto puede deberse al hecho de que aquella expansión significativa ocurrió durante el procedimiento en el cual el contacto entre progenitores indujo esta diferenciación (Song, H. et al. 2002. Nature (Naturaleza) 417: 29-32).

20 **EJEMPLO 16**

Transplante de células derivadas de posparto

25 Las células derivadas umbilicales y de placenta de posparto son útiles para terapias regenerativas. Se evaluó el tejido producido por las células derivadas de posparto (PPDCs) trasplantadas en ratones SCID con un material biodegradable. Los materiales evaluados fueron poliglactina no tejida, espuma 35/65 PCL/PGA hidrogel péptido auto ensamblable RAD16.

30 **Métodos y Materiales**

Cultivo celular. Las células derivadas de la placenta y umbilicales fueron cultivadas en un medio de crecimiento (DMEM - de baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15% (volumen / volumen) de suero bovino fetal (Cat. #SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0.001% (volumen / volumen) de betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina / estreptomina (Gibco)) en Matrices cubiertos de gelatina.

35 **Preparación de la muestra.** Se sembró 1 millón de células viables en 15 μ l de Medio de Crecimiento en un diámetro de 5 mm en portador no tejido Vivryl de 2.25 mm de grueso (64.33 miligramos /cc; Lot#3547-47-1) o una espuma 35/65 PCL/PGA con un diámetro de 5 mm (Lot# 3415-53). Se les permitió a las células adherirse durante dos horas antes de agregar más medio de crecimiento para cubrir los portadores. Las células se cultivaron en los portadores durante la noche. También se incubaron en el medio células sin portadores.

40 Se obtuvieron péptidos auto ensamblables (3D Matrix, Cambridge, MA bajo un acuerdo de transferencia de materiales) como un 1% (masa / volumen) de solución estéril en agua, que fue mezclada 1:1 con 1×10^6 células en un 10% (masa / volumen) de sacarosa (Sigma, St Louis, MO), 10mM de HEPES en un medio modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) justo antes de usarse. La concentración final de células en el hidrogel RAD16 fue de 1×10^6 células por cada 100 μ l.

50 **MATERIAL DE PRUEBAS (N=4/Rx)**

1. Poliglactina no tejida + 1×10^6 de células derivadas umbilicales
2. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas umbilicales
3. Péptido auto - ensamblable RAD 16 + 1×10^6 células derivadas umbilicales
4. Poliglactina no tejida + 1×10^6 células derivadas de la placenta
5. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas de la placenta
6. Péptidos auto - ensamblable RAD 16 + 1×10^6 células derivadas de la placenta
7. Espuma 35/65 PCL/PGA
8. Poliglactina no tejida

60 **Preparación animal.** Los animales fueron manejados y mantenidos de acuerdo a los requerimientos actuales de la ley del bienestar animal. Se cumplió con las leyes públicas que se acaban de mencionar al adherirse a las regulaciones de bienestar animal (9 CFR) y conforme a los estándares promulgados en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, 7ma edición.

65 Ratones (Mus Musculus)/Fox Chase SCID/ masculino (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana), cinco semanas de edad. Todas las personas manejaban los ratones SCID bajo una cubierta. Los ratones fueron pesados

individualmente y anestesiados con una inyección intraperitoneal con una mezcla de 60 mg por kilogramo de KETASET (clorhidrato de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) y 10 mg por kilogramo de ROMPUN (Xilacina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de la anestesia, toda la espalda del animal desde el área cervical dorsal hasta el área lumbosacra dorsal se afeitaba removiendo todo el pelo usando máquinas afeitadoras eléctricas para animal. Después de eso, esa área era refregada con diacetato de clorhexidina, enjuagado con alcohol, secado, y pintado con una solución de yodo acuoso de 1% de yodo disponible. Se aplicó ungüento oftálmico a los ojos para prevenir que se seque el tejido durante el período anestésico.

