

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 837**

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

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2004 PCT/US2004/020816**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2005 WO05001076**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 04777231 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 1641914**

54 Título: **Células posparto derivadas de tejido de la placenta, y métodos de fabricación y utilización de los mismos**

30 Prioridad:

**27.06.2003 US 483264 P**

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

**23.01.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 597 837 T3

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

**Células posparto derivadas de tejido de la placenta, y métodos de fabricación y utilización de los mismos**

**Descripción**

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] Esta invención se refiere al campo de la biología de células de mamífero y el cultivo de células. En particular, la invención se refiere a células cultivadas derivadas de tejido de la placenta después del parto que tiene el potencial de diferenciarse en múltiples linajes, y métodos de preparación y uso de esas células derivadas de placenta.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] La generación de órganos y tejidos a partir de células que ofrecen tratamientos prometedores para una serie de patologías, con lo que las células madre se convierten en un foco central de la investigación en muchos campos. Las células madre humanas son capaces de generar una variedad de linajes celulares humanos maduros. El trasplante de estas células ha proporcionado una herramienta clínica para reconstituir un tejido diana, restaurando con ello la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de la tecnología de células madre es muy amplia, incluyendo la ingeniería de tejidos, administración de terapia génica, y la terapéutica de células de trastornos que incluyen enfermedades malignas, errores innatos del metabolismo, hemoglobinopatías, y inmunodeficiencias.

15

[0003] US 2003/032179 describe un método de extracción y la recuperación de las células madre embrionarias-similares.

20

[0004] US 5.919.702 describe un método de producción de tejido de cartílago utilizando células aisladas de la gelatina de Wharton.

25

[0005] El documento WO 03/068937 describe células madre similares a las embrionarias derivadas de la placenta de los mamíferos después del parto.

30

[0006] Lodie et al. (2002) Tissue Engineering 8(5):739-751 describe el análisis de poblaciones distintas de células madre derivadas de médula multipotente.

35

[0007] Tremain et al. (2001) Stem Cells 19:408-418 describe el análisis microSAGE de 2.353 genes expresados en una colonia derivada de células únicas de las células madre mesenquimatosas humanas no diferenciadas.

40

[0008] El documento WO 2004/072273 describe células progenitoras humanas que se extraen de gelatina de Wharton.

45

[0009] Un obstáculo a la realización del potencial terapéutico de la tecnología de células madre ha sido la dificultad para obtener un número suficiente de células madre humanas. Una fuente de células madre es el tejido embrionario o fetal. Células madre y progenitoras embrionarias se han aislado a partir de un número de especies de mamíferos, incluyendo seres humanos. La obtención de células madre a partir de fuentes embrionarias o fetales, no obstante, ha planteado muchas cuestiones éticas y morales.

50

[0010] Las células madre también se han aislado de los tejidos adultos. Los métodos para el aislamiento de células madre a partir de fuentes de adultos a menudo producen solamente cantidades limitadas de células y/o células que tienen una capacidad limitada para diferenciarse.

55

[0011] Tejidos posparto han generado interés como una fuente alternativa de células madre humanas. Por ejemplo, se han descrito métodos para la recuperación de las células madre por perfusión de la placenta o la recogida de sangre de cordón umbilical. Una limitación de obtención de células madre a partir de estos métodos ha sido un volumen inadecuado de la sangre o la cantidad de células obtenidas del cordón umbilical.

60

[0012] De este modo, las fuentes alternativas de suministro adecuadas de células que tienen la capacidad de diferenciarse en una variedad de linajes de células para la criopreservación y/o su uso en aplicaciones clínicas siguen siendo en gran demanda. Tales células pueden usarse en ensayos de cribado de fármacos, para la criopreservación y/o la banca, y para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

65

**RESUMEN DE LA INVENCION**

60

[0013] La invención proporciona una célula derivada de placenta aislada obtenible a partir de tejido de la placenta después del parto humano sustancialmente libre de sangre, en el que dicha célula se auto-renueva y se expande en cultivo, es multipotente, requiere L-valina para el crecimiento, crece en aproximadamente 5% a sobre 20% de oxígeno, y tiene las siguientes características adicionales:

65

a) la producción de vimentina y actina de músculo alfa lisa;

- b) la expresión de la proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2) como se detecta por citometría de flujo;
- c) la falta de producción de GRO-alfa y el receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada, tal como se detecta por citometría de flujo;
- d) la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C, tal como se detecta por citometría de flujo;
- e) la falta de producción de CD31, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DP, DQ, DR, detectada por citometría de flujo;
- f) la expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se reduce para homeobox de baja estatura 2; proteína 27kDa de choque térmico 2; quimiocina (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de células estromales 1); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); mesénquima de homeobox 2; homólogo de homeobox sine oculis 1; cristalina, alfa B; activador asociado desgreñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; homólogo src tres (SH3) y el dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionada con runt-3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo rizado 7; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; homeobox de proteínas Iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína vesícula sináptica 2; ADNc FLJ12280 fis, Clon de MAMMA1001744; citoquina factor-1 tipo receptor; canal activado por calcio de pequeña conductancia/intermedia de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; Proteína de DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ); homólogo de homeobox sine oculis 2; proteína KIAA10<sup>3</sup>4; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa de hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina beta tipo 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético, ciclase C/guanilato C (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (a partir de DKFZp564B222 clon); proteína de membrana asociada a vesículas 5; Proteína de la matriz extracelular que contiene EGF tipo fibulina 1; E1B 19 kDa BCL2/adenovirus de proteínas que interactúan tipo 3; Proteína AE de unión 1; citocromo c oxidasa subunidad polipeptídica VIIa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína de unión factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa como se ensayó por microensayo;
- g) la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), heparina de unión al factor de crecimiento epidérmico (HB-EGF), inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), Rantes (regulada en activación, células T normales expresadas y secretadas) y el timo y quimiocina regulada por activación (TARC), como se detecta por ELISA;
- h) la falta de secreción de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF BB), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2), proteína inflamatoria de macrófagos 1beta (MIP1b), I309, y quimioquina derivada de macrófagos (MDC), como se detecta por ELISA;
- i) tiene la capacidad de someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo; y
- j) la expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para miembro de superfamilia de lectina de tipo C A2, tumor de Wilms 1, deshidrogenasa de aldehído 1 miembro de familia A2, renina, receptor de lipoproteínas oxidado de baja densidad 1, quinasa de proteína C zeta, clon IMAGEN: 4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, subregulado en el cáncer de ovario 1, y el clon DKFZp547K1113 como se ensayó mediante microensayos. La invención también proporciona una matriz que comprende la célula de la invención.

**[0014]** La invención también proporciona una población de células homogéneas que comprende la célula de la invención

**[0015]** La invención también proporciona un cultivo de células homogéneas que comprende la población de células de la invención.

**[0016]** La invención también proporciona un método para aislar la célula de la invención a partir de una placenta humana post-parto o fragmento del mismo que comprende dicha célula de disociación de dicha placenta o fragmento con dispasa, y al menos una de colagenasa y hialuronidasa.

**[0017]** La invención también proporciona un método para producir una población de células mediante la ampliación de una célula de la invención en cultivo.

**[0018]** La invención también proporciona un kit que comprende al menos una célula de la invención y al menos un componente adicional seleccionado de un andamio, un agente hidratante, un sustrato de cultivo de células, y medios de cultivo celular.

**[0019]** La presente invención se refiere a células derivadas de placenta después del parto. Las células de la invención pueden caracterizarse por una o más de las características incluyendo la presencia o ausencia de marcadores de superficie celular, los métodos de extracción de tejido de la placenta, los perfiles de expresión de genes, los perfiles de producción de proteínas, la secreción de factores, características de crecimiento, o cualquier

combinación de tales características.

**[0020]** La invención abarca las células derivadas del tejido de placenta después del parto humano sustancialmente libre de sangre. Las células de la invención son capaces de auto-renovación y expansión del cultivo. En algunos aspectos de la invención, la célula tiene el potencial de diferenciarse en células de otro fenotipo. La célula derivada de placenta requiere L-valina para el crecimiento. Las células derivadas de la placenta de la invención son capaces de crecer en aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de oxígeno. En algunas realizaciones de la descripción, las exposiciones de células derivadas de la placenta muestran al menos una de las siguientes características:

- (a) producción de al menos uno de factor tisular, vimentina, proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), y actina muscular lisa alfa;
- (b) la falta de producción de al menos uno de GRO-alfa y el receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada, tal como se detecta por citometría de flujo;
- (c) la producción de al menos uno de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C;
- (d) la falta de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DP, DQ, DR, detectada por citometría de flujo;
- (e) expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para al menos uno de miembro de superfamilia de lectina de tipo C A2, tumor de Wilms 1, dehidrogenasa 1 miembro de familia A2, renina, receptor de lipoproteínas oxidado de baja densidad 1, quinasa de proteína C zeta, clon IMAGEN: 4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, subregulado en el cáncer de ovario 1, y el clon DKFZp547K1113;
- (f) la expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se reduce por al menos uno de: baja estatura de homeobox 2; proteína 27kDa de choque térmico 2; quimiocina (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); mesénquima de homeobox 2; homólogo de homeobox sine oculis 1; cristalina, alfa B; activador asociado desgreñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZp586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; homólogo src tres (SH3) y el dominio rico en cisteína; gen de translocación 1 de células B, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt-3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno endopeptidasa C; homólogo rizado 7; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; homeobox de proteínas Iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína vesícula sináptica 2; ADNc FLJ12280 fis, Clon de MAMMA1001744; citoquina factor-1 tipo receptor; canales de calcio activados/pequeña conductancia intermedia de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína de DKFZp586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ); homólogo de homeobox sine oculis 2; proteína KIAA10<sup>3</sup>4; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa de hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina beta tipo 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (a partir de DKFZp564B222 clon); proteína de membrana asociada a vesículas 5; proteína de la matriz extracelular que contiene EGF fibulina tipo 1; BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa proteína que interactúa tipo 3; proteína AE de unión 1; citocromo c oxidasa subunidad polipeptídica VIIa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína de unión factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa;
- (g) la secreción de al menos una de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), factor 1 alfa derivado del estroma (SDF-1 alfa), la interleucina 8 (IL8), proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor de neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), inhibidor tisular de la metaloproteasa de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), Rantes (reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas), timo y quimiocina regulada por activación (TARC), y eotaxina;
- (h) la falta de secreción de al menos uno de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), 1309, y quimiocina derivada de macrófagos (MDC), como se detecta por ELISA; y
- (i) la capacidad de someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo.

**[0021]** En realizaciones específicas, la célula tiene todas las señas de identidad de cualquiera de: tipo de célula PLA 071003 (P8) (Nº de acceso ATCC PTA-6074); tipo de células PLA 071003 (P11) (ATCC Nº de acceso PTA-6075); y el tipo de células PLA 071003 (P16) (Nº de acceso ATCC PTA-6079). Las células derivadas de la placenta de la invención son las células humanas. Las células de la invención pueden ser de linaje neonatal, linaje materno, o una combinación de los mismos.

**[0022]** La invención también proporciona células derivadas de la placenta de la reivindicación 1 aislada de una placenta después del parto o fragmento del mismo por disociación enzimática con una metaloproteasa de matriz (MMP); una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra; una metaloproteasa de matriz y una enzima que digiere ácido hialurónico mucolítico; o una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra, y una enzima que digiere ácido hialurónico mucolítico. Metaloproteasas de la matriz preferida incluyen colagenasa. La proteasa neutra es

preferiblemente termolisina o dispasa, y lo más preferiblemente es dispasa. La enzima que digiere ácido hialurónico mucolítico es preferiblemente hialuronidasa. La serie LIBERASE™ (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) blendcima (Roche) de combinaciones de enzimas son muy útiles y se pueden usar en los presentes procedimientos. Otras fuentes de enzimas son conocidas, y el experto en la técnica también pueden obtener tales enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto en la técnica también está bien equipado para evaluar enzimas nuevas o combinaciones de enzimas adicionales para su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Tratamientos enzimáticos preferidos son 0,5, 1, 1,5 o 2 horas de duración o más. En realizaciones más preferidas, se incuba el tejido a 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de desintegración.

**[0023]** En algunas realizaciones de la invención, el tejido de la placenta se separa en fracciones previas a la celda de extracción, de tal manera que la célula es predominantemente de derivación neonatal o materna. En algunos aspectos de la invención, el tejido de la placenta se disocia mecánicamente antes de la etapa de disociación enzimática. En algunas realizaciones, el método de aislamiento de las células de la invención implica además el cultivo de las células en medio de cultivo. El medio de cultivo es preferiblemente RPMI1640, medio F10 de Ham, medio F12 de Ham, medio de crecimiento de células madre mesenquimales, medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DMEM avanzada (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), CELL-GRO FREE™, DMEM/F12, o medio basal de Eagle. En algunos aspectos de la invención, el medio de cultivo se complementa con aproximadamente 2% a aproximadamente 15% de suero (v/v), beta-mercaptoetanol, glucosa, y/o un agente antibiótico y un agente antimicótico. El medio de cultivo es preferiblemente el medio de crecimiento que comprende DMEM, glucosa, beta-mercaptoetanol, suero, y un agente antibiótico. El medio de cultivo puede contener al menos uno de factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento epidérmico y el factor inhibidor de la leucemia. Las células de la invención pueden ser cultivadas sobre una superficie sin revestir o revestida. Las superficies para el crecimiento de las células se pueden revestir por ejemplo, con gelatina, colágeno (por ejemplo, nativa o desnaturalizada), fibronectina, laminina, ornitina, vitronectina o proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA)).

**[0024]** La invención incluye dentro de su alcance derivada de placenta células caracterizadas por las características de crecimiento, tales como, pero sin limitarse a, células que producen mayor de aproximadamente  $10^{17}$  células en unos 60 días tras la siembra inicial de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup>. En algunas realizaciones, las células derivadas de la placenta de la invención tienen la capacidad de someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en alrededor de 80 días en cultivo.

**[0025]** Las células derivadas de la placenta de la invención pueden ser utilizadas del primer subcultivo (paso 0) a la senescencia. El número preferible de pasajes es el del que se obtiene un número de células suficiente para una aplicación dada. En ciertas realizaciones, las células se pasan de 2 a 25 veces, preferiblemente de 4 a 20 veces, más preferiblemente 8 a 15 veces, más preferiblemente 10 o 11 veces, y lo más preferiblemente 11 veces.

**[0026]** Los métodos para inducir la diferenciación de células derivadas de la placenta de la invención también se contemplan. En algunas realizaciones de la invención, células derivadas de la placenta se inducen a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico. Por ejemplo, las células pueden ser inducidas a diferenciarse a un linaje adipogénico, condrogénico, osteogénico, neurogénico, oculogénico, pancreagénico, cardiomiogénico, o hepatógeno. Los métodos de inducción de la diferenciación de las células de la invención preferiblemente implican la puesta en contacto o exposición de las células a uno o más agentes inductores de la diferenciación. En algunas realizaciones, dicho contacto o la exposición se producen en cultivo.

**[0027]** Las células de la invención pueden ser diseñadas genéticamente para expresar un gen de interés o para producir una proteína de interés tales como, pero no limitado a una proteína terapéutica. Por ejemplo, PDC se puede modificar genéticamente para expresar un compuesto antiinflamatorio o un agente anti-apoptótico.

**[0028]** Los métodos de la invención incluyen además métodos para producir una población de células de la placenta-derivada por expansión de una célula o células de la invención en cultivo. Las PDC pueden inducirse por diferenciación o no diferenciarse. En algunas realizaciones, una población de células derivadas de la placenta se mezcla con otra población de células. En algunas realizaciones, la población de células es heterogénea. Una población heterogénea de células de la invención puede comprender al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% PDC no diferenciadas de la invención o diferenciación PDC de la divulgación inducida. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender además células de un linaje mesodérmico, endodérmico o ectodérmico. Las poblaciones de células de la invención pueden ser homogéneas. Poblaciones homogéneas de células derivadas de la placenta pueden ser de linaje neonatal o materno. La homogeneidad de una población de células se puede conseguir mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo) o por la expansión clonal.

**[0029]** Algunas realizaciones de la invención proporcionan métodos de fabricación de una matriz de tejido para la implantación en un paciente mediante la siembra de una o más células derivadas de la placenta de la invención sobre o dentro de una matriz de tejido para la implantación en un paciente. La matriz puede contener uno o más factores, entre ellos fármacos, agentes anti-apoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), EPO mimético, cuerpo,

trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasas), compuestos anti-inflamatorios (por ejemplo, inhibidores de quinasa p38 MAP, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS) (tales como TEPOXALINA, TOLMETINA, y SUPROFENO)), así como anestésicos locales, y factores de crecimiento. En algunos aspectos de la divulgación, la matriz comprende tejido descelularizado, tales como la matriz extracelular o los lisados celulares de las PDC. En algunas realizaciones, la matriz es biodegradable. En algunos aspectos de la invención, la matriz comprende polímeros naturales o sintéticos. Las matrices de la invención incluyen los andamios biocompatibles, celosías, las estructuras de autoensamblaje y similares, ya sean biodegradables o no, líquidos o sólidos. Tales matrices se conocen en el arte de la terapia basada en células, la reparación quirúrgica, la ingeniería de tejidos y la cicatrización de heridas. Preferiblemente, las matrices se tratan previamente (por ejemplo, con semillas, inoculación, en contacto con) con las células de la invención. Más preferentemente, las matrices están pobladas con células en estrecha asociación con la matriz o de sus espacios. En algunos aspectos de la invención, las células se adhieren a la matriz. En algunas realizaciones, las células están contenidas dentro de o hacen puente con espacios intersticiales de la matriz. Más preferidas son aquellas matrices sembradas en donde las células se encuentran en estrecha asociación con la matriz y que, cuando se usan terapéuticamente, inducen o apoyan el crecimiento de las células del paciente y/o la angiogénesis adecuada. Las matrices de semillas pueden ser introducidas en el cuerpo de un paciente de cualquier modo conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a la implantación, inyección, fijación quirúrgica, trasplante con otro tejido, la inyección, y similares. Ejemplos de andamiajes que pueden usarse en la presente invención incluyen esteras no tejidas, espumas porosas, o péptidos de autoensamblaje. esteras no tejidas pueden ser, por ejemplo, pueden formarse usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólicos y lácticos (PGA/PLA) que se venden bajo el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc. Somerville, NJ). Espumas compuestas de, por ejemplo, poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA) copolímero, formado por los procesos tales como liofilización, como se discute en la Patente de EE.UU. N<sup>o</sup>. 6.355.699, también son posibles andamios. Los hidrogeles tales como péptidos de autoensamblaje (por ejemplo, RAD16) también se pueden utilizar. Estos materiales se utilizan con frecuencia como soporte para el crecimiento del tejido. Las matrices de la invención pueden estar configuradas para la forma y/o tamaño de un tejido u órgano *in vivo*. Los andamios de la invención pueden ser planos o tubulares o pueden comprender secciones de los mismos. Los andamios de la invención pueden ser de varias capas. Los órganos y tejidos que comprenden las PDC de la invención se proporcionan, y los órganos que componen la matriz extracelular del PDC o su lisado celular se dan a conocer.

**[0030]** También se incluyen dentro del alcance de la descripción matrices extracelulares de PDC, fracciones celulares (por ejemplo, fracciones celulares solubles) de PDC, PDC y el medio acondicionado.

**[0031]** En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones de PDC y uno o más factores bioactivos, por ejemplo, pero no limitado a, factores de crecimiento, agentes anti-apoptóticos, agentes anti-inflamatorios, y/o la inducción de factores de diferenciación.

**[0032]** Las células, matrices, tejidos, y las composiciones de la invención se pueden criopreservar. células crioconservadas y composiciones de la invención pueden ser almacenadas. Los métodos para criopreservar y/o almacenar las células después del parto derivados de la invención también se contemplan.

**[0033]** Las composiciones de PDC y productos relacionados, incluyendo, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, se incluyen dentro del alcance de la invención. Las composiciones de PDC pueden incluir uno o más de un factor inductor de la diferenciación, un factor de supervivencia de las células, tales como inhibidor de la caspasa, un agente anti-inflamatorio tal como p38 inhibidor de la quinasa, los factores de crecimiento, tales como PDGF-BB, EGF, bFGF, LIF, IGF-1, o VEGF, o un factor angiogénico tal como VEGF o bFGF. Las composiciones farmacéuticas de las células derivadas de la placenta están incluidas dentro del alcance de las composiciones de la invención y farmacéuticas de la matriz extracelular producidas de ese modo, lisadas de células del mismo, y medio acondicionado a PDC están incluidos dentro del alcance de la descripción. Las composiciones farmacéuticas incluyen preferiblemente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

**[0034]** En algunas realizaciones, se proporcionan células o matrices de la invención derivadas de la placenta para su uso en métodos de trasplante, y los métodos de la regeneración de un tejido u órgano en un paciente en necesidad del mismo, en el que los procedimientos comprenden el trasplante de dichas células o matrices de la invención en un paciente.

**[0035]** También se describen células derivadas de placenta, poblaciones de PDC, matrices o composiciones de la invención, para uso en métodos para tratar una enfermedad o lesión en un paciente mediante la administración de una o más de dichas células derivadas de la placenta, las poblaciones de PDC, matrices o composiciones.

**[0036]** La invención también abarca los cultivos de células de las células derivadas de la placenta de la invención. Los cultivos de la invención son capaces preferiblemente de al menos 40 duplicaciones de la población sobre la siembra inicial.

**[0037]** La célula y composiciones de la invención pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento de condiciones o

reparación del tejido. En algunas realizaciones de la invención, la condición a ser tratada es una condición de los tejidos blandos (por ejemplo, piel, músculo, vasos, tendones, ligamentos, vejiga, fascia, suelo pélvico), hueso, páncreas, riñón, hígado, sistema nervioso, ojo, corazón, o cartílago.

5 **[0038]** Los métodos de la invención incluyen además métodos para producir una población de células de la placenta-derivados por expansión de una célula de la invención en cultivo.

**[0039]** Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y los ejemplos que siguen.

10

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

### Definiciones

15 **[0040]** Varios términos utilizados en la especificación y reivindicaciones se definen como se indica a continuación.

**[0041]** Las células madre son células no diferenciadas definidas por su capacidad a nivel de células individuales tanto para auto-renovar como diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitores de auto-renovación, progenitores no-renovables de células y células terminales diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a los tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

20 **[0042]** Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) *totipotente* - capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionario; (2) *pluripotentes* - capaz de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias; (3) *multipotentes* - capaz de dar lugar a un subconjunto de los linajes de células, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una progenie que incluyen HSC (auto-renovación), de glóbulos restringidos progenitores oligopotentes, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre); (4) *oligopotente* - capaz de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes de células que las células madre multipotentes; y (5) *unipotente* - capaz de dar lugar a un único linaje de células (por ejemplo, células madre de espermatogénesis).

25 **[0043]** Las células madre también se clasifican sobre la base de la fuente de la que se pueden obtener. Una *célula madre adulta* es generalmente una célula indiferenciada multipotente que se encuentra en el tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre adulta puede renovarse y, en circunstancias normales, diferenciarse para producir los tipos especializados de células del tejido del que se originó, y posiblemente otros tipos de tejidos. Una célula madre embrionaria es una célula pluripotente de la masa celular inteARN de un embrión en fase de blastocisto. Una célula madre fetal es una que se origina a partir de tejidos o membranas fetales. Una célula madre es una célula de posparto multipotente o pluripotente que se origina sustancialmente a partir de tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, a saber, la placenta y del cordón umbilical. Se ha encontrado que estas células poseen rasgos característicos de las células madre pluripotentes, incluyendo la rápida proliferación y el potencial de diferenciación en muchos linajes celulares. Células madre posparto pueden ser derivadas de la sangre (por ejemplo, como son los obtenidos a partir de sangre de cordón umbilical) o no derivadas del sangre (por ejemplo, tal como se obtiene de los tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y la placenta).

30 **[0044]** *Tejido embrionario* se define típicamente como tejido de origen del embrión (que en los seres humanos se refiere al período de la fertilización a aproximadamente seis semanas de desarrollo. Tejido fetal se refiere al tejido procedente del feto, que en los seres humanos se refiere al período de alrededor de seis semanas de desarrollo a parto. Tejido extraembrionario es el tejido asociado con, pero que no se origina a partir del embrión o el feto. Tejidos extraembrionarios incluyen membranas extraembrionarias (corion, amnios, saco vitelino y alantoides), cordón umbilical y la placenta (que a su vez se forma a partir del corion y la decidua basal materna).

35 **[0045]** La *diferenciación* es el proceso por el cual una célula ("no comprometida") no especializada o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula diferenciada o la diferenciación inducida es una que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término cometido, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación a un punto en el que, en circunstancias normales, continuará para diferenciarse en un tipo celular específico o un subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de células menos diferenciadas. *De-diferenciación* se refiere al proceso por el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. En la presente memoria, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de dónde las células venían y qué células se pueden. El linaje de una célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un marcador de linaje específico se refiere a una característica asociada específicamente con el fenotipo de las células de un linaje de

interés y se puede utilizar para evaluar la diferenciación de una célula no comprometida con el linaje de interés.

**[0046]** En un sentido amplio, una célula progenitora es una célula que tiene la capacidad de crear progenie que es más diferenciada de sí misma y sin embargo, conserva la capacidad para reponer la reserva de progenitores. Según esta definición, las células progenitoras mismas también son células madre, que son los precursores más inmediatos a las células terminales diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, como se describe en mayor detalle a continuación, esta amplia definición de células progenitoras se puede utilizar. En un sentido más estricto, una célula progenitora se define a menudo como una célula que es intermedia en la vía de diferenciación, es decir, que surge de una célula madre y es intermedia en la producción de un tipo de célula madura o un subconjunto de tipos de células. Este tipo de células progenitoras en general, no es capaz de auto-renovación. Por consiguiente, si este tipo de célula se denomina en el presente documento, se refiere como una *célula progenitora no renovadora* o como un *progenitor intermedio* o *célula precursora*.

**[0047]** Tal como se usa aquí, la frase *se diferencia en un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico* se refiere a una célula que se encuentra comprometida en un linaje específico mesodérmico, ectodérmico o endodérmico, respectivamente. Los ejemplos de células que se diferencian en un linaje mesodérmico o dan lugar a células específicas mesodérmicas incluyen, pero no se limitan a células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, hemangiogénicas, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas, o estromales. Los ejemplos de células que se diferencian en el linaje ectodérmico incluyen, pero no se limitan a las células epidérmicas, células neurogénicas, y células neurogliagénicas. Ejemplos de células que se diferencian en linaje endodérmico incluyen, pero no se limitan a las células pleurigénicas, y las células hepatógenas, las células que dan lugar a la mucosa del intestino, y las células que dan lugar a células pancreogénicas y splancogénicas.

**[0048]** Las células de la presente invención se conocen como células derivadas de la placenta (PDC). También se puede hacer referencia a ellas aquí como células derivadas de posparto o células después del parto (PPDCs). Además, las células pueden ser descritas como células madre o progenitoras, este último término se utiliza en el sentido amplio. El término *privado* se utiliza para indicar que las células se han obtenido a partir de su fuente biológica y cultivadas o de otro modo manipuladas *in vitro* (por ejemplo, se cultivan en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de células de la placenta y las características únicas derivadas de las células derivadas de la placenta de la presente invención se describen en detalle a continuación.

**[0049]** Varios términos se utilizan para describir las células en cultivo. El *cultivo celular* se refiere generalmente a las células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo condiciones controladas ("en el cultivo"). Un cultivo de células primarias es un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de los organismos y antes del primer subcultivo. Las células se expanden en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, lo que resulta en una mayor población de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación de las células a veces se mide por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número. Esto se conoce como tiempo de duplicación.

**[0050]** Una *línea celular* es una población de células formadas por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se conoce como un *pasaje*. Cuando se subcultivan las células, se dice que han sido pasajeadas. A una población específica de células, o una línea celular, se refiere a veces o se caracteriza por el número de veces que se ha cultivado. Por ejemplo, una población de células cultivadas que ha sido pasajeado diez veces puede ser denominada como un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo siguiendo el aislamiento de células a partir de tejido, se denomina P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o el paso 1). Después del segundo subcultivo, las células se vuelven un cultivo terciario (P2 o el paso 2), y así sucesivamente. Se entenderá por los expertos en la técnica que puede haber muchas duplicaciones de población durante el período de pasaje; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es mayor que el número de pasajes. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo comprendido entre los pasajes depende de muchos factores, incluyendo pero no limitado a la densidad de siembra, sustrato, medio, y el tiempo entre los pasajes.

**[0051]** Un *medio acondicionado* es un medio en el que se ha cultivado una célula o población de células específicas, y después removido. Mientras que las células se cultivan en el medio, que secretan factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, pero no están limitados a hormonas, citoquinas, la matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos, y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio condicionado.

**[0052]** En general, un factor trófico se define como una sustancia que promueve la supervivencia, el crecimiento, la proliferación, el mantenimiento, la diferenciación y/o la maduración de una célula, o estimula el aumento de la actividad de una célula.

**[0053]** Cuando se hace referencia a las células de vertebrados en cultivo, el término *senescencia* (también *senescencia replicativa* o *senescencia celular*) se refiere a una propiedad atribuible a los cultivos celulares finitos; a



saber, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de la población (a veces denominado como límite de Hayflick). A pesar de que la senescencia celular se describió primero por el uso de células similares a fibroblastos, la mayoría de los tipos de células humanas normales que pueden cultivarse con éxito en el cultivo se someten a la senescencia celular. La vida útil *in vitro* de diferentes tipos de células varía, pero la vida útil máxima es típicamente menos de 100 duplicaciones de la población (esto es el número de duplicaciones para todas las células en el cultivo para convertirse en senescente y por lo tanto hacer que el cultivo sea incapaz de dividirse). La senescencia no depende de tiempo cronológico, sino que se mide por el número de divisiones celulares o duplicaciones de la población, el cultivo ha experimentado. Por lo tanto, las células hechas de reposo mediante la eliminación de los factores de crecimiento esenciales son capaces de reanudar el crecimiento y la división cuando se vuelvan a introducir los factores de crecimiento, y, posteriormente, llevar a cabo el mismo número de duplicaciones a medida que células equivalentes se cultiven continuamente. Del mismo modo, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de varios números de duplicaciones de población y después se descongelan y cultivan, se someten a sustancialmente el mismo número de duplicaciones como células mantenidas en cultivo no congelado. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; en realidad son resistentes a la muerte celular programada (apoptosis), y se han mantenido en su estado de no división de hasta tres años. Estas células son muy vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. El estado de no división de células senescentes no ha demostrado ser reversible por cualquier agente biológico, químico, o viral.

**[0054]** Tal como se utiliza aquí, el término medio de crecimiento se refiere a un medio de cultivo suficiente para la expansión de células derivadas de la placenta. El medio de cultivo de medio de crecimiento contiene preferiblemente los medios de comunicación esenciales modificados de Dulbecco (DMEM). Más preferiblemente, el medio de crecimiento contiene glucosa. El medio de crecimiento contiene preferiblemente DMEM-de glucosa baja (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio de crecimiento contiene preferiblemente de aproximadamente 15% (v/v) de suero (por ejemplo, suero bovino fetal, suero bovino definido). El medio de crecimiento contiene preferiblemente al menos un agente antibiótico y/o agente antimicótico (por ejemplo, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina, nistatina, preferiblemente 50 unidades/mililitro de penicilina G sódica y sulfato de estreptomina 50 microgramos/mililitro). El medio de crecimiento contiene preferentemente 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). Más preferiblemente, el medio de crecimiento contiene DMEM-de glucosa baja, suero, 2-mercaptoetanol, y un agente antibiótico y el agente antimicótico.

**[0055]** Como se usa en el presente documento, *condiciones de crecimiento estándar* se refiere a las condiciones atmosféricas estándar que comprenden 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura en el intervalo de 35°C a 39°C, más preferiblemente, 37°C, y una humedad relativa de aproximadamente 100%.

**[0056]** El término *aislado* se refiere a una célula, componente celular, o una molécula que se ha eliminado de su entorno nativo. PDC, por ejemplo, se pueden aislar en algunas realizaciones de la invención.

**[0057]** El término *aproximadamente* se refiere a una aproximación de un valor declarado dentro de un rango de  $\pm 10\%$ .

**[0058]** El término *tratar* (o tratamiento) de una condición se refiere a la mejora de los efectos de, o retraso de, detención de o reversión del progreso de, o retraso o prevención de la aparición de una condición tal como, pero no limitado a una anomalía congénita, enfermedad o lesión.

**[0059]** La *cantidad eficaz* se refiere a una concentración de una composición de reactivo o farmacéutica, tal como un factor de crecimiento, agente de diferenciación, factor trófico, población celular u otro agente, que es eficaz para producir un resultado deseado, incluyendo el crecimiento celular y/o la diferenciación *in vitro* o *in vivo*, o el tratamiento de una condición como se describe aquí. Con respecto a los factores de crecimiento, una cantidad eficaz puede variar de aproximadamente 1 nanogramo/mililitro a aproximadamente 1 microgramo/mililitro. Con respecto a PDC como administran a un paciente *in vivo*, una cantidad eficaz puede variar desde tan pocos como varios cientos o menos a tantos como varios millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad eficaz puede variar desde  $10^3$  a  $10^{11}$ . Se apreciará que el número de células a administrar variará dependiendo de las características específicas de la enfermedad a tratar, incluyendo, pero no limitado al tamaño o área total de volumen/superficie a tratar, así como la proximidad del sitio de administración a la localización de la región a tratar, entre otros factores familiares para el biólogo medicinal. **[0060]** Los términos *período efectivo* (o tiempo) y *condiciones eficaces* se refieren a un período de tiempo o de 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.

**[0061]** El término *paciente* o *sujeto* se refiere a animales, incluyendo mamíferos, preferiblemente seres humanos, que son tratados con las composiciones farmacéuticas o de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

**[0062]** El término *matriz* tal como se utiliza aquí, se refiere a un soporte para los PPDCs de la invención, por ejemplo, un andamio (por ejemplo, VICRYL, PCL/PGA, o RAD16) o medio de soporte (por ejemplo, hidrogel, proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA)).

**[0063]** El término *portadores farmacéuticamente aceptables (o Medio)*, que se puede usar de forma intercambiable con el término *vehículo biológicamente compatible o medio*, se refiere a formas reactivas, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otra complicación acorde con una razonable de beneficio/riesgo relativo. Como se describe en mayor detalle en el presente documento, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para uso en la presente invención incluyen líquidos, materiales semi-sólidos (por ejemplo, geles) y sólidos (por ejemplo, andamios celulares). Tal como se utiliza aquí, el término biodegradable describe la capacidad de un material que se descompone (por ejemplo, degradado, erosionado, disuelto) *in vivo*. El término incluye la degradación *in vivo* con o sin la eliminación (por ejemplo, mediante la reabsorción) del cuerpo. Los materiales semisólidos y sólidos pueden ser diseñados para resistir la degradación en el cuerpo (no biodegradable) o pueden ser diseñados para degradarse en el cuerpo (biodegradable, bioerosionable). Un material biodegradable puede ser además biorreabsorbible o bioabsorbible, es decir, se puede disolver y se absorbe en los fluidos corporales (implantes solubles en agua son un ejemplo), o degradado y, finalmente, eliminado del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o desglose y la eliminación a través de vías naturales.

**[0064]** Varios términos se utilizan aquí con respecto a la terapia de reemplazo celular. Los términos de transferencia autóloga, trasplante autólogo, autoinjerto y similares se refieren a los tratamientos en el que el donante de la célula es también el receptor de la terapia de reemplazo celular. Los términos de transferencia alogénica, trasplante alogénico, aloinjertos y similares se refieren a los tratamientos en el que el donante de la célula es de la misma especie que el receptor de la terapia de sustitución celular, pero no es el mismo individuo. A la transferencia de células en la que las células del donante han sido emparejadas histocompatiblemente con un receptor se refiere a veces como una *transferencia singénica*. Los términos de transferencia de xenogénico, trasplantes xenogénicos, xenoinjertos y similares se refieren a los tratamientos en el que el donante de la célula es de una especie diferente que el destinatario de la terapia de reemplazo celular.

**[0065]** Las siguientes abreviaturas se usan en este documento:

ANG2 (o *Ang2*) para angiopoyetina 2;  
 APC para células presentadoras de antígeno;  
 BDNF para el factor neurotrófico derivado del cerebro;  
 bFGF para el factor de crecimiento de fibroblastos básico;  
 bid (BID) para "bis in die" (dos veces al día);  
 BSP para sialoproteína ósea;  
 CK18 para citoqueratina 18;  
 ligando CXC 3 para el ligando del receptor de quimioquinas 3;  
 DAPI de 4'-6-diamidino-2-fenilindol-2 HCl;  
 DMEM por medio esencial mínimo de Dulbecco;  
 DMEM: Ig (o *DMEM Lg*, *DMEM: LG*) de DMEM con bajo nivel de glucosa;  
 EDTA para ácido etilendiaminotetraacético;  
 EGF (o *E*) para el factor de crecimiento epidérmico;  
 EPO de eritropoyetina;  
 FACS para clasificación activada de células fluorescente;  
 FBS para suero bovino fetal;  
 FGF (o *F*) para el factor de crecimiento de fibroblastos;  
 GCP-2 de la proteína quimiotáctica de granulocitos-2;  
 GDF-5 para el crecimiento y factor de diferenciación 5;  
 GFAP para la proteína ácida glial fibrilar;  
 HB-EGF para el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina;  
 HCAEC para las células endoteliales de arteria coronaria humana;  
 HGF para el factor de crecimiento de hepatocitos;  
 hMSC para las células madre mesenquimatosas humanas;  
 HNF-1 *alfa* para el factor de transcripción específica de hepatocitos;  
 HUVEC para las células endoteliales de la vena umbilical humana;  
 I309 para una quimioquina y el ligando para el receptor de CCR8 y es responsable de la quimioatracción de células T de tipo Th2;  
 IGF para el factor de crecimiento similar a la insulina;  
 IL-6 para la interleucina-6;  
 IL-8 de la interleucina 8;  
 K19 de queratina 19;  
 K8 para la queratina 8;  
 KGF para el factor de crecimiento de queratinocitos;  
 MCP-1 para proteína quimiotáctica de monocitos 1;  
 MDC para quimiocina derivada de macrófagos;  
 MIP1 *alfa* para proteína inflamatoria de macrófagos 1 *alfa*;  
 MIP1 *beta* para proteína inflamatoria de macrófagos 1 *beta*;

- MMP* de metaloproteasas de matriz (MMP);  
*MSC* para las células madre mesenquimáticas;  
*NHDF* para fibroblastos dérmicos humanos normales;  
*NPE* para los medios de expansión progenitoras neurales;  
5 *OxLDLR* para el receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada;  
*PBMC* de células mononucleares de sangre periférica;  
*PBS* para solución salina tamponada de fosfato;  
*PDC* para célula derivada de placenta;  
*PDGFbb* para el factor de crecimiento derivado de plaquetas;  
10 *PDGFr-alfa* para derivado de plaquetas alfa del receptor del factor de crecimiento;  
*PD-L2* para ligando muerto programado 2;  
*PE* para ficoeritrina;  
*PO* para "per os" (por la boca);  
*PPDC* para la célula posparto derivada;  
15 *Rantes* (o *RANTES*) para regulado en la activación normal de células T expresadas y secretadas;  
*rb* para conejo  
*rh* para recombinante;  
*SC* por vía subcutánea;  
*SCID* de la inmunodeficiencia combinada grave;  
20 *SDF-1 alfa* para el factor 1 alfa derivado del estroma;  
*SHH* para el erizo sónico;  
*SMA* para actina de músculo liso;  
*SOP* para el procedimiento operativo estándar;  
*TARC* para el timo y la quimiocina regulada por activación;  
25 *TCP* para el plástico de cultivo de tejidos;  
*TGFbeta2* de factor de crecimiento transformante beta 2;  
*TGFbeta-3* para la transformación del factor de crecimiento beta-3;  
*TIMP1* de tejido inhibidor de metaloproteinasas de matriz 1;  
*TPO* para la trombopoyetina;  
30 *TuJ1* para BIII Tubulina;  
*UDC* para celular derivada del cordón umbilical;  
*VEGF* para el factor de crecimiento endotelial vascular;  
*vWF* para el factor de von Willebrand; y  
*alfaFP* de alfa-fetoproteína.

35 **Descripción**

[0066] En un aspecto, la invención proporciona células derivadas de la placenta (PDC) derivadas de tejido placentario lavado sustancialmente libre de sangre. Las placentas de las que derivan las células son placentas post-parto. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo. Las células derivadas de la placenta tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. En formas de realización preferidas, las células pueden diferenciarse en una célula ectodérmica, mesodérmica o endodérmica. Las células se aíslan de tejidos de la placenta, en lugar de la sangre de la placenta.

[0067] Las células se han caracterizado como a varias de sus propiedades celulares, genéticas, inmunológicas, y bioquímicas. Por ejemplo, las células se han caracterizado por su crecimiento, por sus marcadores de superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad de producir ciertos factores tróficos bioquímicos, y por sus propiedades inmunológicas.

50 **Derivación y expansión de células derivadas de la placenta (PDC)**

[0068] De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, una placenta de los mamíferos se recupera en el momento o poco después de la terminación de un embarazo a término o embarazo antes de término, por ejemplo, después de su expulsión después del nacimiento. El tejido de placenta se puede obtener de cualquier embarazo completado, a término o no a término, ya sea por vía vaginal, o por otros medios, por ejemplo, la sección cesárea. La placenta puede ser transportada desde el lugar de nacimiento a un laboratorio en un recipiente estéril, tal como un frasco, matraz, placa de cultivo, o una bolsa. El recipiente puede tener una solución o medio, incluyendo, pero no limitado a una solución de sal, tal como, por ejemplo, el Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier solución utilizada para el transporte de órganos utilizada para el trasplante, tales como la solución de la Universidad de Wisconsin o solución perfluorada. Uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos, tales como, pero no limitado a la penicilina, estreptomycin, anfotericina B, gentamicina y nistatina, pueden añadirse al medio o tampón. La placenta se puede enjuagar con una solución anticoagulante tal como una solución que contiene heparina. Es preferible mantener el tejido en alrededor de 4 a 10°C antes de la extracción de PDC. Es aún más preferible que el tejido no se congele antes de la extracción de PDC.