Técnica de implantación subcutánea. Se realizaron cuatro incisiones en la piel, cada una de aproximadamente 1 cm de largo, en el dorso de los ratones. Dos lugares craneales fueron ubicados transversalmente sobre la región torácica lateral dorsal, alrededor de 5 mm de caudal al filo interior palpado de la escápula, con uno a la izquierda y otro a la derecha de la columna vertebral. Otros dos fueron ubicados transversalmente sobre el área del músculo glúteo al nivel lumbar-sacro caudal, alrededor de 5 mm de caudal a la cresta ilíaca palpada, con uno en cada lado de la línea media. Los implantes fueron colocados aleatoriamente en estos lugares de acuerdo al diseño experimental. La piel fue separada del tejido conectivo subyacente para hacer un pequeño bolsillo y colocar el implante (o inyectar el RAD16) alrededor de 1 cm de caudal a la incisión. El material de pruebas apropiado fue implantado en el espacio subcutáneo. La incisión en la piel fue cerrada con broches metálicos.

Vivienda de los animales. Los ratones fueron albergados individualmente en jaulas microaislantes mientras duró el estudio a una temperatura que variaba entre 64° F a 79° F y una humedad relativa del 30% al 70%, y se mantenía un ciclo aproximado de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. La temperatura y humedad relativa fueron mantenidas dentro de los rangos declarados en la mayor medida de lo posible. La dieta consistía de Chow 5058 irradiado para hocico de ratón (Purina Co.) y agua con ad libitum. [0331] Los ratones fueron sacrificados a sus intervalos de diseño con inhalación de dióxido de carbono. Los lugares de Los implantes subcutáneos con su respectiva piel fueron extirpados y congelados para histología.

Histología. La piel e implantes extirpados fueron fijados con un 10% de formalina tamponada neutral (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Muestras con tejidos supra yacentes y adyacentes fueron atravesados, procesados con parafinas, y pegados a la superficie del corte utilizando métodos de rutina. Las secciones de tejido de cinco micrones fueron obtenidas por micro tomos y pintadas con hematoxilina y eosina (Poly Scientific Bay Shore, NY) usando métodos de rutina.

Resultados

Hubo un crecimiento interno mínimo de tejidos en las espumas (sin células) implantadas subcutáneamente en los ratones SCID después de 30 días. En contraste, había bastante tejido lleno en las espumas implantadas con células derivadas umbilicales o células derivadas de la placenta. Se observó algo de tejido que creció internamente en los portadores no tejidos de poliglactina. Los portadores no tejidos sembrados con células derivadas umbilicales o de la placenta mostraron una deposición matricial incrementada y un mayor número de vasos sanguíneos maduros.

Resumen. Se sembraron discos no tejidos / de espuma absorbibles sintéticos (5.0 milímetros de diámetro por 1.0 milímetros de grosor) o hidrogel péptido auto-ensamblable ya sea con células derivadas umbilicales o de la placenta humanas e implantadas subcutáneamente bilateralmente en la región de la espina dorsal de los ratones SCID. Los resultados demostraron que las células derivadas de posparto pueden incrementar dramáticamente la formación de tejidos de buena calidad en portadores biodegradables.

EJEMPLO 17

El uso de células derivadas de posparto para la reparación de nervios

Las lesiones de células ganglionares de la retina (RGC - Retinal ganglion cell) han sido usadas extensivamente como modelos para varias estrategias de reparación en mamíferos adultos CNS. Se ha demostrado que una división de los axones RGC de roedores adultos resultan en brotes abortivos (Zeng et al., 1995) y muerte progresiva de la población de células padre (Villegas-Perez et al., 1993). Muchos estudios han demostrado los efectos simuladores de varios factores exógenos y endógenos en la supervivencia de RGCs donde se cortó los axones y su regeneración (Yip and So, 2000; Fischer et al., 2001). Adicionalmente, otros estudios han demostrado que los trasplantes celulares pueden ser utilizados para promover la regeneración de varios axones de nervios separados (Li et al., 2003; Ramon-Cueto et al., 2000). Por lo tanto, estos y otros estudios han demostrado que la terapia que se basan en células puede ser utilizada para el tratamiento de desórdenes neurales que afectan la médula espinal, los nervios periféricos, los nervios de los pudendos, nervios ópticos u otras enfermedades / traumas debido a lesiones en los que haya ocurrido un daño nervioso.

Se han desarrollado péptidos auto - ensamblables (PuraMatrix™, patentes de Estados Unidos 5,670,483, 5,955,343, US/PCT aplicaciones US2002/0160471, WO02/062969) para actuar como portadores para la adjunta acción de células A células encapsuladas en 3-D, células tapadas en coberturas 2-D, o cómo microportadores en cultivos de

suspensión. Los cultivos celulares tridimensionales han requerido ya sea materiales derivados de animales (extracto de sarcoma de ratón), con su reproducibilidad inherente y tejidos de señalización celular, o portadores sintéticos mucho más grandes, que no pueden aproximar la escala física nanométrica y atributos químicos del ECM. RAD 16 (NH₂-(RADA)₃-COOH) y KLD (NH₂-(KLDL)₃-COOH) nativos son sintetizados en pequeños (RAD16 es de 5 manómetros) fragmentos de oligopéptidos que se auto ensamblan en nanofibras en una escala similar a la de la matriz extracelular in vivo (ECM) (3D Matrix, Inc Cambridge, MA). El auto ensamblaje es iniciado por cationes mono o divalentes encontrados en el medio de cultivo o el entorno fisiológico. En los protocolos descritos en este ejemplo, se utilizó RAD 16 como un micro portador de los implantes de células posparto no al defecto ocular. En este ejemplo, se demuestra que los trasplantes de las células derivadas de posparto (PPDCs) pueden suministrar eficacia en un modelo de regeneración axonal del nervio óptico de rata adulta.

Métodos y Materiales

Células. Cultivos de PPDCs (umbilicales y placentarias) de humano adulto y células de fibroblastos (pase 10) fueron expandidos durante un pase. Todas las células se sembraron inicialmente a 5000 células por centímetro cuadrado en Matraces T 75 cubiertos con gelatina en un medio de crecimiento con 100 U por mililitro de penicilina, 100 µg por mililitro de estreptomycin, 0.25 microgramos por mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA). En el pase 11 las células fueron tripnizadas y se determinó la viabilidad usando tinción de tripano azul. Brevemente, 50 µl de suspensión celular fueron combinados con 50 µl de 0.0 4% (masa / volumen) de tripano azul (Sigma, St. Louis MO) y el número de células viables, se estimó usando un hemocitómetro. Las células fueron lavadas tres veces en un medio suplementar L15 libre de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células fueron suspendidas entonces a una concentración de 200.000 células en 25 µl de RAD-16 (3DM Inc., Cambridge, MA) que fue taponado y hecho isotónico de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se agregó 100 µl del medio suplemental libre de L-15 de Leibovitz sobre la suspensión celular / matricial para mantenerla mojada hasta su uso. Estos cultivos celulares / matriciales fueron mantenidos bajo condiciones atmosféricas estándar hasta que ocurrió el trasplante. En el momento del trasplante el medio excesivo fue removido.

Animales y cirugía. Se utilizaron Ratas hembras Long Evans (220 - 240 g de peso corporal). Bajo anestesia de tribromoetanol intraperitoneal (20 miligramos / 100 gramos de peso corporal), se expuso el nervio óptico, y se hizo una incisión en la envoltura óptica intraorbitalmente a aproximadamente 2 mm del disco óptico, el nervio fue levantado de la envoltura para permitir completar un corte transversal con tijeras finas (Li et al., 2003). La totalidad del corte transversal fue confirmado visualmente al ver la separación completa de los troncos proximal y distal. El grupo de control consistió de ratas lesionadas sin trasplantes. En las ratas con trasplantes se sembraron entre los tocones proximal y distal células de posparto cultivadas sembradas en RAD-16 usando un par de micro pinzas. Aproximadamente 75.000 células en RAD-16 fueron implantadas en el nervio óptico separado. Las células / matriz fueron untadas en el corte de separación usando un par de micropinzas finas. La envoltura dividida del nervio óptico fue cerrada con un monofilamento de nylon negro 10/0 (Ethicon, Inc., Edinburgh, UK). Por lo tanto, la apertura fue cerrada empatando los extremos proximal y distal del corte del nervio poniéndolos en proximidad el uno con el otro.