**[0069]** El aislamiento de PDC tiene lugar preferiblemente en un ambiente aséptico. El cordón umbilical se elimina de la placenta por medios conocidos en la técnica. el tejido de la placenta se lava sustancialmente libre de sangre y residuos antes de la derivación de las PDC. Por ejemplo, el tejido de la placenta se puede lavar con una solución tampón, tal como pero no limitado a tampón de fosfato salino. El tampón de lavado puede comprender también uno o más agentes antimicóticos y/o antibióticos, tales como, pero no limitado a la penicilina, estreptomycin, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

**[0070]** En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos de células presentes en el tejido después del parto se fraccionan en subpoblaciones de las que las PDC se pueden aislar. Esto puede lograrse usando técnicas de separación de células incluyendo, pero no limitado a, tratamiento enzimático para disociar el tejido después del parto en sus células componentes, seguido por la clonación y selección de tipos celulares específicos, por ejemplo, pero no limitado a la selección basada en marcadores morfológicos y/o bioquímicos; el crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), la destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativo); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con la aglutinina de soja; congelar y descongelar los procedimientos; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; tracción filtro; centrifugación convencional y zonal; la decantación centrífuga (centrifugación contra-corriente); unidad de separación por gravedad; distribución en contracorriente; electroforesis; y citometría de flujo, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

**[0071]** En una realización preferida, el tejido de la placenta que comprende toda una placenta o un fragmento o sección de la misma se desagrega por la fuerza mecánica (picado o fuerzas de cizallamiento), la digestión enzimática con las enzimas proteolíticas individuales o combinatorios, como una metaloproteasa de matriz y/o neutral proteasa, por ejemplo, colagenasa, tripsina, dispasa, LIBERASE™ (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), hialuronidasa, y/o pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Por ejemplo, el componente celular del tejido de la placenta puede desagregarse por métodos que utilizan la disociación con colagenasa-mediada. La colagenasa puede ser de tipo 1, 2, 3, o 4. Métodos de digestión enzimática emplean preferiblemente una combinación de enzimas, tales como una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. Más preferiblemente, la digestión enzimática de tejido placentario utiliza una combinación de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra, y una enzima mucolítica para la digestión del ácido hialurónico, tal como una combinación de la colagenasa, dispasa, y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE™ (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) y hialuronidasa. Otras enzimas conocidas en la técnica para el aislamiento de células incluyen papaína, desoxirribonucleasas, proteasas de serina, tales como tripsina, quimotripsina o la elastasa, que pueden ser utilizadas ya sea solas o en combinación con otras enzimas tales como las metaloproteasas de matriz, enzimas mucolíticas y proteasas neutras. Las proteasas de serina se utilizan preferiblemente en uso consecutivo siguiente al uso de otras enzimas. La temperatura y el período de tiempo que los tejidos o las células estén en contacto con las proteasas de serina es particularmente importante. Las proteasas de serina pueden ser inhibidas por la microglobulina alfa 2 en suero y, por tanto, el medio utilizado para la digestión es por lo general libre de suero. EDTA y ADNsa se utilizan comúnmente en procedimientos de digestión de enzimas para aumentar la eficiencia de la recuperación celular. El grado de dilución de la digestión también puede afectar en gran medida al rendimiento de células, ya que las células pueden quedar atrapados dentro de la digestión viscosa.

**[0072]** En algunas realizaciones de la invención, el tejido de la placenta se separa en dos o más secciones, cada sección que consiste en cualquier aspecto neonatal, neonatal y materno, o materno. Las secciones separadas a continuación se disocian por disociación mecánica y/o enzimática de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Las células de linaje maternal o neonatal pueden ser identificadas por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, por análisis de cariotipo o hibridación *in situ* para un cromosoma Y. El análisis de cariotipos también se puede utilizar para identificar las células de cariotipo normal.

**[0073]** Las células aisladas o tejido de la placenta de la que crecen PDC pueden ser utilizados para iniciar, o sembrar cultivos celulares. Las células se transfirieron a recipientes de cultivo de tejidos estériles o bien no recubiertos o con la matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA)). PDC se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sostener el crecimiento de las células tales como, pero no limitado a, DMEM (glucosa alta o baja), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, Medio de Crecimiento de Células de Mesenquimales (MSCGM), Medio de Liebovitz L-15, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, avanzó DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), y CELL-GRO FREE. El medio de cultivo se puede complementar con una o más composiciones componentes incluyendo, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferiblemente de aproximadamente 2 a 15% (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferiblemente de aproximadamente 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y la eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos/antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomycin, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solo o en combinación. El

medio de cultivo comprende preferiblemente medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa), suero, BME, un agente antimicótico y un agente antibiótico).

5 **[0074]** Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. Por ejemplo, las células se pueden sembrar a baja densidad (por ejemplo, aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup>) a alta densidad (por ejemplo, aproximadamente 50.000 o más células/cm<sup>2</sup>). En una realización preferida, las células se cultivaron a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO<sub>2</sub> en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivaron a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O<sub>2</sub> en el aire, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O<sub>2</sub> en el aire. 10 Las células preferiblemente se cultivan a aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C, más preferiblemente de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C, y más preferiblemente se cultivan a 37°C. Las células son preferiblemente cultivadas en una incubadora. El medio en el cultivo recipiente puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. PDC preferiblemente se cultivan en condiciones de baja tensión oxidativa (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína). "Estrés oxidativo bajo", 15 como se usa aquí, se refiere a condiciones de daño de radical libre a las células cultivadas ausentes o mínimas.

**[0075]** Los métodos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación del medio, y técnicas de cultivo de células son bien conocidas en la técnica y se describen en una variedad de fuentes, incluyendo Doyle et al., (Eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston. 20

**[0076]** Se cambia el medio de cultivo según sea necesario, por ejemplo, mediante la aspiración cuidadosa del medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y la reposición con medio fresco. La incubación se continúa hasta que un número o densidad de células suficiente se acumulan en el plato. Las secciones de tejido explantadas originales 25 pueden ser removidas y las células restantes tripsinizadas utilizando técnicas estándar o utilizando un rascador de células. Después de tripsinización, se recogen las células, se extraen a un medio fresco y se incuban como anteriormente. En algunas formas de realización, el medio se cambió al menos una vez en aproximadamente 24 horas después de la tripsinización para retirar las células flotantes. Se considera que las células restantes en el cultivo son PDC. **[0077]** Después de cultivar las células o fragmentos de tejido durante un período de tiempo suficiente, PDC se habrá cultivado, ya sea como resultado de la migración del tejido de la placenta o la división celular, o ambos. En algunas realizaciones de la invención, PDC se pasa, o se traslada a un recipiente de cultivo separado que contiene un medio fresco de las mismas o un tipo diferente que la utilizada inicialmente, donde la población de células se puede expandir mitóticamente. PDC se pasan preferiblemente hasta aproximadamente 100% de confluencia, más preferiblemente de aproximadamente 70 a aproximadamente 85% de confluencia. El límite inferior de confluencia para el paso se entiende por un experto en la técnica. Las células de la invención se 35 pueden usar en cualquier punto entre el paso 0 y la senescencia. Las células preferiblemente se pasan entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, se pasan más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferiblemente se pasan 10 o 11 veces. La clonación y/o subclonación se pueden realizar para confirmar que una población clonal de las células ha sido aislada. 40

**[0078]** Las células de la invención pueden ser criopreservadas. PDC son preferiblemente criopreservadas en un medio de criopreservación, por ejemplo, medio de cultivo incluyendo, pero no limitado a medio de crecimiento, o medio de congelación de células, por ejemplo medio de congelación de células comercialmente disponible, tales como, pero no limitado a C2695 (Sigma), C2639 (Sigma), o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación comprende preferiblemente dimetilsulfóxido (DMSO), por ejemplo aproximadamente 10% (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes de crioconservación adicionales, incluyendo pero no limitado a metilcelulosa y/o glicerol. Las células se enfrían preferiblemente a aproximadamente 1°C/min. La temperatura de crioconservación preferida es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, más preferiblemente es de aproximadamente -90°C a aproximadamente -160°C, y lo más preferiblemente es de aproximadamente -125 a aproximadamente -140°C. células crioconservadas se transfieren preferiblemente a nitrógeno líquido antes de la descongelación para el uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas se han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Células crioconservadas reservadas preferiblemente se descongelan a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, más preferiblemente de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C, y más preferiblemente de 50 aproximadamente 37°C. 55

### Caracterización de las PDC

**[0079]** PDC se pueden caracterizar, por ejemplo, por las características de crecimiento (por ejemplo, duplicación de la capacidad de la población, el tiempo de duplicación, pasajes a la senescencia), análisis de cariotipo (por ejemplo linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítopos incluyendo, pero no limitado a la vimentina, desmina, actina de músculo liso alfa, citoqueratina 18, factor de von Willebrand, CD34, GROalfa, GCP-2, receptor de lipoproteína de baja densidad oxidizado 1, y NOGO-a), perfiles de expresión génica (por ejemplo, ensayos de chips de genes; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, y PCR convencional)), ensayos de proteínas, la secreción de proteínas (por ejemplo, mediante ensayo de coagulación 60 65

de plasma o el análisis de medio acondicionado PDC, por ejemplo, mediante análisis de inmunoabsorción enzimática (ELISA)), el análisis de anticuerpos (por ejemplo, ELISA, tinción de anticuerpos de marcadores de superficie celular incluyendo, pero no limitado a, CD10, CD 13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD80, CD86, CD90, CD117, CD141, CD178, derivado de plaquetas alfa del receptor del factor de crecimiento (PDGFR-alfa), HLA de antígenos de clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), HLA de antígenos de clase II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR), B7-H2, y PD-L2), reacción mixta de linfocitos (por ejemplo, como medida de la estimulación de asignaciones de células mononucleares de sangre periférica alogeneicas (PBMCs), por ejemplo, linfocitos alogénicos, por ejemplo, células ingenuas T CD4+), u otros métodos conocidos en la técnica.

10 **[0080]** Las células derivadas de la placenta de la invención preferentemente se derivan de tejido de la placenta después del parto humano sustancialmente libre de sangre. PDC son capaces de auto-renovación y expansión del cultivo y tienen el potencial de diferenciar en células de otro fenotipo. PDC requieren L-valina para el crecimiento. PDC preferiblemente son capaces de crecimiento en aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de oxígeno. PDC de la descripción comprenden preferiblemente al menos una de las siguientes características:

15 (a) producción de al menos uno de factor tisular, vimentina, la proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), y actina muscular lisa alfa;

(b) la falta de producción de al menos uno de GRO-alfa y receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada, detectada por citometría de flujo;

(c) la producción de al menos uno de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C;

20 (d) la falta de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DP, DQ, DR, detectada por citometría de flujo;

(e) expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para al menos uno de miembro de superfamilia de lectina A2 de tipo C, tumor de Wilms 1, Dehidrogenasa - miembro de la familia drogenasa 1 A2, renina, receptor de lipoproteínas oxidado de baja densidad 1, quinasa de proteína C zeta, clon IMAGEN:4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, subregulado en el cáncer de ovario 1, y el clon DKFZp547K1113;

25 (f) la expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se reduce por al menos uno de: baja estatura de homeobox 2; proteína 27kDa de choque térmico 2; quimiocina (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); mesénquima de homeobox 2; homólogo de homeobox sine oculis 1; cristalina, alfa B; activador asociado desgreñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; homólogo src tres (SH3) y el dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionada 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador procolágeno de endopeptidasa C;

30 homólogo rizado 7; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; homeobox de proteínas Iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína vesícula sináptica 2; ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; citoquina del factor-1 similar a receptor; canales de calcio activados/pequeña conductancia intermedia de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína de DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ); homólogo de homeobox sine oculis 2; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa de hidroxiesteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (a partir de DKFZp564B222 clon); proteína de membrana asociada a vesículas 5; proteína de la matriz extracelular que contiene EGF fibulina de tipo 1; BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa

35 proteína que interactúa de tipo 3; proteína AE de unión 1; citocromo c oxidasa de subunidad polipeptídica VIIa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína de unión de factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa;

40 (g) la secreción de al menos una de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), factor 1 alfa derivado del estroma (SDF-1 alfa), la interleucina 8 (IL8), de granulocitos de proteína quimiotáctica-2 (GCP-2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor de neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), inhibidor tisular de la metaloproteinasas de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), Rantes (reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas), timo y quimiocina regulada por activación (TARC), y eotaxina;

45 (h) la falta de secreción de al menos uno de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), 1309, y quimiocina derivada de macrófagos (MDC), como se detecta por ELISA; y

50 (i) la capacidad de someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo.

55 **[0081]** Duplicación de la población puede ser calculada como  $\ln(\text{célula final} / \text{célula inicial}) / \ln 2$ . El tiempo de duplicación se puede calcular como (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población).

65 **[0082]** En formas de realización preferidas de la divulgación, la célula comprende dos o más de las características anteriores. Más preferidas son las células que comprenden tres, cuatro, o cinco o más de las características. Aún

más preferidas son aquellas células posparto derivadas que comprenden seis, siete, u ocho o más de las características. Aún más preferidas son aquellas células que comprenden todas los nueve de las características reivindicadas.

5 **[0083]** También actualmente preferidas son células que producen al menos dos de GCP-2, factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa. Más preferidas son las células que producen tres o cuatro de las proteínas GCP-2, factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa.

10 **[0084]** En algunas realizaciones, las células de la invención no producen al menos uno de receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada o GRO-alfa, como se detecta por análisis FACS. En algunas realizaciones, las células no producen proteína como se detecta por análisis de FACS.

15 **[0085]** El experto en la técnica apreciarán que los marcadores de células están sujetas a variar algo bajo muy diferentes condiciones de crecimiento, y que generalmente se describe en el presente documento son caracterizaciones en medio de crecimiento, o variaciones de las mismas. Células derivadas de posparto que producen de al menos uno, dos, tres, o cuatro de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C son PPDCs preferidas de la divulgación. Más preferidas son las células productoras de cinco, seis, o siete de estos marcadores de la superficie celular. Aún más preferidas son células derivadas de posparto que pueden producir ocho de las proteínas marcadoras de la superficie celular que anteceden.

20 **[0086]** PPDCs que carecen de producción de al menos uno, dos, tres, cuatro de las proteínas CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR, DP, DQ, detectadas por citometría de flujo son PPDCs preferidas de la descripción. Se prefieren PPDCs que carecen de producción de al menos cinco, seis, siete u ocho o más de estos marcadores. Más preferidas son las células que carecen de producción de al menos nueve o diez de los marcadores de superficie celular. Más altamente preferidas son aquellas células que carecen de producción de once, doce o trece de las proteínas identificadoras.

25 **[0087]** Las células de la invención producen cada una de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, y HLA-A, B, C, y no producen ninguna de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, detectada por citometría de flujo.

30 **[0088]** Se prefiere que las células derivadas de posparto presentan una mayor expresión, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, por al menos uno, dos, o tres de C- tipo de miembro de lectina superfamilia A2, tumor de Wilms 1, deshidrogenasa de aldehído 1 miembro de la familia A2, renina, lipoproteínas oxidadas de baja densidad de receptores 1, quinasa de proteína C zeta, Clon IMAGEN: 4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, subregulado en el cáncer de ovario 1, y el clon DKFZp547K1113. Más preferidas son las células que presentan aumento de expresión de cuatro, cinco, seis, o siete, y aún más preferidas son células capaces de la expresión aumentada de ocho, nueve, o diez de los genes anteriores.

35 **[0089]** Para algunas formas de realización, se prefieren células que, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, han reducido la expresión de al menos uno de los genes correspondientes a: baja estatura homeobox 2; proteína 27kDa de choque térmico 2; quimiocina (C-X-C con motivos) ligando 12 (estromal el factor 1 derivado de células); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); mesénquima de homeobox 2; homólogo de homeobox sine oculis 1; cristalina, alfa B; activador asociado desgreñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; homólogo src tres (SH3) y el dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt-3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo rizado 7; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; homeobox de proteínas Iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína vesícula sináptica 2; ADNc FLJ12280 fis, Clon de MAMMA1001744; citoquina del receptor de factor-1 como; los canales de calcio activados/pequeña conductancia intermedia de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína de DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ); homólogo de homeobox sine oculis 2; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa de hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina beta tipo 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; guanilato ciclasa C receptor del péptido natriurético C/(atrionatri- uretic péptido receptor C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (a partir de DKFZp564B222 clon); proteína de membrana asociada a vesícula 5; proteína de la matriz extracelular que contiene EGF fibulina tipo 1; BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa proteína de interacción 3-como; proteína AE de unión 1; citocromo c oxidasa subunidad polipeptídica VIIa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y factor de crecimiento similar a la insulina proteína 2 de unión, 36 kDa. Más preferidas son células que tienen, en relación con los fibroblastos humanos, células madre mesenquimales, o células de médula ósea de la cresta ilíaca, la reducción de expresión de al menos 5, 10, 15 o 20 genes que corresponden a los enumerados anteriormente. Actualmente más preferidas son células con expresión reducida relativa de al menos 25, 30, o 35 de los genes correspondientes a las secuencias enumeradas. También más preferidas son aquellos

células posparto derivadas que tienen la expresión que se reduce, en relación con la de un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, de genes que corresponden a 35 o más, 40 o más, o incluso todas las secuencias de la lista.

5 **[0090]** La secreción de ciertos factores de crecimiento y otras proteínas celulares puede hacer que las células de la invención sean particularmente útiles. Las células derivadas de la placenta preferidas secretan al menos uno, dos, tres, o cuatro de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), factor 1 alfa derivado del estroma (SDF-1 alfa), la interleucina 8 (IL8), proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el tejido inhibidor de la metaloproteinasas de la matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), Rantes (reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas), timo y quimiocina regulada por activación (TARC), y eotaxina. Las células que secretan más de cinco, seis, siete u ocho de las proteínas enumeradas son también útiles y preferidas. Las células que pueden secretar al menos nueve, diez, once o más de los factores son más preferidas, como son células que pueden secretar doce, trece, o catorce, o incluso la totalidad de las proteínas en la lista anterior.

20 **[0091]** Mientras que la secreción de estos factores es útil, PDC puede también caracterizarse por su falta de secreción de factores en el medio. PDC que carecen de secreción de al menos uno, dos, tres, o cuatro de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), de crecimiento transformante beta2 de los factores (TGFbeta2), inflamatoria de macrófagos 1 beta de proteínas (MIP1b), I309, y quimiocina derivada de macrófagos (MDC), tal como se detectó por ELISA, se prefieren para su uso. Las células que se caracterizan por la falta de secreción de cinco, seis, o siete de las proteínas anteriores son más preferidas. También se prefieren las células que carecen de secreción de todos los factores mencionados anteriormente.

30 **[0092]** Los ejemplos de células derivadas de la placenta de la invención fueron depositados en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y asignados números de acceso ATCC de la siguiente manera: (1) designación de la cepa PLA 071003 (P8) se depositó el 15 de junio 2004 y asignación del número de acceso PTA-6074; (2) designación de cepa PLA 071003 (P11) se depositó 15 de junio de 2004 y asignación del número de acceso PTA-6075; y (3) designación de la cepa PLA 071003 (P16) se depositó el 16 de junio de 2004 y asignación del número de acceso PTA-6079.

35 **[0093]** PDC de la invención pueden ser aisladas. La invención proporciona composiciones de PDC, incluyendo poblaciones de PDC. En algunas realizaciones, la población es heterogénea. Una población heterogénea de células de la invención puede comprender al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% de PDC de la invención. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender además células madre no embrionarias o células progenitoras no embrionarias. En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo PPDCs (preferiblemente al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más PPDCs). La población de células homogéneas de la invención puede comprender células derivadas de la placenta neonatales o células derivadas de la placenta materna. La homogeneidad de una población de células se puede conseguir mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo), la separación del grano, o por la expansión clonal.

45 **[0094]** Las células de la invención pueden ser inducidas a diferenciarse a células de linaje o fenotipo mesodérmico, ectodérmico o endodérmico.

#### **Cultivo de PDC en un Medio Condrógeno**

50 **[0095]** PDC pueden ser inducidas a diferenciarse en un linaje condrogénico someténdolos a condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación. En algunas realizaciones, PDC pueden ser inducidas a diferenciarse a un linaje condrogénico mediante, por ejemplo, la puesta en contacto con PDC con factores específicos de crecimiento exógenos (por ejemplo, en cultivo), tales como, por ejemplo, uno o más de GDF-5 o factor de crecimiento transformante beta3 (TGF-beta3), con o sin ascorbato.

60 **[0096]** El medio condrogénico preferido se complementa con un agente antibiótico, aminoácidos incluyendo prolina y glutamina, piruvato de sodio, dexametasona, ácido ascórbico, y la insulina/tranferina/selenio. El medio condrogénico se complementa preferiblemente con hidróxido de sodio y/o colágeno. Más preferiblemente, el medio de cultivo condrogénico se complementa con colágeno. Las células pueden ser cultivadas a alta o baja densidad. Las células son preferiblemente cultivadas en ausencia de suero.

65 **[0097]** La diferenciación condrogénica se puede evaluar, por ejemplo, mediante tinción con safranina-O para la expresión de glicosaminoglicano o la tinción con hematoxilina/eosina.

#### **Cultivo de PDC en un Medio Adipogénico**



[0098] PDC pueden ser inducidas a diferenciarse en un fenotipo de linaje adipogénico sometiéndolos a diferenciación que inducen condiciones de cultivo celular. En algunas realizaciones, PDC se cultivan en un medio definido para la inducción de la diferenciación de un linaje adipogénico. Ejemplos de medios adipogénicos incluyen, pero no se limitan a, medios que contienen uno o más glucocorticoides (por ejemplo, dexametasona, indometasona, hidrocortisona, cortisona), insulina, un compuesto que eleva los niveles intracelulares de AMPc (por ejemplo, dibutilil-AMPc; 8-CPT - AMPc (8- (4) clorofeniltio) adenosina, 3', 5' monofosfato cíclico); 8- bromo-cAMP; dioctanoilo-cAMP; forskolina) y/o un compuesto que inhibe la degradación del AMPc (por ejemplo, un inhibidor de la fosfodiesterasa tales como isobutilmetilxantina (IBMX), metil isobutilxantina, teofilina, cafeína, indometacina), y suero.

[0099] La adipogénesis se puede evaluar por tinción con Oil-Red-O para determinar la presencia de la formación de gotitas de lípidos o mediante la detección de la expresión de PPAR gamma o leptina.

#### 15 Cultivo del PDC en un Medio Osteogénico

[0100] PDC pueden ser inducidas a diferenciarse en un fenotipo de linaje osteogénico sometiéndolos a diferenciación que inducen condiciones de cultivo celular. En algunas realizaciones, PDC se cultivan en medio osteogénico tal como, pero no limitado a, medios de comunicación (por ejemplo, DMEM de baja glucosa) que contiene aproximadamente  $10^{-7}$  molar y aproximadamente  $10^{-9}$  dexametasona molar en combinación con aproximadamente sal de fosfato de ascorbato 10 micromolar hasta aproximadamente 50 micromolar (por ejemplo, ascorbato-2-fosfato) y entre aproximadamente beta-glicerofosfato 10 nanomolar y aproximadamente 10 milimolar. El medio incluye preferiblemente suero (por ejemplo, suero bovino, suero de caballo). medio osteogénico también puede comprender uno o más agentes antibióticos/antimicóticos. El medio osteogénico se complementa preferiblemente con factor de crecimiento transformante beta (por ejemplo, TGF-beta1) y/o la proteína morfogénica ósea (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, o una combinación de los mismos; lo más preferiblemente BMP-4)

[0101] Las células pueden ser analizadas por un fenotipo osteogénico por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, la tinción de von Kossa o por la detección de marcadores osteogénicos tales como la osteocalcina, sialoproteína ósea, o la fosfatasa de alcalina.

#### Cultivo del PDC en Medio Neurogénico

[0102] PDC pueden ser inducidas a diferenciarse en un fenotipo de linaje neuronal sometiéndolos a diferenciación que inducen condiciones de cultivo celular. Esto puede lograrse por uno o más métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, como se ejemplifica en el presente documento, PDC pueden ser cultivadas en un medio neurogénico tal como una composición DMEM libre de suero/F12 que contiene hidroxianisol butilado, cloruro de potasio, insulina, forskolina, ácido valproico, y hidrocortisona.

[0103] Alternativamente, PDC puede ser chapadas en matraces recubiertos con laminina en Neurobasal-A medio (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contienen B27 (suplemento B27, Invitrogen), L-glutamina y penicilina/estreptomicina, la combinación de los cuales se denomina en este documento como medio de Expansión de Progenitores Neuronales (NPE). Medios NPE podrán completarse además con bFGF y/o EGF.

[0104] Alternativamente, PDC pueden ser inducidas a diferenciarse *in vitro* por (1) co-cultivo de las PDC con células progenitoras neuronales, o (2) el cultivo de las PDC en medio condicionado por células progenitoras neuronales.

[0105] La diferenciación de las PDC a un linaje neurogénico puede demostrarse mediante una morfología celular bipolar con procesos largos. Las poblaciones de células inducidas pueden mancharse positivamente para la presencia de nestina. PDC diferenciadas pueden ser evaluadas mediante la detección de nestina, TuJ1 (tubulina BIII), GFAP, tirosina hidroxilasa, 04, GABA, y la proteína básica de la mielina (MBP). En algunas realizaciones, PDC tienen la capacidad de formar cuerpos tridimensionales característicos de la formación de células madre neuronales de neuroesferas.

#### 55 Evaluación de la diferenciación

[0106] PDC pueden ser inducidas a diferenciarse a un linaje ectodérmico, endodérmico o mesodérmico. Métodos para caracterizar las células diferenciadas de la descripción que se desarrollan a partir de las PDC de la invención, incluyen, pero no se limitan a métodos histológicos, morfológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos, o el uso de marcadores de superficie celular, o genéticamente o molecularmente, o mediante la identificación de factores secretados por la célula diferenciada, y por las cualidades inductivas de las PDC diferenciadas.

#### Métodos de uso de las PDC o componentes o sus productos

#### 65 Ingeniería genética de PDC

**[0107]** Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para expresar una proteína terapéutica utilizando cualquiera de una variedad de vectores, incluyendo, pero no limitado a, la integración de vectores virales, por ejemplo, vector de retrovirus o vectores virales adeno-asociados; no integración de replicar vectores que, por ejemplo, vectores de virus papiloma, vectores de SV40, vectores adenovirales; o vectores víricos de replicación defectuosa. Otros métodos de introducción de ADN en las células incluyen el uso de liposomas, la electroporación, un disparador de partículas, o por inyección directa del ADN.

**[0108]** Células huésped se transforman o se transfectan con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos de control de expresión apropiado tales como secuencias de promotor o de potenciador, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable de preferencia.

**[0109]** Después de la introducción del ADN extraño, las células manipuladas pueden dejarse crecer en medio enriquecido y luego cambiarse a medio selectivo. El marcador seleccionable en ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y se crecen para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas de célula.

**[0110]** Este método se puede utilizar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan el producto del gen.

**[0111]** Cualquier promotor puede utilizarse para conducir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan al promotor/potenciador de CMV, SV40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o elastina promotor del gen. Preferiblemente, los elementos de control utilizados para controlar la expresión del gen de interés deben permitir la expresión regulada del gen de modo que el producto se sintetiza sólo cuando sea necesario *in vivo*. Si se desea la expresión transitoria, los promotores constitutivos se utilizan preferiblemente en un vector no integrante y/o de replicación defectuosa. Altemativamente, los promotores inducibles se podrían utilizar para conducir la expresión del gen insertado cuando sea necesario.

**[0112]** Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados con proteínas de metalotioneína y de choque térmico.

**[0113]** Ejemplos de regiones de control de la transcripción que exhiben especificidad de tejido que se han descrito y se pueden utilizar incluyen pero no se limitan a: región de control del gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al, 1984, Cell 38: 639; Ornitz et al, 1985, Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 50: 399; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515); región de control del gen de la insulina, que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315: 115); región de control del gen de proteína básica de mielina, activa en células de oligodendrocitos en el cerebro (Readhead et al, 1987, Cell 48: 703); cadena ligera de miosina-2 región de control de genes, que es activa en el músculo esquelético (Shani, 1985, Nature 314: 283); y región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica, que es activa en el hipotálamo (Mason et al, 1986, Science 234: 1372).

**[0114]** Las células de la invención pueden ser modificadas genéticamente para "knock out" o "knock down" de factores de expresión que promueven la inflamación o rechazo en la zona del implante. Técnicas moduladoras negativas para la reducción de los niveles de expresión del gen diana o niveles de actividad del producto del gen diana se discuten a continuación. "Modulación negativa", como se usa aquí, se refiere a una reducción en el nivel y/o actividad de gen diana producto en relación con el nivel y/o actividad del producto del gen diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo para una célula puede reducir o eliminar mediante la utilización de un número de técnicas que incluyen, por ejemplo, la inhibición de la expresión mediante la inactivación del gen completo (comúnmente denominado "knockout") utilizando la técnica de recombinación homóloga. Por lo general, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exon 5' para dicha región) es interrumpida por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, la prevención de la producción de ARNm normal a partir del gen diana y que resulta en la inactivación del gen. Un gen también puede ser inactivado mediante la creación de una delección en parte de un gen o mediante la supresión del gen entero. Mediante el uso de una construcción con dos regiones de homología al gen diana que son muy separadas en el genoma, las secuencias que intervienen las dos regiones se pueden eliminar (Mombaerts et al, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 88: 3084).

**[0115]** Antisentido, ADNzimas, ARN de interferencia pequeña, y moléculas de ribozima que inhiben la expresión del gen diana también pueden ser utilizados de acuerdo con la invención para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de los principales complejos de genes de histocompatibilidad (HLA) han mostrado ser más versátiles con respecto a las respuestas inmunes. Aún más, las moléculas de triple hélice pueden ser utilizadas en la reducción del nivel de actividad del gen diana.

**[0116]** Estas técnicas se describen en detalle por L.G. Davis et al. (eds), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn.

**[0117]** El uso de cualquiera de las técnicas anteriores, por ejemplo, la expresión de IL-1 puede ser eliminada o derribada en las células de la invención para reducir la producción de mediadores inflamatorios por las células de la

invención. Del mismo modo, la expresión de moléculas MHC de clase II puede ser eliminada o derribada con el fin de reducir el riesgo de rechazo del tejido implantado.

[0118] Una vez que las células de la invención han sido diseñadas genéticamente, se pueden implantar directamente en el paciente.

[0119] Alternativamente, las células de ingeniería genética se pueden usar para producir nuevo tejido *in vitro*, que se implanta a continuación en el sujeto.

#### La secreción de factores tróficos por PDC

[0120] La secreción de factores de crecimiento por PDC puede proporcionar soporte trófico para un segundo tipo de célula *in vitro* o *in vivo*. PDC pueden secretar, por ejemplo, la interleucina 8 (IL8), factor tisular, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor derivado de estroma-1 alfa (SDF-1 alfa), factor neurotrófico derivado de cerebros (BDNF), la interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), Rantes (reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas), timo y regulada por activación quimiocina (TARC), eotaxina, NGF, NT-3, IL-7, IL-1, SCF, AMPS, o cistatina-C en poblaciones sustancialmente homogéneas de células, que pueden aumentarse por una variedad de técnicas, incluyendo cultivo *ex vivo* de las células en medio definido químicamente.

[0121] En algunos aspectos de la invención, una población de PDC apoya la supervivencia, la proliferación, el crecimiento, el mantenimiento, la maduración, la diferenciación, o aumento de la actividad de las células incluyendo las células madre no embrionarias, tales como células madre neurales (NSC), células madre hematopoyéticas (HPC, en particular células madre CD34+), y sus mezclas, o de acuerdo con la divulgación, de las células madre embrionarias (ESC). En otras realizaciones, la población con el apoyo de la PDC es sustancialmente homogénea, sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo PDC (preferiblemente al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más PDC).

#### Medios condicionados de PDC

[0122] Otra realización de la invención presenta el uso de PDC para la producción de medio acondicionado. Se contemplan dichos medios condicionados de la descripción para el uso en cultivos *in vitro* o *ex vivo* de las células, por ejemplo, las células madre o progenitoras, o para el uso *in vivo*, por ejemplo, para apoyar las células trasplantadas (por ejemplo, poblaciones, homogéneas o heterogéneas de las PDC).

#### Co-cultivos de PDC con otros tipos de células

[0123] PDC tienen la capacidad para apoyar la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de otros tipos de células en el co-cultivo. Por consiguiente, en otra realización, PDC son co-cultivadas *in vitro* para proporcionar soporte trófico a otras células. Para co-cultivo, puede ser deseable para las PDC y las otras células deseadas a ser co-cultivadas bajo condiciones en las que los dos tipos de células están en contacto. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la siembra de las células como una población heterogénea de células en medio de cultivo o sobre un sustrato de cultivo adecuado. Alternativamente, las PDC primero pueden ser cultivadas hasta la confluencia y empleadas como un sustrato para el segundo tipo de célula deseado en cultivo. En esta última realización, las células pueden además estar físicamente separadas, por ejemplo, por una membrana o dispositivo similar, de tal manera que el otro tipo de células puede retirarse y utilizarse por separado siguiendo el período de cultivo de cooperación. El uso de PDC en co-cultivo para promover la expansión y diferenciación de otros tipos de células pueden encontrar aplicabilidad en la investigación y en áreas clínicas/terapéuticas. Por ejemplo, PDC co-cultivo puede ser utilizado para facilitar el crecimiento y la diferenciación de células de un fenotipo dado en cultivo, para los propósitos de investigación básica o para uso en ensayos de cribado de fármacos, por ejemplo. PDC co-cultivo también puede ser utilizado para la expansión *ex vivo* de células de un fenotipo dado para la administración posterior para fines terapéuticos. Por ejemplo, las células pueden ser cosechadas a partir de un individuo, se expanden *ex vivo* en co-cultivo con PDC, después se regresan a ese individuo (transferencia autóloga) o de otro individuo (transferencia alogénica o xenogénica). En estas realizaciones, se apreciará que, después de la expansión *ex vivo*, la población mixta de células que comprenden las PDC se podría administrar a un paciente en necesidad de tratamiento. Alternativamente, en situaciones en las que la transferencia autóloga es apropiada o deseable, las poblaciones de células co-cultivadas se pueden separar físicamente en cultivo, lo que permite la eliminación de las células autólogas para la administración al paciente.

#### Terapia celular

[0124] Como se ha demostrado en el presente documento, PDC se han demostrado para ser trasplantadas con eficacia en el cuerpo y para suministrar la función perdida en modelos animales aceptados para la previsibilidad de

la eficacia en seres humanos. Estos resultados apoyan una realización preferida de la invención, en la que las PDC se utilizan en la terapia celular para el tratamiento de una condición, lesión o enfermedad. Por ejemplo, PDC de la invención pueden usarse para tratar pacientes que requieren la reparación o sustitución de un tejido u órgano resultante de enfermedad o trauma o el fracaso del tejido para desarrollarse normalmente, o para proporcionar una función cosmética, tal como para aumentar características del cuerpo. Una vez trasplantadas en una ubicación de destino en el cuerpo, PDC pueden ellas mismas diferenciarse en uno o más fenotipos, o pueden proporcionar apoyo trófico para otros tipos de células *in vivo*, o pueden ejercer un efecto beneficioso en esas dos modas, entre otros.

**[0125]** PDC pueden administrarse solas (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. PDC se pueden administrar tal como se formula en una preparación farmacéutica con una matriz, o con vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Cuando PDC se administran con otras células, se pueden administrar simultánea o secuencialmente con otras células (ya sea antes o después de las otras células). Las células que se pueden administrar en conjunción con PDC incluyen, pero no se limitan a células multipotentes o pluripotentes. Las células de diferentes tipos se pueden mezclar con el PDC inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden ser co-cultivadas juntas durante un período de tiempo antes de la administración.

**[0126]** PDC se pueden administrar con otros fármacos beneficiosos o moléculas biológicas (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando PDC se administran con otros agentes, se pueden administrar juntos en una sola composición farmacéutica o en composiciones separadas farmacéuticas, de forma simultánea o secuencial con los demás factores bioactivos (ya sea antes o después de la administración de los otros agentes). Ejemplos de factores bioactivos incluyen agentes anti-apoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes anti-inflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de la IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, y NSAIDS (no esteroides anti-inflamatorios, por ejemplo, TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFEN); - agentes inmunomoduladores/ inmunosupresivos (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, como la ciclosporina, tacrolimus, inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetil); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-IL-2Ralfa del receptor (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos anti-células T policlonales (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo anti-célula T monoclonal OKT3)); agentes anti-trombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos de antitrombina, antagonistas del receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anti-plaquetas, inhibidores de anticuerpos contra el receptor de aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de las prostaglandinas, y plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, la coenzima Q-10, glutatona, L-cisteína, N-acetilcisteína). Los fármacos que pueden ser administrados co-incluyen anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden administrarse conjuntamente con el factor inhibidor de cicatriz como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 5.827.735.

**[0127]** En una realización, PDC se administran como células indiferenciadas, es decir, como se cultivaron en Medio de Crecimiento. Alternativamente, PDC pueden estar expuestas en cultivo a las condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo deseado y la descripción proporciona la administración de estas células diferenciadas.

**[0128]** Las células de la invención pueden ser implantadas quirúrgicamente, inyectadas, administradas (por ejemplo, por medio de un catéter o jeringa), o administradas de otro modo directa o indirectamente con el sitio en necesidad de reparación o aumento. Las vías de administración de las células de la invención o composiciones de las mismas incluyen, pero no se limitan a, vías de administración oral, nasal, intraarterial, parenteral, intravenosa, oftálmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral, intraventricular, ventricular intracerebroventricular, intratecal, intracisteARNI, intraespinal y/o peri-espinal mediante la entrega a través de agujas intracraneales o intravertebrales y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

**[0129]** Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, implantación quirúrgica en un lugar preciso en el cuerpo es típicamente un medio adecuado de administración. Las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas, sin embargo, se pueden administrar a un lugar más general (por ejemplo, a lo largo de un área difusa afectada, por ejemplo), de la que migran a un lugar determinado, por ejemplo, respondiendo a señales químicas.

**[0130]** También se describen los componentes celulares (por ejemplo, lisados de células o componentes de los mismos) o productos (por ejemplo, matriz extracelular, tróficos y de otros factores biológicos producidos naturalmente por PDC o por medio de la modificación genética, el medio acondicionado del cultivo PDC) de las PDC para uso en métodos de tratamiento en los que dicho uso comprende la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden dichos componentes celulares PDC o productos. Una vez más, estos métodos pueden comprender además la administración de factores bioactivos, tales como agentes anti-apoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF e inhibidores de caspasas); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, IL-6 e IL-1 inhibidores,

PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, y NSAIDS (no esteroides antiinflamatorios, por ejemplo, TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFEN); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, agentes, inhibidores de calcineurina, como la ciclosporina, tacrolimus, inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS); anti-proliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetil); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-IL-2Ralfa del receptor (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos anti-células T policlonales (por ejemplo, anti-timocitos globulina (ATG); anti-linfocitos globulina (ALG); monoclonal anti-T OKT3 anticuerpo celular)); agentes anti-génicos tromboembólicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometil cetona), compuestos de anti-trombina, antagonistas del receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anti-receptor de plaquetas, anticuerpos inhibidores de la aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de las prostaglandinas, y plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, la coenzima Q-10, el glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), anestésicos locales, y el factor inhibidor de cicatriz como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.827.735 .

**[0131]** Las formas de dosificación y los regímenes para la administración de PDC o cualquiera de las otras composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrollan de acuerdo con la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado del paciente individual, por ejemplo, la naturaleza y extensión de la afección que se trata, la edad, sexo, peso corporal y estado médico general, y otros factores conocidos por los médicos. Así, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica a administrar a un paciente es determinada por estas consideraciones tal como se conocen en la técnica.

**[0132]** En algunas realizaciones de la invención, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir a un paciente antes de la iniciación de la terapia celular con PDC. Además, se ha demostrado que PDC no estimula PBMC alogénicas (por ejemplo, linfocitos alogénicos, por ejemplo, células T CD4 + no tratados previamente) en una reacción mixta de linfocitos. De acuerdo con ello, el trasplante alogénico con, o incluso xenogénico, PDC puede ser tolerado en algunos casos.

**[0133]** Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado farmacológicamente inmunosuprimir un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto se puede lograr mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse mediante la administración de las células en un dispositivo de encapsulado. PDC se pueden encapsular en una cápsula que es permeable a los nutrientes y oxígeno requeridos por la célula y factores terapéuticos la célula es todavía impermeable a factores y células humorales inmunes. Preferiblemente, el encapsulante es hipoaergénico, se encuentra con facilidad y de forma estable en un tejido diana, y proporciona una protección adicional a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alteARNtiva, PDC se pueden modificar genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

**[0134]** La supervivencia de las PDC trasplantadas en un paciente vivo se puede determinar mediante el uso de una variedad de técnicas de exploración, por ejemplo, la tomografía axial computarizada (TAC o TC), resonancia magnética (RM) o la tomografía por emisión de positrones (PET) . Determinación de la supervivencia del trasplante también puede hacerse post mortem mediante la eliminación del tejido diana, y examinando visualmente o por medio de un microscopio. AlteARNtivamente, las células pueden ser tratadas con manchas que son específicas para células de un linaje específico. Las células trasplantadas también pueden identificarse mediante la incorporación previa de colorantes trazadores tales como microesferas con rodamina o marcados con fluoresceína, azul rápido, bisbenzamida, micropartículas férricos, o productos de genes informadores genéticamente introducidos, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

**[0135]** La integración funcional de las PDC trasplantadas a un sujeto puede evaluarse mediante el examen de la restauración de la función que se ha dañado o sujeta a enfermedad o el aumento de la función.

#### **Las composiciones y composiciones farmacéuticas**

**[0136]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden la población de células de la invención se incluyen dentro del alcance de la invención. También se proporcionan composiciones de PDC, junto con productos relacionados (por ejemplo, matriz extracelular, lisado celular, lisado, medio condicionado). Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más factores bioactivos, por ejemplo, pero no limitado a un factor de crecimiento, un factor inductor de la diferenciación, un factor de supervivencia de las células, tales como inhibidor de la caspasa, un agente anti-inflamatorio tal como inhibidor de la quinasa p38, o un factor angiogénico tal como VEGF o bFGF. Algunos ejemplos de factores bioactivos incluyen PDGF-BB, EGF, FGF, IGF, y LIF. En algunas realizaciones, PDC no diferenciadas se cultivan en contacto con el factor bioactivo. En algunas realizaciones, PDC no diferenciadas permanecen indiferenciadas al entrar en contacto con el factor bioactivo. En otras realizaciones, el factor bioactivo induce la diferenciación de las PDC.