Después que se realizaron las inyecciones de células, se les inyectó a los animales dexametasona (2 mg por kilogramo) durante 10 días después del trasplante. Durante el estudio, se administró a los animales ciclosporina A oral (210 mg por litro de agua bebida; resultando en una concentración sanguínea: 250 a 300 µg por litro) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) desde dos días antes del trasplante hasta el final del estudio. La comida y el agua estuvieron disponible ad libitum. Los animales fueron sacrificados de 30 a 60 días después del trasplante.

Aplicación CTB. Tres días antes de que los animales fuesen sacrificados, con anestesia, una micropipeta de vidrio con una punta de 30 a 50 µm fue insertada tangencialmente de a través de la esclera atrás de los lentes, y dos porciones de cuatro a 5 µl de una solución acuosa con 1% de toxina rastreador ha de cólera retrógrada de (CTB - cholera toxin B) (List Biologic, Campbell, CA) se inyectó al vitreo. Los animales fueron perfundidos con fijadores y los nervios ópticos fueron recolectados con el mismo fijador durante una hora. Los nervios ópticos fueron transferidos a sacarosa durante la noche. Se incubaron secciones de criostato de 20 µm en 0.1 molar de glicina durante 30 minutos y se bloqueó en una solución PBS que contenía 2.5 por ciento de albúmina de suero bovino (BSA) (Boeinger Mannheim, Mannheim, Alemania) y 0.5 por ciento de tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO), seguido de una solución que contenía anticuerpos de cabra anti - CTB (List Biologic, Campbell, CA) diluidos 1:4000 en un PBS que tenía un 2% de suero de conejo normal (NRS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), un 2.5 por ciento de BSA, y un 2% de tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO) en PBS, incubado en anticuerpos IgG biotinilados de conejo anti cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluidos 1:200 en un 2% de tritón X100 en PBS durante dos horas a la temperatura del cuarto. Esto fue seguido por una tinción en 1:200 de estreptavidina verde (Alexa Flour 438;Molecular Probes - sondas moleculares, Eugene, O) en PBS durante dos horas a la temperatura del cuarto. Las secciones pintadas fueron lavadas entonces en PBS y contra tintadas con yoduro de propidio para microscopía confocal

Preparación histológica. Brevemente, cinco días después de la inyección CTB, las ratas fueron perfundidas con un 4% de paraformaldehído. Se les dio a las ratas 4 cm³ de uretano y después fueron perfundidas con PBS (0.1 mol) y entonces con un 4% de paraformaldehído. La médula espinal fue cortada y el hueso fue removido de la cabeza para exponer el cóliculo. El cóliculo fue entonces removido y colocado en un 4% de paraformaldehído. El ojo fue removido al cortar alrededor de la parte exterior del ojo yendo hacia atrás lo más posible. Se tomó cuidado de no cortar el nervio

óptico que está en la parte inferior del ojo. El ojo fue removido y los músculos fueron cortados exponiendo el nervio óptico el cual fue colocado entonces en un 4% de para formaldehído.

Resultados

5 Lesiones individuales. Un mes después de la sección retrotubular del nervio óptico, se identificaron varios axones marcados como CTB en el segmento del nervio junto a la retina. En los 200 micrometros más cercanos al corte, se observó que axones emitieron varios colaterales en ángulos rectos al eje principal y terminaban como un enredo de neuromas en la superficie del corte. En este corte entre llos muñones próximos y distales, se observó que el vacío se conectó progresivamente a un segmento de tejido conectivo vascularizado de 2 -3 milímetros; sin embargo, no se observó que avance ningún axón en esta área de conexión. Por lo tanto, en los animales que solo recibieron una lesión no se observó que ningún crecimiento axonal alcance el muñón distal.