**[0137]** Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender poblaciones homogéneas o heterogéneas de PDC no diferenciadas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender poblaciones homogéneas o heterogéneas de PDC

diferenciadas, cultivos de los mismos, lisados de células de las mismas, de la matriz extracelular producidas de ese modo, o medio acondicionado derivado de las mismas en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0138]** Los vehículos farmacéuticamente aceptables para las células de la invención incluyen sustancias de vehículo orgánicas o inorgánicas, que no reaccionan perjudicialmente con las células de la invención o composiciones o componentes de los mismos. En la medida que son biocompatibles, vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución de sal (por ejemplo, solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos, tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, y pirrolidina de polivinilo. Tales preparaciones se pueden esterilizar, y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, y el colorante. Los vehículos farmacéuticos adecuados para uso en la presente invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Pharmaceutical Sciences* (17a Ed., Mack Pub. Co. Easton, PA) y el documento WO 96/05309.

**[0139]** La dosis (por ejemplo, número de células a administrar) y frecuencia de administración dependerá de una serie de factores, incluyendo, pero no limitado a, la naturaleza de la afección a tratar, el grado de los síntomas de la condición, características del paciente (por ejemplo, edad, tamaño, sexo, salud).

#### ***El uso de PDC para el trasplante***

**[0140]** Los métodos de tratamiento de la presente descripción implican la implantación de PDC en individuos en necesidad del mismo. Las células de la presente invención se pueden suministrar al sitio de la necesidad terapéutica o "en casa" al sitio.

**[0141]** Las células de la presente invención pueden diferenciarse *in vivo* o proporcionar soporte trófico para las células endógenas. La dosis de la implantación de células adecuada en los seres humanos puede determinarse a partir de la información existente en relación con, por ejemplo, la actividad de las células. Desde el cultivo *in vitro* y en experimentos con animales *in vivo*, la cantidad de factores producidos se puede cuantificar. Esta información también es útil en el cálculo de una dosis apropiada de material implantado. Además, el paciente puede ser monitorizado para determinar si la implantación adicional puede ser hecha o material implantado reducido en consecuencia.

**[0142]** Para mejorar la vascularización y la supervivencia de las células trasplantadas, factores angiogénicos tales como VEGF, PDGF o bFGF se pueden añadir ya sea solo o en combinación con células endoteliales o sus precursores incluyendo células CD34+, CD34+/CD117+.

**[0143]** Uno o más de otros componentes pueden añadirse a las células trasplantadas, incluyendo los componentes de la matriz extracelular seleccionados, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas, y las drogas. AlteARNtivamente, las células de la invención pueden ser diseñadas genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento. Factores bioactivos que se pueden incorporar de manera útil en la formulación celular incluyen agentes anti-apoptóticos (por ejemplo, EPO, EPO mimético, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes anti-inflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de la IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, RÉMICADE, SIROLIMUS, y NSAIDS (no esteroides anti-inflamatorios, por ejemplo, TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFEN); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de la calcineurina, como la ciclosporina, tacrolimus, inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, everolimus); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo), corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-IL-2R $\alpha$  del receptor (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos anti-células T policlonales (por ejemplo, globulina anti-timocitos (ATG); globulina anti-linfocitos (ALG); anticuerpo celular monoclonal anti-T OKT3)); agentes anti-trombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos de antitrombina, antagonistas del receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anti-plaquetas, inhibidores de anticuerpos contra el receptor de aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de las prostaglandinas, y plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, la coenzima Q-10, glutatión, cisteína L-, N-acetilcisteína), así como anestésicos locales. Como otro ejemplo, las células pueden administrarse conjuntamente con el factor inhibidor de cicatriz como se describe en la Patente de EE.UU. Nº. 5.827.735.

#### ***Formulación de PDC para el trasplante***

**[0144]** En una realización no limitante, una formulación que comprende las células de la invención se prepara para la inyección directamente en el sitio donde se desea la producción del nuevo tejido. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las células de la invención pueden suspenderse en una solución de hidrogel para inyección. Ejemplos de hidrogeles adecuados para su uso en la invención incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. AlteARNtivamente, la solución de hidrogel que contiene las células puede permitirse endurecer, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersadas en ella antes de la implantación. O bien, una vez que la

matriz se ha endurecido, las formaciones de células se pueden cultivar de manera que las células se expanden mitóticamente antes de la implantación. El hidrogel es un polímero orgánico (natural o sintético) que es reticulado por medio de enlaces covalentes, iónicos, o enlaces de hidrógeno para crear una estructura de celosía abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Ejemplos de materiales que pueden ser utilizados para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales de los mismos, péptidos, polifosfazinas, y poliácridatos, que están reticulados iónicamente, o polímeros de bloques tales como copolímeros de bloques de óxido de glicol de polipropileno-polietileno que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas formas de realización, el soporte para las PDC de la invención es biodegradable.

5 [0145] En algunas realizaciones de la invención, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ*, como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. 2002/0022676; Anseth et al, J. Control Release, 78 (1-3): 199-209 (2002); Wang et al, Biomateriales, 24 (22): 3969-80 (2003).

10 [0146] En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones acuosas de alcohol, que han cargadas grupos laterales, o una sal iónica monovalente de los mismos. Los ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes son poli (fosfacenos), poli (ácidos acrílicos), poli (ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli (acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. Copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de monómeros de ácido acrílico o metacrílico y vinil éter o polímeros también se pueden utilizar. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, halogenados (preferiblemente fluorados) grupos de alcohol, grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.

15 [0147] Los ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden hacerse reaccionar con aniones son poli (aminas de vinilo), poli (vinil piridina), poli (vinil imidazol), y algunos polifosfacenos imino sustituidos. La sal de amonio o cuaternaria de los polímeros también se pueden formar a partir de los nitrógenos de la cadena principal o grupos colgantes imino. Los ejemplos de grupos laterales básicos son grupos amino e imino.

20 [0148] El alginato puede ser reticulado iónicamente con cationes divalentes, en agua, a temperatura ambiente, para formar una matriz de hidrogel. Debido a estas condiciones leves, el alginato ha sido el polímero más comúnmente usado para encapsulación de células de hibridoma, como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Nº. 4.352.883 de Lim. En el proceso de Lim, una solución acuosa que contiene los materiales biológicos a encapsular se suspende en una solución de un polímero soluble en agua, la suspensión se forma en gotitas que se configuran en microcápsulas discretas por contacto con cationes multivalentes, a continuación, la superficie de las microcápsulas se reticula con poliaminoácidos para formar una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

25 [0149] Los polifosfacenos son polímeros con cadenas principales que consisten en nitrógeno y fósforo separados por enlaces simples y dobles alternantes. Cada átomo de fósforo está unido covalentemente a dos cadenas laterales.

30 [0150] Los polifosfacenos adecuados para la reticulación tienen una mayor parte de grupos de cadena lateral que son ácidos y capaces de formar puentes de sal con cationes di- o trivalentes. Los ejemplos de grupos laterales ácidos preferidos son grupos de ácido carboxílico y grupos de ácido sulfónico. polifosfacenos hidrolíticamente estables se forman de monómeros que tienen grupos laterales de ácido carboxílico que se reticulan por cationes divalentes o trivalentes tales como  $Ca^{2+}$  o  $Al^{3+}$ . Se puede sintetizar polímeros que degradan mediante hidrólisis incorporando monómeros que tienen imidazol, amino éster de ácido, o grupos laterales de glicerol. Por ejemplo, se puede sintetizar un polianiónico poli[bis(carboxilatofenoxi)]fosfaceno (PCPP), que está reticulado con cationes multivalentes disueltos en medio acuoso a temperatura ambiente o inferior para formar matrices de hidrogel.

35 [0151] Polifosfacenos biodegradables tienen al menos dos tipos diferentes de cadenas laterales, grupos laterales ácidos que pueden formar puentes de sal con cationes multivalentes, y grupos laterales que hidrolizan en condiciones *in vivo*, por ejemplo, grupos imidazol, ésteres de aminoácido, glicerol y glucosilo.

40 [0152] La hidrólisis de los resultados de la cadena lateral de la erosión del polímero. Ejemplos de hidrólisis de cadenas laterales son imidazoles sustituidos y no sustituidos y ésteres de aminoácidos en el que el grupo está unido al átomo de fósforo a través de un enlace amino (polímeros de polifosfaceno en los que ambos grupos R están unidos de esta manera se conocen como polyaminofosfacenos). Para poliimidazolefosfacenos, algunos de los grupos "R" en la columna vertebral de polifosfaceno son anillos de imidazol, unidos a fósforo en la cadena principal a través de un átomo de nitrógeno del anillo. Otros grupos "R" pueden ser residuos orgánicos que no participan en la hidrólisis, tales como grupos metilo u otros grupos fenoxi que se muestran en el artículo científico de Allcock, et al, Macromolecule 10: 824 (1977). Los métodos de síntesis de los materiales de hidrogel, así como los métodos para preparar tales hidrogeles, son conocidos en la técnica.

45 [0153] Otros componentes también pueden ser incluidos en la formulación, incluyendo, pero no limitado a cualquiera de los siguientes: (1) tampones para proporcionar pH e isotonicidad apropiados; (2) lubricantes; (3) materiales

viscosos para retener las células en o cerca del sitio de administración, incluyendo, por ejemplo, alginatos, agares y gomas vegetales; y (4) otros tipos de células que pueden producir un efecto deseado en el sitio de administración, tales como, por ejemplo, la mejora o modificación de la formación de tejido o de sus características fisicoquímicas, o es el apoyo a la viabilidad de las células, o inhibición de la inflamación o rechazo. Las células pueden ser cubiertas por una herida adecuada que cubra para evitar que las células abandonen el lugar. Tales apósitos para heridas son conocidos por expertos en la técnica.

#### **El trasplante de PDC utilizando andamios**

[0154] Las células de la invención o co-cultivos de los mismos pueden ser sembradas sobre una estructura de tres dimensiones o andamio y implantados *in vivo*, donde las células sembradas proliferarán sobre la superficie de la estructura y formarán un tejido de reemplazo *in vivo* en cooperación con las células del sujeto. Dicho marco se puede implantar en combinación con cualquier uno o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes descritos anteriormente que estimular la formación de tejido o potencia o mejora la práctica de la invención de otra manera.

[0155] Las células de la invención se pueden utilizar para producir nuevo tejido *in vitro*, que después puede ser implantado, trasplantado o de lo contrario se inserta en un sitio que requiere la reparación de tejidos, la sustitución o el aumento en un sujeto.

[0156] En una realización no limitante, las células de la invención se utilizan para producir un constructo de tejido tridimensional *in vitro*, que se implanta a continuación *in vivo*. Como un ejemplo de la producción de construcciones de tejido tridimensionales, véase la Patente de EE.UU. N<sup>o</sup>. 4.963.489. Por ejemplo, las células de la invención pueden ser inoculadas o "sembradas" en un marco tridimensional o andamio, y proliferadas o cultivadas *in vitro* para formar un tejido vivo que puede ser implantado *in vivo*.

[0157] Las células de la invención se pueden crecer libremente en un recipiente de cultivo a sub-confluencia o confluencia, levantadas a partir del cultivo e inoculadas en un marco tridimensional. La inoculación de la estructura de tres dimensiones con una alta concentración de células, por ejemplo, aproximadamente  $10^5$  a  $10^8$  células por mililitro, dará lugar a la creación del soporte de tres dimensiones en periodos relativamente cortos de tiempo.

[0158] Ejemplos de andamios que se pueden usar en la presente invención incluyen esteras no tejidas, espumas porosas, o péptidos de autoensamblaje. Esteras no tejidas pueden ser, por ejemplo, formadas usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se vende bajo el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ), espumas, compuesto de, por ejemplo, copolímero de poli (epsilon-caprolactona)/poli (ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procesos tales como liofilización, como se discute en la Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 6.355.699, también son posibles los andamios. Los hidrogeles tales como péptidos de autoensamblaje (por ejemplo, RAD16) también se pueden utilizar. Estos materiales se utilizan con frecuencia como soporte para el crecimiento de tejido.

[0159] El marco tridimensional también puede estar hecho de materiales cerámicos, incluyendo, pero no limitado a: mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- y tetra-fosfato de calcio, hidroxiapatita, fluoroapatites, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de calcio de magnesio, cristales biológicamente activos, tales como BIOGLASS (Universidad de Florida, Gainesville, FL), y mezclas de los mismos. Hay un número de materiales adecuados porosos biocompatibles de cerámica actualmente disponibles en el mercado comercial tales como SURGIBON (Unilab Surgibone, Inc., Canadá), ENDOBON (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS (Mathys, AG, Bettlach, Suiza), e INTERPORE (Interpore, Irvine, CA, Estados Unidos), y la mineralización ósea de colágeno injerto de productos tales como HEALOS (Orquest, Inc., Mountain View, CA) y VITOSS, RHAKOSS, y CORTOSS (Orthovita, Malvern, PA). El marco puede ser una mezcla, o compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.

[0160] De acuerdo con una realización preferida, el marco es un fieltro, que puede estar compuesto de un hilo multifilamento de un material bioabsorbible, por ejemplo, PGA, PLA, copolímeros o mezclas de PCL, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro utilizando técnicas de procesamiento textil estándar que consta de engaste, corte, cardado y punción.

[0161] En otra realización preferida, las células de la invención se siembran en los andamios de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Además, la estructura de tres dimensiones se puede moldear en una forma útil, tal como la de la parte exteARN de la oreja, u otra estructura específica en el cuerpo para ser reparado, reemplazado o aumentado.

[0162] En algunas formas de realización, el marco es tratado antes de la inoculación de las células de la invención con el fin de mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, matrices de nylon pueden ser tratadas con ácido acético 0,1 molar y se incubaron en polilisina, PBS, y/o colágeno para recubrir el nylon. El poliestireno puede ser tratado de forma similar utilizando ácido sulfúrico.

[0163] Las superficies exteARNs de la estructura de tres dimensiones pueden ser modificadas para mejorar la unión



o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tales como el recubrimiento del marco de plasma o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular, y/o otros materiales tales como, pero no limitado a, gelatina, alginatos, gomas agar, agarosa, y de la planta, entre otros.

[0164] En algunas realizaciones, el armazón está compuesto de, o se trata con materiales que la hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal, tales como laminina y colágeno tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretaneura segmentadas, como PURSPAN (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden ser tratados adicionalmente para hacer que el andamio sea no trombogénico. Tales tratamientos incluyen agentes anti-trombóticos tales como la heparina, y los tratamientos que alteran la carga superficial del material tal como revestimiento por plasma.

[0165] En algunos aspectos de la invención, es importante volver a crear en cultivo el microambiente celular encontrado *in vivo*, de manera que el grado en que las células de la invención se cultivan antes de la implantación *in vivo* o uso *in vitro* puede variar. Además, los factores de crecimiento se pueden añadir al medio de cultivo antes de, durante, o después de la inoculación de las células para activar la diferenciación y la formación de tejido por las PDC.

[0166] El marco tridimensional puede ser modificado de manera que se mejora el crecimiento de las células y la producción de tejido sobre el mismo, o de modo que el riesgo de rechazo del implante se reduce. Por lo tanto, uno o más compuestos biológicamente activos, incluyendo, pero no limitado a factores anti-inflamatorias, inmunosupresoras o de crecimiento, se pueden añadir a la estructura.

#### **Usos terapéuticos de la divulgación de la matriz extracelular y los lisados celulares derivados de PDC**

[0167] Como alteARNtiva a la implantación de las células de la invención, o tejido vivo producido a partir de las mismas, la descripción describe un componente o producto de PDC, tales como la matriz extracelular (ECM) o lisado celular producido por las células para su uso en la reparación de tejidos, sustitución o aumento.

[0168] En algunas realizaciones, después de que las células de la invención se han cultivado *in vitro*, tal como, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de andamiaje tridimensional se describe en el presente documento, de manera que una cantidad deseada de ECM ha sido secretada en el marco. Una vez que ECM se secreta en el marco, las células pueden ser removidas. La ECM de la descripción puede ser procesada para su uso posterior, por ejemplo, como una preparación inyectable.

[0169] En algunas realizaciones, las células mueren y los desechos celulares (por ejemplo, membranas celulares) se retira del marco. Este proceso puede llevarse a cabo en un número de maneras diferentes. Por ejemplo, el tejido vivo puede ser de destello congelado en nitrógeno líquido sin un crioprotector, o el tejido puede ser sumergido en agua destilada estéril de modo que las células estallan en respuesta a la presión osmótica. Una vez que se han matado las células, las membranas celulares pueden ser interrumpidas y los residuos celulares eliminados por tratamiento con un enjuague de detergente suave, como EDTA, CHAPS o un detergente zwitteriónico. Una ventaja de utilizar un enjuague con detergente suave es que solubiliza las proteínas unidas a la membrana, que a menudo son altamente antigénicas.

[0170] AlteARNtivamente, el tejido puede ser digerido enzimáticamente y/o se extrae con reactivos que rompen las membranas celulares. Ejemplo de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas (por ejemplo, desoxirribonucleasa y ribonucleasa). Los ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alquilarilo alcohol de poliéter (TRITON® X-100), octilfenoxi polietoxi-etanol (Rohm y Haas de Philadelphia, PA), BRIJ-35, un éter de lauril polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, CA), polisorbato 20 (TWEEN 20®), un monolaurato de sorbitán polietoxietanol (Rohm y Haas), lauril éter de polietileno (Rohm y Haas); y detergentes iónicos tales como, por ejemplo, sulfato de sodio de dodecil, alcoholes superiores sulfatados alifáticos, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen de 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o no ramificada.

[0171] Según la descripción, el soporte que comprende la ECM de la descripción puede ser utilizado terapéuticamente como se describe anteriormente. Como alteARNtiva, el ECM puede ser recogida desde el andamio. Colección de ECM se puede lograr en una variedad de formas, dependiendo, por ejemplo, de si el marco es biodegradable o no biodegradable. Por ejemplo, si el marco no es biodegradable, el ECM puede eliminarse sometiendo el marco a sonicación, chorros de agua de alta presión, raspado mecánico, o tratamiento suave con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de los anteriores.

[0172] Si el marco es biodegradable, el ECM puede ser recogido, por ejemplo, al permitir que el marco se degrade o disuelva en solución. AlteARNtivamente, si el marco biodegradable se compone de un material que puede en sí

mismo ser inyectado junto con la ECM, el marco y el ECM se pueden procesar en su totalidad para la inyección posterior. Alternativamente, el ECM puede ser retirado del marco biodegradable por cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la recolección de ECM de un marco no biodegradable. Todos los procesos de recogida están diseñados preferiblemente para no desnaturalizar la ECM producida por las células de la invención.

**[0173]** Una vez que el ECM se ha recogido, que puede procesarse adicionalmente de acuerdo con la divulgación. El ECM se puede homogeneizar a las partículas finas utilizando técnicas bien conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, por tratamiento con ultrasonidos, para que puedan pasar a través de una aguja quirúrgica. Componentes de ECM se pueden reticular, si se desea, por irradiación gamma. Preferiblemente, el ECM puede ser irradiado entre 0,25 a 2 mega rads para esterilizar y reticular el ECM. Agentes de reticulación químicos que son tóxicos, tales como glutaraldehído, son posibles, pero no se prefiere generalmente su uso.

**[0174]** Los lisados celulares de la descripción preparada a partir de las poblaciones de las células después del parto derivados también tienen muchas utilidades. En una realización, se preparan lisados de células enteras de la descripción, por ejemplo, mediante la interrupción de las células sin posterior separación de fracciones de células. En otra realización, una fracción de membrana celular se separa de una fracción soluble de las células por métodos de rutina conocidos en la técnica, los métodos por ejemplo, centrifugación, filtración, o similares. El uso de fracciones de células solubles *in vivo* permite que el medio intracelular beneficioso para ser utilizado en un paciente sin provocar rechazo o una respuesta adversa. Los métodos de células de lisado son bien conocidos en la técnica e incluyen diversos medios de disrupción mecánica, perturbación enzimática, o alteración química, o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares se pueden preparar a partir de células directamente en su medio de crecimiento y por lo tanto que contiene factores de crecimiento secretados y similares, o se pueden preparar a partir de células lavadas libres del medio, por ejemplo, en PBS u otra solución. Las células lavadas se pueden volver a suspender en concentraciones mayores que la densidad de población original si se prefiere. Los lisados celulares de la descripción preparados a partir de poblaciones de células posparto derivadas se pueden usar, con mayor concentración, por ejemplo, en ultrafiltración o liofilización, o incluso se pueden secar, parcialmente purificar, o combinarse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica, o en combinación con otros compuestos tales como los biológicos, para composiciones de proteínas útiles, por ejemplo farmacéuticamente. Los lisados celulares se pueden usar *in vitro* o *in vivo*, solos o, por ejemplo, con las células. Los lisados celulares, si se introduce *in vivo*, pueden introducirse de forma local en un sitio de tratamiento, o de forma remota para proporcionar, por ejemplo, factores de crecimiento celulares necesarios a un paciente.

**[0175]** Las cantidades y/o proporciones de las proteínas se pueden ajustar mediante la mezcla de la ECM o lisado de célula de la divulgación producida por las células de la invención con ECM o lisado de célula de uno o más de otros tipos de células. Además, las sustancias biológicamente activas tales como proteínas, factores de crecimiento y/o medicamentos, se pueden incorporar en la ECM o preparación de lisado celular. Los ejemplos de sustancias biológicamente activas incluyen agentes anti-inflamatorios y factores de crecimiento que promueven la curación y la reparación de tejidos. Las células se pueden administrar conjuntamente con el ECM o lisados celulares. De acuerdo con la divulgación, ECM o lisado de célula de PDC pueden ser formulados para la administración como se describe anteriormente para las PDC.

***Uso de PDC para proyección In vitro de la eficacia del fármaco o toxicidad***

**[0176]** Las células y tejidos de la invención pueden ser utilizados *in vitro* para seleccionar una gran variedad de compuestos para la eficacia y la citotoxicidad de agentes farmacéuticos, crecimiento/factores reguladores, agentes anti-inflamatorios. Para este fin, las células de la invención, o cultivos de tejidos descritos anteriormente, se mantienen *in vitro* y se expusieron al compuesto a ensayar. La actividad de un compuesto citotóxico se puede medir por su capacidad para dañar o matar las células en cultivo. Esto puede fácilmente evaluarse mediante técnicas de tinción vitales. El efecto de los factores reguladores del crecimiento/se puede evaluar mediante el análisis del número de células vivas *in vitro*, por ejemplo, mediante recuentos de células totales y los recuentos de células diferenciales. Esto se puede lograr usando citológico estándar y/o técnicas histológicas, incluyendo el uso de técnicas inmunocitoquímicas que emplean anticuerpos que definen los antígenos celulares específicos del tipo. El efecto de diversos fármacos sobre las células de la invención ya sea en cultivo en suspensión o en el sistema tridimensional descrito anteriormente puede evaluarse.

**[0177]** Las células y tejidos de la invención se pueden utilizar como sistemas modelo para el estudio de las condiciones fisiológicas o patológicas. Las células y los tejidos de la invención también se pueden utilizar para estudiar el mecanismo de acción de las citoquinas, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, por ejemplo, IL-1, TNF y prostaglandinas. Además, citotóxicos y/o agentes farmacéuticos pueden ser seleccionados para los que son más eficaces para un paciente particular. Los agentes que han demostrado ser eficaces *in vitro* podrían utilizarse para tratar al paciente terapéuticamente.

***Uso de PDC para producir moléculas biológicas***

**[0178]** En una realización adicional, las células de la invención pueden ser cultivadas *in vitro* para producir productos biológicos con alto rendimiento. Por ejemplo, tales células, que naturalmente producen ya sea un producto biológico

particular de interés (por ejemplo, un factor de crecimiento, factor regulador, o de la hormona péptida), o han sido genéticamente modificadas para producir un producto biológico, se podría ampliar clonalmente utilizando, por ejemplo, el sistema de cultivo tridimensional se ha descrito anteriormente. Si las células excretan el producto biológico en el medio nutricional, el producto puede aislarse fácilmente a partir del medio gastado o acondicionado utilizando técnicas de separación estándar, por ejemplo, tales como precipitación diferencial de proteína, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, electroforesis, y alta cromatografía líquida de alto rendimiento. Un "biorreactor" se puede utilizar para tomar ventaja del método de flujo para la alimentación, por ejemplo, un cultivo tridimensional *in vitro*.

[0179] En esencia, como medio fresco se hace pasar a través del cultivo en tres dimensiones, el producto biológico se lava fuera del cultivo y puede entonces aislarse de la salida, como anteriormente.

[0180] Alternativamente, un producto biológico de interés puede permanecer dentro de la célula y, por lo tanto, su recolección puede requerir que las células se lisen. El producto biológico puede entonces purificarse usando una cualquiera o más de las técnicas arriba mencionadas.

### Kits

[0181] Las PDC y componentes y productos derivados convenientemente pueden emplearse como parte de un kit, por ejemplo, para el cultivo o la implantación. En consecuencia, la invención proporciona un kit que incluye las PDC de la invención y componentes adicionales, tales como una matriz (por ejemplo, un andamio), agentes hidratantes (por ejemplo, soluciones salinas fisiológicamente compatibles, medios de cultivo celular preparado), los sustratos de cultivo de células (por ejemplo, placas de cultivo, placas, frascos, etc.), medios de cultivo celular (ya sea en forma líquida o en polvo), compuestos antibióticos, hormonas, y similares. Mientras que el kit puede incluir cualquiera de estos componentes, preferiblemente que incluya todos los ingredientes necesarios para el uso deseado. Si se desea, el kit también puede incluir células (típicamente criopreservadas), que pueden ser sembradas en la red como se describe aquí.

[0182] En otro aspecto, la invención proporciona kits de la invención que utilizan las PDC poblaciones PDC, componentes y productos de PDC en varios métodos para el aumento, la regeneración y la reparación como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, incluyendo al menos PDC y un vehículo farmacéuticamente aceptable (líquido, semi-sólido o sólido). Los kits también pueden incluir opcionalmente un medio de administración de las células, por ejemplo por inyección. Los kits pueden incluir además instrucciones para el uso de las células. Kits preparados para su utilización en hospital de campaña, como para uso militar, pueden incluir suministros de procedimiento completo incluyendo andamiaje de tejido, suturas quirúrgicas, y similares, donde las células se van a utilizar en conjunción con la reparación de lesiones agudas. Kits para ensayos y métodos *in vitro* como se describe en el presente documento pueden contener uno o más de (1) PDC o componentes o productos de PDC, (2) los reactivos para la práctica del método *in vitro*, (3) otras células o poblaciones de células, según sea apropiado, e (4) instrucciones para realizar el método *in vitro*.

### Criopreservación y almacenamiento de PDC

[0183] PDC de la invención se pueden criopreservar y mantener o almacenar en un "banco de células". Criopreservación de células de la invención se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las células pueden suspenderse en un "medio de congelación", tales como, por ejemplo, de cultivo que comprende medio más de 0 a 95 por ciento FBS y de 0 a 10 por ciento de dimetilsulfóxido (DMSO), con o sin 5 a 10 por ciento de glicerol, a una densidad, por ejemplo, de alrededor de 0,5 a 10 x 10<sup>6</sup> células por mililitro. El medio de criopreservación puede comprender agentes de criopreservación incluyendo, pero no limitado a metilcelulosa. Las células se dispensan en ampollas de vidrio o de plástico que después se sellan y se transfieren a la cámara de congelación de un congelador de velocidad controlada. La velocidad óptima de congelación se puede determinar empíricamente. Un congelador de velocidad programable por ejemplo, puede dar un cambio en la temperatura de -1 a -10°C por minuto. La temperatura de criopreservación preferida es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, más preferiblemente es de aproximadamente -90°C a aproximadamente -160°C, y lo más preferiblemente es de aproximadamente -125 a aproximadamente -140°C. Células criopreservadas se transfieren preferiblemente a nitrógeno líquido antes de la descongelación para el uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas superan aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células criopreservadas se pueden almacenar por un período de años.

[0184] Las células criopreservadas de la invención constituyen un banco de células, partes del cual pueden ser "retiradas" de descongelación y después se usa según sea necesario. La descongelación generalmente debe llevarse a cabo rápidamente, por ejemplo, mediante la transferencia de una ampolla de nitrógeno líquido a un baño de agua 37°C. Los contenidos descongelados de la ampolla deben ser transferidos inmediatamente bajo condiciones estériles a un recipiente de cultivo que contienen un medio apropiado, tal como DMEM acondicionada con 10 por ciento de FBS.

[0185] En otro aspecto, la invención proporciona también para la banca de tejidos, células y poblaciones de células de la invención. Como se discutió anteriormente, las células son fácilmente criopreservadas. Por consiguiente, la invención proporciona procedimientos de criopreservación de las células de la invención en un banco, en el que las células se almacenaron congeladas y se asocian con una caracterización completa de las células en base a propiedades inmunológicas, bioquímicas y genéticas de las células. Las células así congeladas se pueden utilizar para autólogo, singénico, alogénico o terapia, dependiendo de los requisitos del procedimiento y de las necesidades del paciente. Preferiblemente, la información sobre cada muestra criopreservada se almacena en un ordenador, que es capaz de búsqueda, basada en los requisitos del cirujano, el procedimiento y el paciente con coincidencias que se realizan en base a la caracterización de las células o poblaciones. Preferiblemente, las células de la invención se cultivan y se expandieron a la cantidad deseada de células y composiciones de células terapéuticas se preparan ya sea por separado o como co-cultivos, en presencia o ausencia de una matriz o soporte. Mientras que para algunas aplicaciones, puede ser preferible usar células recién preparadas, el resto se puede criopreservar y almacenar mediante la congelación de las células y de introducir la información en el ordenador para asociar la entrada de equipo con las muestras. Incluso cuando no es necesario para que coincida con una fuente o de un donante con un receptor de tales células, a los efectos inmunológicos, el sistema bancario hace que sea fácil de combinar, por ejemplo, propiedades deseables, bioquímicas y genéticas de las células peraltadas a las necesidades terapéuticas. Tras la adecuación de las propiedades deseadas con una muestra en bancos, la muestra se recupera, y se preparó para uso terapéutico. Lisados celulares o componentes de la divulgación preparada como se describe en el presente documento también se pueden conservar (por ejemplo, criopreservado, liofilizado) y en bancos de acuerdo con la presente invención.

[0186] Los siguientes ejemplos describen varios aspectos de formas de realización de la invención con mayor detalle. Estos ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente, no para limitar, aspectos de la invención descritos en este documento.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### Derivación de células del tejido de placenta posparto

[0187] Placentas posparto se obtuvieron después del nacimiento ya sea de un término o un embarazo prematuro. Se recogieron las células de cinco donantes diferentes de tejido de la placenta. Diferentes métodos de aislamiento de células se ensayaron para determinar su capacidad para producir células con: 1) el potencial de diferenciarse en células con diferentes fenotipos, o 2) el potencial de proporcionar factores tróficos críticos útiles para otras células y tejidos.

#### Método y materiales

[0188] **Aislamiento de las células de placenta.** El tejido placentario se obtuvo a partir de National Disease Research Interchange (ISRND) (Philadelphia, PA). Los tejidos se obtuvieron a partir de un embarazo en el momento de la administración quirúrgica normal. Se aislaron células de la placenta asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los residuos, el tejido se lavó en fosfato de solución salina tamponada (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina (Invitrogen Carlsbad, CA). Los tejidos fueron entonces disociados mecánicamente en 150 placas de cultivo de tejido cm<sup>2</sup> en presencia de 50 ml de medio (DMEM de baja glucosa o DMEM de alta glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido se troceó en una pasta fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos de 50 ml cónicos (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo).

[0189] A continuación, el tejido se digirió en un medio ya sea medio de glucosa DMEM-Medio de baja glucosa, DMEM-Medio de alta glucosa, cada uno conteniendo 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro amfotericina y enzimas de digestión. 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 medio DMEM-Medio de baja glucosa). En otros experimentos una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa se utilizó (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro, y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro, en ("C: H: D") DMEM-Medio de baja glucosa). Los tubos cónicos que contienen las enzimas de tejido, medio y de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

[0190] Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento (DMEM: Medio de baja glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (p/v) de suero bovino fetal v (FBS; suero bovino definido; Lot#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un filtro de células de nylon de 70 micrómetros (BD Biosciences). 5 mililitros adicionales de limpieza que comprende el medio de crecimiento se hizo pasar por el colador. La suspensión celular se pasó por un filtro de

células de nylon de 40 micrómetros (BD Biosciences) y seguido de un enjuague de un 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

5 [0191] El filtrado se volvió a suspender en medio de crecimiento (volumen total 50 ml) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso (es decir, resuspensión, centrifugación y aspiración) se repitió dos veces más.

10 [0192] Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 ml de medio de crecimiento fresco. Se determinó el número de células viables mediante tinción con azul de tripano. Las células fueron cultivadas bajo condiciones estándar.

15 [0193] Las células aisladas de placenta se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T-75cm<sup>2</sup> recubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) de suero bovino definido (Hyclone, Logan, UT; Lote#AND18475), 0,001 por ciento (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina (Invitrogen)). Después de unos 2-4 días, medio agotado se aspiró de los frascos. Las células se lavaron con PBS tres veces para eliminar los residuos y las células derivadas de la sangre. Las células fueron rellenas con medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días desde el paso 0 al paso 1). En los pasajes posteriores (del paso 1 a 2, etc.), las células llegaron a sub-confluencia (75 a 85 por ciento confluencia) en 4-5 días. Para estos pasajes posteriores, las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron en un incubador humidificado con 5 por ciento de dióxido de carbono y 20 por ciento de oxígeno, a 37°C.

25 [0194] **El aislamiento de las poblaciones de células derivadas maternas y derivadas neonatales de la placenta.** El protocolo de aislamiento de células se realizó asépticamente en una campana de flujo laminar. El tejido de la placenta se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicótico y antibióticos (penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen) a eliminar la sangre y escombros. Después, el tejido placentario se disecó en tres secciones: la primera línea (lado neonatal o de aspecto), de la línea media (aislamiento de células mixtas región neonatal y materna, o vellosidades), y la línea inferior (lado materno o aspecto).

35 [0195] Las secciones separadas fueron individualmente lavadas varias veces en PBS con antibiótico/antimicótico para eliminar más sangre y escombros. A continuación, cada sección se disoció mecánicamente en placas de cultivo de tejidos de 150 cm<sup>2</sup> en presencia de 50 ml de DMEM de baja glucosa (Invitrogen) a una pasta fina. La pulpa se transfirió a tubos de 50 ml cónicos. Cada tubo contenía aproximadamente 5 gramos de tejido. El tejido fue digerido ya sea en DMEM de baja glucosa o media alta de glucosa DMEM que contiene 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina 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) a 500 unidades/mililitro y dispasa (Invitrogen) a 50 unidades/mililitro en medio DMEM-Low glucosa. En otros experimentos una mezcla de colagenasa, dispasa, y hialuronidasa ("C: D: H") se utilizó (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro, y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro en DMEM de baja glucosa). Los tubos cónicos que contiene el tejido, medio, y las enzimas de digestión se incubaron durante 2 horas a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm.

45 [0196] Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, y el sobrenadante resultante se retiró por aspiración. El sedimento se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Invitrogen), 15% (v) de suero v/bovino fetal (FBS; suero bovino definido; Lot#AND18475; hyclona, logan, UT), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro anfotericina B; Invitrogen)). La suspensión celular se filtró a través de un filtro de células 70 micrómetros nylon (BD Biosciences), perseguido por un enjuague con un 5 ml más de medio de crecimiento. La suspensión total de células se pasó por un filtro de células de nylon de 40 micrómetros (BD Biosciences) seguida de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento como un enjuague.

55 [0197] El filtrado se volvió a suspender en medio de crecimiento (volumen total 50 ml) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró, y el sedimento celular se resuspendió en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso (es decir, resuspensión, centrifugación y aspiración) se repitió dos veces más.

60 [0198] Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento fresco. Un recuento de células se determinó usando el ensayo de exclusión de azul de tripano. Las células fueron cultivadas en condiciones normales.

65 [0199] El aislamiento de PDC usando diferentes condiciones de crecimiento. células derivadas de placenta fueron digeridas en medio de crecimiento con o sin 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), utilizando la combinación de enzimas de C: D: H, de acuerdo con los procedimientos previstos arriba. Células derivadas de placenta así aisladas se sembraron bajo condiciones indicadas en la Tabla 1-1 y cultivadas en presencia de penicilina/estreptomina. Las células se pasaron hasta cuatro veces después de la siembra y criopreservadas. Las

células criopreservadas se almacenaron.

**Tabla 1-1.** El aislamiento y la expansión del cultivo de células de la placenta en condiciones diferentes:

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

Clave: Lg: Glucosa baja; N: Ninguno; Y: Sí; BME: beta-mercaptoetanol; FGF: Factor de crecimiento de fibroblasto; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaqueta; VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial.

**Resultados**

**[0200] El aislamiento de PDC usando diferentes condiciones de crecimiento.** En todas las condiciones establecidas en la Tabla 1-1, las células se unieron y ampliaron bien entre el paso entre 0 y 1. Las casillas de la condición 5 a 8 y 13 a 16 se demostraron a proliferar así hasta al menos cuatro pasajes después de la siembra.

**[0201] El aislamiento de las células de placenta utilizando diferentes combinaciones de enzimas.** La digestión del tejido con colagenasa: dispasa y colagenasa: dispasa: hialuronidasa como resultado del aislamiento de poblaciones de células de tejidos de la placenta que se expandieron fácilmente.

**[0202] Resumen.** PDC se pueden aislar utilizando una combinación de una metaloproteasa de matriz y proteasa neutra, tal como, pero no limitado a una combinación de colagenasa y dispasa. PDC se aíslan preferiblemente usando una combinación de enzimas de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra, y una enzima mucolítica que degrada el ácido hialurónico, tales como, pero no limitado a una combinación de colagenasa, dispasa, y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE™ (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) y hialuronidasa. Blendcima 3, que es la colagenasa (4 unidades Wunsch/g) y termolisina (1714 unidades de caseína/g) se puede usar junto con hialuronidasa para aislar células.

**EJEMPLO 2**

**Evaluación de Medios de Crecimiento de las Células Derivadas del Placenta**

**[0203]** Se evaluaron varios medios de cultivo celular por su capacidad para apoyar el crecimiento de células derivadas de la placenta. El crecimiento de las células derivadas de la placenta en oxígeno normal (20%) y bajo (5%) se evaluó después de 3 días utilizando el ensayo colorimétrico MTS.

**Métodos y materiales**

**[0204]** Las Células derivadas de la placenta en el paso 8 (P8) se sembraron a  $1 \times 10^3$  células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15% (v/v) de bovino fetal suero (Cat. #SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro estreptococos micina (Gibco). Después de 8 horas el medio se cambió al descrito en la Tabla 2-1 y las células se incubaron en condiciones normales (20%, v/v) o bajo (5%, v/v) de oxígeno a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. MTS se añadió al medio de cultivo (una solución acuosa CELLTITER96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI) durante 3 horas y la absorbancia medida a 490 nanómetros (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

Tabla 2-1. Medios de cultivo evaluados

	Medio de cultivo	Suministrador	Suero bovino fetal añadido% (v/v)
5	DMEM-glucosa baja	Gibco Carlsbad CA	0, 2, o 10
	DMEM-glucosa alta	Gibco Carlsbad CA	0, 2, o 10
	RPMI 1640	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2, o 10
10	Célula libre de gro (libre de suero, libre de proteína)	Mediatech, Inc. Herndon, VA	---
	F10 de Ham	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2, o 10
	MSCGM (completo con suero)	Cambrex, Walkersville, MD	0, 2, o 10
15	Completo libre de suero con albumina	Mediatech, Inc. Herndon, VA	---
	Medio de crecimiento	NA	---
	F12 de Ham	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2, o 10
	De Iscove	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0,2, o 10
20	Medio Basal de Eagle	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0,2, o 10
	DMEM/F12 (1:1)	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2, o 10
	<b>MSCGM: Medio de crecimiento de célula madre mesenquimal</b>		

**Resultados**

[0205] Las curvas de calibración para el ensayo de MTS establecieron una correlación lineal entre un aumento en la absorbancia y un aumento en el número de células. Los valores de absorbancia obtenidos se convierten en el número de células estimado y se calculó el cambio (%) con relación a la siembra inicial.

[0206] La adición de suero a los medios de comunicación en condiciones normales de oxígeno resultó en un incremento dependiente de la dosis reproducible en la absorbancia y por lo tanto el número de células viables (extrapolar). La adición de suero para completar MSCGM resultó en una disminución dependiente de la dosis en la absorbancia. En los medios sin suero añadido, sólo las células crecieron en Cellgro®, F10 de Ham y DMEM.

[0207] La reducción de oxígeno incrementó la tasa de crecimiento de las células en medio de crecimiento, F 10 de Ham, y, MSCGM.

[0208] Con el fin de disminuir el crecimiento, los medios de comunicación que resulta en el mejor crecimiento de las PDC eran el medio de crecimiento > MSCGM > Iscove + 10% FBS = DMEM de alta glucosa + 10% FBS = F12 de Ham + 10% FBS = RPMI 1640 + 10% de FBS.

[0209] **Resumen.** Células derivadas de placenta pueden cultivarse en una variedad de medios de cultivo en oxígeno normal o bajo. PDC crecieron en condiciones libres de suero, por ejemplo, en F10 de Ham, Cellgro-free, y DMEM. PDC también creció en condiciones libres de proteínas, por ejemplo, en F10 de Ham y Cellgro-free™. oxígeno reducido incrementa la tasa de crecimiento de las células en medio de crecimiento, F10 de Ham, y, MSCGM.

**Referencia**

[0210]

Publicación de la Solicitud de EE.UU. Nº 20040005704

**EJEMPLO 3**

**Crecimiento de las células posparto en medio que contiene D-valina**

[0211] Se ha informado de que el medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma normal de L-valina se puede utilizar para inhibir selectivamente el crecimiento de células similares a fibroblastos en cultivo (Hongpaisan (2000) Cell Biol Int 24: 1-7.; Sordillo et al (1988) Cell Biol Int Rep.12: 355-64).. Se realizaron experimentos para determinar si las células derivadas de la placenta podrían crecer en medio que contiene D-valina.

**Métodos y materiales**

[0212] Las células derivadas de la placenta (P3) y los fibroblastos (P9) se sembraron a 5 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas se retiró el medio y se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se reemplazó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (pedido especial, Gibco), 15%

(v/v) dializó suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)).

**Resultados**

[0213] Células de fibroblastos derivadas de placenta y sembradas en el medio que contiene D-valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medio de crecimiento que contenía suero dializado. Células de fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando de tamaño y cambiando de forma. Todas las células murieron y eventualmente se separaron de la superficie del matraz después de 4 semanas.

[0214] **Resumen.** PDC requieren L-valina para el crecimiento celular y para mantener la viabilidad a largo plazo.

**EJEMPLO 4**

**Medios de crioconservación para las células derivadas de la placenta**

[0215] El objetivo de este estudio fue determinar un medio de crioconservación adecuado para la criopreservación de células derivadas de la placenta.

**Métodos y materiales**

[0216] Las células derivadas de la placenta se cultivan en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15% (v) de suero v/bovino fetal (Cat. #SH30070.03, Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)), en un matraz T75 recubierta con gelatina se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco) y se trataron con tripsina usando 1 mililitro de tripsina/EDTA (Gibco). La tripsinización se detuvo añadiendo 10 mililitros medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g, el sobrenadante eliminado, y el sedimento celular se resuspendió en medio de crecimiento 1 mililitro. Una parte alícuota de suspensión celular, 60 microlitros, se retiró y se añadió a 60 microlitros azul htrypan (Sigma). El número de células viables se estimó utilizando un hemocitómetro. La suspensión celular se dividió en cuatro alícuotas iguales que contienen cada uno 88 x 10<sup>4</sup> células cada uno. La suspensión celular se centrifugó y se resuspendió en 1 mililitro de cada medio por debajo y se transfiere a crioviales (Nalgene).

- 1.) El medio de crecimiento + 10% (v/v) de DMSO (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO)
- 2.) El medio de de congelación con DMSO, conmetilcelulosa, libre de suero (C6295, Sigma, St. Louis, MO)
- 3.) El medio de de congelación libre de suero (C2639, Sigma, St. Louis, MO)
- 4.) El medio de de congelación con glicerol (C6039, Sigma, St. Louis, MO)

[0217] Las células se enfriaron a aproximadamente 1°C/min durante la noche en un congelador de -80°C utilizando un "Mr Frosty"® contenedor de congelación de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de las células se transfirieron a nitrógeno líquido durante 2 días antes de descongelar rápidamente en un baño de agua 37°C. Se añadieron las células a 10 mililitros de medio de crecimiento y se centrifugaron antes de que se estima el número de células y viabilidad como antes. Las células se sembraron en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup> para determinar si las células se conectan y proliferan.

**Resultados**

[0218] La viabilidad inicial de las células a ser criopreservadas se evaluó mediante tinción con azul de tripano para ser 100%.

[0219] Se observó una reducción proporcional en el número de células con viabilidad para C6295 debido a la lisis celular. Las células viables criopreservadas en las cuatro soluciones adjuntas, divididas, y producidas una monocapa confluyente en el plazo de 3 días. No hubo diferencia apreciable en la tasa de crecimiento estimada.

[0220] **Resumen.** La criopreservación de células es un procedimiento disponible para la preparación de un banco de células o un producto celular. Cuatro mezclas de crioconservación se compararon por su capacidad para proteger las células de la placenta humanos derivados de daño por congelación. Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y 10% (v/v) sulfóxido de dimetilo (DMSO) es un medio preferido de los comparados para la crioconservación de células derivadas de la placenta.

**EJEMPLO 5**

**Características de crecimiento de las células derivadas de placenta**

[0221] El potencial de expansión celular de las Células derivadas de la placenta se comparó con otras poblaciones de células madre aisladas. El proceso de expansión de las células a la senescencia se denomina límite de Hayflick



(Hayflick (1974) J. Am Geriatr Soc 22: 1-12; Hayflick (1974) Gerontologist 14: 37 a 45).

### **Materiales y métodos**

- 5 **[0222] Matrices de recubrimiento de gelatina.** Matrices de plástico de cultivo de tejidos se recubrieron mediante la adición de 20 mililitros 2% (w/v) de gelatina de porcina (tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a un matraz T75 (Corning, Corning, NY) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de gelatina, una solución salina tamponada con fosfato de 10 mililitros (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) se añadió y después se aspiró.
- 10 **[0223] Comparación del potencial de expansión de células derivadas de la placenta con otras poblaciones celulares.** Para la comparación de la expansión potencial de crecimiento, se utilizaron las siguientes poblaciones de células: i) Las células madre mesenquimales (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) las células derivadas de tejido adiposo (Patente de EE.UU. N° 6.555.374 B1; Solicitud de Patente de EE.UU. US20040058412); iii) fibroblastos de la piel dérmica normal (CC-2509 lote # 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); y iv) Células derivadas de placenta. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero bovino definido (Hyclone, Logan, UT; Lot#AND18475), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)). Para pasos posteriores, los cultivos de células se trataron como sigue. Después de tripsinización, las células viables se contaron después de la tinción de azul de tripano (por ejemplo, suspensión de células (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO); el número de células viables se estimó utilizando un hemocitómetro).
- 20 **[0224]** Tras el recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces recubiertos de gelatina T 75 en 25 mililitros de medio de crecimiento fresco. Las células se cultivaron en atmósfera estándar con dióxido de carbono al 5% a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia, se sometieron a pasajes. Este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron la senectud.
- 30 **[0225]** En cada paso, las células se trataron con tripsina y se contaron. El rendimiento viable de células, duplicación de la población [ $\ln(\text{célula final}/\text{célula inicial})/\ln 2$ ], y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población) se calcularon. Para los fines de la determinación de la expansión de células óptima, el rendimiento total de células por paso se determina multiplicando el rendimiento total para el paso anterior por el factor de expansión para cada paso (es decir, la expansión = factor de célula inicial/final de células).
- 35 **[0226] Potencial de expansión de los bancos de células a baja densidad.** El potencial de expansión de las células en bancos en el paso 10 se puso a prueba. Se probaron y Células derivadas de la placenta; fibroblastos normales de la piel dérmica (Cambrex, Walkersville, MD CC-2509 lot # 9F0844). Estas poblaciones de células habían sido almacenadas en el paso 10 anteriormente, habiendo sido sembradas a 5.000 células/cm<sup>2</sup> y cultivadas hasta la confluencia en cada paso a ese punto. Se determinó el efecto de la densidad celular en las poblaciones de células tras descongelación de células en el paso 10. Las células se descongelaron en condiciones estándar y se contaron usando tinción de azul de tripano. Las células descongeladas fueron entonces sembradas a 1.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo (DMEM: bajo nivel de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero bovino definido (Hyclone, Logan, UT; Lot#AND18475), 0,001% 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 100 penicilina unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin y 0,25 microgramos/mililitro anfotericina (Invitrogen, Carlsbad, CA)). Las células fueron cultivadas en condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces a la semana y se pasaron las células cuando alcanzaron aproximadamente el 85% de confluencia. Las células fueron posteriormente a pasajeadas hasta la senectud. Las células se trataron con tripsina y se contaron en cada pasaje. El rendimiento celular, duplicación de la población ( $\ln(\text{célula inicial}/\text{final de células})/\ln 2$ ), y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población) se calcularon para cada paso. El rendimiento total de células por paso se determinó multiplicando el rendimiento total para el paso anterior por el factor de expansión para cada paso (es decir, la expansión = factor de célula inicial/final de células).
- 50 **[0227] Expansión de Células derivadas de la placenta a baja densidad de siembra de células inicial.** El potencial de expansión de los cultivos celulares derivados de la placenta recién aislada bajo condiciones de baja siembra de células se puso a prueba en otro experimento. Se aislaron células derivadas de placenta como se describe en el Ejemplo 1. Las células se sembraron a 1.000 células/cm<sup>2</sup> y se pasaron como se describe anteriormente hasta la senescencia. Las células fueron cultivadas en condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se pasaron al llegar a aproximadamente el 85% de confluencia. En cada pasaje, las células se tripsinizaron y se contaron mediante tinción con azul de tripano. El rendimiento celular, duplicación de la población ( $\ln(\text{Inicial Final célula}/\text{célula})/\ln 2$ ) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población) se calcularon para cada pasaje. El rendimiento total de células por cada pasaje se determina multiplicando el rendimiento total para el pasaje anterior por el factor de expansión para cada pasaje (es decir, la expansión = factor de célula inicial/final de células). Las células se cultivaron en matraces de gelatina y gelatina no recubiertos.
- 65

**[0228] Expansión clonal de neonatología o derivados de las células de la placenta materna.** La clonación se puede utilizar con el fin de expandir una población de células neonatales o maternas con éxito a partir de tejido placentario. Después del aislamiento de tres diferentes poblaciones de células de la placenta (aspecto neonatal, de aspecto maternal, y de la región de las vellosidades), estas poblaciones de células se expanden en condiciones de crecimiento estándar y luego cariotipo para revelar la identidad de las poblaciones de células aisladas. Al aislar las células de una madre que pare un niño, es posible distinguir entre los cromosomas masculinos y femeninos mediante la realización de análisis de metafase. Estos experimentos se pueden usar para demostrar que las células de la línea de la parte superior son cariotipo positivo para fenotipo neonatal, las células de la línea media son cariotipo positivo tanto para fenotipos neonatal y como materno, y células finales son cariotipo positivo para células maternas.

**[0229] Otras condiciones de crecimiento.** En otros experimentos se ampliaron las células, ya sea en proteína de membrana no recubierta, recubierta con colágeno, recubierta de fibronectina, recubierta de laminina, o extracelular (por ejemplo, MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA)) - placas recubiertas. Los cultivos se han demostrado para expandir bien en estos diferentes matrices.

### Resultados

**[0230] Comparación del potencial de expansión de células derivadas de la placenta con otras poblaciones celulares.** Células derivadas de placenta expandidas por más de 40 pasajes, generando los rendimientos celulares de  $> 1 \times 10^{17}$  células en 60 días. Por el contrario, las MSC y los fibroblastos seniles después de  $< 25$  días y  $< 60$  días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas de tejido adiposo y omental y expandido por casi 60 días, se generaron los rendimientos totales de células de  $4.5 \times 10^{12}$  y  $4.24 \times 10^{13}$ , respectivamente. Por lo tanto, cuando se sembraron a  $5.000$  células/cm<sup>2</sup> en las condiciones experimentales utilizadas, PDC expandido mucho mejor que los otros tipos de células cultivadas bajo las mismas condiciones (Tabla 5-1).

**Tabla 5-1.** Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células cultivadas a la senescencia

Tipo de célula	Senescencia	Población total de duplicaciones	Rendimiento total de células
MSC	24 día	8	$4,72 \times 10^7$
Células derivadas de tejido adiposo (Artecel, patente de EE.UU. n°. 6,555,374)	57 día	24	$4,5 \times 10^{12}$
Fibroblastos	53 día	26	$2,82 \times 10^{13}$
Placenta	80 día	46	$2,49 \times 10^{19}$

**[0231] Expansión del potencial de los bancos de células a baja densidad.** Células derivadas de la placenta y fibroblastos se expandieron durante más de 10 pasajes, generando rendimientos celulares de  $> 1 \times 10^{11}$  células en 60 días (Tabla 5-2). Después de 60 días en estas condiciones, las células derivadas de la placenta se convirtieron en senescente mientras que las poblaciones de células de fibroblastos se sometieron a senescencia después de 80 días, completando  $> 40$  duplicaciones de población.

**Tabla 5-2.** características de crecimiento para las diferentes poblaciones celulares usando la expansión de bajo crecimiento de la densidad del pasaje 10 a través de la senescencia

Tipo Celula (Pasaje No.)	Senescencia	Población total de duplicaciones	Rendimiento total de células
Fibroblastos (P10)	80 day	43,68	$2,59 \times 10^{11}$
Placenta (P10)	60 día	32,96	$6,09 \times 10^{12}$

**[0232] Expansión de células derivadas de la placenta a baja densidad de siembra de células inicial.** Células derivadas de la placenta se ampliaron a baja densidad ( $1.000$  células/cm<sup>2</sup>) en placas o matraces recubiertos de gelatina y sin recubrir. El potencial de crecimiento de estas células en estas condiciones era bueno. Las células se expandieron rápidamente en una fase logarítmica de crecimiento. La tasa de expansión de las células era similar a la observada cuando las células derivadas de la placenta se sembraron a  $5.000$  células/cm<sup>2</sup> en matraces recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. No se observaron diferencias en el potencial de la expansión de células entre el cultivo en cualquiera de los frascos no recubiertos o matraces recubiertos de gelatina. Las células cultivadas en matraces recubiertos de gelatina parecían fenotípicamente más pequeños que las células cultivadas en frascos no recubiertos.

**[0233] Expansión clonal de Neonatología o células derivadas del placenta materna.** Una población celular neonatal o materna clonal emergente se puede ampliar a partir de células de placenta derivadas de aislados del

aspecto neonatal o del aspecto maternal, respectivamente, de la placenta. Las células se diluyeron en serie y después se sembraron en placas recubiertas con gelatina en medio de crecimiento para la expansión a 1 célula/pocillo en placas recubiertas de gelatina de 96 pocillos. A partir de esta clonación inicial, se identifican clones expansivos, tripsina, y se volvieron a sembrar en placas revestidas de gelatina de 12 pocillos en medio de crecimiento y después se pasaron a continuación en matraces recubiertos de gelatina T25 a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento. La subclonación se lleva a cabo para asegurar que una población clonal de las células ha sido identificado. Para la subclonación experimentos, las células se tratan con tripsina y se sembraron de nuevo en 0,5 células/pocillo. Los subclones que crecen bien se expandieron en matraces T25 recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup>/matraz. Las células se pasaron a 5.000 células/cm<sup>2</sup>/matraz T75. Las características de crecimiento del mejor clon se representan, para demostrar la expansión celular. análisis de cariotipo puede confirmar que el clon es neonatal o materno.

**[0234] Resumen.** Las condiciones de la expansión de células actuales de crecimiento PDC aisladas a densidades de alrededor de 5.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento en matraces recubiertos de gelatina o no recubiertos bajo oxígeno atmosférico estándar son suficientes para generar grandes números de células en el pasaje 11. PDC también se pueden ampliar fácilmente utilizando las condiciones de cultivo de densidad más bajas (por ejemplo, aproximadamente 1.000 células/cm<sup>2</sup>). Se prefiere células derivadas de la placenta de cultivo en condiciones atmosféricas estándar para generar grandes grupos de células. Las condiciones de cultivo pueden ser alteradas para lograr capacidad proliferativa y/o alterARntiva la de diferenciación de células derivadas de la placenta.

**[0235]** En las condiciones utilizadas, mientras que el potencial de expansión de MSC y células derivadas de tejido adiposo se limitó, células derivadas de la placenta se amplían fácilmente a un gran número. Los datos demuestran que las líneas celulares derivadas de la placenta desarrolladas en el presente documento se pueden expandir para más de 40 duplicaciones para proporcionar el número de células suficientes, por ejemplo, para los bancos de células, mientras que las células madre mesenquimales no se pueden ampliar para obtener grandes cantidades de células.

### **Referencias**

#### **[0236]**

Hayflick (1974) J. Am. Geriatr. Soc. 22 (1): 1-12

### **EJEMPLO 6**

#### **Análisis de cariotipo de las células derivadas de placenta**

**[0237]** Las líneas celulares utilizadas en la terapia celular son preferentemente homogénea y libre de cualquier tipo de célula contaminante. Las células humanas se utilizan en la terapia de células deben tener un número normal de cromosomas (46) y la estructura. Para identificar las líneas celulares derivados de la placenta que son homogénea y libre de células de origen no-tejido de la placenta, se analizaron los cariotipos de las muestras de células.

### **Materiales y métodos**

**[0238]** PDC a partir de tejido posparto de un neonato masculino se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco Carlsbad, CA), 15% (v) de suero v/fetal bovino (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 0.001 % (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA)). El tejido posparto de un recién nacido macho (X, Y) se selecciona para permitir la distinción entre las células derivadas neonatalmente y las células derivadas maternalmente (X, X). Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron a aproximadamente 80% de confluencia. Un matraz T25 que contiene células se llenó hasta el cuello con medio de crecimiento. Las muestras se administraron a un laboratorio de citogenética clínica por mensajería (el tiempo estimado de transporte de laboratorio a laboratorio es de una hora). El análisis cromosómico se llevó a cabo por el Center for Human & Molecular Genetics at the New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De las veinte células en metafase contadas, cinco fueron analizadas por el número de cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra de células se caracteriza por ser homogénea si se observaron dos cariotipos. Una muestra de células se caracteriza por ser heterogénea si se han cumplido más de dos cariotipos. Células en metafase adicionales se contaron y se analizaron cuando se identificó un número cariotipo heterogéneo (cuatro).

### **Resultados**

**[0239]** Se interpretó que todas las muestras de células enviadas para análisis cromosómico presentaron un aspecto normal. Tres de las trece líneas celulares analizadas exhibieron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) que indica la presencia de células derivadas de ambos orígenes neonatal y materna (Tabla 6-1). Las células derivadas de tejido de la placenta-N fueron aisladas del aspecto neonatal de placenta. En el punto cero, esta línea celular apareció XY

homogénea. Sin embargo, en el pasaje nueve, la línea celular fue heterogénea (XX/XY), lo que indica una presencia no detectada previamente de las células de origen materno.

**Tabla 6-1. Análisis de cariotipo de PDC**

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

**Key: N- Lado neonatal; V- Región vellosa; M- Lado materno; C- clon**

**[0240] Resumen.** Células derivadas de placenta identificadas por análisis de los cromosomas cuyos cariotipos parecen normales como interpretados por un laboratorio de citogenética clínica. Análisis de cariotipo también identificó líneas de células libres de células maternas, como se determina por cariotipo homogéneo.

#### **EJEMPLO 7**

##### **Evaluación de marcadores de superficie celular derivados de placenta humana por citometría de flujo**

**[0241]** Caracterización de proteínas de superficie celular o "marcadores" por citometría de flujo se puede utilizar para determinar la identidad de una línea celular. La consistencia de la expresión se puede determinar a partir de múltiples donantes y en las células expuestas a diferentes condiciones de cultivo y procesamiento. Se caracterizaron líneas celulares posparto derivadas de placenta (por citometría de flujo) que proporciona un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

##### **Materiales y métodos**

**[0242] Medios.** Las células se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero bovino fetal (FBS); (Hylcone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA)).

**[0243] Recipientes de cultivo.** Las células fueron cultivadas en T75 tratada con plasma, T150, T225 y matraces de cultivo tisular (Corning, Corning, NY) hasta confluencia. Las superficies de crecimiento de los frascos se recubrieron con gelatina mediante incubación de 2% (w/v) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

**[0244] Tinción de anticuerpos.** Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, CA) y separadas con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se añadió anticuerpo para el marcador de superficie celular de interés (Tabla 7-1) a cien microlitros de suspensión de células, y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

**[0245] Análisis de citometría de flujo.** Citometría de flujo El análisis se realizó con un instrumento FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA).

**[0246] Anticuerpos a los marcadores de superficie celular.** Se utilizaron los siguientes anticuerpos frente a marcadores de superficie celular.

**Tabla 7-1.** Los anticuerpos a marcadores de superficie celular

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

**[0247] Comparación pasaje a pasaje.** Se analizaron las células derivadas de placenta en pasajes 8, 15, y 20.

40 **[0248] Comparación donantes a donantes.** Para comparar las diferencias entre los donantes, las células de la placenta de diferentes donantes se compararon entre sí.

**[0249] Comparación de recubrimiento de superficie.** Células derivadas de placenta cultivadas en matraces recubiertos de gelatina se comparó con células derivadas de placenta cultivadas en frascos no recubiertos.

45 **[0250] Comparación de la enzima de digestión.** Se compararon cuatro tratamientos utilizados para el aislamiento y la preparación de células. Las células aisladas a partir de placenta mediante tratamiento con 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispsa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispsa se compararon.

50 **[0251] Comparación de capa placentaria.** Las células aisladas del aspecto maternal de tejido de la placenta se compararon con las células aisladas de la región de las vellosidades de tejido de la placenta y células aisladas del aspecto fetal neonatal de placenta.

### **Resultados**

55 **[0252] Caracterización de células derivadas de placenta.** Células derivadas de placenta analizadas por citometría de flujo se mostraron positivas para la producción de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicado por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicadas por los valores de fluorescencia comparable a la de control de IgG. Se tuvieron en cuenta las variaciones en los valores de fluorescencia de curvas positivas. Mientras que la media (es decir, CD13) y rango (es decir, CD90) de las curvas de positivos mostró alguna variación, las curvas parecían normales, lo que confirma una población homogénea, y la fluorescencia mostraron valores de mayor que el control de IgG.

65 **[0253] Comparación pasaje a pasaje.** Células derivadas de placenta en pasajes 8, 15, y 20 se analizaron por citometría de flujo fueron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa, y HLA-A,

B, C, como se refleja en el aumento del valor de la fluorescencia en relación con el control de IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, como se indica por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

5 **[0254] Donantes para la comparación de los donantes.** Células derivadas de placenta aisladas de donantes independientes analizados por citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa, y HLA-A, B, C, con un aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ como se indica por valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

10 **[0255] El efecto del recubrimiento de superficie con gelatina.** Células derivadas de la placenta expandida en cualquiera de los matraces recubiertos de gelatina o sin recubrimiento analizadas por citometría de flujo expresaron CD 10, CD 13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa, y HLA-A, B, C, reflejados en el aumento de los valores de la fluorescencia en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD 141, y HLA-DR, DP, DQ indicado por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

15 **[0256] Efecto del proceso de digestión enzimática en el perfil de marcador de superficie celular.** PDC aisladas utilizando diversas enzimas de digestión se analizaron por citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa, y HLA-A, B, C, como se indica por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, como se indica por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

20 **[0257] Comparación de capa placentaria.** Las células aisladas de las capas materna, las vellosidades, y capas neonatales de la placenta, respectivamente, analizadas por citometría de flujo se mostraron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, alfa PDGFr, y HLA-A, B, C, como indicadas por el aumento del valor de la fluorescencia en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, como se indica por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

25 **[0258] Resumen.** Análisis de células derivadas de la placenta por citometría de flujo ha establecido un perfil útil para identificar de estas líneas celulares. células derivadas de placenta son positivos 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 las variaciones de variables que incluyen el donante, pasaje, revestimiento de la superficie recipiente de cultivo, enzimas de digestión, y la capa de la placenta. Alguna variación en la curva de valor de fluorescencia histograma individuo significa y se observaron rangos, pero todas las curvas positivas bajo todas las condiciones ensayadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia mayores que el control de IgG, lo que confirma que las células comprenden una población homogénea que tiene la expresión positiva de los marcadores .

30

## EJEMPLO 8

### Análisis de células derivadas de placenta por matrices de Affymetrix GeneChip®

35 **[0259]** Ensayos de Affymetrix GeneChip® se utilizaron para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas de la placenta con células del cordón umbilical derivadas, fibroblastos, células madre mesenquimatosas humanas, y otra línea celular derivada de la médula ósea humana. Este análisis proporciona una caracterización de las células después del parto y se identificaron los marcadores moleculares únicos para estas células.

### 50 Materiales y métodos

#### **Aislamiento y cultivo de células**

55 **[0260]** Las células derivadas de tejido post-parto. cordones umbilicales y placentas humanas se obtuvieron de National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) a partir de un parto normal a término con el consentimiento del paciente. Se recibieron los tejidos y las células fueron aisladas como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento (Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM de baja glucosa; Invitrogen, Carlsbad, CA) con 15% v) de suero (v/fetal bovino (Hyclone, Logan UT), penicilina 100 unidades/ml, 100 microgramos/mililitro de estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA), y 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO)) en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron en condiciones de crecimiento estándar.

60 **[0261] Fibroblastos.** Fibroblastos dérmicos humanos fueron adquiridos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Número de lote 9F0844) y se obtuvieron de ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Hyclone) y penicilina 100 unidades/mililitro, 100 micro gramos/mililitro de estreptomina (Invitrogen). Las células fueron cultivadas sobre

65

plástico tratado de tejidos estándar.

**[0262]** Las células madre mesenquimales humanas (hMSC). hMSCs se compraron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en MSCGM Media (Cambrex). Las células se cultivaron en plástico cultivaron tejido estándar a 37°C en atmósfera estándar con 5% de CO<sub>2</sub>. **[0263]** Las células iliaca humana cresta ósea Morrow (ICBM). iliaca óseo de cresta ósea humana se recibió de ISRND con el consentimiento del paciente. La médula ósea se procesó de acuerdo con el método descrito por Ho et al. (Publicación Internacional PCT No. WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (155 micromolar NH<sub>4</sub>Cl, 10 micromolar KHCO<sub>3</sub>, y 0,1 micromolar EDTA, pH 7,2) en una proporción de médula ósea 1 parte a 20 partes tampón de lisis. La suspensión de células se agitó con vórtice, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo alfa (Invitrogen) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal y glutamina 4 micromolar. Las células se centrifugaron y el sedimento celular se resuspendió en medio fresco. Las células mononucleares viables se contaron usando exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico de tejido se cultivaron a 5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> a cualquiera de O<sub>2</sub> atmosférica estándar o al 5% de O<sub>2</sub>. Las células se cultivaron durante 5 días sin cambio de medio. Medios y las células no adherentes se retiraron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

**[0264]** El aislamiento de ARNm y análisis GeneChip®. Activamente crecientes cultivos de células se retiraron de los frascos con un raspador de células en frío tampón fosfato salino (PBS). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Se retiró el sobrenadante, y las células se resuspendieron en PBS fresco y se centrifugó de nuevo. Se retiró el sobrenadante, y el sedimento celular fue inmediatamente congelados y almacenados a -80°C. ARNm celular se extrajo y se transcribió en ADNc. a continuación se transcribe en ADNc y cARN marcado con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con HG U133A GeneChip ® matriz de oligonucleótidos (Affymetrix, Santa Clara, CA). La colección de la hibridación y los datos se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los análisis se realizaron (SAM) utilizando la versión "Análisis de la importancia microensayos" 1.21 software de ordenador (Universidad de Stanford ;, Tusher, V.G. y otros, 2001, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 98: 5116 a 5121).

**Resultados**

**[0265]** Catorce poblaciones diferentes de células se analizaron en este estudio. Las células junto con la información del pasaje, sustrato de cultivo, y los medios de cultivo se enumeran en la Tabla 8-1.

**Tabla 8-1.** Las células analizadas por el estudio de microensayos. Las líneas celulares se enumeran por sus códigos de identificación junto con el pasaje en el momento del análisis, sustrato de crecimiento celular, y medios de crecimiento.

Población de células	Pasaje	Sustrato	Medios
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, BME
ICBM (070203) (5% O <sub>2</sub> )	3	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (std O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (5% O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM 10% FBS
hMSC (Lot 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblast (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10 % FBS
hFibroblast (ATCC CRL-1501)	4	Plástico	DMEM-F12, 10 % FBS

**[0266]** Los datos fueron evaluados por un Análisis de componentes principales, análisis de los 290 genes que son expresados diferencialmente en las células. Este análisis permite una comparación relativa de las similitudes entre las poblaciones. La tabla 8-2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de las parejas de células. Las distancias euclidianas se basaron en la comparación de las células a partir de los 290 genes que son expresados diferencialmente entre los tipos de células. La distancia euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

**Tabla 8-2.** Las distancias euclidianas para las parejas de células. La distancia euclidiana se calculó para los tipos de células utilizando los 290 genes que son expresados diferencialmente entre los tipos de células. Similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclídea.

<i>Pareja de células</i>	<b>Distancia Euclidiana</b>
ICBM-hMSC	24,71
Placenta-umbilical	25,52
ICBM-Fibroblast	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

**[0267]** Tablas 8-3, 8-4, y 8-5 muestran la expresión de genes en el aumento de células derivadas de la placenta (Tabla 8-3), el aumento en umbilical las células del cordón derivados (Tabla 8-4), y la reducción en por cordón umbilical y células derivadas de la placenta (Tabla 8-5). La columna titulada "Identificación de conjunto de sondas" se refiere al código de identificación del fabricante para los conjuntos de varias sondas de oligonucleótidos localizados en un sitio en particular en el chip, que se hibridan con el gen llamado (columna "Gen"), que comprende una secuencia que puede encontrarse dentro de la base de datos NCBI (GenBank) en el número de acceso especificado (columna "número de acceso de NCBI").

**Tabla 8-3.** Los genes que se muestran aumentarse específicamente la expresión en las células derivadas de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes aumentados en células derivadas de Placenta</b>		
<b>Identificación de conjunto de sondas</b>	<b>Nombre de gen</b>	<b>Número de acceso NCBI</b>
209732_at	Tipo C (dependiente de calcio, dominio de reconociendo de carbohidrato) lectina, miembro de superfamilia 2 (inducido por activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	Dehidrogenasa de aldehído familia 1, miembro A2	AB015228
206367_at	renina	NM_000537
210004_at	lipoproteína de baja densidad oxidizada (tipo lectina) receptor 1	AF035776
214993_at	Homo sapiens, clon IMAGE:4179671, ARNm, parcial cds	AF070642
202178_at	quinasa de proteína C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	subregulado cancer ovario 1	NM_014890
213542_at	Homo sapiens ARNm; ADNc DKFZp547K1113 (de clon DKFZp547K1113)	AI246730



**Table 8-4.** Los genes que se muestran han aumentado específicamente la expresión en las células del cordón umbilical derivadas en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes aumentados en células derivadas de cordón umbilical</b>		
<b>Identificación de conjunto de sondas</b>	<b>Nombre de gen</b>	<b>Nombre de gen</b>
202859_x_at	interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	interleucina 8	AF043337
210222_s_at	reticulon 1	BC000314
204470_at	quemoquina (C-X-C motivo) ligando 1 (melanoma actividad de estimulación de crecimiento)	NM_001511
206336_at	quemoquina (C-X-C motivo) ligando 6 (granulocito proteína quemoatáctica 2)	NM_002993
207850_at	quemoquina (C-X-C motivo) ligando 3	NM_002090
203485_at	reticulon 1	NM_021136
202644_s_at	tumor factor necrosis, proteína inducida alfa 3	NM_006290

**Table 8-5.** Los genes que se muestran tener una disminución en la expresión de las células del cordón umbilical y la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes aumentados en células derivadas de cordón umbilical</b>		
<b>Identificación de conjunto de sondas</b>	<b>Nombre de gen</b>	<b>Nombre de gen</b>
210135_s_at	homeobox de baja estatura 2	AF022654.1
205824_at	choque térmico 27kDa proteína 2	NM_001541.1
209687_at	quemoquina (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de células estromales 1)	U19495.1
203666_at	quemoquina (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de células estromales 1)	NM_000609.1
212670_at	elastina (estenosis aortica supravulvar, síndrome Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	Homo sapiens ARNm; ADNc DKFZp586M2022 (de clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	homeobox de mesénquima 2 (homeobox específico de crecimiento detenido)	NM_005924.1
205817_at	sine oculis homeobox homólogo 1 (Drosophila)	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador de morfogenesis asociado desgreñado 2	BF513244
213488_at	DKFZP586B2420 proteína	AL050143.1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	tetranectina (proteína de unión de plasminogen)	NM_003278.1
205743_at	src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	gen de traslocación de célula B 1, anti-proliferativo	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción relacionado a runt 3	AA541630
219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	interleucina 11 receptor, alfa	NM_004512.1
202465_at	procolagen C-potenciador de endopeptidasa	NM_002593.2
203706_s_at	homólogo frizzled 7 (Drosophila)	NM_003507.1
212736_at	gen hipotético BC008967	BE299456
214587_at	colagen, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	tenascina C (hexabrachion)	NM_002160.1
210239_at	iroquois homeobox proteína 5	U90304.1
203903_s_at	hefaestina	NM_014799.1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	glicoproteína de vesículo sináptico 2	NM_014849.1
213909_at	Homo sapiens ADNc FLJ12280 fis, clone MAMMA1001744	AU147799

ES 2 597 837 T3

206315_at	citoquina similar al receptor del factor 1	NM_004750.1
204401_at	potasio intermedia / pequeña conductancia de calcio canal activado, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
216331_at	integrina, alfa 7	AK022548.1
209663_s_at	integrina, alfa 7	AF072132.1
213125_at	proteína DKFZP586L151	AW007573
202133_at	co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ)	AA081084
206511_s_at	homeobox de homólogo sine oculis 2 (Drosophila)	NM_016932.1
213435_at	proteína KIAA1034	AB028957.1
206115_at	respuesta de crecimiento temprano 3	NM_004430.1
213707_s_at	homeobox no distal 5	NM_005221.3
218181_s_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
209160_at	aldo-ceto reductasa familia 1, miembro de C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II)	AB018580.1
213905_x_at	biglicano	AA845258
201261_x_at	biglicano	BC002416.1
202132_at	co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ)	AA081084
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
213791_at	proencefalina	NM_006211.1
205422_s_at	integrina beta tipo 1 (con dominios de recepción similares a EGF)	NM_004791.1
214927_at	Homo sapiens ARNm de longitud completa inserción ADNc clon Euroimage 1968422	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	proteína KIAA0367	AB002365.1
219789_at	natriurético receptor del péptido C/guanilato ciclasa C (péptido atrionatriurético receptor C)	AI628360
219054_at	hipotética proteína FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	Homo sapiens ARNm; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesículas 5 (myobrevin)	NM_006634.1
201843_s_at	EGF que contiene proteína de la matriz extracelular fibulin tipo 1	NM_00410 <sup>5</sup> .2
221478_at	interacción de proteínas BCL2 / adenovirus E1B de 19 kDa 3-como	AL132665.1
201792_at	proteína de unión a AE 1	N_001129.2
204570_at	citocromo c oxidasa subunidad polipeptídica VIIa 1 (músculo)	NM_001864.1
201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
202718_at	proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa	NM_000597.1

5

10

15

20

[0268] Tablas 8-6, 8-7, y 8-8 muestran la expresión de genes aumentada en los fibroblastos humanos (Tabla 8-6), las células de ICBM (Tabla 8-7), y MSC (Tabla 8-8).

Tabla 8-6. Los genes se han demostrado aumentar la expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

5

<b>Genes aumentados en fibroblastos</b>	
	fosfatasa de doble especificidad 2
10	proteína KIAA0527
	Homo sapiens ADNc: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G)
15	inhibina, beta A (activina A, activina AB polipéptido alfa)
	pirofosfatasa ectonucleótido/fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	proteína KIAA10 <sup>53</sup>
	proteína asociada a microtúbulos 1A
20	proteína dedos de zinc 41
	proteína HSPC019
	Homo sapiens ADNc: FLJ23564 fis, clon LNG10773
	ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
25	proteína LIM (similar al enigma de quinasa de proteína C de rata vinculante)
	inhibidor de potenciador del gen de polipéptido ligero kappa en las células B, proteína quinasa de complejo asociado
	proteína hipotética FLJ22004
30	(Clon CTG-A4) secuencia de ARNm humano
	EST, moderadamente similares a citoquina factor de 2 similar al receptor; CRL2 precursor del receptor de citoquinas [Homo sapiens]
	factor de crecimiento transformante, beta 2
35	proteína hipotética MGC29643
	antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2

Tabla 8-7. Los genes que se han mostrado tener una mayor expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

40

<b>Genes aumentados en las células ICBM</b>	
	proteína con repeticiones de anquirina cardiaca
45	MHC de clase I región ORF
	integrina, alfa 10
	proteína hipotética FLJ22362
	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
50	proteína inducida por interferón 44
	SRY (región determinante del sexo Y)-box 9 (displasia campomélica, autosómica reversión sexual)
	proteína de queratina asociada 1-1
	hipocalcina tipo 1
	dentado 1 (síndrome de Alagille)
55	proteoglicano 1, gránulo secretor

60

65

**Tabla 8-8.** Los genes se han mostrado tener una mayor expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes aumentados en las células MSC</b>	
5	interleucina 26
	maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
	subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
	v-fos FBJ osteosarcoma murino oncogén viral homólogo
10	proteína hipotética DC42
	subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
	FBJ osteosarcoma murino oncogén viral homólogo B
	WNT1 señalización inducible proteína de la ruta 1
15	secuencia transformadora línea celular derivada de MCF.2
	canal de potasio, K subfamilia, miembro 15
	homeoproteína cartílago de clase emparejado 1
	ADNc Homo sapiens FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
20	ADNc Homo sapiens FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
	Junio B proto-oncogén
	CLL de células B/linfoma 6 (proteína de dedo de cinc 51)
	dedo de zinc de proteínas 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

[0269] **Resumen.** El análisis GeneChip® se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células después del parto derivadas de placenta. Este análisis incluye células derivadas de tres placentas diferentes. El estudio también incluyó tres líneas diferentes de células del cordón umbilical, derivadas de dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesenquimales, y tres líneas de células de médula ósea de la cresta ilíaca. El **ARNm** que fue expresado por estas células se analizó por Affymetrix GeneChip® que contenía sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

[0270] Los resultados mostraron que 290 genes se expresan diferencialmente en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen diez genes que se incrementan específicamente en las células derivadas de la placenta. Se han encontrado cincuenta y cuatro genes específicamente para tener menores niveles de expresión en la placenta.

[0271] La expresión de genes seleccionados ha sido confirmada por PCR en el Ejemplo 9. Estos resultados demuestran que las células derivadas de la placenta tienen un perfil de expresión de genes distintos, por ejemplo, en comparación con las células y los fibroblastos derivados de médula ósea.

### **Ejemplo 9**

#### **Marcadores de células en células derivadas del Placenta**

[0272] Las similitudes y diferencias en la expresión de genes entre células derivadas de la placenta humana y células derivadas de otras fuentes fueron evaluadas mediante la comparación de sus perfiles de expresión génica utilizando un Affymetrix GeneChip®. Se identificaron seis genes "firma": oxidan receptor LDL 1, la interleucina-8, la renina, reticulon, ligando del receptor de quimioquinas 3 (CXC ligando 3), y la proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes "firma" se expresaron en niveles relativamente altos en células derivadas de la placenta. Este análisis se realizó para verificar los datos de microensayos y encontrar conformidad/divergencia entre el gen y la expresión de proteínas, así como para establecer una serie de ensayo fiable para la detección de identificadores únicos para las células derivadas de la placenta.

#### **Métodos y materiales**

[0273] **Células.** Células derivadas de la placenta (tres aislamientos, incluyendo una cepa predominantemente neonatal que se identifican por cariotipo análisis) y Fibroblastos Dérmicos Humanos Normales (NHDF; neonatal y de adultos) se cultivaron en medio de cultivo (DMEM-bajo de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15 % (v/v) de suero bovino fetal (Cat #SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro estreptococos micina (Gibco, Carlsbad, CA)) en un matraz T75 recubierta con gelatina. Las células madre mesenquimales (MSC) se cultivaron en un kit de bala Mesen- Medio chymal crecimiento de células madre (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

[0274] Para la IL-8 experimentos, las células se descongelaron a partir de nitrógeno líquido y se sembraron en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup>, que se cultiva durante 48 horas en medio de crecimiento y

luego cultivadas durante 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero [DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina 50 unidades/mililitro, estreptomycinina 50 microgramos/mililitro (Gibco, Carlsbad, CA) y 0,1% (w/v) albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. Después de este tratamiento, se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares.

5 **[0275] El cultivo de células para el ensayo ELISA.** células derivadas de placenta y fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células se congelaron a paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de 15 ml de centrifuga. Después de centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante.  
10 Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se contaron. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> que contiene 15 mililitros de medio de crecimiento a 375.000 células / matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El medio privación de suero se recogió al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos, y se almacenó a -20°C.

15 **[0276]** Para estimar el número de células en cada frasco, 2 ml de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) se añadió a cada frasco. Después de células desprendidas del matraz, la actividad tripsina se neutralizó con 8 ml de medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió medio de crecimiento 1 mililitro a cada tubo para resuspender las células. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

20 **[0277] Ensayo ELISA.** La cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero se analizó mediante ensayos de ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se ensayaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

25 **[0278] Aislamiento de ARN total.** Se extrajo ARN de las células y los fibroblastos derivados de la placenta confluentes o para IL-8 expresión a partir de células tratadas como se describe anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros RLT tampón que contiene beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). Se extrajo el ARN según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a tratamiento con DNasa (2,7 U / muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80 ° C. Se extrajo ARN de placenta humana. Tejido (30 miligramos) se suspendió en 700 microlitros de tampón que contiene RLT beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente, y la extracción de ARN procedieron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ARN se extrajo con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C.

35 **[0279] Transcripción inversa.** El ARN se transcribe de forma inversa utilizando hexámeros al azar con reactivos de transcripción reversa 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.

40 **[0280]** Los genes identificados por ADNc microensayo regulado únicamente en las células después del parto ("genes de firma", incluyendo el receptor de LDL oxidado, la interleucina-8, la renina, y reticulon), se investigaron más utilizando en tiempo real y PCR convencional.

45 **[0281] PCR en tiempo real.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando ASSAYS-ON-DEMAND™ productos de expresión: receptor de LDL oxidada (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); ligando CXC 3 (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH se mezclaron con ADNc y mezcla maestra TaqMan Universal de PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencia 7000 con ABI Prism® 7000 software SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA ). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C para 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los datos de PCR se analizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario con el n° 2 de Applied Biosystems de ABI Prism® 7700 Sequence Detection System).

55 **[0282] PCR convencional.** PCR convencional se realizó utilizando un ABI PRISM® 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. PCR se realizó con 2 microlitros de solución de ADNc, 1 3 TAQ polimerasa (nombre comercial AMPLITAQ GOLD®) mezcla universal de PCR tampon de reacción (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. La amplificación se optimiza para cada conjunto de cebadores. Para la IL-8, CXC ligando 3, y reticulon (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos, y 72°C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos, y 72°C durante 30 segundos para 38 ciclos); para el receptor de LDL oxidada y GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos, y 72°C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores utilizados para la amplificación se enumeran en la Tabla 9-1. concentración de cebador en la reacción de PCR final fue de 1 micromolar a excepción de GAPDH, que era 0,5 micromolar. Cebadores GAPDH fueron los mismos que en tiempo real PCR, excepto que la sonda TaqMan® del fabricante no se agregó a la reacción de PCR final. Las muestras se corrieron en 2% (w/v) en gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes fueron capturadas utilizando una película de 667 Twinpack universal (VWR

International, South Plainfield, NJ) utilizando una longitud focal de la cámara polaroid (VWR International, South Plainfield, Nueva Jersey).