15 Transplante RAD-16. Después del transplante de RAD-16 al corte, se observó un crecimiento interno de tejido conectivo vascularizado. Sin embargo, no se observó ningún crecimiento axonal entre los troncos distales. Los resultados demuestran que la aplicación de RAD-16 por si sola no es suficiente para inducir una regeneración axonal en esta situación.

20 Transplante de células derivadas de postparto. Transplante de células derivadas de postparto en nervio óptico seccionado estimuló el nuevo crecimiento del nervio óptico. Parte del nuevo crecimiento también fue observado en condiciones donde células fibroblastos fueron implantadas, aun cuando esto fue mínimo en comparación con el nuevo crecimiento observado con el transplante de células derivadas de placenta. El nuevo crecimiento de nervio óptico fue observado en 4/5 de animales transplantados con células derivadas de placenta, 3/6 de animales transplantados con fibroblastos dermales adultos y en 1/4 de animales transplantados con células derivadas de cordón umbilical. En las situaciones en las que se observó el nuevo crecimiento, el etiquetado por CTB confirmó la regeneración de axones en células ganglionares de la retina, lo que se demostró para penetrar a través de la zona de trasplante. También se realizó un proceso de etiquetado por GFAP para determinar el nivel de gliosis. La expresión GFAP se intensificó en el tronco proximal (final de la neurona afectada) observándose cierto nivel de inmunocoloración a través del injerto reinervado.

30 **Resumen.** Estos resultados demuestran que las células humanas adultas derivadas de postparto transplantadas son capaces de estimular y guiar la regeneración de axones cortados en células ganglionares de la retina.

Referencias para Ejemplo 17

35 1) Zeng BY, Anderson PN, Campbell G, Lieberman AR. 1995. J. Anat. (Revista de Anatomía) 186:495-508.
 2) Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. 1988. J Neurosci. (Revista de Neurociencia)8:265-80.
 3) Yip HK, So KF. 2000. Prog Retin Eye Res. (Progreso en la Investigación del Ojo y la Retina),19: 559-75.
 4) Fischer D, Heiduschka P, Thanos S. 2001. Exp Neurol. 172: 257-72.
 40 5) Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. 2000. Neuron (Neurona) 25: 425-35.

La presente invención no se limita a los alcances descritos y ejemplificados arriba. Tiene la capacidad de variar y ser modificada dentro del alcance de las declaraciones adjuntas.

45 LISTADO DE LA SECUENCIA

- <110> ETHICON, INCORPORATED
- <120> REGENERACIÓN Y REPARACIÓN DE TEJIDO NEURONAL UTILIZADO CÉLULAS DERIVADAS DE POSTPARTO
- <130> P055851EP
- <140>
- 55 <141>
- <150> EP 04777235.5
- <151> 2004-06-25
- 60 <150> EE.UU. 60/483,264
- <151> 2003-06-27
- <160> 10
- 65 <170> Versión de la Patente 3.5

<210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético

 10 <400> 1
 gagaaatcca aagagcaaat gg 22

 <210> 2
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético
 20
 <400> 2
 agaatgaaa actggaatag g 21

 <210> 3
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético
 30
 <400> 3
 tctc gatgc ttcgattcc 20