**Tabla 9-1: Cebadores usados**

Nombre de cebador	Cebadores	
Receptor de LDL oxidado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3'	(SEQ ID NO: 1)
	A: 5'-AGAATGGAAAAGTGGGAATAGG-3'	(SEQ ID NO: 2)
Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3'	(SEQ ID NO: 3)
	A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3'	(SEQ ID NO: 4)
Reticulon	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3'	(SEQ ID NO: 5)
	A: 5'-AGTAAACATTGAAACACAGCC-3'	(SEQ ID NO: 6)
Interleucina-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3'	(SEQ ID NO: 7)
	A: 5'-CTTCAAAAAGTCTCCACAACC-3'	(SEQ ID NO: 8)
Quimiocina (CXC) ligando 3	S: 5' CCCACGCCACGCTCTCC-3'	(SEQ ID NO: 9)
	A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGTCTCC -3'	(SEQ ID NO: 10)

**[0283] Inmunofluorescencia.** Las células fueron fijadas con 4% frío (w/v) de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Células de la placenta derivada de pasaje a 0 (P0) (un aislado, directamente después del aislamiento) y el pasaje 11 (P11) (dos aislamientos) y fibroblastos (P11) se utilizaron. La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los epítomos siguientes: vimentina (1: 500, Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150; Sigma - levantado contra conejo; o 1: 300; Chemicon, Temecula, CA - levantó contra ratón.), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (CD34 humana Clase III; 1: 100; Dako, Carpinteria, CA). Además, los siguientes marcadores fueron probados en células derivadas de pasaje 11 placenta: GROalfa anti-humano - PE (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-humano GCP-2 (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-humano LDL oxidada receptor 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGA-A anti-humana (1: 100; Santa Cruz, Biotech).

**[0284]** Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína conteniendo PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Cuando el epítomo de interés se encuentra en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), Triton X-100 se omitió en todos los pasos del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítomo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se planteó en contra de cabra se utilizó (GCP-2, ox-LDL R1, Nogo-A), 3% (v/v) de suero de burro en lugar de suero de cabra durante todo el proceso. Los anticuerpos primarios, se diluyó en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpo primario se eliminaron, y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contiene el bloque, junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, o) y/o de cabra anti-conejo IgG - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes) o en burro anti-IgG de cabra - FITC (1: 150, Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

**[0285]** Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando un filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó señal de fluorescencia por encima de la tinción de control donde todo el procedimiento descrito anteriormente se siguió, con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario. Las imágenes representativas se capturaron con una cámara de vídeo digital color y ImagePro(r)® software (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. Montajes en capas se prepararon a continuación, utilizando el software Adobe Photoshop® (Adobe, San Jose, CA).

**[0286] Preparación de células para el análisis FACS.** Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y separadas con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 13.107/mililitro. Cien microlitros alícuotas fueron entregados a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con Perm/Tampón de lavado (BD Pharmingen, San Diego, CA). El anticuerpo se añadió a alícuotas según las especificaciones del fabricante y las células 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 eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que requieren un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de 3% de FBS. El anticuerpo secundario se añadió según la especificación del fabricante y las células 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 eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 ml de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: el receptor oxidado LDL 1 (sc-

5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555 042; BD Pharmingen, Bedford, MA), el ratón IgG1 kappa, (P-4685 y M-5284; Sigma), burro contra cabra IgG (sc-3743; Santa Cruz, Biotech).

5 **[0287] Análisis FACS.** Análisis de citometría de flujo se realizó con FACScalibur™ (Becton Dickinson San Jose, CA).

**Resultados**

10 **[0288]** Resultados de PCR en tiempo real de los genes seleccionados "firma" realizados en ADNc a partir de células derivadas de la placenta humana, de adultos y fibroblastos neonatales, y células madre mesenquimales (MSCs) indican que tanto oxidado del receptor de LDL y de la renina se expresaron en nivel más alto en las células de la placenta derivadas en comparación con otras células. Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el método  $\Delta\Delta C_T$  y se expresaron en una escala logarítmica. No hay diferencia significativa en los niveles de expresión de CXC ligando 3 y GCP-2 se encontraron entre las células y los controles derivados de la placenta. CXC ligando 3 se expresó en niveles muy bajos. GCP-2 se expresó en niveles comparables a los de adultos humanos y fibroblastos neonatales. Los resultados de PCR en tiempo real fueron confirmados por PCR convencional. La secuenciación de productos de PCR validaron aún más estas observaciones. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión del ligando CXC 3 entre las células después del parto y controles utilizando cebadores de ligando PCR convencional CXC 3 que figuran en la Tabla 9-1.

20 **[0289]** La producción de la citoquina IL-8 en células de la placenta derivada es elevada tanto en las células de la placenta derivadas de suero de hambre medio-cultivadas y el crecimiento. Todos los datos en tiempo real PCR se validaron con la PCR convencional y mediante la secuenciación de productos de PCR.

25 **[0290]** Cuando los sobrenadantes de las células cultivadas en medio libre de suero se examinaron para la presencia de IL-8, se detectaron altas cantidades en medios derivados de ciertos aislados de células de la placenta (Tabla 9-2). No se detectó IL-8 en un medio derivado de fibroblastos dérmicos humanos.

30 **Tabla 9-2. la producción de proteína IL-8 medido por ELISA**

Tipo de célula	IL-8
Fibroblastos humanos	ND
Aislado de placenta 1	ND
Aislado de placenta 2	ND
Aislado placentario 3 (normal O <sub>2</sub> )	17,27±8,63
Aislado de placenta 3 (lowO <sub>2</sub> , W/O BME)	264,92±9,88
Los resultados del ensayo ELISA para la interleucina-8 (IL-8) realizados en células de la placenta y derivados de fibroblastos de piel humana. Los valores se presentan aquí son kilogramo/millón de células, n = 2, sem.	
<b>ND: No detectado</b>	

45 **[0291]** Se examinaron las células derivadas de la placenta para la producción de receptor de LDL oxidada, GCP-2, y GROalfa por análisis FACS. Las células dieron positivo por GCP-2. Receptor de oxidado de LDL y GROalfa no fueron detectados por este método.

50 **[0292]** Se ensayaron las células derivadas de la placenta para la producción de proteínas seleccionadas por el análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (paso 0), las células derivadas de la placenta humana fueron fijadas con 4% de paraformaldehído y se expusieron a los anticuerpos para seis proteínas: von Willebrand Factor, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina del músculo liso alfa, y vimentina. Células teñidas positiva tanto para alfa-actina de músculo liso y vimentina. Este patrón se conserva a través del paso 11. Sólo unas pocas células (<5%) en el pase 0 tiñeron positivas para citoqueratina 18.

55 **[0293]** Las células derivadas de la placenta en el paso 11 también se investigaron mediante inmunocitoquímica para la producción de GROalfa y GCP-2. Células derivadas de placenta eran GCP-2 positivas, pero la producción GROalfa no fue detectada por este método.

60 **[0294] Resumen.** Conformidad entre los niveles de expresión de genes medidos por microensayo y PCR (tanto en tiempo real y convencional) se ha establecido para cuatro genes: oxidado del receptor de LDL 1, la renina, reticulon, e IL-8. La expresión de estos genes se regula diferencialmente en el nivel de ARNm en células de placenta derivadas, con IL-8 también reguladas diferencialmente a nivel de proteínas. La presencia de receptor de LDL oxidada no se detectó a nivel de proteínas por análisis FACS en células derivadas de la placenta. Expresión diferencial de GCP-2 y CXC ligando 3 no se confirmó en el nivel de ARNm, sin embargo, se detectó GCP-2 a nivel de proteínas por análisis FACS en las células de la placenta derivadas. A pesar de que este resultado puede no coincidir totalmente con los datos obtenidos del experimento de microensayos, cualquier inconsistencia puede

deberse simplemente a diferencias en la sensibilidad de las metodologías.

**[0295]** Inmediatamente después del aislamiento (paso 0), las células derivadas de la placenta humana se tiñeron positiva tanto para actina alfa de músculo liso y vimentina. Este patrón también se observó en las células en el paso 11. Estos resultados sugieren que la vimentina y la producción de actina de músculo liso alfa se conserva en las células con pasaje, por ejemplo, en el medio de crecimiento usado aquí.

## EJEMPLO 10

### **Caracterización inmunohistoquímica de PDC Fenotipo**

**[0296]** Los fenotipos de células que se encuentran dentro del tejido de la placenta humana se analizó mediante inmunohistoquímica.

### **Materiales y Métodos**

**[0297] Preparación de tejidos.** El tejido de la placenta humana se cosechó y la inmersión se fijó en 4% (w/v) de paraformaldehído durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (véase la Tabla 10-1): vimentina (1: 500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150, generado contra conejo; Sigma; o 1: 300, generado contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma) y CD34 (CD34 humano de Clase III; 1: 100; Dako, Carpintería, CA). Además, se ensayaron 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 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech) anti-humana, y Nogo-A anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech). Muestras fijadas se recortaron con un bisturí y se colocan dentro de la incrustación de compuesto OCT (Tejido-Tek PTU; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contiene etanol. Los bloques congelados se seccionaron a continuación (de 10 micras de espesor) usando un estándar de criostato (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para la tinción.

**Tabla 10-1: Resumen de los anticuerpos primarios utilizados**

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

**[0298] Inmunohistoquímica.** La inmunohistoquímica se llevó a cabo del mismo modo que en estudios previos (p.ej. Messina et al. (2003) Exper. Neurol. 184: 816-829). Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a antígenos intracelulares. En los casos en que se ubica el epítomo de interés en la superficie celular (CD34, LDL-ox R1), triton se omitió en todos los pasos del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítomo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se planteó en contra de cabra se utilizó (GCP-2, ox-LDL R1, Nogo-A), 3% (v/v) de suero de burro en lugar de suero de cabra durante todo el procedimiento. Los anticuerpos primarios, se diluyó en solución de bloqueo, se aplicaron a las secciones durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Soluciones de anticuerpos primarios fueron retirados, y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contiene el bloque, junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o de cabra anti-conejo IgG - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes) o en burro anti-IgG de cabra - FITC (1: 150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) se aplicó durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

**[0299]** Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representa



por la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Imágenes representativas fueron capturadas utilizando un software ImagePro® (Media Cybernetics, Carlsbad, CA) y cámara de vídeo digital en color. Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. Montajes en capas se prepararon a continuación, utilizando el software Adobe Photoshop® (Adobe, San Jose, CA).

## Resultados

**[0300] Caracterización de placenta.** Vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 se observaron todos dentro de la placenta y regionalmente específicas.

**[0301] GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1 y Expresión tisular Nogo-A.** Ninguno de estos marcadores se observaron dentro del tejido de la placenta.

**[0302] Resumen.** Vimentina, desmina, actina de músculo liso alfa, citoqueratina 18, von Willebrand Factor, y CD34 se expresan en células dentro de la placenta humana.

## EJEMPLO 11

### Inmunología *In Vitro*

**[0303]** Las líneas de células postparto fueron evaluadas *in vitro* por sus características inmunológicas en un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica que, en su caso, estas células podrían provocar en el trasplante *in vivo*. Las líneas de células después del parto se analizaron por citometría de flujo para la producción de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2. Estas proteínas se expresan por las células presentadoras de antígeno (APC) y son necesarias para la estimulación directa de las células T ingenuas CD4<sup>+</sup> (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171). Las líneas celulares también se analizaron por citometría de flujo para la producción de HLA-G (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171), CD 178 (Coumans, et. al, (1999) JouARNI of Immunological Methods 224, 185-196), y PD-L2 (Abbas y Lichtman, Celular y Molecular Immunology, 5ª edición (2003). Saunders, Philadelphia, p 171; Brown, et al. (2003) The JouARNI of Immunology 170, 1257-1266). La producción de estas proteínas por las células que residen en tejidos de la placenta se cree que median el estado inmuno-privilegiado de tejidos de la placenta en el útero. Para predecir el grado en que las líneas de células de placenta derivados de provocar una respuesta inmune *in vivo*, las líneas celulares se probaron en una reacción mixta de linfocitos de una vía (MLR).

### Materiales y métodos

**[0304] Cultivo celular.** Las células se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero fetal bovino (FBS); (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, estreptomycin 50 microgramos/mililitro (Gibco, Carlsbad, CA)) hasta confluencia en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertas con 2% de gelatina (Sigma, St. Louis, MO).

**[0305] Tinción de anticuerpos.** Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y separadas con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Anticuerpo (Tabla 11-1) se añadió a un centenar de microlitros de suspensión de células según 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 eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en quinientos microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA).

**Tabla 11-1. Los anticuerpos**

Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557227
CD86	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555665
B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846
Ratón IgG2a	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
Ratón IgG1kappa	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

**[0306] Reacción mixta de linfocitos.** Viales criopreservadas de PDC derivadas de placenta de pasaje 11 placenta etiquetadas como línea de células B se enviaron en hielo seco a CTBR (Senneville, Quebec) para llevar a cabo una reacción de linfocitos mixta utilizando CTBR SOP no. CAC-031. Se recogieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes voluntarios femeninos y masculinos múltiples. Estimulador (donante) alogénico PBMC, PBMC autólogas, y las líneas celulares derivadas de la placenta se trataron con mitomicina C. Células estimuladoras tratadas C de autólogo y mitomicina se añadieron para responder (receptores) PBMC y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, [<sup>3</sup>H]-timidina se añadió a cada muestra y se cultivó durante 18 horas. Después de la cosecha de las células, se extrajo el ADN radiomarcado, y [<sup>3</sup>H]-timidina se midió utilizando un contador de centelleo.

**[0307]** El índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) se calculó como la proliferación media del receptor más donante alogénico de mitomicina C-tratada dividida por la proliferación de línea de base del receptor. El índice de estimulación de la célula derivada de placenta se calculó como la media de proliferación del receptor de la línea celular derivada de placenta C-tratada más mitomicina dividida por la proliferación de línea de base del receptor.

**Resultados**

**[0308] Reacción de linfocitos mixtos-Placenta.** Siete donantes de sangre voluntarios humanos fueron examinados para identificar un único donante alogénico que exhibiría una robusta respuesta de proliferación en una reacción de linfocitos mezclados con los otros seis donantes de sangre. Este donante fue seleccionado como el donante de control alogénico positivo. Los seis donantes de sangre restantes fueron seleccionados como receptores. El donante de control positivo alogénico y las líneas células de placenta fueron tratados con mitomicina C y se cultivaron en una reacción de linfocitos mezclados con los seis receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 11-2). El índice medio de estimulación varió de 1.3 (placa de 2) a 3 (placa 1) y los controles positivos de donante alogénico oscilaron entre 46,25 (placa de 2) a 279 (Placa 1) (Tabla 11-3).

**Tabla 11-2.** Reacción de datos de linfocito mixtos - línea de células B (placenta)

DPM para ensayo de proliferación									
	Placa de identificación: Placa1								
Analítico	Cultivo	Replicados							
número	Sistema	1	2	3		Medio	SD	CV	
IM03-7769	Línea base de proliferación del receptor	79	119	138		112,0	30,12	26,9	
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina C)	241	272	175		229,3	49,54	21,6	
	Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	23971	22352	20921		22414,7	1525,97	6,8	
	MLR con línea celular (tipo celular B tratada por mitomicina C)	664	559	1090		771,0	281,21	36,5	
SI (donante)						200			
SI (línea celular)						7			
IM03-7770	Proliferación de línea de base de receptor	206	134	262		200,7	64,17	32,0	
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina C)	1091	602	524		739,0	307,33	41,6	
	MLR alogénica IM03-7768 donante (tratadas con mitomicina C)	45005	43729	44071		44268,3	660,49	1,5	
	MLR con la línea celular (mitomicina C tipo celular tratado)	533	2582	2376		1830,3	1128,24	61,6	

ES 2 597 837 T3

	B)								
DPM para ensayo de proliferación									
	Placa ID: Placa1								
Analítico	Cultivo		Replicados						
número	Sistema		1	2	3		Medio	SD	CV
SI (donante)							221		
SI (línea celular)							9		
IM03-7771	Proliferación de línea de base de receptor		157	87	128		124.0	35.17	28.4
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina C)		293	138	508		313.0	185.81	59.4
	MLR alogénica IM03-7768 donante (tratadas con mitomicina C)		24497	34348	31388		30077.7	5054.53	16.8
	MLR con la línea celular (mitomicina C tipo celular tratado B)		601	643	a		622.0	29.70	4.8
SI (donante)						243			
SI (línea celular)						5			
IM03-7772	Proliferación de línea de base de receptor		56	98	51		68.3	25.81	37.8
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina C)		133	120	213		155.3	50.36	32.4
	MLR alogénica IM03-7768 donante (tratadas con mitomicina C)		14222	20076	22168		18822.0	4118.75	21.9
	MLR con la línea celular (mitomicina C tipo celular tratado B)		a	a	a		a	a	a
SI (donante)						275			
SI (línea celular)						a			
IM03-7768 (donante alogénico)	Proliferación de línea de base de receptor		84	242	208		178.0	83.16	46.7
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina)		361	617	304		427.3	166.71	39.0
DPM para ensayo de proliferación									
	Placa ID: Placa1								
Analítico	Cultivo		Replicados						

número	Sistema	1	2	3	Medio	SD	CV
Línea de células tipo B	Proliferación de línea de base de receptor	126	124	143	131.0	10.44	8.0
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina)	822	1075	487	794.7	294.95	37.1
Placa ID: Placa2							
Número analítico	Sistema de cultivo	Replicados 123			Medio	SD	CV
IM03-7773	Proliferación de línea de base de receptor	908	181	330	473,0	384,02	81.2 36.5 1.5 23.0
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina C)	572		405	415,3	151,76	
	Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratada con Mitomicina C)	29151		28691	28719,0	418,70	
	MLR con línea celular (Tipo celular B tratado con Mitomicina C)	567 732 905 28315			734,7	169,02	
SI (donante) SI (línea celular)					61 2		
IM03-7774	Proliferación de línea de base de receptor	893	1376	185	818,0	599,03	73.2 38.4 10.7 46.6
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina C)	568		381	403,3	154,71	
	Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratada con Mitomicina C)	53101		42839	48074,3	5134,18	
	MLR con línea celular (Tipo celular B tratado con Mitomicina C)	515 789 294 48283			532,7	247,97	
SI (donante) SI (línea celular)					59 1		
Placa ID: Placa 2							
Número analítico	Sistema de cultivo	Replicados 123			Medio	SD	CV
IM03-7775	Proliferación de línea de base de receptor	1272	300		705,3 305,0 21014,0 751,7	505,69 155,89 9479,74 181,05	71.7 51.1 45.1 24.1
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina C)	544	232	199			
	Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratada con Mitomicina C)	484					
	MLR con línea celular (Tipo celular B tratado con Mitomicina C)	23554 10 <sup>5</sup> 23 768 924 563 28965					
SI (donante) SI (línea celular)					30 1		
IM03-7776	Proliferación de línea de base de receptor	1530	137		904,3 344,0 32044,0 a	707,22 109,89 2952,22 a	78.2 31.9 9.2 a
	El control de autoestimulación (células autólogas tratadas por mitomicina C)	1046	420				
	Donante alogénico MLR IM03-7768 (tratada con Mitomicina C)	218 394 28893					
	MLR con línea celular (Tipo celular B tratado con Mitomicina C)	32493 aaa 34746					
SI (donante) SI (línea celular)					35 a		

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

5

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

10

**[0309] Marcadores de células presentadoras de antígenos - Placenta.** Histogramas de células derivadas de la placenta analizadas por citometría de flujo dieron negativo para la producción de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, según lo observado por valor de fluorescencia coherente con la IgG de control, lo que indica que las líneas de células placentarias carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente PBMCs alogénicas (por ejemplo, células T CD4<sup>+</sup>).

**[0310] Marcadores inmunomoduladores - Placenta.** Histogramas de células derivadas de la placenta analizadas por citometría de flujo muestran positivos para la producción de PD-L2, como se ha señalado por el incremento del valor de fluorescencia relativa al control de IgG, y negativo para la producción de CD 178 y HLA-G, como se ha señalado por valor de fluorescencia consistente con el control de IgG.

**[0311] Resumen.** En las reacciones de linfocitos mixtos realizados con líneas de células derivadas de la placenta, el índice medio de estimulación oscilaron desde 1,3 hasta 3, y la de los controles positivos alogénicas varió de 46,25 a 279. Líneas de células derivadas de placenta fueron negativas para la producción de las proteínas estimulantes HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7H2, tal como se mide por citometría de flujo. Líneas de células derivadas de placenta fueron negativas para la producción de proteínas inmodulación de HLA-G y CD 178 y positivas para la producción de PD-L2, medida por citometría de flujo. PBMCs de donantes alogénicos contienen células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DP, DR, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, permitiendo de este modo la estimulación de las PBMC alogénicas (por ejemplo, células T ingenuas CD4<sup>+</sup>). La ausencia de moléculas de superficie celular presentadoras de antígeno en las células derivadas de la placenta requeridas para la estimulación directa de las PBMC alogénicas (por ejemplo, células T CD4<sup>+</sup> no tratadas previamente) y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el índice de baja estimulación exhibido por estas células en un MLR en comparación con los controles alogénicos.

## EJEMPLO 12

### La secreción de factores tróficos por las células derivadas del placenta

**[0312]** Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de PDC. Los factores fueron seleccionados que tienen actividad angiogénica (es decir, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen et al (1997) Ciba Found Symp 212: 215-26), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Salcedo et al. (2000) Blood 96; 34-40), la interleucina-8 (IL-8) (Li et al (2003). J. Immunol 170: 3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes et al (2004). Ann Thorac Surg 77: 812-8), inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor derivado de estroma-1 alfa (SDF-1 alfa)), neurotrófico/actividad neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng et al (2003). Dev Biol 258; 319-33), la interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2)), o la actividad de quimioquinas (proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), proteína inflamatoria de macrófagos 1beta (MIP1b), quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), Rantes (regulada en la activación, células T normales expresadas y secretadas), 1309, timo y quimiocina regulada por activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

### Métodos y materiales

**[0313] Cultivo celular.** PDC derivados de placenta y fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15% (v) de suero v/bovino fetal (SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)) en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células fueron crioconservados en el pasaje 11 y se almacenan en nitrógeno líquido. Después de la descongelación de las células, medio de crecimiento se añadió a las células, seguido de la transferencia a un tubo de centrifuga de 15 ml y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó. El sedimento celular se resuspendió en 4 mililitros medio de crecimiento, y se contaron las células. Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en un matraz T75 que contiene 15 mililitros de medio de crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio libre de suero (DMEM de baja glucosa (Gibco), 0,1% (w/v) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)) para 8 horas. Se recogió el medio libre de suero acondicionado al final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a - 20°C. Para estimar el número de células en cada matraz, se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron por medio de 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). actividad de la tripsina fue inhibida por la adición de 8 mililitros medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro Medio de Crecimiento. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

**[0314] Ensayo ELISA.** Las células se cultivaron a 37°C en dióxido de carbono 5% y oxígeno atmosférico. PDC (aislar 3) también se cultivaron en 5% de oxígeno o beta-mercaptoetanol (BME). La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1 alfa, GCP-2, IL-8, y TGF-beta2 producida por cada muestra de células se midió mediante un ensayo ELISA

(R & D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son picogramos/er millilit-/millón de células (n = 2, SEM).

**[0315] Ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT.** Las quimiocinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, 1309, TARC, Eotaxina, MDC, IL8), BDNF, y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-BB, TPO, HB-EGF) se midieron utilizando SEARCHLIGHT ensayos de proteoma (Pierce Biotechnology Inc.). Las Matrices de Proteoma son ELISA multiplexadas sandwich para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Las matrices se producen mediante la detección de un patrón 2 x 2, 3 x 3, o 4 x 4 de cuatro a 16 anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento ELISA sándwich, toda la placa se forma para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. La cantidad de señal generada en cada punto es proporcional a la cantidad de proteína diana en el estándar o muestra original.

**Resultados**

**[0316] Ensayo ELISA.** MCP-1 e IL-6 fueron secretadas por las PDC derivadas de la placenta y fibroblastos dérmicos (Tabla 12-1). SDF-1 alfa fue secretada por células derivadas de la placenta cultivada en 5% de O<sub>2</sub> y por los fibroblastos. GCP-2 y IL-8 fueron secretadas por células derivadas de la placenta cultivada en presencia de BME o 5% de O<sub>2</sub>. GCP-2 también se secretó por los fibroblastos humanos. TGF-beta2 no era detectable mediante el ensayo de ELISA.

**Tabla 12-1.** Resultados del ensayo de ELISA

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1 alfa	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
Fibroblastos	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Placenta - aislado 1	60±3	41±2	ND	ND	ND	ND	ND
Placentaria - aislado 2	125±16	10±1	ND	ND	ND	ND	ND
Placenta - aislado 3, + BME	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
Placenta - aislado 3, + 5% de O <sub>2</sub> , W/O BME	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND

Clave: ND: No detectado.

**[0317] Ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT.** TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, Rantes, TARC, Eotaxina, y IL-8 se secretan a partir de células derivadas de la placenta (Tablas 12-2 y 12-3). No se detectaron Ang2, VEGF o PDGF-bb.

**Tabla 12-2.** Los resultados del ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
HFB	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
P1	24299,5	ND	ND	546,6	8,8	16,4	ND	ND	3,8	ND
P3	14176,8	ND	ND	568,7	5,2	10,2	ND	ND	1,9	33,6

Clave: hFB (fibroblastos humanos), P1 (células derivadas de la placenta aislado 1), P3 (células derivadas de la placenta 0 aislado 3). ND: No detectado.

**Tabla 12-3.** Los resultados del ensayo ELISA multiplexado 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
P3	ND	ND	102,7	ND	ND	0,4	ND	ND	63,8

Clave: hFB (fibroblastos humanos), P1 (células derivadas de la placenta aislado 1), P3 (células derivadas de la placenta 0 aislado 3). ND: No detectado.

**[0318] Resumen.** Células derivadas de placenta secretan una serie de factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, MCP-1 y IL-8, desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF y IL-6, tienen un papel importante en la regeneración neural.

**EJEMPLO 13****Ensayo de coagulación de plasma**

5 **[0319]** La terapia celular puede ser inyectada sistémicamente para ciertas aplicaciones en las que las células son capaces de dirigir el sitio de acción. Es importante que las células inyectadas no causan trombosis, que puede ser fatal. El factor tisular, una glicoproteína procoagulante unida a la membrana, es el iniciador de la cascada de coagulación extrínseca, que es la vía de coagulación predominante *in vivo*. El factor tisular también juega un papel importante en la formación de vasos embrionaria, por ejemplo, en la formación de la pared vascular primitiva (Brodsky et al (2002) Exp Nephrol 10: 299-306). Para determinar el potencial de PPDCs para iniciar la coagulación, se evaluaron PPDCs derivadas de placenta para la producción de factor tisular y su capacidad para iniciar la coagulación de plasma.

**Métodos y materiales**

15 **[0320] Factor tisular humano.** Factor tisular humano SIMPLASTIN (Organon Tekailca Corporation, Durham, NC), se reconstituyó con 20 mililitros de agua destilada. La solución madre se diluyó en serie (1:2) en ocho tubos. El plasma humano normal (George King Biomedical, Overland Park, KS) se descongeló a 37°C en un baño de agua y después se almacena en hielo antes de su uso. A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadió 100 microlitros de salina tamponada con fosfato (PBS), 10 microlitros diluidas SIMPLASTIN (excepto un pozo en blanco), 30 microlitros de cloruro de calcio 0,1 Molar, y 100 microlitros de plasma humano normal. La placa se coloca inmediatamente en un lector de microplacas a temperatura controlada y la absorbancia medida a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

25 **[0321] J-82 y células derivadas de la placenta.** Células J-82 (ATCC, MD) se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Gibco, Carlsbad, CA) que contiene 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; Hyclone, Logan UT), 1 milimolar piruvato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO), 2 milimolar L-glutamina (Mediatech Herndon, VA), 1 x aminoácidos no esenciales (Mediatech Herndon, VA). Alrededor de 70% de confluencia, las células se transfirieron a los pocillos de la placa de 96 pocillos a 100.000, 50.000 y 25.000 células/pocillo. Células derivadas de placenta se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco), 15% (v/v) FBS, penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco), y 0,001% betamercaptoetanol (Sigma)) en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Células derivadas de placenta en el pasaje 5 se transfirieron a los pocillos a 50.000 células/pocillo. El medio de cultivo se retiró de cada pocillo después de centrifugación a 150 x g durante 5 minutos. Las células se suspendieron en PBS sin calcio y magnesio.

35 **[0322] Factor de inhibición de tejidos.** La inhibición de la reacción de coagulación por la preincubación de las células con CNTO 859, un anticuerpo para el factor tisular, demostrará que el factor tisular es responsable de la coagulación. Las células se incubaron con 20 micro gramos/mililitro CNTO 859 (Centocor, Malvern, PA) durante 30 minutos. El cloruro de calcio (30 microlitros) se añade a cada pocillo. La placa se coloca inmediatamente en un lector de microplacas a temperatura controlada y la absorbancia medida a 405 nometer nacional en intervalos de 40 segundos durante 30 minutos. Las células se lavan en PBS y se separaron del matraz con tripsina/EDTA (Gibco Carlsbad, CA). Las células se recogen, se centrifugaron, y se resuspendieron 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Anticuerpo se añade a 100 microlitros de suspensión celular según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavan con PBS y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 100 microlitros de 3% de FBS y anticuerpo secundario se añade según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavan con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo secundario no unido. Las células lavadas se resuspenden en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

**Resultados**

50 **[0323]** La citometría de flujo El análisis reveló que el factor tisular expresa células posparto derivadas de la placenta. Células derivadas de placenta aumentó la tasa de coagulación como se indica por el tiempo de la absorbancia media máxima (T max @ a, Tabla 13-1). El T 1/2 de max es inversamente proporcional al número de células J82.

55 **Tabla 13-1.** Se evaluó el efecto del factor de tejido humano (SIMPLASTIN) y células derivadas de la placenta (PLA) en la coagulación de plasma. El tiempo para un medio de absorbancia máxima (T 1/2 a max) en la meseta en segundos se utilizó como unidad de medida.

60

65

Dilución SIMPLASTIN	T 1/2 a max (segundos)
1:2	61
1:4	107
1:8	147
1:16	174
1:32	266
1:64	317
1:128	378
0 (control negativo)	1188
células J-82	
100,000	122
50,000	172
25,000	275
Pla P5	
50,000	757

**[0324] Resumen.** Células derivadas de placenta expresan el factor tisular. El factor tisular se encuentra normalmente en las células en una conformación que es inactiva, pero se activa por la tensión mecánica o química (por ejemplo, LPS) (Sakariassen y col (2001) Thromb Res 104: 149-74; Engstad et al (2002) Int Immunopharmacol 2: 1585-1597). Por lo tanto, la reducción al mínimo de la tensión durante el proceso de preparación de PDC puede evitar la activación del factor tisular. Además de la actividad trombogénica, el factor tisular se ha asociado con la actividad angiogénica. Así, la actividad del factor tisular puede ser beneficiosa cuando las células derivadas de la placenta se trasplantan en el tejido, sino que deben inhibirse cuando PDC se inyectan por vía intravenosa.

#### 30 Ejemplo 14

##### Diferenciación de las células derivadas de placenta en hepatocitos

**[0325]** Una variedad de condiciones fueron examinadas para determinar una combinación adecuada de medios básicos y factores de crecimiento para la diferenciación de células derivadas de la placenta en los hepatocitos. HNF-alfa, un factor de transcripción específico de hepatocitos, proteínas de filamentos intermedios citoplasmáticos tales como la queratina 19 (K19), queratina 8 (K8), y citoqueratina 18 (CK18), que son marcadores de células epiteliales y dos proteínas secretadas específicas del hígado, alfa-fetoproteína (alfaFP), y la albúmina se seleccionaron como marcadores para la diferenciación de hepatocitos (Schwartz et al (2002) J. Clin Invest 109 (10): 1291-1302; Okumoto et al (2003) Biochem Biophys. Res. Commun. 304 (4): 691-695; Chagraoui et al (2003) Blood 101 (8): 2973-2982).

##### Métodos y materiales

**[0326]** Las células derivadas de la placenta aisladas de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, así como fibroblastos dérmicos normales humanos neonatales o adultos (NHDF) se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero bovino fetal (Cat #SH30070.03; Hyclone, Logan UT), 0,001% (v/v) beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)), en un matraz T75 recubierta con gelatina. El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), oncostatina M, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Factor de células Madre (SCF), y el factor de crecimiento fibroblástico 4 (FGF 4) eran de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) era de R&D Systems (Minneapolis, MN).

**[0327]** Los siguientes condiciones se ensayaron:

##### **Método 1**

**[0328]** Células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales analizadas por cariotipado), fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales y de adultos (NHDF). Las células se cultivaron en placas a 22,5 X 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> en un 1% MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA) (Becton-Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) en un medio libre de suero (60% (v/v) baja glucosa DMEM) (DMEM-LG; Gibco, Carlsbad, CA), 40% (v/v) MCDB-201 (Sigma, St. Louis, MO), complementado con 1X insulina/transferrina/selenio, 4,7 microgramos/mililitro ácido linoleico, 1 miligramo/mililitro de albúmina de suero bovino, 10 nanodexametasona molar, 100 fosfato de ácido ascórbico microMolar (todos de Sigma), penicilina 100 unidades/mililitro, 100 unidades/millones lilitre estreptomycin (Gibco), 2% (v/v) FCS (Hyclone Laboratories, Logan, UT), y 10 nanogramos/mililitro cada EGF y PDGF-BB). Después de 8 a 12 horas, se eliminó medio, las células se lavaron dos veces con PBS (Gibco) y se cultivaron en el medio anteriormente descrito sin EGF y PDGF-BB, pero suplementado con 20 nanogramos/mililitro HGF y/o 10 nanogramos/mililitro FGF 4 (Schwartz et al (2002) J. Clin Invest 109 (10): 1291-1302). Las células se



cultivaron en aire estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### Método 2

- 5 **[0329]** *Las células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales analizadas por cariotipado), neonatales y de adultos NHDF.*  
Las células se sembraron a 22.500 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina y se cultivaron como se describe anteriormente.

#### 10 Método 3

- 15 **[0330]** *Las células derivadas de la placenta (P10), adulto NHDF, células derivadas de la placenta (P3).* Las células se sembraron a una densidad elevada (50.000 células/cm<sup>2</sup>) en placas de TCP de 24 pocillos y se cultivaron en DMEM (Gibco), B27 Suplemento (Gibco), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 20 nanogramos/mililitro de HGF y/o 10 nanogramos/mililitro FGF-4. Las células se hicieron crecer en estas condiciones durante 4 semanas.

#### Método 4

- 20 **[0331]** *Las células derivadas de la placenta (P3), las células derivadas de la placenta (P15), las células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales como se analiza por cariotipo), las células derivadas de la placenta (P5) (predominantemente neonatales según el análisis de cariotipo), las células derivadas Placenta (P5) (predominantemente maternas analizadas en el cariotipo), neonatales y adultos NHDF.* Las células se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup> en frascos T25 en medio Chang C (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) a cada fibronectina (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o gelatina (Sigma) y se cultivaron durante dos pasajes hasta confluencia. Las células fueron sembradas a 1.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos y se cultivaron TCPS como se describe más arriba hasta que llegaron a alrededor de 40-60% de confluencia.

#### Método 5

- 30 **[0332]** *Las células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatales como se analizó por cariotipado) y adulto NHDF.* Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en gelatina en medio de crecimiento suplementado ya sea con 1 nanogramo/mililitro o 10 nanogramos/miliones lilitero oncostatina M (Chagraoui et al (2003) Blood 101 (8): 2973-2982). Las células se hicieron crecer en estas condiciones durante 4 semanas.

#### Método 6

- 35 **[0333]** *Las células derivadas de la placenta (P2) (predominantemente neonatal como analizó por cariotipo) y adulto NHDF.* Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en gelatina en medio de cultivo suplementado con 10 nanogramos/mililitro bFGF, 10 nanogramos/lilitero millones de HGF, 10 nanogramos/mililitro SCF. (Okumoto et al (2003) Biochem Biophys Res Commun 304 (4): 691-695) Las células se hicieron crecer en estas condiciones durante 4 semanas.

- 45 **[0334] Total ARN aislamiento y RT-PCR cuantitativa.** Se extrajo ARN de células derivadas de la placenta y fibroblastos cultivados como se describe en cada protocolo. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contiene beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) y ARN extraído de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de ADNsa 2.7 Unidades/muestra (Sigma). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. El ARN se transcribe de forma inversa utilizando hexámeros al azar con los reactivos TaqMan transcripción reversa (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.

- 50 **[0335] PCR en tiempo real.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión de genes ASSAYS-ON-DEMAND<sup>TM</sup> para la albúmina (Hs00609411), el citocromo p450 2B6 (Hs00167937), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y mezcla maestra TaqMan Universal de PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con ABI PRISM® 7000 software SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 min y 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Datos de PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario n° 2 de Applied Biosystems ABI Prism® para 7700 Sequence Detection System).

- 55 **[0336] Inmunofluorescencia.** Los cultivos de células se fijaron con paraformaldehído frío 4% durante un período de 10 minutos a temperatura ambiente (v/w). La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: queratina 8 (K8; 1: 400; Chemicon, Temecula, CA), queratina 19 (K19; 1: 400; Chemicon), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma, St. Louis, MO), vimentina (1: 500; Sigma), desmina (1: 150; Sigma), la albúmina (1: 200; Sigma), c-met (1: 400; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA ), y HNF-1 alfa (1: 400; Santa Cruz

Biotech). En general, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100, Sigma) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. En los casos en que se ubica el epítipo de interés en la superficie celular (c-Met), tritón se omitió en todos los pasajes del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítipo. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas y cultivos lavados con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contiene la solución de bloqueo, junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR ) para K8, K19, CK18, vimentina, y albúmina, IgG de cabra anti-conejo - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes) para desmina y c-Met, o burro IgG anti-cabra - FITC (1: 150; de Santa Cruz Biotech) para la tinción de HNF-1 alfa. Los cultivos se lavaron y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) se aplicó durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0337] Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Imágenes representativas fueron capturadas utilizando un software ImagePro® (Media Cybernetics, Carlsbad, CA) y cámara de vídeo digital en color. Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. Montajes en capas se prepararon a continuación, utilizando el software Adobe Photoshop® (Adobe, San Jose, CA).

## **Resultados**

[0338] Con el fin de determinar si las células derivadas de la placenta podían expresar marcadores epiteliales, las células se cultivaron en medio Chang C. Células derivadas de placenta (P4), (P3), y (P8) se cultivaron en medio Chang C durante 11 días. Células derivadas de placenta tiñeron positivas para citoqueratina 18 por análisis de inmunocitoquímica. Ninguna de las muestras tiñeron positivas para queratina 8. Las muestras cultivadas en medio de cultivo fueron negativas para ambos marcadores.

[0339] Se investigó el efecto de los pasajes tempranos y tardíos, así como sustratos de gelatina y fibronectina. Las células se cultivaron en medio Chang C durante 11 días. Se analizó el ARN y la proteína de expresión de las proteínas epiteliales/específicas de hepatocitos. La tinción inmunocitoquímica para citoqueratina18, queratina 8, queratina 19, c-met, albúmina, desmina, y HNF-1 alfa fueron negativos en todas las condiciones. Las células se tiñeron positivas para vimentina. se detectó la expresión tanto de la albúmina y del citocromo P450 2B6 en niveles más bajos que los de las células HepG2 humanas con cebadores de ensayo a la carta. La albúmina y la expresión del citocromo P450 2B6 también se detectaron en las células cultivadas en medio de crecimiento.

[0340] Las células derivadas de la placenta se trataron como se describe en el método 1 de acuerdo con un protocolo desarrollado por Schwartz et al. (2002) J. Clin. Investir. 109 (10): 1391-02).. Tanto la albúmina y 2B6 del citocromo P450 se detectaron con cebadores assay-on-demand a niveles más bajos que en el control positivo HepG2. No surgió un patrón claro entre las condiciones aplicadas y los niveles de expresión de genes, es decir, la albúmina y la expresión del citocromo P450 2B6 también se detectó en las muestras de control. Alguna expresión de albúmina y 2B6 del citocromo P450 se detectó con cebadores ASSAY-ON-DEMAND sin embargo, los niveles fueron significativamente inferiores a los observados en las células HepG2 humanos.

[0341] La oncostatina M a una concentración baja de niveles de expresión de citocromo aumentados de 1 nanogramo/mililitro P450 2B6 en células derivadas de la placenta cultivadas en medio de crecimiento en matraces recubiertos de gelatina. Tratamiento FGF-4 y HGF tuvo poco efecto y pudo haber reducido la expresión de albúmina y citocromo P450 2B6.

[0342] **Resumen.** Varios protocolos de diferenciación se ensayaron para determinar la capacidad para inducir la diferenciación de células derivadas de la placenta de fenotipo de hepatocitos. se detectó la expresión de los marcadores específicos de hepatocitos, tales como la albúmina y el citocromo p450 2B6, lo que indica que las células se sometieron a cierta diferenciación en hepatocitos. Células derivadas de placenta cultivadas en medio Chang C expresaron citoqueratina 18, un marcador de las células epiteliales en los conductos inferiores o pancreáticas.

## **EJEMPLO 15**

### **La diferenciación de las células derivadas del Placenta a un fenotipo osteogénico**

[0343] Las células madre mesenquimales (MSCs) derivadas de médula ósea se ha demostrado que diferencian de forma reproducible en células similares a osteoblastos que mineralizan y expresan la fosfatasa de alcalina. Marcadores adicionales expresados por los osteoblastos, tales como la osteocalcina y la sialoproteína ósea, se han utilizado para demostrar la diferenciación en una célula de tipo osteoblasto. La capacidad de las células derivadas de la placenta de diferenciarse en un fenotipo osteogénico se evaluó mediante el cultivo en un medio osteogénico y la adición de proteínas óseas morfogénicas (BMP) -2 (Rickard et al (1994) Dev Biol 161: 218 a 228) o -4 y factor de crecimiento transformante beta 1.

**Métodos y materiales**

5 [0344] **Cultivo de células.** Antes del inicio de la osteogénesis, las células madre mesenquimales (MSC) se cultivaron en kit de bala medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM, Cambrex, Walkerville, MD). Otras células se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15% v) de suero (v/bovino fetal (SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (p/v) betamercaptoetanol v (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro estreptomina (Gibco)) en un matraz T75 recubierto con gelatina y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

10 [0345] Los osteoblastos (9F1721; Cambrex) se cultivaron en medio de crecimiento de osteoblastos (Cambrex) y se extrajo el ARN como se describe a continuación.

**Osteogénesis**

15 [0346] **Protocolo 1.** Las células derivadas de la placenta (P3) y (P4) (anteriormente cariotipado y demostrado como células derivadas predominantemente neonatalmente) y MSC (P3) se sembraron a  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos y platos de 6 pocillos en crecimiento medio y se incubaron durante la noche. El medio se retira y se sustituye con medio osteogénico (DMEM de baja glucosa, 10% de suero (v/v) fetal bovino, 10 milimolar betaglicerofosfato (Sigma), 100 nanodexametasona molar (Sigma, St. Louis, MO), 50 micromolar fosfato de ascorbato sal (Sigma), Fungizone (Gibco), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 micro gramos/mililitro de estreptomina (Gibco)). medio osteogénico se complementó con 20 nanogramos/mililitro de TGF-beta1 (Sigma), 40 nanogramos/mililitro hrBMP-2 (Sigma) o 40 nanogramos/mililitro hrBMP-4 (Sigma). Los cultivos se trataron durante un total de 14, 21 y 28 días, con cambios de medio cada 3-4 días.