 35 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético

 <400> 4
 45 gaattctcgg aatctctgtt g 21

 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético

 <400> 5
 55 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético

 65 <400> 6
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22

5 <210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético

10 <400> 7
tctgcagctc tgtgtgaagg 20

15 <210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético

20 <400> 8
cttcaaaaac ttctccacaa cc 22

25 <210> 9
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético

30 <400> 9
cccacgccac gctctcc 17

35 <210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebo Sintético

45 <400> 10
tcctgtcagt tgggtctcc 19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Las células que son obtenibles del tejido del cordón umbilical humano que están sustancialmente libres de sangre para su uso en el tratamiento de una condición neurodegenerativa, donde las células son capaces de auto renovarse y de expandirse en el cultivo, tienen el potencial de diferenciarse a células de por lo menos un fenotipo neural, requieren valina L para su crecimiento, pueden crecer con alrededor de un 5% a un 20% de oxígeno, son multipotentes o pluripotentes y tienen las siguientes características:
- 10 a. El potencial para experimentar por lo menos 40 doblajes en cultivos;
- b. Tienen adherencia y expansión en portadores de cultivos de tejidos cubiertos o no cubiertos, donde el portador de cultivos de tejidos cubiertos comprende una cobertura de gelatina, laminina, colágeno, poliomitina, vitronectina o fibronectina;
- 15 c. Producen vimentina y actina de músculo liso alfa;
- d. Producen cada una de CD10, CD13, CD44, CD73, HLA-A,B,C, CD90, PD-L2 y PDGFr-alfa, tal como puede ser detectado por medio de citometría de flujo;
- 20 e. Tienen una expresión incrementada de genes endógenos que codifican a la interleucina 8; al reticulon 1; al ligando 1 de la quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de la melanoma, alfa); al ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); el ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 3; y el factor de necrosis tumoral, la proteína inducida por alfa 3 en relación a la expresión endógena en una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesénquima, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, tal como se puede analizar por un ensayo de oligonucleótidos;
- 25 f. No producen CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, HLA-G, B7-H2 y HLA-DR,DP,DQ, tal como puede detectarse por medio de citometría de flujo;
- 30 g. Una expresión reducida de los homeobox 2 de los genes de corta estatura; la proteína 2 de un golpe de calor de 27kDa; el ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (el factor 1 derivado de las células estromales); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox de mesénquimas 2; homólogo del homeobox 1 sine oculis; cristalina alfa B; activador asociado desaliñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a la neuralina 1; tetranectina; homología src tres (SH3 – src homology three) y el dominio rico en cisteína; el gen de translocación 1 de la célula B; 25- hidroxilasa de colesterol; factor 3 de transcripción relacionado al enanismo; proteína hipotética F1123191; receptor alfa de interleucina 11; mejorador de la endopeptidasa de procolágeno C; homólogo rizado 7; gen hipotético BC008967; colágeno alfa 1 tipo VIII; tenascina C; proteína 5 de homeobox iroqués; hefaestina; integrina beta 8; glicoproteína 2 de vesícula sináptica; fis de ADNc FLJ12280 del clon MAMMA1001744; factor 1 similar a un receptor de citoquinas; canal activado por un intermediador de potasio/una baja conducción del calcio, de la subfamilia N, el miembro 4; proteína DKFZP586L151; co-activador de transcripciones con un motivo que se enlaza con PDZ (TAZ); homólogo 2 del homeobox sine oculis; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox 5 menos distal; proteína hipotética FLJ20373; miembro C3 de la familia de aldo-ceto reductasas 1 (deshidrogenasa hidroxiesteroide alfa 3 tipo II); biglicano; fibronectina 1; proegkefalin; integrina 1 similar a beta (con dominios repetitivos similares a EGF); ADNc del clon EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptidos natriuréticos/ciclasa de guanilato C (receptor C de péptidos atriales - natriuréticos); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); la proteína 5 de la membrana asociada con la vesícula; proteína matricial extracelular 1 similar a la fibulina que contiene EGF; BCL2/proteína similar a la 3 que interactúa con el adenovirus EIB de 19kDa; proteína enlazadora de AE 1; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de oxidasa de citocromo c (músculo); neuroblastoma, supresión de carcinogénesis 1; y la proteína 2 que enlaza al factor de crecimiento similar a la insulina, 36kDa relativo a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesénquima, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, tal como se puede analizar por medio de un ensayo de oligonucleótidos;
- 35 40 45 50 55
- 60 h. Secretan MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO y TIMP1, tal como puede ser determinado por ELISA; y
- i. No secretan SDF-1 alfa, TGF-beta2, ANG2, PDGFbb y VEGF, tal como puede ser determinado por ELISA.
- 65 2. Una composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1 que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y las células de la reivindicación 1 en un monto efectivo para tratar a la condición neurodegenerativa, donde dichas células son multipotentes y pluripotentes.

3. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2 donde dichas células mantienen un cariotipo normal con pases.
- 5 4. Las células para su uso en la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde la condición neurodegenerativa es una condición neurodegenerativa aguda.
- 10 5. Las células o la composición para el uso de la reivindicación 4, donde la condición neurodegenerativa aguda es un trauma cerebral, un trauma de la médula espinal o un trauma de los nervios periféricos.
- 15 6. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde la condición neurodegenerativa es una condición neurodegenerativa crónica o progresiva.
- 20 7. Las células o la composición para el uso de la reivindicación 6, donde la condición neurodegenerativa crónica o progresiva es la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, tumores, esclerosis múltiple o una lesión crónica de los nervios periféricos.
- 25 8. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde las células son inducidas in vitro para diferenciarse a células de linaje neural antes de su administración.
- 30 9. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde las células son diseñadas genéticamente para producir un producto genético que promueve el tratamiento de la condición neurodegenerativa.
- 35 10. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde el tratamiento comprende la administración de las células con por lo menos un tipo celular adicional.
- 40 11. Las células o composición para el uso de la reivindicación 10, donde el otro tipo de células son astrocitos, oligodendrocitos, neuronas, progenitoras neurales, células madres neurales u otras células madre multipotentes.
- 45 12. Las células o la composición para su uso en la reivindicación 10, donde el tratamiento comprende la administración de las células con por lo menos un tipo adicional de células simultáneamente con, o antes de, o después de, las células derivadas de cordones umbilicales.
- 50 13. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde el tratamiento comprende la administración de las células con por lo menos un agente adicional.
- 55 14. Las células o la composición para el uso de la reivindicación 13, donde el tratamiento comprende la administración de las células con por lo menos un agente adicional simultáneamente con, o antes de, o después de, la administración de las células derivadas del cordón umbilical.
- 60 15. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde el tratamiento comprende la administración de las células en un sitio predeterminado en el sistema nervioso central o periférico del paciente.
- 65 16. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde el tratamiento comprende la administración de células por medio de inyección o infusión.
17. Las células para el uso de la reivindicación 1 o la composición para el uso de la reivindicación 2, donde las células son encapsuladas dentro de un dispositivo que se puede implantar.
18. Las células para el uso de la reivindicación 16, donde las células están incluidas en una matriz o en un portador adecuado para su implantación en el paciente.
19. El uso de las células tal como se mencionó en cualquiera de las reivindicaciones 1 o de la 3 a la 18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición neurodegenerativa.
20. Un botiquín para su uso en el tratamiento de una condición neurodegenerativa, donde el botiquín comprende a las células de la reivindicación 1 donde dichas células son multipotentes o pluripotentes, un portador farmacéuticamente aceptable e instrucciones para el uso del botiquín en un método para el tratamiento del paciente.
21. El botiquín para el uso de la reivindicación 20 donde la célula mantiene un cariotipo normal con pases.

22. El botiquín para el uso de la reivindicación 20, que comprende además por lo menos un reactivo e instrucciones para cultivar a las células derivadas de cordones umbilicales.
- 5 23. El botiquín para el uso de la reivindicación 20, que comprende además una población de por lo menos un tipo celular adicional.
24. El botiquín para el uso de la reivindicación 20, que comprende además por lo menos un agente adicional para el tratamiento de una condición neurodegenerativa.
- 10 25. Un método para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de células de linaje neural que comprende el co-cultivo de las células de linaje neural con las células derivadas de cordones umbilicales mencionadas en la reivindicación 1 bajo condiciones efectivas para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neural.
- 15 26. Un botiquín para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neural que comprende a las células derivadas de cordones umbilicales de la reivindicación 1 e instrucciones para co-cultivar a las células de linaje neural con las células derivadas de cordones umbilicales de la reivindicación 1 bajo condiciones efectivas para incrementar la supervivencia, el crecimiento o la actividad de las células de linaje neural.
- 20