25 [0347] **Protocolo 2.** Se ensayaron las células derivadas de la placenta para la capacidad de diferenciarse en un fenotipo osteogénico. Células derivadas de placenta (P4) se sembraron a 30.000 células/pocillo de una placa de 6 pocillos (recubiertos de gelatina) en medio de crecimiento. Células madre mesenquimales (MSC) (P3 y P4), fibroblastos (P11), y células de médula ósea de cresta iliaca (P3; la Publicación Internacional PCT nº WO03/025149) se sembraron a 30.000 células/pocillo de una placa de 6 pocillos (recubierto con gelatina) en medio de crecimiento de célula madre mesenquimales (MSCGM, Cambrex) y medio de crecimiento, respectivamente.

35 [0348] La inducción osteogénica se inició mediante la eliminación de los medios de comunicación de siembra inicial (24 h) y su sustitución por medio de inducción osteogénico: DMEM de baja glucosa, suero bovino fetal 10%, 10 milimolar betaglicerofosfato (Sigma), 100 nanoMolar dexametasona (Sigma), 50 microMolar sal de fosfato de ascorbato (Sigma), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco). En algunas condiciones, medio osteogénico se complementó con recombinante humano (hr) BMP-2 (20 nanogramos/mililitro) (Sigma), o hrBMP-4 o con ambos hrBMP-2 (20 nanogramos/mililitro) y hrBMP-4 (20 nanogramos/mililitro) (Sigma). Los cultivos se trataron durante un total de 28 días con cambios de medio cada 3-4 días.

40 [0349] **Extracción de ARN y transcripción reversa.** Las células se lisaron con tampón RLT de 350 microlitros que contiene betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia) y se almacenaron a -80°C. Los lisados celulares se descongelaron y se extrajeron los ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de 2,7 unidad/muestra de ADNsa (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitro agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. El ARN se transcribe de forma inversa utilizando hexámeros al azar con reactivos de transcripción reversa 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.

50 [0350] **PCR.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando sialoproteína de hueso de productos de expresión de gen ASSAYS-ON-DEMAND™ (Hs00173720), osteocalcina (Hs00609452), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA), y mezcla maestra TaqMan® Universal PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con ABI PRISM® 7000 software SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

55 **Tinción de von Kossa.** Las células fueron fijadas con 10% (v/v) de formalina tamponada neutra (Richard-Allan, Kalamazoo, MI). Después de la fijación, las células se lavaron en agua desionizada y se incubaron en 5% (w/v) de nitrato de plata (Aldrich Chemical Company Milwaukee, WI) durante una hora a la luz solar directa. Las células se lavaron en agua desionizada y se incubaron en 5% (w/v) de tiosulfato de sodio (EM Sciences, Gibbstown, NJ) durante cinco minutos. Las células fueron lavadas en agua destilada y se examinaron por microscopía de luz.

60

**Resultados**

65 [0351] **Protocolo 1.** ARN extraído de los osteoblastos se utilizó como control positivo para la expresión de genes en tiempo real de la osteocalcina y sialoproteína ósea. Los niveles de expresión de los osteoblastos de osteocalcina y BSP respecto a las células derivadas de la placenta cultivadas en medio de cultivo fueron de 2,5 y 8.000 veces, respectivamente. MSC cultivadas en el medio osteogénico se mineralizaron y dieron positivo en tinción de von

Kossa. Expresión de MSC de osteocalcina y BSP fue significativamente mayor en medio osteogénico a los 21 días. La adición de BMP-2 y expresión mejorada BSP-4 no tuvo efecto sobre la expresión de osteocalcina. TGF-beta1 no aumentó el efecto del medio de la osteogénesis. Amplia mineralización se observó con una muestra de placenta (P4) que tenía células predominantemente derivadas neonatalmente. Células derivadas de la placenta (P3) mostraron la inducción de niveles de expresión de BSP en los medios osteogénicos y bajos niveles de inducción de osteocalcina. BMP-4 y TGF-beta1 aumentaron la expresión de osteocalcina por las células derivadas de la placenta (P3).

**[0352]** *Protocolo 2.* La diferenciación osteogénica, como se muestra por la tinción positiva de von Kossa para la mineralización, se observó con células derivadas de la placenta (P4) y ICBM (P3) se incubaron con medio osteogénico suplementado con BMP2 o 4, y MSC (P3) se incubaron con medio osteogénico suplementado con BMP 4 (Tabla 15-1). Ninguna de las otras células diferenciaron el fenotipo osteogénico y manchado de von Kossa. Para asegurarse de que la tinción de von Kossa se relacionó con la célula y no de la matriz extracelular, las células se contratiñeron con rojo rápido nuclear. Esta mancha demostró grandes gotas de lípidos en algunos MSCs consistentes con un fenotipo del adipocito. Esto sugiere que las MSC no diferencian específicamente en un fenotipo osteogénico en estas condiciones. Además, se observó que el nivel de la adipogénesis se aumentó cuando las MSC se incubaron en medio suplementado con osteogénico ya sea con BMP2 o con BMP4.

**Tabla 15-1:** Resultados de diferenciación osteogénica mediante la tinción de von Kossa para Protocolo 2. Las células derivadas de placenta (PLA), las células madre mesenquimales (MSC), fibroblastos (FIB), y células de cresta ilíaca de las células de médula ósea (ICBM) se cultivaron en medio osteogénico (OM) solo o complementado con BMP2 o BMP2 y BMP4

Número	Línea celular	Condiciones	Von Kossa	Comentarios
1	ICBM P3	Medio Osteogénico (OM)	Neg	Normal O2
2	ICBM P3	OM, BMP2	Pos	Normal O3
3	ICBM P3	OM, BMP4	Pos	Normal O4
4	MSC	Medio Osteogénico (OM)	Neg	mucha grasa
5	MSC	OM, BMP2	Neg	mucha grasa
6	MSC	OM, BMP4	Pos	mucha grasa
7	Pla P4	Medio Osteogénico (OM)	Neg	
8	Pla P4	OM, BMP2	Pos	
9	Pla P4	OM, BMP4	Pos	
10	MSC P4	Medio Osteogénico (OM)	Neg	Grasa
11	MSC P4	OM, BMP2	Neg	Grasa
12	MSC P4	OM, BMP2, BMP4	Neg	Grasa
13	Pla P4	Medio Osteogénico (OM)	Neg	
14	Pla P4	OM, BMP2	Neg	
15	Pla P4	OM, BMP2, BMP4	Neg	
16	Fib 1F1853 P11	Medio Osteogénico (OM)	Neg	
17	Fib 1F1853 P11	OM, BMP2	Neg	
18	Fib 1F1853 P11	OM, BMP2, BMP4	Neg	

**[0353] Resumen.** MSC derivadas de médula ósea (Kadiyala et al (1997) Cell Transplant.6: 125-34), así como células derivadas de otros tejidos tales como tejido adiposo (Halvorsen et al (2001) Tissue Eng 7: 729-41) se ha demostrado diferenciarse en una célula similar a osteoblastos. MSCs también se han demostrado diferenciarse en adipocitos o osteoblastos en respuesta a BMPs (Chen et al (1998) J. Cell Biol 142: 295 a 305) debido a la diferencia de funciones de proteína morfogénica ósea (BMP) receptor de tipo IB y IA . células derivadas de placenta son también capaces de expresar un fenotipo similar a osteoblastos como ya se observó con células óseas derivadas de médula madre mesenquimales (MSCs) cuando se coloca en medio osteogénico que contiene dexametasona, B-glicerofosfato, y ácido ascórbico. Varios experimentos se llevaron a cabo con diferentes aislados para determinar si existe la mineralización de las células cultivadas por tinción de von Kossa y la expresión de la sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina, que se expresa en los osteoblastos. Después de inducir la osteogénesis, las MSC se demostró mineralizar y teñirse con von Kossa y también han aumentado los niveles de ARNm de sialoproteína ósea y la expresión de osteocalcina en tiempo real mediante la cuantificación relativa. Numerosos MSCs también formaron gotas de lípidos en el citoplasma similar a adipocitos. Células derivadas de la placenta (predominantemente células neonatales) mostraron extensa mineralización y la inducción de BSP y la osteocalcina en medio osteogénico, que fue mejorada a los 21 días con BMP-2 o -4.

**EJEMPLO 16**

**Diferenciación condrogénica de las células derivadas del Placenta**

**[0354]** Se ensayaron las células derivadas de la placenta para su capacidad de diferenciarse en condrocitos *in vitro* en dos diferentes sistemas de ensayo: el sistema de cultivo de ensayo de sedimento y cultivos en gel de colágeno. El sistema de cultivo de sedimento se ha utilizado con éxito con las porciones seleccionadas de células madre mesenquimales humanas (MSC). MSC cultivado en este ensayo y se trató con factor de crecimiento transformante-beta3 se ha demostrado que se diferencian en condrocitos (Johnstone, et al (1998) Exp Cell Res 238: 265-272). El sistema de gel de colágeno se ha utilizado para los condrocitos de cultivo *in vitro* (Gosiewska, et al (2001) Tissue Eng 7: 267-277). Los condrocitos cultivados en estas condiciones forman una estructura similar a cartílago.

**Materiales y métodos**

**[0355] Cultivo Celular** Se recibieron placentas humanas y se aislaron las células como se ha descrito (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en medio de crecimiento (Medios Esenciales Modificados de Dulbecco (DMEM), 15% (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,001% (v/v) 2- mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO)) en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para el uso en los experimentos, las células estaban entre los pasajes 4 y 12.

**[0356]** Los condrocitos articulares humanos se adquirieron de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en el mismo medio como las células derivadas de la placenta. Veinticuatro horas antes del experimento, el medio de cultivo se cambió a un medio que contiene 1% de FBS.

**[0357]** Las células madre mesenquimales humanas (MSC) fueron adquiridos de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Las células utilizadas para los experimentos eran entre los pasajes 2 y 4.

**[0358] Ensayos de gel de colágeno.** Las células cultivadas se trataron con tripsina para eliminar la placa de cultivo. Se lavaron las células con centrifugación dos veces en 300 x g durante 5 min en DMEM sin suero y se contaron. Las células se mezclan con los siguientes componentes en las concentraciones finales enumeradas: colágeno de cola de rata (1 miligramo/mililitro, BD Discovery Labware, Bedford, MA), NaOH normal 0,01, y medio condrogénico (DMEM, 100 Unidades/ml de penicilina, 100 microgramos/mililitro estreptomina, 2 milimolar L-glutamina, 1 milimolar de piruvato sódico, 0,35 milimolar L-prolina, 100 nanomolar dexametasona, 0,17 milimolar L-ácido ascórbico, 1% (v/v) ITS (insulina, transferrina, selenio) (todos los componentes de Sigma Chemical Company)). Las células se mezclaron suavemente con el medio, y las muestras se dividieron en alícuotas en pocillos individuales de una placa de clúster de ultra-bajo 24 pocillos (Corning, Corning, NY) a una concentración de ya sea 2 x 10<sup>5</sup> por pocillo o 5 x 10<sup>5</sup> por pozo. Los cultivos se colocaron en una incubadora y se dejará reposar durante 24 a 48 horas. El medio se reemplazó con medio fresco suplementado condrogénico con factor de crecimiento apropiado cada 24 a 48 horas. Las muestras se dejaron cultivar durante un máximo de 28 días, en cuyo momento fueron removidos y fijados en el 10% (v/v) de formalina (VWR Scientific, West Chester, PA) y se procesan para su examen histológico. Las muestras se tiñeron con safranina O o hematoxilina/eosina para su evaluación.

**[0359] Ensayos de cultivo de sedimento.** Las células cultivadas se trataron con tripsina para eliminar la placa de cultivo. Se lavaron las células con centrifugación dos veces en 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se contaron. Las células se resuspendieron en medio fresco condrogénico (descrito anteriormente) a una concentración de 5 x 10<sup>5</sup> células por mililitro. Las células se dividen en partes alícuotas en nuevos tubos de polipropileno a 2,5 x 10<sup>5</sup> células por tubo. Las muestras adecuadas fueron tratadas ya sea con TGF-beta3 (10 nanogramos/mililitro, Sigma) o GDF-5 (100 nanogramos/mililitro; R&D Systems, Minneapolis, MN) como factor de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 3 minutos. Los tubos se transfirieron a continuación a la incubadora y se dejará reposar durante 24 a 48 horas en atmósfera estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y. Se reemplazó el medio con medio celular de condrocitos frescos y factor de crecimiento, en su caso, cada 2 a 3 días. Las muestras se dejaron al cultivo para un máximo de 28 días y en cuyo momento se retiraron y se fijaron y se tiñeron como se ha descrito anteriormente.

**Resultados**

**[0360]** Manchas de Safranina O de sedimentos celulares de células derivadas de placenta tratadas con TGF-beta3 y GDF-5 mostraron tinción positiva Safranina O, en comparación con las células de control, lo que indica glicosaminoglicano. Células derivadas de la placenta también mostraron cierta morfología similar a condrocitos.

**[0361] Resumen.** Los resultados del presente estudio muestran que las células derivadas de la placenta parcialmente diferenciadas en condrocitos *in vitro* en el cultivo de sedimento y de los sistemas de ensayo de gel de colágeno, como se evidencia por la expresión de glicosaminoglicano y la similitud de la morfología celular de tejido de cartílago.

**EJEMPLO 17**

## Evaluación del Potencial condrogénico de las células derivadas del placenta

### en un ensayo basado en cultivo de sedimento *in vitro*

5 **[0362]** Este ejemplo describe la evaluación del potencial condrogénico de las células derivadas de tejido placentario utilizando ensayos basados en cultivo *in vitro* de sedimento. Se utilizaron células derivadas de placenta en el pasaje temprano (P3) y finales de pasaje (P12). El potencial condrogénico de las células se evaluó en ensayos de cultivo de sedimento, bajo condiciones de inducción condrogénica, en medio suplementado con factor de crecimiento transformante beta-3 (TGF beta -3), rhGDF-5 (crecimiento humano recombinante y el factor de diferenciación 5) o una combinación de ambos.

### Materiales y Métodos

15 **[0363] Reactivos.** Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomocina, se obtuvieron de Invitrogen, Carlsbad, CA. de suero bovino fetal (FCS) se obtuvo de HyClone (Logan, UT). Medio de crecimiento celular madre mesenquimales (MSCGM) y el kit de bala de diferenciación condrogénica hMSC se obtuvo de Biowhittaker, Walkersville, MD. TGF beta-3 se obtuvo a partir de productos de investigación Oncogene, San Diego, CA. rhGDF-5 se obtuvo de Biopharm, Heidelberg, Alemania (WO9601316 A1, US5994094 A).

20 **[0364] Células.** Las células madre mesenquimatosas humanas (Lot#2F1656) se obtuvieron de Biowhittaker, Walkersville, MD y se cultivaron en MSCGM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este lote ha sido probado con anterioridad, y se demostró que era positivo en los ensayos de la condrogénesis. Adulto humano y fibroblastos neonatales se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA y se cultivan en medio de crecimiento (Esencial Modificado de Dulbecco suplementado con 15% (v/v) suero fetal bovino, 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/estreptomocina ml y 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Células derivadas de placenta (Lot#071003play) se utilizaron. Se cultivaron en medio de crecimiento similares a los fibroblastos. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células usadas para los experimentos estuvieron en pasajes 3 y 12.

30 **[0365] Ensayo de cultivo de sedimento.** Para los cultivos de sedimento, se colocaron 0.25x10<sup>6</sup> células en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 150xg durante 5 minutos a temperatura ambiente para formar una pastilla esférica según el protocolo para el ensayo condrogénico de Biowhittaker. Sedimento se cultivaron en medio de inducción condrogénica que contiene TGF beta -3 (10 nanogramos/mililitro), rhGDF-5 (500 nanogramos/mililitro), o una combinación de TGF beta -3 (10 nanogramos/mililitro), y rhGDF-5 (500 nanogramos/mililitro) durante tres semanas. Los controles no tratados se cultivaron en medio de crecimiento. Durante el cultivo, los sedimentos fueron re-alimentados con medio fresco cada dos días. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

### Grupo de tratamiento

- 40 **[0366]**
- A. Células derivadas de la placenta de pasaje temprano (P EP) + rhGDF-5
  - B. Células derivadas de la placenta de pasaje tardío (P LP) + rhGDF-5
  - 45 C. Las células madre humanas mesenquimales (HMSC) + rhGDF-5
  - D. Células de fibroblastos de adultos humanos (HAF) + rhGDF-5
  - E. Células derivadas de la placenta de pasaje temprano (P EP) + TGF beta -3
  - F. Células derivadas de la placenta de pasaje tardío (P LP) + TGF beta -3
  - G. Células mesenquimales humanas primarias (HMSC) + TGF beta -3
  - 50 J. Células de fibroblastos de humano adulto (HAF) + beta TGF -3
  - I. Células derivadas de la placenta de pasaje temprano (P EP) + rhGDF-5 + TGF beta -3, n = 1
  - J. Las células derivadas de la placenta de pasaje tardío (P LP) + rhGDF-5 + TGF beta -3
  - K. Las células madre humanas mesenquimales (HMSC) + rhGDF-5 + TGF beta -3
  - L. Las células de fibroblastos adultos humanos (HAF) + rhGDF-5 + TGF beta -3
  - 55 M. Células de fibroblastos humanas neonatales (HNF) + rhGDF-5 + TGF células beta -3 N. Las células derivadas de la placenta de pasaje temprano (P EP)
  - O. Las células derivadas de la placenta de pasaje tardío (P LP)
  - P. Las células madre humanas mesenquimales (HMSC)
  - Q. Células de fibroblastos humanas adultas (HAF)

60 **[0367] Histología de muestras *in vitro*.** Al final del cultivo, gránulos de período se fijaron en 10% de formalina tamponada y se envía a MPI Research (Mattawan, MI) para la inclusión en parafina, seccionado, y la tinción con hematoxilina/eosina (H/E) y safranina O (SO) de la tinción.

### Resultados

65

**[0368]** Las células derivadas de la placenta, las MSC y los fibroblastos forman sedimentos de células en medio de inducción condrogénica con los diferentes factores de crecimiento. El tamaño del sedimento al final del período de cultivo varía entre los diferentes tipos de células. Sedimento formado con las células de la placenta fueron similares en tamaño, o ligeramente mayores que, los formados por MSCs y fibroblastos. Sedimento formado con todos los tipos de células y se cultivaron en medio de control era más pequeño que el sedimento que se cultivó en medio de inducción condrogénica.

**[0369]** El examen de secciones transversales de sedimento teñidas con H/E y safranina-O proporciona alguna indicación de que células derivadas de placenta en pasaje temprano y tardío puede tener el potencial para someterse a la diferenciación condrogénica. Condrogénesis como se evaluó mediante la condensación de células, la morfología celular y tinción positiva de safranina O de la matriz era indistinta en las células derivadas de la placenta cultivadas en medio de inducción condrogénica complementada con TGF beta -3, rhGDF-5, o ambos. Sin embargo, esto puede ser debido al hecho de que las condiciones de inducción condrogénicas se optimizaron para MSCs, no para las células derivadas del postparto, y hay que señalar que el sedimento de control cultivado en medio de crecimiento no mostró evidencia de la condrogénesis. Por otra parte, se observaron poblaciones de células diferenciadas en células derivadas de la placenta en ambos pasajes situados apicalmente o centralmente. Alguna condensación celular se observó con los fibroblastos, pero no se asoció con safranina O tinción.

## **EJEMPLO 18**

### **La diferenciación adipogénica de las células derivadas del Placenta**

**[0370]** Poblaciones estromales de células madre se han demostrado diferenciarse en un fenotipo adipogénico (Janderova et al (2003) *Obes. Res.* 11 (1): 65 a 74; Zangani et al (1999) *Diferenciación* 64 (2): 91 a 101; Liu et al (2003) *Curr. Mol. Med.* 3 (4): 325-40). El potencial de las células derivadas de la placenta de diferenciarse en un fenotipo adipogénico se examinó.

### **Métodos y materiales**

**[0371] Diferenciación de adiposa.** Células derivadas de la placenta (P3) se sembraron a 200.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos de cultivo de tejidos tratados en medio de crecimiento ((DMEM: Baja la glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), el 15 por ciento (v) definido en suero v/bovino (Hyclone, Logan, UT; Lot#AND18475), 0,001 por ciento 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 100 Unidades/ mililitros de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA) de las células madre mesenquimales (P3, IF2155), osteoblastos (P5, CC2538; Cambrex, Walkerville, MD), células omentaleses (P6) (aisladas de tejido omental de NDRI, siguiendo el protocolo utilizado para el aislamiento de células derivadas de placenta en Ejemplo 1), las células derivadas de tejido adiposo (Patente de Estados Unidos N° 6.555.374 B1) (P6), y fibroblastos (P6, CC2509) (Cambrex, Walkerville, MD) se sembraron también en las mismas condiciones. Antes de la iniciación de la osteogénesis, células madre mesenquimales fueron cultivadas en un kit de bala de medio de crecimiento de células madre mesenquimales (Cambrex, Walkerville, MD). Después de 2 días, medio gastado se aspiró y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En este punto, el medio se cambió a glucosa medio-alta mínima esencial de Dulbecco (DMEM-Hg; Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene 10 por ciento FBS (v/v, Hyclone, Logan UT), 0,02 miligramos por insulina mililitro (Sigma, St. Louis, MO), y 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). Una vez que las células habían alcanzado la confluencia, el medio gastado se retiró por aspiración. Las células fueron cultivadas en un medio de diferenciación adiposo (DMEM-Hg (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene 10 por ciento de suero fetal bovino definido ((v/v), Hyclone, Logan, UT), 0,02 miligramos por insulina de mililitro (Sigma, St. Louis, MO) y penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin y 0,25 microgramos/mililitro anfotericina, 5 micromolar isobutylmetilxantina (Sigma, St. Louis, MO), 100 microdexametasona molar (Sigma, St. Louis, MO), y 2,5 micromolar indometacina (Sigma, St. Louis, MO) durante hasta 4 semanas. las células fueron teñidas con Oil-Red-S para determinar la presencia de la formación de gotas de lípidos.

**[0372] Tinción con Oil Red O.** Las células se fijaron con 10 por ciento (v/v) de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Después de la fijación, las células se lavaron en agua desionizada y se incubaron durante dos minutos en propilenglicol (absoluto; Poli Scientific, Bay Shore, NY). El propilenglicol se separó por aspiración, y las muestras se incubaron en Oil Red O (Poli Scientific, Bay Shore, NY) durante una hora. La solución de tinción se eliminó por aspiración y muestras teñidas fueron incubadas en 85 por ciento (v/v) solución de propilenglicol (Poli Scientific, Bay Shore, NY) durante un minuto. Finalmente las muestras teñidas se lavaron con dos cambios de agua desionizada. Las muestras fueron contra-teñidas con hematoxilina de Mayer (Poli Científico Bay Shore, NY) y examinadas por microscopía de luz. Las imágenes fueron tomadas con una ampliación de 20 X.

**[0373] Ensayo de leptina.** Células derivadas de tejido adiposo y células derivadas de la placenta se sembraron a 200.000 células/pocillo en placas de cultivo de tejido tratados con 6 pocillos. Las células se sembraron inicialmente en medio de crecimiento ((DMEM: Lg; Invitrogen, Carlsbad, CA), 15% de FBS (suero bovino definido Lot#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% de 2-meraptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 100 Unidades/ml de

penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)), que fue cambiado a un medio de diferenciación adipogénica (medio DMEM-Hg (Gibco, Carlsbad, CA) que contiene 1 microdexametasona molar (Sigma, St. Louis, MO), 0,2 milimolar indometasona (Sigma, St. Louis, MO), 0,01 miligramos por insulina microlitro (Sigma, St. Louis, MO), 0,5 milimolar isobutylmetilxantina (Sigma, St. Louis, MO), 10 por ciento (v/v) de suero/bovino fetal (Cat. #SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad CA)). Al final del ensayo, se recogió el medio acondicionado y los niveles de leptina se midió usando un kit de ELISA (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN).

## 10 **Resultados**

15 **[0374] Diferenciación de adiposa.** Morfológicamente, las MSC y células derivadas de tejido adiposo (Artecel; Patente de EE.UU. 6,555,374) demostraron la formación de lípidos a los 5 días en este ensayo. Se observaron grandes cantidades de formación de gotas de lípidos en estos dos cultivos por 15 días de cultivo. Los cultivos de osteoblastos también depositan grandes cantidades de lípidos en estas condiciones después de 10 días de cultivo y extensamente a los 15 días. Se observó la formación de gotas de lípidos en cultivos derivados de la placenta y células omentales después de 15 días de cultivo. Se observó la formación de gotas de lípidos de baja intensidad en los cultivos de fibroblastos después de 20 días en condiciones que inducen adipogénicos.

20 **[0375] Leptina.** La leptina no fue detectada por ELISA en medio celular acondicionado derivada de placenta.

25 **[0376] Resumen.** El potencial de las células derivadas de la placenta de diferenciarse en un fenotipo de adiposo se examinó. Los datos demuestran que las células de placenta derivadas se someten a un bajo nivel de diferenciación de adiposo en comparación con los cultivos de células madre mesenquimales, células derivadas de tejido adiposo, o los osteoblastos. Ninguna leptina se detectó en células derivadas de la placenta por ELISA siguiendo el protocolo de diferenciación adipogénica utilizada.

## 30 **EJEMPLO 19**

### 30 **Diferenciación de las células derivadas de la placenta hacia las células beta**

35 **[0377]** El páncreas contiene células endocrinas, organizadas en los islotes de Langerhans, que producen insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (PP). La capacidad de las células derivadas de la placenta de diferenciarse hacia células con un fenotipo productor de insulina se probó bajo ocho protocolos de inducción diferentes.

### **Métodos y materiales**

40 **[0378]** Células derivadas de placenta, así como fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales o adultos (NHDF) se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero v/bovino fetal (Cat. #SH30070.03, Hyclone; Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA)) en un matraz T75 recubierta con gelatina, así como en diferentes condiciones de diferenciación de promoción de células beta. Los matraces se cubrieron con 2% (w/v) solución de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La solución de gelatina se aspiró, y los matraces se lavaron con PBS. El Factor de Crecimiento de Fibroblasto Básico (bFGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGFbeta) y Factor de Crecimiento de Fibroblástico 10 (FGF-10) se adquirieron de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). GLP-1 se adquirió de Sigma (St. Louis, MO)

50 **[0379] Protocolo 1:** *Células derivadas de placenta (aislado 1; P2), células derivadas de tejido adiposo (Patente de Estados Unidos N° 6.555.374), células derivadas de placenta (aislado 2; P4) (predominantemente neonatal según el análisis de cariotipo - datos no presentados), y de fibroblastos dérmicos adultos humanos normales (NHDF) (P10).* Las células se mantuvieron bajo cualquiera de las condiciones normales o 5% de O<sub>2</sub>. Las células se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm<sup>2</sup>) en matraces T75 recubiertos de gelatina en gelatina y se cultivaron en medio F12 de Ham (Clonetics, Santa Rosa, CA), 2% (v/v) FBS, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 10 nanogramos/mililitro EGF, y 20 nanogramos/mililitro bFGF hasta confluencia. Las células confluentes se tripsinizaron y se sembraron en placas a 50.000 células/cm<sup>2</sup> en tejidos de 24 pocillos de poliestireno Cultivo (TCPS; BD Biosciences, Bedford, MA) placas con o sin recubrimiento de gelatina o colágeno. Las células se cultivaron en medio F12 de Ham, 2% de FBS, penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro bFGF, y 15 nanomolar GLP-1 (7-37 isoforma) hasta a 3 semanas.

65 **[0380] Protocolo 2:** *Células derivadas de placenta (aislado 3; P3) y células derivadas de la placenta (aislado 2; P3) (predominantemente neonatales como se identifica por análisis de cariotipo).* Las células se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm<sup>2</sup>) en matraces T75 en gelatina y se cultivaron en medio F12 de Ham, 2% de FBS, penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20



nanogramos/mililitro bFGF hasta su confluencia. Las células confluentes se trataron con tripsina y se sembraron a razón de 50.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos TCPS con o sin recubrimiento de gelatina. Las células se cultivaron en medio F12 de Ham, 2% de FBS, P/S, 15 nanomolar GLP-1 (7-37 isoforma) para un máximo de 3 semanas.

5  
**[0381] Protocolo 3:** *Células derivadas de placenta (aislado 1; P10), adulto P10 NHDF y células derivadas de placenta (aislado 2; P3).* Las células se sembraron a una densidad elevada (50.000 células/cm<sup>2</sup>) en placas de 24 pocillos TCPS y se cultivaron en DMEM: F12 de Ham (1: 1) medio, B-27 suplemento (Gibco, Carlsbad, CA), 50 unidades/ml de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 20 nanogramos/mililitro EGF, 40 nanogramos/mililitro bFGF. Cúmulos esféricos se generaron dentro de aproximadamente 4-6 días. Con el cumplimiento de ese período, se recogieron las agrupaciones esféricas, se centrifugaron, y se volvieron a sembrar en placas recubiertas con laminina de 24 pocillos (BD Biosciences, Bedford, MA), y se cultivaron hasta 3 semanas en el medio suplementado-B-27 que contiene 10 nanomolar GLP-1 (7-37) sin otros factores de crecimiento (es decir, no bFGF y EGF no).

15  
**[0382] Protocolo 4:** *Células derivadas de placenta (aislado 1; P10), adulto NHDF (P10), las células derivadas de la placenta (aislado 2; P3).* Las células se establecieron a alta densidad (50.000 células/cm<sup>2</sup>) en placas de 24 pocillos TCPS y se cultivaron en DMEM: F12 de Ham (1: 1) medio, B-27 suplemento, 50 unidades/ml de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 20 nanogramos/mililitro EGF, 40 nanogramos/mililitro bFGF. Cúmulos esféricos se generaron, por lo general en alrededor de 4-6 días. Después de ese período, los cúmulos se recogieron, se centrifugaron, y se volvieron a sembrar en placas recubiertas de 24 pocillos con laminina y se cultivaron hasta 3 semanas en medio B-27 suplementado que contiene 10 nanomolar GLP-1 (1-37 isoforma) pero no otros factores de crecimiento (es decir, sin bFGF y EGF).

25  
**[0383] Protocolo 5:** *Adultos NHDF (P15) y células derivadas de la placenta (aislado 1; P15).* Las células se sembraron a una densidad elevada (50.000 células/cm<sup>2</sup>) en placas recubiertas de gelatina TCPS de 24 pocillos y se cultivaron en DMEM: F12 de Ham (1: 1) medio, B-27 suplemento, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro estreptomina, 10 nanogramos/mililitro FGF-10, y/o 40 nanogramos/mililitro TGFbeta para > dos semanas.

30  
**[0384] Protocolo 6:** *NHDF adulto y células derivadas de la placenta (aislado 1; P15).* Las células se sembraron a una densidad elevada (50.000 células/cm<sup>2</sup>) en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina TCPS y se cultivaron en EBM-2 media, 10 nanogramos/mililitro FGF-10, y/o de 40 nanogramos/mililitro TGFbeta para > dos semanas.

35  
**[0385] Protocolo 7:** Células derivadas de placenta (aislado 3; P3) se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm<sup>2</sup>) en matraces T75 en gelatina y cultivado ya sea en medio de crecimiento o en medio F12 de Ham, 2% de SFB, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 10 nanogramos/mililitro EGF, 20 nanogramos/mililitro bFGF hasta confluencia. Las células confluentes se trataron con tripsina y se sembraron a razón de 50.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos TCPS, con o sin recubrimiento de gelatina. Se utilizaron tres tipos de medios básicos para un máximo de 3 semanas:

medio beta1: medio F12 de Ham, 2% de FBS, 10 milimolar nicotinamida, penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 25 milimolar de glucosa

45  
 medio beta2: Partes iguales de medio DMEM/F12 de Ham, FBS al 2%, 10 milimolar nicotinamida, 25 milimolar de glucosa

La célula endotelial de medio basal (EBM), (Clonetics, Santa Rosa, CA).

50  
**[0386]** Se añadieron los siguientes factores de crecimiento para cada uno de los medios de comunicación: 10 nanogramos/mililitro EGF, de 20 nanogramos/mililitro bFGF, 10 nanomolar GLP-1 (7-37 isoforma).

55  
**[0387] Protocolo 8:** Células derivadas de placenta (aislado 2; P2) (predominantemente neonatales como se identifica por análisis de cariotipo), células derivadas de la placenta (aislado 2; P1), el clon #22. Las células se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm<sup>2</sup>) en matraces T25 TCPS y se cultivaron en DMEM, 20% de FBS, penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina hasta confluencia.

60  
**[0388] Aislamiento total ARN y RT-PCR cuantitativa.** Se extrajo ARN de células derivadas de la placenta y fibroblastos cultivados como se describe en cada protocolo. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contiene beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini kit, Qiagen, Valencia, CA) y ARN extraído de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de ADNasa 2,7 Unidades/muestra (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. El ARN se transcribe de forma inversa utilizando hexámeros al azar con reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, y 95°C durante 10 minutos. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

65  
**[0389] PCR en tiempo real.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión de genes

ASSAYS-ON-DEMAND™ PDX-1 (Hs00426216), pro-insulina (Hs00355773), Ngn-3 (Hs00360700), Glut-2 (Hs00165775), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y mezcla maestra TaqMan® universal de PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con ABI prism® 7000 software SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA).  
 5 Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Además se puso a prueba otro conjunto de cebadores diseñados en casa para PDX-1 y NGN-3. Tabla 19-1 contiene secuencias de los cebadores. PCR usando estos cebadores se realizó como se ha descrito anteriormente. Páncreas ARN total (Ambion, Austin, TX) se utilizó como control. los datos de PCR se analizó de acuerdo con el método recomendado por  $\Delta\Delta C_T$  (Applied Biosystems usuario Boletín #2 de Applied Biosystems ABI Prism® 7700 Sequence Detection System).  
 10

**Tabla 19.1 Cebadores**

Nombre de cebador	Secuencia
PDX-1 Cebador directo	5'-CTGGATTGGCGTTGTTTGTG-3' (SEQ ID NO:11)
PDX-1 Cebador inverso	5' -TCCCAAGGTGGAGTGCTGTAG-3' (SEQ ID NO:12)
PDX-1-TaqMan® sonda	5'-CTGTTGCGCACATCCCTGCC-3' (SEQ ID NO:13)
20 Ngn-3 Cebador directo	5' -GGCAGTCTGGCTTTCTCAGATT-3' (SEQ ID NO:14)
Ngn-3 Cebador inverso	5' -CCCTCTCCCTTACCCTTAGCA-3' (SEQ ID NO:15)
Ngn-3 TaqMan® sonda	5' -CTGTGAAAGGACCTGTCTGTCTCGC-3' (SEQ ID NO:16)

## 25 **Resultados**

**[0390]** Para células derivadas de la placenta tratadas de acuerdo con los protocolos de 1-8, la expresión del marcador de páncreas-específico no se detectó utilizando PCR en tiempo real y los cebadores de assay-on-demand, con la excepción de que los bajos niveles de NGN-3 se detectaron en las células de protocolo 7. Los mismos  
 30 cebadores produjeron resultados positivos con ADNc derivado de ARN tejido pancreático. Resultados de PCR en tiempo real para PDX-1 y NGN-3 realizado en muestras de ADNc derivadas de placenta humana se comparan con los resultados para las células derivadas de tejido de adiposo cultivadas según el protocolo 1. También se realizó PCR usando en-casa diseñado cebadores (Tabla 19 -1). Resultados de PCR en tiempo real utilizando cebadores para PDX-1 y NGN-3 realizados en muestras de ADNc derivadas de placenta humana se compararon con los  
 35 resultados de las células derivadas de tejido adiposo. Los datos obtenidos de PCR a tiempo real se analizó mediante el método  $\Delta\Delta C_T$  (usuario Boletín # 2de Applied Biosystems para ABI Prism® 7700 Sequence Detection System) y se expresan en una escala logarítmica.

**[0391]** Las condiciones experimentales en los protocolos de 3 y 8 aplicados a células derivadas de la placenta, pero no los fibroblastos, reensamblando las estructuras producidas en el conjunto celular de las células epiteliales pancreáticas en islotes. Estas estructuras surgieron unos 3-5 días después de la aplicación del protocolo. La expresión de marcadores pancreáticos PDX-1, Ngn3, GLUT-2 y pro-insulina no se detectaron por PCR en tiempo real.

**[0392] Resumen.** Se observó expresión limitada de PDX-1 y NGN-3 en células derivadas de la placenta tratados con una variedad de protocolos experimentales. No hubo diferencias en los resultados entre los cebadores capaces internamente diseñados y disponible en el comercio. Por ejemplo, mientras que el protocolo número 1 dio datos positivos para el PDX-1 y NGN-3 utilizando cebadores diseñados internamente, cebadores ASSAYS-ON-DEMAND™ para los mismos genes produjeron datos negativos. Los resultados no fueron verificados directamente por técnicas inmunológicas. A pesar de estas diferencias, la expresión de varios marcadores de páncreas se ha logrado, lo que sugiere el potencial de las células derivadas de la placenta de diferenciarse hacia los fenotipos pancreáticas.

## 55 **EJEMPLO 20**

### **La diferenciación de las células derivadas del placenta al fenotipo de cardiomiocitos**

**[0393]** Existe una gran necesidad de una terapia que ralentiza la progresión de la enfermedad cardíaca y/o curación, tales como la enfermedad isquémica del corazón e insuficiencia cardíaca congestiva. Las células que pueden diferenciarse en cardiomiocitos que puedan integrar plenamente en el músculo cardíaco del paciente sin arritmias son muy deseables. las células madre mesenquimales de roedores tratados con 5-azacitidina se han demostrado para expresar marcadores de los cardiomiocitos (Fukuda et al (2002) C. R. Biol 325: 1027-1038). Esto no se ha demostrado para las células madre humanas adultas. Los factores adicionales se han utilizado para mejorar la diferenciación de células madre, incluyendo bajos niveles de oxígeno (Storch (1990) Biochim Biophys Acta 1055: 126-9)., el ácido retinoico (Wobus et al (1997) J. Mol Cell Cardiol 29: 1525 -39), DMSO (Xu et al (2002). Circ Res 91:.. 501-8), y cloruro de queleritina (Internacional PCT No. WO03 Pub- licación/025.149), que efectúa la  
 60  
 65

translocación de PKC desde el citosol a membrana plasmática y es un inhibidor de la actividad PKC. En este ejemplo, células derivadas de la placenta fueron tratadas con 5-azacitidina, ya sea solo o en combinación con DMSO o cloruro de queleritrina y marcadores de cardiomiocitos medidos por PCR en tiempo real.

## 5 Métodos y materiales

[0394] **Células.** Células derivadas de la placenta de criopreservados (P24) se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15% (v) de suero v/bovino fetal (Cat. #SH30070.03, Hyclone, Logan UT), 0.001 (v/v)% betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)), en un matraz recubierto con gelatina. Las células se sembraron a  $5 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento durante 24 horas. El medio se cambió a 0, 3, 10 y 30 uM 5-azacitidina (Sigma, St. Louis, MO) solo o con 5 micromolar cloruro de queleritrina (Sigma), 1% (v/v) sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma) o 1 micromolar ácido retinoico (Sigma) en MEM alfa (Sigma), insulina, transferrina y selenio (ITS; Sigma), 10% (v/v) de suero fetal bovino, penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro estreptomycin, y las células se incubaron a 37°C, 5% (v/v) O<sub>2</sub> durante 48 o 72 horas. Después el medio se cambió a MEM alfa, la insulina, transferrina y selenio, 10% (v/v) de suero fetal bovino, penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin, y las células se incubaron a 37°C, 5% (v/v) O<sub>2</sub> durante 14 días.

[0395] **Extracción de ARN y transcripción reversa.** Las células se lisaron con 150 microlitros RLT tampón que contiene betamercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy 96 kit, Qiagen, Valencia, CA) y se almacenaron a 80°C. Los lisados celulares se descongelaron y se extrajeron los ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy 96 kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de ADNsa 2.7 Unidades/muestra (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. El ARN se transcribe de forma inversa utilizando hexámeros al azar con el TaqMan transcripción reversa reactivos (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.

[0396] **PCR.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando genes ASSAYS-ON-DEMAND™ productos de expresión de la miosina cardíaca (Hs00165276 ml), miosina esquelética (Hs00428600), GATA 4 (Hs00171403 ml), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA), y TaqMan® Universal PCR master mix de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems sistemas, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con el ABI prism® 7000 software SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. ADNc de corazón y músculo esquelético (Ambion Austin TX) se utilizaron como control.

## Resultados

[0397] ARN de control desde el músculo cardíaco mostraron expresión de la miosina cardíaca y GATA 4, ARN de músculo esquelético mostró miosina esquelética y miosina cardíaca, pero no la expresión de GATA 4. Células derivadas de placenta (P24) tratadas durante 72 h con los factores y se cultivaron durante 14 días adicionales expresaron GATA 4, pero sin miosina esquelética ni miosina cardíaca. Las muestras adicionales de la placenta, que se analizaron mostraron expresión de GATA 4.

[0398] **Resumen.** Células derivadas de la placenta no tratadas constitutivamente expresan GATA 4, un factor de transcripción nuclear en cardiomiocitos, células de Sertoli, y hepatocitos.

## EJEMPLO 21

### Tratamiento de células derivadas de placenta con progesterona y cAMP

[0399] La placenta comprende tanto las células maternas y neonatales. Las células maternas se derivan de la pared uterina durante el proceso de implantación. Las células del endometrio del útero se someten a un proceso llamado decidualización después de la concepción que es impulsado por las hormonas esteroideas y señales embrionarias que cambia la morfología de la célula, fenotipo y la función. La morfología de las células cambia de fibroblástica a poligonal. La expresión de actina muscular lisa alfa se reduce, y las células comienzan a expresar la desmina, prolactina y factor de crecimiento de insulina proteína de unión-1 (IGFBP-1) (Fazleabas y Strakova (2002) Mol. Cellular Endo. 186: 143-147). En el presente estudio los efectos de la progesterona y 8-bromoadenosina 3', 5'-ciclicmonofosfato, un análogo de cAMP, se investigaron. Se ha demostrado anteriormente que estos compuestos promueven decidualización de endometrio *in vitro* (Gellersen y Brosens (2003) J. Endocrinol. 178: 357-372). Fibroblastos, células madre mesenquimales (MSC), y células derivadas de la placenta se trataron con progesterona y un análogo de cAMP para los 3 y 6 días y se tiñeron para desmina, un marcador de decidualización, y vimentina para las células mesenquimales del estroma.

## Métodos y materiales

**[0400]** Las células madre mesenquimales (P3) (Cambrex, Walkersville, MD), células derivadas de la placenta (P3) (cariotipo materna), y fibroblastos dérmicos (P10) (Cambrex,) fueron sembradas en LabTek II cámara de diapositivas recubiertos de gelatina (Nalgene, Rochester, NY) a 10.000 células/pocillo en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco Carlsbad CA), 15% (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramo/mililitro de estreptomina (Gibco)). Las células se volvieron confluentes en 4 días y se cambió el medio a cualquiera de 1) el control de medio basal (DMEM de baja glucosa (Gibco), 10% (v/v) fetal bovino carbón suero/dextrano tratado (Hyclone), 50 unidades/mililitro penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco), Fungizone (Gibco)) o 2) medio basal que contiene 63,5 progesterona micromolar (Sigma) y 0,76 milimolar 8-bromoadenosina 3'5' ciclicmonofosfato (Sigma). Las células se incubaron durante 3 ó 6 días con los medios cambiados a los 3 días. Las células se lavaron con PBS (Gibco) y se fijaron con 4% (w/v) de paraformaldehído (Sigma) durante 20 minutos y se almacenaron a 4°C en solución salina tamponada con fosfato.

**[0401]** La inmunocitoquímica se realizó para evaluar la expresión de vimentina (1: 500, Sigma,) y desmina (1: 150, Sigma). Brevemente, cultivos fijados se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% de Triton (Triton X-100, Sigma) durante 30 minutos. Soluciones de anticuerpo primario se aplicaron a las muestras que contienen solución de bloqueo más anticuerpos de vimentina (1: 500) y desmina (1: 150) durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las soluciones de anticuerpos primarios se retiraron y las muestras se lavaron con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contiene solución de bloqueo junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1: 250) y anti-cabra IgG de conejo - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR). Las muestras se lavaron y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) se aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

**[0402]** Tras la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó utilizando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus. Imágenes representativas fueron capturadas utilizando un software ImagePro® (Media Cybernetics, Carlsbad, CA) y cámara de vídeo digital en color. Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. Montajes en capas se prepararon a continuación, utilizando el software Adobe Photoshop® (Adobe, San Jose, CA).

### **Resultados**

**[0403]** Todas las células, con la excepción de las MSC, en el medio de control no mostraron tinción de vimentina o desmina en día 3 o 6. Células derivadas de la placenta materna a 3 y 6 días mostraron un cambio en la morfología cuando se trataron con progesterona y 8- bromoadenosina 3'5' ciclicmonofosfato. Las células derivadas de la placenta se convirtió en fase luminosa y tenía una tasa de proliferación reducida de manera significativa lo que resulta en una cultivo de menor densidad. Células derivadas de la placenta eran las únicas células que se tiñen fuertemente para vimentina cuando son tratadas con progesterona y 8-bromoadenosina 3'5' ciclicmonofosfato durante 3 ó 6 días. MSCs mostró tinción débilmente positiva para vimentina bajo ambas condiciones a los 3 y 6 días.

**[0404] Resumen.** Células derivadas de placenta y fibroblastos cultivados en DMEM de baja glucosa con suero bovino fetal 10% normalmente expresan vimentina. En el presente análisis, no hubo tinción para vimentina cuando las células fueron cultivadas al 10% de carbón vegetal/suero fetal bovino tratado por dextrano para tan poco como 3 días. Células derivadas de la placenta maternas mostraron un cambio en la morfología y la expresión de vimentina con progesterona y tratamiento 8-bromoadenosina 3'5'-ciclicmonofosfato. No se detectó expresión de desmina.

**[0405]** El análisis de chip de genes reveló que hay poca o ninguna expresión del receptor de la progesterona en las células examinadas. Se detectó una expresión de un receptor de esteroides putativos, componentes de la membrana de progesterona 1 y 2 (Gerdes et al. (1998) Biol Chem.379:907-11).

### **EJEMPLO 22**

#### **Diferenciación Neural de Corto Plazo de las células derivadas del Placenta**

**[0406]** Se examinó la capacidad de las células derivadas de la placenta de diferenciarse en células de linaje neural.

#### **Materiales y Métodos**

**[0407] Aislamiento y expansión de células derivadas de la placenta.** Se aislaron células derivadas de placenta y se expandieron tal como se describe en el Ejemplo 1.

**[0408] Protocolo Modificado Woodbury-Negro.** (A) Este ensayo se adaptó de un ensayo originalmente realizado para probar el potencial de inducción neural de las células estromales de la médula ósea (1). Células derivadas de placenta (P3) se descongelaron y expandieron en medio de crecimiento a 5.000 células/cm<sup>2</sup> hasta sub-confluencia (75%) se alcanzó. Las células fueron tripsinizadas y se sembraron a 6.000 células por pocillo de una placa de vidrio

Titretek II (VWR International, Bristol, CT). Como controles, las células madre mesenquimales (P3; 1F2155; Cambrex, Walkersville, MD), osteoblastos (P5; CC2538; Cambrex), células de epiplón (P6; 041003), células Artecél (US6555374 B1) (P6; Donantes 2) y neonatales fibroblastos dérmicos humanos (P6; CC2509; Cambrex) también se sembraron en las mismas condiciones.

5 **[0409]** Todas las células se expandieron inicialmente durante 4 días en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contienen 15% (v/v) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan, UT), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; 20 nanogramos/mililitro; Peprotech, Rocky Hill, NJ), factor de crecimiento epidérmico (EGF; 20 nanogramos/mililitro; Peprotech) y penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen). Después de 4 días, las células se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen) y posteriormente fueron cultivadas en DMEM/F12 medio + 20% (v/v) de FBS + 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/estreptomycin mililitro durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se enjuagaron con PBS. Las células fueron cultivadas durante 1 a 6 horas en un medio de inducción que estaba compuesto de DMEM/F12 (sin suero) que contenía 200 milimolar hidroxianisol butilado, 10 nanomolar cloruro h potasio, 5 miligramos/mililitro de insulina, 10 nanoMolarforskolina, 4 nanoMolar- valproico ácido, y 2 nanoMolarhydrocortisone (todos los productos químicos de Sigma, St. Louis, MO). Las células fueron fijadas en -20°C 100% de metanol y se realizó inmunocitoquímica (véase métodos abajo) para evaluar la expresión de proteína de nestina humana.

10 (B) Células derivadas de la placenta (P11) y fibroblastos dérmicos humanos adultos (1F1853, P11) se descongelaron y el cultivo se expandió en medio de crecimiento a 5.000 células/cm<sup>2</sup> hasta que se alcanzó sub-confluencia (75%). Las células fueron tripsinizadas y sembradas a una densidad similar como en (A), pero en (1) placas de cultivo tratadas con tejido de 24 pocillos (TCP, marca Falcon, VWR International), (2) pozos TCP + 2% (w/v) gelatina adsorbido durante 1 hora a temperatura ambiente, o (3) TCP pozos + 20 nanogramos/mililitro laminina de ratón adsorbido (adsorbido durante un mínimo de 2 horas a 37°C; Invitrogen).

25 **[0410]** Exactamente como en (A), las células se expandieron inicialmente y los medios de comunicación se conmutaron en los marcos de tiempo antes mencionados. Un conjunto de cultivos se ha fijado, como antes, a los 5 días y seis horas, esta vez con 4°C 4% de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente (v/w). En la segunda serie de cultivos, se retiró el medio y se cambió a medios progenitores neurales de expansión (NPE) que consiste en Neurobasal-A medio (Invitrogen) que contiene B27 (suplemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar), y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen). NPE medio se complementa además con ácido retinoico (RA; 1 micromolar; Sigma). Este medio se retiró 4 días más tarde y los cultivos se fijaron con 4°C 4% (w/v) de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la nestina, GFAP, y expresión de proteínas TuJ1 (véase la Tabla 22-1).

35 **Tabla 22-1 Resumen de anticuerpos primarios utilizados**

Anticuerpo	Concentración	Vendedor
Rata 401 (nestina)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
Nestina Humana	1:100	Chemicon
TuJ1 (BIII Tubulina)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
Hidroxilasa de Tirosina (TH)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
Desmina (ratón)	1:300	Chemicon
alfa - actina de músculo liso	1:400	Sigma
Protéina nuclear humana (hNuc)	1:150	Chemicon

50 **[0411] Protocolo de diferenciación de dos etapas.** Células derivadas de placenta (P11), fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11; 1F1853; Cambrex) se descongelaron y el cultivo expandido en Medio de Crecimiento a 5.000 células/cm<sup>2</sup> hasta alcanzarse la sub-confluencia (75%). Las células fueron tripsinizadas y sembradas a 2.000 células/cm<sup>2</sup>, pero en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en presencia de medios de comunicación NPE suplementados con bFGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech) [denominado en su conjunto la composición del medio en adelante como NPE + F + E]. Al mismo tiempo, progenitores neuronales de rata adulta aislados a partir de hipocampo (P4; 062603; véase el Ejemplo 23)) también se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina en medios NPE + F + E. Todos los cultivos se mantuvieron en esas condiciones durante un periodo de 6 días (células se alimentaron una vez durante ese tiempo) momento en el cual los medios fueron cambiados a las condiciones de diferenciación que figuran en la Tabla 22-2 para un período adicional de 7 días. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído helado de 4% de (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, (w/v) y se tiñeron para nestina humana o de rata, GFAP, y expresión de proteínas TuJ1.

65

Tabla 22-2. Resumen de las condiciones para protocolo de diferenciación de dos etapas

	A		B	
COND. #	PRE-DIFERENCIACIÓN	DIFF DE 2 <sup>A</sup> ETAPA		
1	NPE + F + E	NPE + SHH (200 nanogramo/mililitro) + F8 (100 nanogramo/mililitro)		
2	NPE + F + E	NPE + SHH (200 nanogramo/mililitro) + F8 (100 nanogramo/mililitro) + RA (1 micromolar)		
3	NPE + F + E	NPE + RA (1 micromolar)		
4	NPE + F + E	NPE + F (20 nanogramo/mililitro) + E (20 nanogramo/mililitro)		
5	NPE + F + E	Medio de Crecimiento		
6	NPE + F + E	Condición 1B + rhGDF-5 (20 nanogramo/mililitro)		
7	NPE + F + E	Condición 1B + BMP7 (20 nanogramo/mililitro)		
8	NPE + F + E	Condición 1B + GDNF (20 nanogramo/mililitro)		
9	NPE + F + E	Condición 2B + rhGDF-5 (20 nanogramo/mililitro)		
10	NPE + F + E	Condición 2B + BMP7 (20 nanogramo/mililitro)		
11	NPE + F + E	Condición 2B + GDNF (20 nanogramo/mililitro)		
12	NPE + F + E	Condición 3B + rhGDF-5 (20 nanogramo/mililitro)		
13	NPE + F + E	Condición 3B + BMP7 (20 nanogramo/mililitro)		
14	NPE + F + E	Condición 3B + GDNF (20 nanogramo/mililitro)		
15	NPE + F + E	NPE + rhGDF-5 (20 nanogramo/mililitro)		
16	NPE + F + E	NPE + BMP7 (20 nanogramo/mililitro)		
17	NPE + F + E	NPE + GDNF (20 nanogramo/mililitro)		

[0412] **Protocolo de Co-cultivo de Progenitor Neural.** Progenitores adulto de hipocampo de rata (062603) se cultivaron como esferas neurológicas o células individuales (10.000 células/pocillo) en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences) en NPE + F (20 nano gramos/mililitro) + E (20 nanogramos /mililitro).

[0413] Por otra parte, células derivadas de la placenta de (022803) P11 se descongelaron y expandidas en cultivo en NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro) a 5.000 células/cm<sup>2</sup> durante un periodo de 48 horas. Las células fueron tripsinizadas y se sembraron a 2.500 células/pocillo en cultivos existentes de progenitores neurales. En ese momento, el medio existente se cambió por medio fresco. Cuatro días más tarde, los cultivos se fijaron con helado de 4% de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la proteína nuclear humana (hNuc; Chemicon) (v/w) (Tabla 221-1 anteriormente) para identificar PPDCs.

[0414] **Inmunocitoquímica.** La inmunocitoquímica se llevó a cabo utilizando los anticuerpos enumerados en la Tabla 22-1. Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Los anticuerpos primarios, se diluyó en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las soluciones de anticuerpos primarios fueron removidos y cultivos lavaron con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contiene la solución de bloqueo, junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y de cabra anti-IgG de conejo - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes). Después, los cultivos se lavaron y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0415] Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio invertido Olympus epi-fluorescencia (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control donde todo el procedimiento descrito anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario. Imágenes representativas fueron capturadas utilizando un software ImagePro® (Media Cybernetics, Carlsbad, CA) y cámara de vídeo digital en color. Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. montajes en capas se prepararon a continuación, utilizando el software Adobe Photoshop® (Adobe, San Jose, CA).

**Resultados**

[0416] **Protocolo Woodbury-Black.** (A) Tras la incubación en esta composición de inducción neural, todos los tipos de células transformadas en células con morfologías bipolares y procesos extendidos. También se observaron otras morfologías no bipolares más grandes. Además, las poblaciones de células inducidas se tiñeron positivamente para

nestina, un marcador de células madre y progenitoras neurales multipotentes.

(B) Cuando se repite en platos de plástico de cultivo de tejido (TCP), no se observó expresión de nestina a menos que la laminina estaba pre-adsorbida en la superficie de cultivo. A fin de evaluar si las células de nestina que expresan podrían entonces pasar a generar neuronas maduras, PPDCs y fibroblastos se expusieron a NPE + RA (ImicroMolar), una composición de los medios de comunicación conocida para inducir la diferenciación de células madre y progenitores neuronales en tales células (2,3,4). Las células se tiñeron para TuJ1, un marcador de neuronas inmaduras y maduras, GFAP, un marcador de astrocitos, y nestina, un marcador de progenitores neurales. Bajo ninguna condición se encendió expresión de TuJ1 ni se observaron células con morfología neuronal, lo que sugiere que las neuronas no se generaron en el corto plazo. Además, expresión de nestina y GFAP ya no se expresan por las PDC, determinadas por inmunocitoquímica.

**[0417] Resultados de diferenciación de dos etapas.** Células derivadas de placenta (así como fibroblastos humanos y progenitores neurales de roedores como los tipos de células de control negativo y positivo, respectivamente) se sembraron en placas recubiertas de laminina (de promoción neural) y expuestas a 13 condiciones diferentes de crecimiento (y dos condiciones de control) conocidas para promover la diferenciación de células progenitoras neurales en neuronas y astrocitos. Además, se añadieron dos condiciones para examinar la influencia de GDF5, y BMP7 en la diferenciación PPDC. En general, un enfoque de diferenciación de dos etapas fue tomado, donde las células se colocaron primero en condiciones de expansión progenitoras neurales durante un período de 6 días, seguido por condiciones de diferenciación completas de 7 días. Morfológicamente, las células derivadas de la placenta exhibieron cambios fundamentales en la morfología celular durante todo el tiempo de este procedimiento. Sin embargo, en ningún caso eran células neuronales o en forma de astrocitos observadas, con excepción de control, en condiciones progenitoras neurales chapadas. La inmunocitoquímica, negativa para nestina humana, TuJ1, y GFAP confirmaron estas observaciones morfológicas.

**[0418] Progenitoras neurales y procedimientos de co-cultivo PDC.** Células derivadas de la placenta se sembraron en cultivos de progenitores neurales de rata sembradas dos días antes en condiciones de expansión neural (NPE + F + E). Si bien la confirmación visual de células derivadas de la placenta chapadas demostró que estas células se sembraron como células individuales, humanos específicos de tinción nuclear (hNuc) 4 días después de chapado (6 días longitud total de la exposición) mostró que tendían a la bola y evitar el contacto con los progenitores neurales. Además, cuando células de la placenta se unieron, estas células se dispersaron y parecían estar invadidas por las neuronas diferenciadas que eran de origen rata lo que sugiere que las células de la placenta pueden haberse diferenciado en células musculares. Esta observación se basó en la morfología bajo microscopio de contraste de fase. Otra observación fue que los cuerpos celulares suelen ser grandes (mayores de progenitores neurales) poseían morfologías semejantes a los progenitores neurales, con procesos delgados que abarcan múltiples direcciones. Tinción HNuc (que se encuentra en una mitad del núcleo de la célula) sugirió que en algunos casos estas células humanas pueden haber fundido con progenitores de rata y asumieron su fenotipo. Controles pocillos que contienen progenitores neurales sólo tenían un menor número de progenitores totales y células diferenciadas aparente que pocillos de co-cultivo que contenían células de la placenta, lo que indica, además, que las células de placenta derivadas influyeron en la diferenciación y el comportamiento de los progenitores neurales, ya sea por la liberación de citocinas y quimiocinas, ya sea por efectos de contacto mediado.

**[0419] Resumen.** Se llevaron a cabo los protocolos múltiples para determinar el potencial a corto plazo de PPDCs derivados de la placenta de diferenciarse en células del linaje neural. Estos incluyen imágenes de contraste de fase de la morfología en combinación con inmunocitoquímica para la nestina, TuJ1, y GFAP, proteínas asociadas con las células neuronales multipotentes madre y progenitoras, las neuronas inmaduras y maduras, y astrocitos, respectivamente. No se observó evidencia que sugiere que la diferenciación neuronal se produjo en ciertos casos previstos en esos protocolos a corto plazo.

**[0420]** Varias observaciones se hicieron notables en co-cultivos de PPDCs con progenitores neurales. Este enfoque, utilizando PPDCs humanos junto con un tipo de célula xenogénica permitido para la determinación absoluta de la procedencia de cada celda en estos cultivos. En primer lugar, se observaron algunas células en estos cultivos, donde se amplió el citoplasma de la célula, con los procesos de neuritas que se extiende del cuerpo de la célula, sin embargo, sólo la mitad del cuerpo marcado con proteína hNuc. Esas células pueden ser PPDCs humanos que se han diferenciado en células de linaje neural o pueden ser PPDCs que se han fusionado con progenitores neurales de origen de rata. En segundo lugar, parece que los progenitores neurales extienden neuritas a PPDCs de una manera que indica los progenitores se diferenciaron en neuronas e invadieron los PPDCs. En tercer lugar, los cultivos de células progenitoras neurales y PPDCs tenían más células de origen de rata y grandes cantidades de la diferenciación de los cultivos de control de progenitores neurales solos, lo que indica, además, que PPDCs chapados proporcionan factores solubles y/o mecanismos dependientes del contacto que estimulan la supervivencia progenitora neuronal, proliferación y/o diferenciación.

**Referencias para el ejemplo 22**

**[0421]**

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

5

**EJEMPLO 23****Factores derivados de la placenta celular trófica para apoyo de progenitor neural**

10 **[0422]** Se examinó la influencia de células derivadas de la placenta en supervivencia de células madre y neuronales adultas y la diferenciación a través de mecanismos no dependientes de contacto (tróficos).

**Materiales y Métodos**

15 **[0423]** Aislamiento de células progenitoras madre y neuronales adultas. Ratas adultas Fisher 344 fueron sacrificadas por asfixia con CO<sub>2</sub>, seguido por dislocación cervical. Cerebros completos fueron retirados intactos usando pinzas de hueso y tejido de hipocampo diseccionado basado en incisiones coronales posterior al motor y regiones somatosensoriales del cerebro (1). El tejido se lavó en Neurobasal-A medio (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27 (suplemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 miliMolar; Invitrogen), y 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen), la combinación de la que se denomina aquí como medio de expansión de progenitores neurales (NPE). Medio NPE se complementa además con bFGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ), en adelante denominado NPE + bFGF + EGF.

25 **[0424]** Después del lavado, las meninges que recubren fueron retiradas, y el tejido picado con un bisturí. Se recogió tejido picado y tripsina/EDTA (Invitrogen) añadido como 75% del volumen total. (volumen total, 100 microlitros por 8 mililitros Sigma, St. Louis, MO) también se añadió ADNsa. A continuación, el tejido/medio se pasó secuencialmente a través de una aguja de calibre 18, 20 aguja de calibre, y por último, una aguja de calibre 25 una vez cada uno (todas las agujas de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 250 x g. Se eliminó el sobrenadante, se añadió NPE + bFGF + EGF fresca y el sedimento se volvió a suspender. La suspensión celular resultante se hizo pasar a través de un filtro de 40 micras de células (BD Biosciences), en matraces T-75 recubiertas con laminina (Becton Dickinson) o bajo placas de 24 pocillos (Becton Dickinson), y se cultivaron en medios NPE + bFGF + EGF hasta obtener el número de células suficientes para los estudios indicados.

35 **[0425] Revestimiento de células derivadas de placenta.** Células derivadas de la placenta (P12) previamente cultivadas en el medio de crecimiento se sembraron a 5.000 células/inserto de transwell (tamaño de placa de 24 pocillos) y se cultivaron durante un período de una semana en medio de crecimiento en insertos para alcanzar la confluencia.

40 **[0426] Revestimiento de progenitores neurales adultos.** Progenitores neuronales, que se cultiva como neuroesferas o células individuales, fueron sembrados en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina a una densidad aproximada de 2.000 células/pocillo en NPE + bFGF + EGF para un período de un día para promover la unión celular. Un día más tarde, se añadieron insertos transwell que contienen células derivadas de la placenta de acuerdo con el siguiente esquema:

45

- (1) Transwell (placenta en medio de crecimiento, 200 microlitros) + progenitoras neuronales (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)  
 (2) Transwell (fibroblastos dérmicos humanos adultos [1F1853; Cambrex, Walkersville, MD] P12 en medio de crecimiento, 200 microlitros) + neuronales progenitoras (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)  
 50 (3) Control: progenitores neurales solos (NPE + bFGF + EGF, 1 mililitro)  
 (4) Control: progenitores neurales solos (NPE solamente, 1 mililitro)

**[0427] Inmunoquímica.** Después de 7 días en el co-cultivo, todas las condiciones fueron fijadas con 4% frío (w/v) paraformaldehida (Sigma) durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. La inmunoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los epítomos enumerados en la Tabla 23-1. Brevemente, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Los anticuerpos primarios, se diluyó en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las soluciones de anticuerpos primarios fueron removidos y cultivos lavados con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contiene la solución de bloqueo, junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y de cabra anti-IgG de conejo - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes). Después, los cultivos se lavaron y 10 microMolar DAPI (Molecular Probes) aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

65

**[0428]** Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente



en un microscopio invertido Olympus epi-fluorescencia (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó una señal de fluorescencia por encima de la tinción de control donde todo el procedimiento descrito anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario. Imágenes representativas fueron capturadas utilizando un software ImagePro® (Media Cybernetics, Carlsbad, CA) y cámara de vídeo digital en color. Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. Montajes en capas se prepararon a continuación, utilizando el software Adobe Photoshop® (Adobe, San Jose, CA).

**Tabla 23-1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados**

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

**[0429] Análisis cuantitativo de la diferenciación progenitora neuronal.** Se examinó la cuantificación de diferenciación progenitora neural de hipocampo. Un mínimo de 1000 células fueron contados por condición o, si es menor, el número total de células observadas en esa condición. El porcentaje de células positivas para una mancha dada se evaluó dividiendo el número de células positivas por el número total de células como se determina por tinción DAPI (nuclear).

**[0430] Análisis de espectrometría de masas y electroforesis en gel de 2D.** Con el fin de identificar los factores únicos, secretados como resultado del co-cultivo, las muestras de medio condicionado tomadas antes de la fijación de cultivo se congelaron a -80°C durante la noche. Las muestras se aplicaron a los dispositivos de ultrafiltración de giro (corte de PM 30 kD). Retenido se aplicó a cromatografía de inmovilización (anti-Hu-albúmina; IgY) (inmovilización no eliminó la albúmina de las muestras). El filtrado se analizó por MALDI. El pase se aplicó a cromatografía de afinidad Cibachron azul. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y electroforesis en gel 2D.

### **Resultados**

**[0431] Co-cultivo de células derivadas de placenta estimula la diferenciación de adultos progenitoras neurales.** Después de cultivo con células derivadas de la placenta, células progenitoras neurales co-cultivadas derivadas de hipocampo de ratas adultas exhiben diferenciación a lo largo de los tres linajes principales del sistema nervioso central. Este efecto se observó con claridad después de cinco días de co-cultivo, con numerosas células que elaboraban procesos complejos y perdían sus rasgos de fase de brillante, característicos de la división de células progenitoras. A la inversa, progenitores neurales cultivadas solo en la ausencia de bFGF y EGF aparecieron poco saludables y la supervivencia fue limitada.

**[0432]** Después de la terminación del procedimiento, los cultivos se tiñeron para los marcadores indicativos de las células madre y progenitoras indiferenciadas (nestina), las neuronas inmaduras y maduras (TuJ1), astrocitos (GFAP) y oligodendrocitos maduros (MBP). La diferenciación a lo largo de los tres linajes se confirmó mientras que las condiciones de control no mostraron una diferenciación significativa como se evidencia por la retención de la tinción de nestina positiva entre la mayoría de las células. Aunque la diferenciación también parecía estar influenciada por los fibroblastos humanos adultos, estas células no fueron capaces de promover la diferenciación de oligodendrocitos maduros ni eran capaces de generar una cantidad apreciable de las neuronas. Aunque no se ha cuantificado, fibroblastos no parecen mejorar la supervivencia de los progenitores neurales y su progenie similar a los hallazgos de las células después del parto derivados de la placenta.

**[0433] Identificación de compuestos únicos.** El medio condicionado de las condiciones de prueba de la placenta, junto con los controles apropiados (Medios NPE  $\pm$  1,7% de suero, medios de co-cultivo con fibroblastos) se examinaron para diferencias. Potencialmente se identificaron compuestos únicos y extirpados de sus respectivos geles 2D.

**[0434] Resumen.** Co-cultivo de células progenitoras neurales adultas con células posparto derivadas de placenta resulta en la diferenciación de esas células. En vista de la falta de contacto entre los PPDCs y los progenitores neurales, este resultado parece ser una función de factores solubles liberados de las PPDCs (efecto trófico).

**[0435]** Se hicieron varias otras observaciones. En primer lugar, había muy pocas células en la condición de control, donde se eliminaron EGF y bFGF. La mayoría de las células murieron y, en promedio, había alrededor de 100 células o menos por pocillo. En segundo lugar, es de esperar que habría muy poca diferenciación en la condición de

control donde EGF y bFGF se mantuvo en el medio a lo largo, ya que esto es normalmente un medio de expansión. Mientras que se observó que aproximadamente 70% de las células retuvieron su estado progenitor (nestina+), alrededor del 30% eran GFAP+ (indicativa de astrocitos). Esto puede deberse al hecho de que tal expansión significativa ocurrió durante todo el curso del procedimiento, induciendo el contacto entre progenitores esta diferenciación. Resultados similares han sido reportados en la literatura (2).

### Referencias para el Ejemplo 23

#### [0436]

- (1) Paxinos, G. y Watson, C. (1997). THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES.  
 (2) Song, H. et al. (2002). Nature. 417 (6884): 39-44.

### EJEMPLO 24

#### Ensayo de formación de red endotelial

[0437] La angiogénesis, o la formación de nueva vasculatura, es necesario para el crecimiento de nuevo tejido. La inducción de la angiogénesis es un importante objetivo terapéutico en muchas condiciones patológicas. El presente estudio tiene como objetivo identificar el potencial de la actividad angiogénica de las células derivadas de la placenta en ensayos *in vitro*. El estudio siguió un método bien establecido de la siembra de células endoteliales en una placa de cultivo recubierta con MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA), un extracto de membrana basal (Nicosia y Ottinetti (1990) *In vitro* Cell Dev. Biol. 26 (2): 119-28). El tratamiento de las células endoteliales en MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA) con factores angiogénicos estimulará las células para formar una red que es similar a los capilares. Este es un ensayo común *in vitro* para el ensayo de estimuladores e inhibidores de la formación de vasos sanguíneos (Ito et al (1996) *Int J. Cancer* 67 (1): 148-52). Los protocolos utilizados en este ejemplo hacen uso de un sistema de co-cultivo con las células derivadas de la placenta sembradas sobre insertos de pocillo de cultivo. Estos insertos permeables permiten el intercambio pasivo de componentes de medios entre el endotelio y los medios de cultivo derivados de placenta.

#### Material y Métodos

##### Cultivo de células.

[0438] *Células derivadas de la placenta*. Se recibieron placentas humanas y se aislaron las células tal como se describe anteriormente (ejemplo 1). Las células se cultivaron en medio de crecimiento (Medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin Invitrogen ), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO)) en matraces de plástico de tejido de cultivo recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células usadas para los experimentos fueron de entre 4 y 12 pasajes.

[0439] Se tripsinizaron activamente células en crecimiento derivados de la placenta, contadas y sembradas en COSTAR® TRANSWELL® 6,5 milímetros insertos de cultivo de tejido de diámetro (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos de 48 a 72 horas en medio de crecimiento en el aire estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

[0440] *Células madre mesenquimales humanas (hMSC)*. hMSCs fueron adquiridos de Cambrex (Walkersville, MD) y cultivados en MSCGM (Cambrex). Los cultivos se incubaron en aire estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

[0441] MSCs en crecimiento activo se tripsinizaron y se contaron y se sembraron sobre Costar® Transwell® 6,5 milímetros insertos de cultivo de tejido de diámetro (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos de 48 a 72 horas en medio de crecimiento en el aire estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

[0442] Las células humanas endoteliales de la vena umbilical (HUVEC). HUVEC se obtuvieron de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separados, ya sea en EBM o medios de comunicación de las células endoteliales EGM (Cambrex). Las células fueron cultivadas sobre plástico cultivado de tejido estándar en aire estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células utilizadas en el ensayo eran entre los pasajes 4 y 10.

[0443] *Células humanas endoteliales coronarias de arteria (HCAEC)*. HCAEC fueron adquiridos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Estas células también se mantuvieron en cultivos separados, ya sea en el EBM o formulaciones de medios EGM. Las células fueron cultivadas sobre plástico cultivado de tejido estándar en aire estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células utilizadas para los experimentos eran los pasajes entre 4 y 8.

[0444] **Ensayos de formación endotelial de red (MATRIGEL)**. Las placas de cultivo se recubrieron con MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA) según las especificaciones del fabricante. Brevemente, MATRIGEL™ (BD Discovery Labware, Bedford, MA) se descongeló a 4°C y aproximadamente 250 microlitros se

dividió en alícuotas y se distribuye uniformemente en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos enfiada (Corning). La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos para permitir que el material se solidifique. Activamente se tripsinizaron y se contaron en crecimiento de cultivos de células endoteliales. Las células se lavaron dos veces en medio de crecimiento con 2% de FBS, seguido de centrifugación, resuspensión y aspiración del sobrenadante. Las células se sembraron en los pocillos recubiertos de 20.000 células por pocillo en medio de crecimiento de aproximadamente 0,5 mililitro con 2% (v/v) de FBS. Las células se incubaron a continuación durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células se asienten.

[0445] Los cultivos de células endoteliales fueron entonces tratados con 10 nanomolar humano bFGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ) o 10 nanomolar VEGF humano (PeproTech, Rocky Hill, NJ) para servir como control positivo para la respuesta de las células endoteliales. Se añadieron insertos Transwell sembrados con células derivadas de la placenta a los pocillos apropiados con medio de crecimiento con 2% de FBS en la cámara de inserción. Los cultivos se incubaron en aire estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante aproximadamente 24 horas. La placa se retira de la incubadora, y las imágenes de los cultivos de células endoteliales se recogieron con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

**Resultados**

[0446] En un sistema de co-cultivo con células derivadas de la placenta, las redes celulares de forma HUVEC. Células HUVEC forman redes celulares limitadas en experimentos de co-cultivo con hMSC y con 10 nanomolar bFGF. Células HUVEC sin ningún tratamiento mostraron muy poca o ninguna formación de la red. Estos resultados sugieren que las células derivadas de la placenta liberan factores angiogénicos que estimulan la HUVEC.

[0447] En un sistema de co-cultivo con células derivadas de la placenta, las CAECs forman redes celulares.

[0448] La Tabla 24-1 muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las PDC en medio de crecimiento. Células derivadas de placenta fueron sembradas en insertos como se describe anteriormente. Las células se cultivaron a 37°C en el oxígeno atmosférico durante 48 horas en los insertos y después se cambiaron a un medio de FBS 2% y se devuelven a 37°C durante 24 horas. Se eliminó el medio, inmediatamente congelado y almacenado a -80°C, y se analizó por el ensayo ELISA multiplex SEARCHLIGHT (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son las medias de las mediciones duplicadas. Los resultados muestran que las células derivadas de la placenta no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) o factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF). Las células DO liberan cantidades mensurables de inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Tabla 24-1. factores angiogénicos potenciales liberadas de las células derivadas de la placenta. Las células se cultivaron en 24 horas en medios con FBS al 2% en oxígeno atmosférico. Se eliminó el medio y se ensayó por el multiplex REFLECTOR ensayo ELISA (Pierce). Los resultados son los medios de un análisis por duplicado. Los valores son concentraciones en los medios reportados en picogramos por mililitro de medio de cultivo

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF-BB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	91655,3	175,5	<2,0	275,5	3,0	58,3	7,5	644,6	<1,2
Plac (P11)	159283 2,4	28,1	<2,0	1273,1	193,3	5960,3	34,8	12361,1	1,7
Medios solos	<9,8	25,1	<2,0	<6,4	<2,0	<3,2	<5,4	<4,0	<1,2

[0449] La Tabla 24-2 muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las PDC. PDC se sembraron en insertos como se describe anteriormente. Las células se cultivaron en medio de crecimiento a 5% de oxígeno durante 48 horas en los insertos y después se cambiaron a un medio de FBS 2% y volvieron a 5% de O<sub>2</sub> de la incubación durante 24 horas. Se retiró el medio, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C, y se analizó por el ensayo ELISA multiplex SEARCHLIGHT (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son las medias de las mediciones duplicadas. Los resultados muestran que las células derivadas de la placenta no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), o factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF). Las células DO liberan cantidades mensurables de inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Tabla 24-2. Factores angiogénicos potenciales liberadas de las células derivadas de la placenta. Las células se cultivaron en 24 horas en medios con FBS al 2% en 5% de oxígeno. Se eliminó el medio y se ensayó por el ensayo

ELISA multiplex SEARCHLIGHT (Pierce). Los resultados son los medios de un análisis por duplicado. Los valores son concentraciones en los medios anotados en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF-BB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
5 Plac (P4)	72972,5	253,6	<2,0	743,1	2,5	30,2	15,1	1495,1	<1,2
10 Plac (P11)	458023,1	55,1	<2,0	2562,2	114,2	2138,0	295,1	7521,3	1,8
10 Medios solos	<9,8	25,1	<2,0	<6,4	<2,0	<3,2	<5,4	<4,0	<1,2

15 **[0450] Resumen.** Los resultados muestran que las células de placenta derivados pueden estimular tanto la vena umbilical humana como las células endoteliales de la arteria coronaria para formar redes en un ensayo MATRIGEL™ *in vitro* (BD Discovery Labware, Bedford, MA). Este efecto es similar al observado con factores angiogénicos conocidos en este sistema de ensayo. Estos resultados sugieren que las PDC son útiles para estimular la angiogénesis *in vivo*.

## 20 EJEMPLO 25

### Trasplante de células derivadas de placenta bajo la cápsula renal

25 **[0451]** El trasplante de islotes pancreáticos a la cápsula renal se realiza rutinariamente para evaluar metodologías de trasplante para el tratamiento de diabetes (Refaie et al (1998) Trans Proc 30: 400-403). Además de los islotes pancreáticos, otras células pueden diferenciarse en células secretoras de insulina capaces de homeostasis de la glucosa en sangre. El propósito de este estudio fue determinar si las células derivadas de la placenta humana podrían sobrevivir cuando se implantan bajo la cápsula renal en ratones inmunodeficientes. Además, las células derivadas de la placenta se mezclaron con células CD34+ movilizadas GM-CSF para determinar si estas células podrían promover la vascularización y la supervivencia de las células derivadas de la placenta.

### Métodos y materiales

35 **[0452] Cultivo de células.** Células derivadas de la placenta criopreservadas (aislado 1, P10) se retiraron del almacenamiento en nitrógeno líquido y se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco Carlsbad CA), 15% (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St Louis, MO), 50 unidades/ml de penicilina, 50 microgramos/mililitro estreptomina estreptomina (Gibco)) en matraces recubiertos de gelatina (Sigma) T225 (Corning, Corning, NY) hasta la confluencia.

40 **[0453]** Las células de dos matraces se lavaron con tampón de fosfato salino (PBS) y una suspensión de células se obtuvo mediante el uso de tripsina/EDTA (Gibco). Células criopreservadas CD34+ movilizadas GM-CSF fueron adquiridas de Cambrex, Walkersville, MD (lote 1F0174 donante 7956). Las células CD34+ se descongelaron y se lavaron en medio DMEM.

45 **[0454]** La suspensión de células se lavó dos veces en DMEM. El número de células y la viabilidad se calculó después de la tinción con azul de tripano (Sigma) usando un hemocitómetro. Las alícuotas de la suspensión de células que contiene -300,000 células viables se centrifugaron a 150 x g, y las células se resuspendieron en aproximadamente 6 microlitros de DMEM y se arrastraron a una punta de pipeta de 20 microlitros conectada a una jeringa de 1 mililitro. La punta de la punta de la pipeta que contiene las células se sujetó usando una pequeña LIGACLIP (Ethicon Endosurgery, Cincinnati OH).

### Preparación animal.

55 **[0455] Ratones (*Mus musculus*)/Fox Chase SCID/varón (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana), 8 semanas de edad. Toda la manipulación de los ratones SCID se llevó a cabo bajo una tapa. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramo (clorhidrato de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) Ketaset y 10 miligramos/kilogramo Rompun (xilacina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de la anestesia, toda la parte posterior del animal desde el área cervical dorsal a la zona lumbosacra dorsal se recortó libre de pelo usando una maquinilla eléctrica para animales. El área fue borrada con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó, y se pinta con una solución de yodóforo acuosa de 1% de yodo disponible. Pomada oftálmica se aplicó a los ojos para evitar el secado del tejido durante el periodo de anestesia. El animal anestesiado y preparado quirúrgicamente se colocó en la posición reclinada deseada. Una incisión transversal se hizo en el lado abdominal izquierdo aproximadamente 2 cm caudal a la caja torácica de animal. El riñón fue expuesto y la cápsula perforada con una aguja 26 de calibre. Se utilizó una lanza de cápsula (punta de la pipeta de vidrio modificada) para crear un espacio debajo de la cápsula renal en el que se introdujeron las células. Las células fueron inyectadas a través de una jeringa con una punta de**

micropipeta adjunta. La bolsa fue cerrada por el pasaje de una pluma oftálmica de cauterio (Aaron Medical Industries, San Petersburgo, Florida) sobre la abertura (no tocar el riñón). El riñón se colocó de nuevo en la posición anatómica correcta y la capa muscular se sutura cerrada. La piel se cerró con grapas para heridas.

5 **[0456]** El diseño experimental comprendió un trasplante de células por ratón (Tabla 25-1); cuatro tratamientos con n-valor de 4 por tratamiento; y tres puntos de tiempo (1, 14, y 30 días).

**[0457]** Los ratones fueron sacrificados en sus intervalos denominados por inhalación de dióxido de carbono. Los lugares de implantación de riñón fueron extirpados y congelados para la histología.

10 **[0458] Inmunohistoquímica.** Sitios de implante de riñón congelados fueron incorporados en el borde de O.C.T. El compuesto (Sakura, Torrance, CA). El tejido renal se recortó por criosección para producir una sección de cinco micrómetros de la zona de implantación y el tejido adyacente. Secciones producidas fueron fijadas en paraformaldehído recién preparado 4% (EM Sciences Gibbstown, NJ) en solución salina tamponada con fosfato (Gibco) durante 15 minutos. Las secciones se lavaron en PBS y se incubaron en 3% de suero de cabra en solución de PBS de bloqueo durante una hora. Solución de bloqueo se retiró por aspiración suave. Las secciones se incubaron en anticuerpo de núcleo anti-humano (Chemicon International, Temecula, CA) diluido 1: 100 en solución de bloqueo durante una hora. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron en anticuerpo IgG fluorescente de cabra anti-ratón marcado (Molecular Probes Eugene, OR) diluido 1: 200 en solución de bloqueo durante 30 minutos en ausencia de luz. Las secciones se lavaron en PBS y se incubaron en 10 DAPI micromolar (Molecular Probes Eugene, OR) durante cinco minutos. Las secciones se lavaron en PBS y se examinaron por microscopía fluorescente.

25 **[0459]** Tri-cromo tinción. sitios de implante de riñón congeladas fueron incorporados en el borde de O.C.T. El compuesto (Sakura Torrance, CA). El tejido renal se recortó por cryosectioning para producir una sección de cinco micrómetros de la zona de implantación y el tejido adyacente. secciones cedidas fueron fijadas en 10% formalina tamponada neutra (Richard Allan-científico Kalamazoo, MI) durante 15 minutos. Las secciones fueron teñidas tri-cromo (Poli Científico Bay Shore, NY) usando métodos del fabricante.

30 **Tabla 25-1. SCID Esquema de Trasplante de células de cápsula renal de ratón**

Animal (#)	Días Pos Trasplante	Cápsula renal (izquierda)
1	1	1
2	1	1
3	1	1
4	1	1
5	14	1
6	14	1
7	14	1
8	14	1
9	30	1
10	30	1
11	30	1
12	30	1
13	1	2
14	1	2
15	1	2
16	1	2
17	14	2
18	14	2
19	14	2
20	14	2
21	30	2
22	30	2
23	30	2
24	30	2

Tratamientos:

65 **[0460]**

1.  $3 \times 10^3$  células de placenta
2.  $3 \times 10^3$  células de placenta +  $3 \times 10^3$  CD34+ células

Animal añadido # 25-27 como control (sin células)

5

### **Resultados**

[0461] La viabilidad de las células derivadas de la placenta era de ~ 75% y las células CD34+ era del 95%. Los primeros intentos de trasplante de  $1 \times 10^6$  células viables no tuvieron éxito debido al tamaño inadecuado de la cápsula renal para dar cabida a las células. Las células fueron trasplantadas dentro de 3 horas de tratamiento con tripsina. Se observó la localización de las células derivadas de la placenta bajo la cápsula renal microscópicamente. No hubo diferencias aparentes en el número y la distribución de células derivadas de la placenta con o sin células CD34+ en cada punto de tiempo. Hubo una aparente disminución en el número de células con el tiempo.

[0462] La tinción de las células bajo la cápsula renal mostró la retención de las células trasplantadas. Se detectaron células humanas usando el antígeno nuclear humano. Se detectaron todas las células (humanas y de ratón) usando DAPI.

[0463] **Resumen.** El trasplante de células en la cápsula renal era exitosa. Células derivadas de la placenta no diferenciada ( $3 \times 10^3$ ), pre-tratada con factores de crecimiento con o sin  $3 \times 10^3$  GM-CSF células CD34+ movilizadas, se trasplantaron debajo de la cápsula del riñón. Los animales se sacrificaron a las 1, 14, y 30 días después del trasplante celular. Las células sobrevivieron a los 1, 14, y 30 días con una reducción en el número de células aparentes a los 30 días. La presencia de GM-CSF células CD34+ movilizadas no afectó la supervivencia de células derivadas de la placenta. Este estudio demuestra que las células de placenta derivadas pueden ser trasplantadas a la cápsula renal.

25

### **Ejemplo 26**

#### **Trasplante de células derivadas de Placenta**

30

[0464] Las células derivadas de la placenta después del parto son útiles para las terapias regenerativas. Se evaluó el tejido producido por células derivadas de la placenta trasplantadas en ratones SCID con un material biodegradable. Los materiales evaluados fueron VICRYL no tejido, espuma 35/65 PCL/PGA, y RAD 16 de hidrogel de péptidos de auto-montaje.

35

#### **Métodos y materiales**

[0465] **Cultivo de células.** Células derivadas de placenta se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15% (v/v) de suero bovino fetal (Cat. #SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos de estreptomycin/ml (Gibco)) en matraces recubiertos de gelatina.

40

[0466] **Preparación Matrix.** Un andamio no tejido se preparó usando una técnica tradicional de perforación de la aguja como se describe a continuación. Las fibras, que constan de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se vende bajo el nombre comercial VICRYL se obtuvieron de Ethicon, Inc. (Somerville, NJ). Las fibras eran filamentos de aproximadamente 20 micras de diámetro. Las fibras se cortaron y se ajustaron en sus longitudes uniformes de 2 pulgadas para formar fibras discontinuas de 2 pulgadas. A continuación, una matriz no tejida punzonada seca se preparó utilizando fibras cortadas VICRYL. Las fibras cortadas se abrieron y cardaron en maquinaria estándar no tejida. La estera resultante estaba en la forma de fibras cortadas palmeadas. Las fibras cortadas eran palmeadas para formar el andamio no tejido punzonado seco perforado de aguja. El andamio no tejido se enjuagó en agua seguido de otra incubación en etanol para eliminar cualquier residuo químico o coadyuvantes de elaboración utilizados durante el proceso de fabricación.

45

50

[0467] Las espumas, compuesto de 35/65 de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) copolímero (35/65 PCL/PGA), se formaron por el proceso de liofilizado, como se analiza en la Patente de EE.UU. N°. 6.355.699.

55

[0468] **Preparación de la muestra.** Un millón de células viables se sembraron en medio de cultivo de 15 microlitros a 5 milímetros de diámetro, 2,25 milímetros de espesor andamios no tejidos (64,33 miligramos/centímetros cúbicos) o 5 milímetros de diámetro 35/65 PCL/PGA de discos de espuma. Las células se dejan adherir durante dos horas antes de añadir más medio de crecimiento para cubrir los andamios. Las células fueron cultivadas en andamios durante la noche. Andamios sin células también se incubaron en medio.

60

[0469] RAD16 péptidos de auto-montaje (3D Matrix, Cambridge, MA bajo un acuerdo de transferencia de material) en forma de un 1% estéril (w/v) en agua, que se mezcló 1: 1 con  $1 \times 10^6$  células en 10 % (w/v) de sacarosa (Sigma, St Louis, MO), 10 milimolar HEPES en medio modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) inmediatamente antes de su uso. La concentración final de las células en RAD16 hidrogel fue de  $1 \times 10^6$  células/ 100 microlitros.

65

## MATERIAL DE ENSAYO (N=4/x)

**[0470]**

- 5 1. VICRYL no tejido +  $1 \times 10^6$  células derivados de placenta
2. 35/65 PCL/PGA espuma +  $1 \times 10^6$  células derivadas de placenta
3. RAD 16 péptido de autoensamblaje +  $1 \times 10^6$  células derivadas de placenta
4. 35/65 PCL/PGA espuma
- 10 5. VICRYL no tejido

**[0471] Preparación de animales.** Los animales utilizados en este estudio fueron manejados y mantenidos de acuerdo con las exigencias actuales de la Ley de Bienestar Animal. El cumplimiento de las Leyes Públicas anteriores se llevaron a cabo mediante la adhesión a las normas de bienestar animal (9 CFR) y conforme a las normas vigentes promulgadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, 7ª edición.

**[0472]** Los ratones (*Mus musculus*)/Fox Chase SCID/Hombre (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana), 5 semanas de edad. Toda la manipulación de los ratones SCID se llevó a cabo bajo una tapa. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramo (clorhidrato de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) Ketaset y 10 miligramos/kilogramo Rompun (xilazina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de la anestesia, toda la parte posterior del animal desde el área cervical dorsal a la zona lumbosacra dorsal se recorta libre de pelo usando maquinilla para animales eléctricos. El área fue borrada con diacetato de clorhexidina, se enjuaga con alcohol, se secó, y se pinta con una solución de yodóforo acuosa de 1% de yodo disponible. Pomada oftálmica se aplicó a los ojos para evitar el secado del tejido durante el periodo de anestesia.

**[0473] Técnica de implantación subcutánea.** Cuatro incisiones en la piel, cada uno de aproximadamente 1,0 cm de longitud, se hicieron sobre el dorso de los ratones. Dos sitios craneales se encuentran transversalmente sobre la región torácica lateral dorsal, cerca de 5 milímetros caudal hasta el borde inferior de la escápula palpada, con uno a la izquierda y uno a la derecha de la columna vertebral. Otros dos fueron colocados transversalmente sobre el área de músculo glúteo a nivel sacro-lumbar caudal, cerca de 5 mm caudal a la cresta ilíaca palpada, con una a cada lado de la línea media. Los implantes fueron colocados al azar en estos sitios. La piel fue separada del tejido conectivo subyacente para hacer un pequeño bolsillo y el implante colocado (o se inyecta para RAD16) sobre 1-cm caudal a la incisión. El material de ensayo apropiado se implanta en el espacio subcutáneo. La incisión de la piel se cerró con clips metálicos.

**[0474] Carcasa de animales.** Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de microaislador durante todo el curso del estudio dentro de un rango de temperatura de 64°F - 79°F y humedad relativa de 30% a 70% y se mantuvieron en un ciclo de aproximadamente 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. La temperatura y la humedad relativa se mantuvieron dentro de los intervalos indicados en la mayor medida posible. La dieta consistía en comida de ratón pico irradiada 5058 (Purina Co.) y agua *ad libitum*.

**[0475]** Los ratones fueron sacrificados en sus intervalos denominados por inhalación de dióxido de carbono. Los sitios de implantación subcutánea con su piel suprayacente fueron extirpados y congelados para la histología.

**[0476] Histología.** Piel extirpada con implante se fija con 10% de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Las muestras con suprayacente y el tejido adyacente fueron biseccionados centralmente, procesados en parafina, y embebidos en la superficie de corte usando métodos de rutina. Secciones de tejido de cinco micrones fueron obtenidas por microtomo y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Poly Scientific Bay Shore, NY) usando métodos de rutina.

**Resultados**

**[0477]** No hubo crecimiento hacia el interior mínimo de tejido en espumas por vía subcutánea en ratones SCID implantados después de 30 días. En cambio, hubo espumas extensivas de tejido implantadas con células derivadas de la placenta.

**[0478]** Hubo cierto tejido del crecimiento en andamios no tejidos VICRYL. Andamios no tejidos sembrados con células derivadas de placenta mostraron una mayor deposición de la matriz y los vasos sanguíneos maduros.

**[0479]** No era posible identificar el punto de inyección de RAD16 y las células.

**[0480] Resumen.** El propósito de este estudio era determinar el tipo de tejido formado por células derivadas de placenta humana en andamios en ratones inmunodeficientes. Discos sintéticos no tejidos absorbibles/de espuma (5,0 mm de diámetro x 1,0 mm de espesor) o péptido de auto-montaje de hidrogel se sembraron con células derivadas de placenta humana y se implanta por vía subcutánea bilateralmente en la región dorsal de la columna vertebral de ratones SCID. Se ha demostrado que las células derivadas de placenta pueden aumentar drásticamente

la formación de tejido de buena calidad en estructuras biodegradables.

#### EJEMPLO 27

##### 5 Evaluación de las células derivadas del placenta para

##### terapia cardiovascular en un modelo ligiton de roedor coronario

10 [0481] La eficacia del tratamiento de células derivadas de placenta humana intracardiaca cuando se administró 15 minutos post coronaria de oclusión de arteria en un modelo de roedor de infarto de isquemia/infarto.

#### Métodos y materiales

15 [0482] El dispositivo de ensayo de Charles River Worcester, MA está acreditada por la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio, Internacional (AAALAC) y registrado en el Departamento de Agrícola de los Estados Unidos para llevar a cabo la investigación en animales de laboratorio. Todas las condiciones de las pruebas se ajustarán a la Ley de Bienestar Animal (9 CFR) y sus modificaciones. El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (IACUC) en las instalaciones de prueba para el cumplimiento de la normativa previa a la iniciación del estudio.

20 [0483] Los animales que tienen las características identificadas en la Tabla 27-1 se alojaron individualmente en jaulas micro-aisladoras en autoclave de cama. Las jaulas se ajustan a las normas establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

#### Tabla 27-1. Características de los animales

25

Especies:	Rattus norvegicus
Cepa:	Rnu
Fuente:	Charles River Laboratorios
Edad en la dosificación:	6-8 semanas
Peso en la Dosificación	~ 200-250 gramos
Número de varones (incluyendo repuestos):	40 + 10

30 [0484] La Dieta Certificada de Purina (irradiada) fue proporcionada a los animales *ad libitum*. Esta dieta se analizó de forma rutinaria por el fabricante de componentes nutricionales y contaminantes ambientales. Los resultados de los análisis del fabricante están archivados en el Centro de Investigación. Agua del grifo filtrado en autoclave se proporcionó *ad libitum*. Las muestras del agua filtrada se analizaron para determinar el total de sólidos disueltos, dureza, contenido microbiológico especificado, y contaminantes ambientales seleccionados. Los resultados de estos análisis se encuentran archivados en el Centro de Investigación.

35 [0485] Los controles ambientales se establecieron para mantener las temperaturas de 18-26°C (64-79°F) con una humedad relativa de 30% a 70%. Una luz 12:12 horas: el ciclo de oscuridad se mantuvo. Diez o mayores cambios de aire por hora se mantuvieron en las salas de los animales. Tras la recepción y antes de su uso en el estudio, los animales se sujetaron durante un mínimo de cuatro días para el acondicionamiento de acuerdo con el Programa Instalación de Pruebas de Funcionamiento, Recepción, Acondicionamiento y Cuarentena de Animales de Laboratorio.

40

[0486] Cada animal se identifica por un número único y este número se indica mediante una punción de oreja. Los animales fueron asignados al azar a grupos por una distribución ordenada de peso de tal manera que los pesos corporales individuales no superan  $\pm 20\%$  de peso medio.

45

[0487] Los animales se anestesiaron con pentobarbital de sodio (40 miligramos/kilogramo) y buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo) como un solo cóctel administrado por vía intramuscular (IM). Tras el establecimiento de la anestesia, los animales fueron intubados utilizando un angiocath de 18-16 indicador, 2 pulgadas, o angiocath de tamaño apropiado, y se mantuvieron en la respiración de aire ambiente (suplementado con oxígeno) y un ventilador de presión positiva durante todo el procedimiento quirúrgico. La anestesia adicional se administró de forma incremental, según sea necesario. La terapia antibiótica preoperatoria también se administró Benzatina/Procaina penicilina G, 40.000 unidades/kg, IM. Terapia antibiótica adicional fue administrada cada 48 horas.

50

55 [0488] Almohadillas de electrodos se colocan alrededor de las patas apropiadas de los animales para recibir una señal de electrocardiograma utilizable (ECG). Los animales fueron colocados en una almohadilla de calefacción para ayudar a mantener la temperatura del cuerpo durante todo el procedimiento. Una sonda de temperatura rectal se insertó en el animal para controlar la temperatura corporal. La pomada oftálmica se administra a cada ojo. Los sitios quirúrgicos (área torácica) se prepararon para la cirugía aséptica mediante la eliminación de cualquier exceso de



piel, y limpia suavemente el área con las esponjas que se han empapado en alcohol isopropílico al 70%, que se dejó secar. A continuación, Medi Sepps™ o solución similar se aplicó a la zona y también se deja secar. La zona estaba cubierta adecuadamente para la cirugía aséptica estricta.

5 **[0489]** Una incisión quirúrgica se realizó en la piel sobre el cuarto espacio intercostal. La disección roma a través de las capas musculares se utilizó para acceder a la cavidad torácica. Un retractor se insertó cuidadosamente en el cuarto espacio intercostal y se abrió para permitir el acceso a la cavidad interior. El pericardio se abrió con cuidado a través de aplicación sutil con hisopos de algodón humedecido en solución salina estéril. Un hisopo de algodón húmedo se utiliza para empujar suavemente la punta del corazón en la abertura en la que se une una longitud de sutura de seda 6-0 en el miocardio para la manipulación del corazón. Después de una pausa para permitir que el corazón se recupere, la sutura se coloca en el vértice utilizado para aliviar el corazón fuera de la cavidad torácica y para colocar una tensión suficiente sobre el corazón para permitir el acceso al corazón superior y la arteria coronaria descendente anterior (LAD). Otra longitud de sutura de seda 6-0 se colocó en el miocardio de manera que rodea la LAD. La presión sobre la sutura apical fue liberada y el corazón se dejó volver al interior de la cavidad torácica.

15 **[0490]** Una vez que la frecuencia cardíaca y el ECG volvieron a los valores basales, las ligaduras alrededor de la LAD fueron atados para ocluir la LAD. Esta fue una oclusión permanente con la sutura atada y los extremos recortados. Una vez que se ató la ligadura, el cirujano buscó las siguientes indicaciones de la oclusión exitosa: cambios en el color de la zona del corazón directamente debajo de la ligadura a un blanco/blanco grisáceo como resultado de la terminación del flujo sanguíneo a la zona y un cambio significativo en el ECG que corresponde a la oclusión de la LAD. Las arritmias pueden haber desarrollado dentro de los primeros 10 minutos de la oclusión. La rata fue monitoreada de cerca durante este período de tiempo en el caso de que la reanimación era necesaria. En el caso de arritmia grave e insuficiencia de la rata a convertirse al ritmo sinusal normal sin ayuda, la ayuda se hizo a través de masaje cardíaco. Aproximadamente 15 minutos después de la iniciación de la oclusión LAD, el área del ventrículo izquierdo se hizo isquémico tratado con vehículo o artículo de ensayo mediante inyección directa en el miocardio isquémico. El tratamiento consistió en tres a diez inyecciones intramiocárdicas (100 microlitros/inyección) en la zona isquémica del miocardio.

30 **[0491]** Las células humanas se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15% (v/v) de suero bovino fetal (Cat. #SH30070.03, Hyclone, Logan UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad CA), en matraces recubiertos de gelatina T300. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco, Carlsbad CA) y se trataron con tripsina utilizando tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad CA). La tripsinización se detuvo añadiendo medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 xg, el sobrenadante se retiró, y el sedimento celular se resuspendió en aproximadamente 1 mililitro de medio de crecimiento por millón de células. Una alícuota de las células se retiró y se añadió a azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). El número de células viables se estimó utilizando un hemocitómetro. La suspensión celular se centrifugó y se resuspendió en 1 mililitro de crecimiento que contiene 10% (v/v) de DMSO (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO) por 5 millones de células y se transfirió a crioviales (Nalgene). Las células se enfriaron a aproximadamente 1C/minuto durante la noche en un congelador a -80°C usando un "Mr Frosty"® recipiente de congelación (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de las células se transfirieron a nitrógeno líquido. Los viales se envían desde CBAT, Somerville, NJ a Charles River, Worcester, MA en hielo seco y se almacenaron a -80°C. Aproximadamente 1-2 horas antes de la inyección de las células en el animal, un vial de células se descongelaron rápidamente en un baño de agua 37°C. En condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad BSL2, se añadieron las células a 40 mililitros de PBS con calcio y magnesio (Sigma St. Louis, MO) y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos antes de resuspender el sedimento celular en 10 mililitros de PBS. Se estimó el número de células y viabilidad como se ha descrito anteriormente. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS a una concentración final de 10<sup>6</sup> células viables/100 microlitro. La suspensión celular se cargó en jeringas de 1 mililitro con una aguja 30G y se mantuvo en hielo. La viabilidad se evaluó de nuevo hasta 5 horas en hielo.

50 **[0492]** Tras la administración de tratamiento (Tabla 27-2) y la estabilización del corazón, el cirujano comenzó a cerrar la incisión quirúrgica. Se retiró el retractor. Los pulmones se inflaron al exceso durante 3 - 4 respiraciones y se inspeccionan visualmente tanto como sea posible para asegurar que estaban completamente re-inflados. Esto crea una presión negativa necesaria para prevenir el neumotórax post-recuperación. Para evacuar el aire y el exceso de fluido de la cavidad torácica, después de cerrar la cavidad, un catéter intravenoso (es decir, calibre 20, 2 milímetros de longitud) se coloca a través de las capas de piel y músculo de manera que la punta se mantiene en la cavidad torácica. Se tuvo cuidado para que la punta no perforase el pulmón o corazón. Los nervios separados y musculares asociados se suturark con sutura apropiada. Las capas superiores de músculo se suturó usando un patrón continuo simple. La piel se cerró con seda 4-0 usando un patrón de colchón horizontal. Una jeringa de 10 mililitros fue unida al catéter intravenoso que había sido colocado previamente en la cavidad torácica y el émbolo lentamente hacia atrás para retirar fluidos y aire de la cavidad. Al mismo tiempo, el catéter fue retirado lentamente desde el sitio de entrada, permitiendo de este modo la masa muscular circundante y la piel para sellar la punción. El paño quirúrgico se retiró y fluidos (es decir, solución de Ringer con lactato, 25 ml/kg por vía subcutánea [SC] o por vía intraperitoneal [IP]) se dieron.

#### Tabla 27-2 Regímenes de tratamiento

Gr. N°.	N°. de varones	Artículo de prueba	Nivel de Dosis (células / animal)	Dosis Conc. (Células/ml)	Ruta/Régimen de dosis	Momento de la administración del tratamiento	Día de la necropsia
1	8	Vehículo	0	0	La inyección directa en la región isquémica del ventrículo izquierdo del corazón, que consta de 3 a 10 inyecciones intramiocárdicas de 100 microlitros total.	15 minutos después de la ligadura de la arteria coronaria	Día 28 (6 Días)
2	8	Placenta #4 (P10) (A)	1 millón	10 millones			
3	8	Placenta # 3 (P10) (C)					
4	8	Los fibroblastos humanos 1F1853 (P10) (D)					

**Gr. = Grupo; N°. = Número; Conc. = Concentración**

20 **[0493]** Inmediatamente después de que cada rata se había sometido a un tratamiento con el artículo de prueba y se sutura la incisión, el animal se sometió a un examen de ecocardiografía (ECG). La anestesia se mantuvo durante toda la realización del examen de eco. Tras la finalización del examen de eco, se interrumpió la ventilación, y la rata fue devuelto a la zona de recuperación para recuperar en una jaula de recuperación climatizada, oxigenada.

25 **[0494]** Un segundo examen eco de cada animal que sobrevive se completó al final del estudio (aproximadamente 28 días después del tratamiento), antes de la terminación. Durante el segundo examen, los animales se anestesiaron como se describió anteriormente.

30 **[0495]** Para cada examen de eco, la zona torácica izquierda se afeitó, y se calentó, gel de ultrasonido se aplica a la piel para mejorar el contacto con el transductor. Almohadillas de electrodos se colocan alrededor de las extremidades apropiadas para recibir una señal ECG. imágenes ecocardiográficas incluyen eje corto y vistas de eje largo para permitir la determinación de las dimensiones de la cavidad ventricular, la contractilidad, el flujo de sangre a través de la vasculatura, y espesor de pared. Estas imágenes se guardan en el disco óptico para su posterior análisis. Después del examen, el medio de gel se retira de la piel con una gasa o papel toalla. La rata se retiró del ventilador y se coloca en una jaula de recuperación calentada hasta que sea móvil.

40 **[0496]** A la conclusión de los procedimientos quirúrgicos, la ventilación respiratoria fue desactivada. Los animales fueron observados por reflejo pedal. La sonda rectal y electrodos del ECG posteriormente se eliminaron, y el animal se retira por intubación y se colocan en una jaula de recuperación oxigenada caliente. Después de la recuperación completa de la anestesia, a los animales se les dio buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo, SC). Las observaciones se realizaron regularmente hasta que los animales mostraron una movilidad total y un interés por la comida y el agua. Los animales entonces se colocaron en una jaula limpia y volvieron a la sala de alojamiento de los animales. Los animales fueron controlados por la integridad de la incisión quirúrgica dos veces al día después de la cirugía.

45 **[0497]** Los analgésicos (es decir, buprenorfina, 0,05 miligramos/kilogramo SC) se administran dos veces al día durante 4 días después de la operación y posteriormente cuando sea necesario. indicaciones visuales del dolor post-operatorio incluyen la falta de posturas del cuerpo normal y un movimiento (por ejemplo, restos de animales en posición encorvada), la antipatía, la falta de comer/beber, falta de aseo, etc.

50 **[0498]** El peso corporal se registró para cada animal antes del tratamiento inicial, después semanalmente, y en el día de la necropsia. Animales encontrados muertos se pesaron y se les practicó la autopsia.

55 **[0499]** Para que el corazón se cosechase, cada rata fue anestesiada como se hizo para la cirugía. La vena yugular se canuló. El corazón fue detenido en la diástole con cloruro de potasio infundido a través de la cánula yugular. A continuación, el corazón se retiró de la cavidad torácica. entonces una necropsia limitada se realizó en el corazón después de lo cual el corazón se colocó en 10% de formalina tamponada neutral. A continuación, el resto de cada carcasa se descartó sin evaluación adicional.

60 **[0500]** Los corazones de todos los animales que fueron encontrados muertos o sacrificados moribundos se colocaron en paraformaldehído al 4% hasta fuesen evaluados. A continuación, el resto de cada carcasa se descartó sin evaluación adicional.

65 **[0501] Histología y análisis de imágenes.** Tejidos fijados seccionados con una matriz de corazón coronal de acero inoxidable (Harvard Apparatus Holliston, MA) produjo cuatro secciones gruesas de tejido de serie de dos milímetros. Las secciones se procesan y se incluyeron en serie en parafina usando procedimientos rutinarios. Cinco secciones micras se obtienen mediante microtomo y se tiñeron Tri-cromo de Masson para tejido conectivo (Poly Scientific Bay

Shore, NY) usando métodos del fabricante. Fotomicrografos electrónicos fueron capturados y analizados utilizando métodos de análisis de imagen desarrollados por la fase 3 del sistema de imágenes (Glen Mills, PA). Las fotomicrografías de las secciones de tri-cromo teñidas se analizaron métricamente al color electrónicamente para determinar el área total del ventrículo y la pared libre y el área de tinción diferencial.

## **Resultados**

**[0502]** No hubo pérdida de la viabilidad inicial de las células durante 5 horas en el vehículo cuando se mantienen en hielo. Las células se inyectan en el infarto con uno a tres puntos de entrada de la aguja y múltiples cambios de dirección de la orientación de la aguja.

**[0503]** Mediciones de ecocardiografía fueron tomadas de las ratas tratadas con el infarto. Fracción de acortamiento de los animales tratados con vehículo había una disminución significativa de  $47,7\% \pm 8,3\%$  en el día 0 a  $23,5\% \pm 30,2\%$  en el día 28 ( $p < 0,05$ ). Los animales que fueron tratados con células derivadas de la placenta mostraron pequeñas diferencias, no significativas entre la fracción de acortamiento entre el día 0 y 28. No hubo diferencia significativa entre la fracción de acortamiento entre los grupos en el día 0. Cada grupo tenía ocho animales en el comienzo pero algunos no sobrevivieron al experimento. Los animales tratados con fibroblasto experimentaron una mayor mortalidad que los tratados con las PDC.

**[0504]** Corazones recogidos al final del estudio se sometieron a análisis histológico. Los corazones fueron detenidos en diástole y se fijaron. Los resultados se calculan a partir de un algoritmo para estimar el porcentaje de área del corazón total, que comprende el infarto. El tamaño del infarto en los animales tratados con vehículo fue de  $22,9\% \pm 6,7\%$  de la superficie del corazón, mientras que el tamaño del infarto en los corazones tratados con dos aislados diferentes de células derivadas de la placenta fue  $13,9\% \pm 3,7\%$  y  $12,9\% \pm 3,4\%$ , respectivamente, y con fibroblastos fue del  $19,3\% \pm 8,0\%$ . La diferencia de tamaño del infarto de los animales tratados con células en relación con animales tratados con vehículo no fue estadísticamente significativa, como se determina por la prueba t/ANOVA.

**[0505] Resumen.** Los resultados del presente estudio sugieren que las células derivadas de la placenta tienen algún beneficio en la reducción de los daños de un infarto de miocardio inducido quirúrgicamente en ratas. Los animales tratados con vehículo mostraron una reducción significativa en la función cardiaca en el día 28 en comparación con el día 0, tal como se mide por la fracción de acortamiento, mientras que los animales tratados con células derivadas de placenta mostraron un cambio mínimo durante el estudio de 28 días. Los animales tratados con fibroblastos mostraron cambios mínimos, pero sólo dos animales sobrevivieron al estudio. La evaluación del tamaño del infarto sugiere que puede haber una reducción algo modesta, pero no estadísticamente significativa, en el tamaño del infarto en los animales tratados con células derivadas de placenta como en comparación con los controles de vehículo en el Día 28. En conjunto, estos datos apoyan la eficacia de las células derivadas de placenta en la reducción de daño de un infarto de miocardio.

## **EJEMPLO 28**

### **Uso de células derivadas de Placenta en el tratamiento de la retinitis pigmentosa**

**[0506]** En la actualidad no existe un tratamiento real para los trastornos que se derivan de la degeneración de las células en la retina cegadora. La pérdida de fotorreceptores como resultado de la apoptosis o la degeneración secundaria conduce a un deterioro progresivo de la visión, y en última instancia a la ceguera. Las enfermedades en las que ocurre esto incluyen la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y retinitis pigmentosa (RP). RP es más comúnmente asociada con una sola mutación de genes, lo que contribuye a la muerte celular de fotorreceptores.

**[0507]** Los fotorreceptores de la retina y el epitelio pigmentario de la retina adyacente forman una unidad funcional. El Colegio Real de Cirujanos (RCS) presenta rata con un defecto de quinasa receptora de tirosina (Merkt) que alteren la fagocitosis de segmento externo, lo que lleva a la muerte de las células fotorreceptoras (D'Cruz et al. (2000) Hum. Mol. Genet. 9 (4): 645-51).

**[0508]** Se encontró que las células del trasplante de epitelio pigmentario de la retina (RPE) en el espacio subretiniano de ratas RCS limitaba el progreso de la pérdida de fotorreceptores y preservaba la función visual (Li y Turner (1988) Exp Eye Res. 47(6):911-7). En este ejemplo, se demuestra que las células derivadas de placenta se pueden utilizar para promover el rescate de los fotorreceptores en un modelo RCS.

### **Métodos y materiales**

**[0509] Trasplantes de células.** Los cultivos de células de placenta humana y adultas de fibroblastos (pasaje 10) se expandieron durante 1 pasaje. Todas las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento ((DMEM: Baja glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero bovino definido (Hyclone, Logan, UT; Lot#AND18475), 0,001% de 2- mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO),

penicilina 50 unidades/mililitro, 50 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)). Para pasajes posteriores, todas las células se trataron como se describe abajo. Después de tripsinización, las células viables se contaron después de la tinción con azul de tripano. Brevemente, 50 microlitros de suspensión de células se combinó con 50 microlitros de 0,04% w/v de azul de tripano (Sigma, St. Louis MO) y el número de células viables, se estimó usando una Cámara de Neubauer. Las células se trataron con tripsina y se lavaron tres veces en suplemento libre de DMEM: medio bajo de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos de células de la placenta y de fibroblastos humanos en el pasaje 11 se trataron con tripsina y se lavaron dos veces en medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el procedimiento de trasplante, ratas RCS distróficas fueron anestesiadas con xilazina-ketamina (1 miligramo/kilogramo intraperitoneal (ip) de la siguiente mezcla: 2,5 mililitros xilazina a 20 miligramos/mililitro, 5 mililitros ketamina a 100 miligramos/mililitro, y 0,5 mililitro de agua destilada) y sus cabezas aseguradas por un extremo de la barra. Las células carentes de suero se resuspendieron ( $2 \times 10^6$  células por inyección) en 2 microlitros de Leibovitz, medio L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y transplantado usando una pipeta de vidrio fino (diámetro interno de 75 a 150 microlitros) transcranialmente. Las células se administraron en el espacio subretiniano dorso-temporal de ratas anestesiadas de 3 semanas de edad distróficas pigmentadas RCS (total N=10/tipo celular).

**[0510]** Las células se inyectaron unilateralmente en el ojo derecho, mientras que el ojo izquierdo se inyectó con medio portador solo (control Sham; medio L-15 de Leibovitz). La viabilidad de las células de trasplante residuales se mantuvo en más de un 95% como se evaluó mediante exclusión con azul de tripano al final de la sesión de trasplante. Después se llevaron a cabo inyecciones de células, los animales fueron inyectados con dexametasona (2 miligramos/kilogramo) durante 10 días post trasplante. Durante la duración del estudio, los animales se mantuvieron en ciclosporina A oral (210 mg/litro de agua potable; dando como resultado la concentración en sangre: 250-300 microgramos/litro) (Bedford Laboratories, Bedford, Ohio) de 2 días pre-trasplante hasta el final del estudio. Comida y agua estaban disponibles *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados a los 60 o 90 días después de la operación, sacrificándose algunos animales a los puntos de tiempo anteriores para la evaluación histológica de los cambios a corto plazo asociados con el trasplante de células.

**[0511] Anotaciones ERG.** Después de adaptación a la oscuridad durante la noche, los animales se prepararon para la anotación de ERG bajo luz roja, como se describe anteriormente (Sauve et al (2004) Vision Res Ene; 44 (1): 9-18). En resumen, bajo anestesia (con una mezcla de 150 miligramos/kilogramo ip ketamina y 10 mg/kg, ip xilacina), la cabeza se aseguró con un soporte para la cabeza estereotáxica y la temperatura corporal monitoreada a través de un termómetro rectal y se mantuvo a 38°C utilizando una manta homeotérmica. Las pupilas estaban dilatadas usando partes iguales de fenilefrina tópica 2,5% y 1% de tropicamida. Anestesia tópica con 0,75% de bupivacaína se usó para prevenir cualesquiera reflejos corneales y una gota de 0.9% de solución salina se aplicó con frecuencia en la córnea para evitar su deshidratación y permitir el contacto eléctrico con el electrodo de registro (bucle de hilo de oro). Una aguja de calibre 25 insertada debajo del cuero cabelludo, entre los dos ojos, sirve como electrodo de referencia. La amplificación (en pasaje de banda 1-1000 Hz, sin filtrado de muesca), la presentación del estímulo, y la adquisición de datos fueron proporcionadas por el sistema UTAS-3000 de LKC Technologies (Gaithersburg, MD). Los ERG se registraron a los 60 días.

**[0512] Grabación de la onda a-y b mixta.** Para la cuantificación de las ondas adaptadas a la oscuridad B, las grabaciones consistieron en presentaciones flash individuales (10 microsegundos de duración), repitieron 3 a 5 veces para verificar la fiabilidad de respuesta y mejorar la relación de señal a ruido, si es necesario. Los estímulos fueron presentados a las seis intensidades crecientes en pasajes unitarios de un registro que varían -3,6 a 1,4 log candila/m<sup>2</sup> de luminancia. Para minimizar el blanqueo potencial de las barras, los intervalos entre estímulos se incrementaron a medida que la luminancia del estímulo se elevó de 10 segundos a la intensidad del estímulo más bajo a 2 minutos a alta intensidad del estímulo. La amplitud máxima de la onda b se define como la obtenida de la serie de la intensidad del flash, independientemente de la intensidad del estímulo. El verdadero Vmax del ajuste de los datos con una curva de Naka-Rushton no se utilizó ya que las respuestas de ERG fueron a menudo irregulares en niveles de luminancia más altos en los animales distróficos y mostraron tendencias para las respuestas deprimidas alrededor de 0,4 y 1,4 log candila/m<sup>2</sup>. Con el fin de determinar la edad a la que se han obtenido o se pierden componentes del ERG, se utilizaron las amplitudes de criterio: 20 microvoltios por A y B olas, y 10 microvoltios para las respuestas de tipo STR. La amplitud de la onda b se midió desde el pico negativo de onda a hasta el vértice positivo de la onda b, y no hasta el pico de las oscilaciones, que puede superar el vértice de la onda b (Nusinowitz et al. (1999) Invest Ophthalmol Vis Sci. 40 (12): 2848-58).

**[0513] Aislamiento de respuestas de conos y bastones.** Se utilizó el protocolo de doble destello para determinar el aislamiento de respuestas de conos y bastones (Nixon et al (2001) Clin. Experiment Ophthalmol 29 (3): 193-6). Un destello de la sonda se presentó 1 segundo después de un acondicionamiento de destello, usando una característica específica del sistema UTAS-3000 (LKC Technologies) con Ganzfeld calibrada; asegurar la recarga completa de la estimuladora en las condiciones utilizadas. El papel del destello acondicionado en el procedimiento era para saturar transitoriamente varillas para que se rindiesen no responsivas al destello de la sonda. La respuesta al destello de la sonda fue tomada como un reflejo de la actividad de cono impulsada. Una onda b guiada por varilla se obtuvo mediante la eliminación de la respuesta de cono expulsado por la respuesta mixta (obtenida después de la presentación de un destello de sonda solo, es decir, no precedido por cualquier destello acondicionado).

**[0514] Histología.** Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de uretano (12,5 gramos/kilogramo). La orientación del ojo se mantuvo mediante la colocación de una sutura de 6,0 a través del músculo recto superior antes de la enucleación. Después de hacer una incisión en la córnea, los ojos se fijaron con paraformaldehído al 2,5%, 2,5% de glutaraldehído, ácido pícrico 0,01% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Después de la fijación, la córnea y la lente se eliminaron mediante el corte alrededor del cuerpo ciliar. Una pequeña incisión fue hecha en la periferia de la retina dorsal antes de la eliminación del recto superior para ayudar a mantener la orientación. Las retinas después se fijaron en 1% de tetróxido de osmio durante 1 hora. Después de la deshidratación a través de una serie de alcoholes a epoxipropano, las retinas fueron incorporadas en TAAB incrustación de resina (TAAB Laboratories, Alderminster, UK). Secciones semi-delgadas se tiñeron con 1% de azul de toluidina en tampón de borato 1% y las secciones ultra delgadas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

**[0515]** Para la tinción de Nissl, las secciones se tiñeron con 0,75% de violeta de cresilo (Sigma, St. Louis, MO) después de lo cual se deshidrataron a través de alcoholes graduados en 70, 95 y 100% dos veces. Posteriormente se colocaron en xileno (Sigma, St. Louis, MO), se lavaron con PBS (pH 7,4) (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se montaron cubreobjetos con DPX medio de montaje (Sigma, St. Louis, MO).

### **Resultados**

**[0516]** Anotaciones ERG. A los 60 días post-trasplante, los animales que recibieron inyecciones de células derivadas de la placenta (n=4) no mostró ninguna mejora en una onda (20±20) frente a los controles sham (0), pero mostraron una mejora en la onda b mixta (81±72) frente a controles simulados (1,5±2), y buena mejora en onda b de cono (50±19) versus controles simulados (7±7), y en la contribución de la varilla (30%) versus controles simulados (0). Estos resultados indican una mejora en la capacidad de respuesta visual en comparación con los controles simulados. En contraste con el trasplante de células derivadas de la placenta, los trasplantes de fibroblastos no mostraron ninguna mejora en ninguno de los parámetros ensayados.

**Tabla 28-1: Datos ERG**

Grupo	Onda a		Onda b mixta		Onda b de cono		% contribución varilla	
	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	No tratado	Tratado
Simulacro 60 días	0	0	7±9	0	23 ± 5	12 ± 16	N/A	N/A
P (n=4) 60 días	0	20 ± 20	1.5 ± 2	81 ± 72	7±7	50 ± 19	N/A	30

**N.B. Simulacro=control (Sólo medio), P=Trasplante de célula de placenta**

**[0517] Histología.** Después del trasplante, no hubo evidencia histológica de una reacción inflamatoria y células inmunes infiltrantes no se observaron en secciones teñidas con Nissl en los grupos de células de la placenta. Sin embargo, las plantaciones de fibroblastos implantados resultaron en la muerte de los animales (n=7) y las indicaciones de las respuestas inflamatorias en etapa temprana.

### **Referencias**

#### **[0518]**

Lund et al. (2001) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 98 (17): 9942-7.

### **EJEMPLO 29**

#### **Potencial condrogénica de las células derivadas del posparto en Implantación en ratones SCID**

**[0519]** El potencial condrogénico de las células derivadas del cordón umbilical o tejido de placenta se evaluó después de la siembra en andamios de factor cargado de crecimiento biorreabsorbible y la implantación en ratones SCID.

### **Materiales y Métodos**

**[0520] Reactivos.** Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomocina, se obtuvo de Invitrogen, Carlsbad, CA. de suero bovino fetal (FCS) se obtuvo de HyClone (Logan, UT). Medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM) se obtuvo de Biowhittaker, Walkersville, MD. TGFbeta-3 se obtuvo a partir de productos de investigación Oncogene, San Diego, CA. GDF-5 se obtuvo de Biopharm, Heidelberg, Alemania (Publicación Internacional de PCT N° WO96/01316 A1, patente de EE.UU. N° 5,994,094A). Medio de crecimiento de condrocitos que comprende DMEM de alta glucosa suplementada con 10% de suero bovino fetal (FCS), 10 milimolar HEPES, 0,1 milimolar aminoácidos no esenciales, 20 microgramos/mililitro L-prolina, ácido ascórbico 50 microgramos/mililitro, 100 unidad/mililitro de penicilina, 100 microgramos de estreptomocina/ml, y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B. Fibrinógeno bovino se obtuvo de Calbiochem.

**[0521] Células.** Las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC, Lot #2F1656) se obtuvieron de Biowhittaker, Walkersville, MD y se cultivaron en MSCGM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este lote fue probado en el laboratorio previamente en experimentos *in vitro* y se demostró que era positivo en los ensayos de condrogénesis. Fibroblastos humanos adultos se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA y se cultivan en medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Se prepararon células posparto derivadas de aislados de cordones umbilicales humanos (Lot #022703Umb) y placenta (Lot #071003Plac) como se describe previamente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos celulares se incubaron en condiciones de crecimiento estándar. Las células utilizadas para los experimentos eran imágenes en las partes 5 y 14.

**[0522] Andamios.** 65/35 de ácido poliglicólico (PGA)/policaprolactona (PCL) de andamiaje de espuma [centímetros 4x5, 1 milímetro de espesor, óxido de etileno (ETO) esterilizado] reforzado con polidioxanona (PDS) de malla (PGA/PCL de espuma-PDS malla) se obtuvieron del Center for Biomaterials and Advanced Technologies (CBAT, Somerville, NJ). Punzones (3,5 milímetros) a base de andamios se cargaron con cualquiera de GDF-5 (3,4 microgramos/andamio), TGFbeta-3 (10 ng/andamio), una combinación de GDF-5 y TGFbeta-3, o medio de control, y se liofilizó.

**[0523] Siembra de células en los andamios.** Células derivadas de cordón de placenta y umbilicales se trataron con tripsina, y se determinó el número de células y la viabilidad.  $0,75 \times 10^6$  células se resuspendieron en 15 microlitros de medio de crecimiento y se sembraron en golpes de andamio 3,5 milímetros en una placa de cultivo celular. El andamio sembrado de células se incubó en un incubador de cultivo de células en el aire estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 2 horas tras lo cual se colocan dentro de los anillos de cartílago de explantes.

**[0524] Explantes de cartílago bovino.** Explantes de cartílago de 5 milímetros de diámetro se hicieron a partir de cartílago obtenido a partir de hombre de bóvido joven. Punzones (3 milímetros) fueron extirpados del centro del explante y se reemplaza con células sembradas 3,5 milímetro andamio reabsorbible. Los andamios con células fueron retenidos dentro de los explantes utilizando pegamento de fibrina (60 microlitros de fibrinógeno bovino, 3 miligramos/mililitro). Las muestras se mantuvieron en medio de crecimiento de condrocitos durante la noche, se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato al día siguiente, y se implantaron en ratones SCID.

**[0525] Animales.** Los ratones SCID ((*Mus musculus*)/Fox Chase SCID/Hombre), 5 semanas de edad, se obtuvieron de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, Indiana) y Charles River Laboratories (Portage, Michigan). Los animales utilizados en el estudio fueron seleccionados sin ningún sesgo sistemático aparente. Una etiqueta se coloca en cada jaula de animales individuales con el número de adhesión, técnica de implantación, número del animal, especie/cepa, fecha de la cirugía, periodo en vivo, y la fecha de la eutanasia. Los animales fueron identificados por números secuenciales marcados en la oreja con un marcador de tinta indeleble.

**[0526] Diseño Experimental.** Se analizaron un total de 42 ratones. Dos andamios se implantaron subcutáneamente en cada ratón como se describe a continuación; 42 ratones para la implantación subcutánea; 28 tratamientos con n-valor de 3 por tratamiento. El estudio corresponde al número de aprobación de IACUC: Skillman CICUAL 01-037. El estudio duró seis semanas.

#### Implantación SCID

##### A. Pesos corporales

**[0527]** Cada animal fue pesado antes de ser anestesiado y en la necropsia.

##### B. La anestesia y la reparación quirúrgica:

**[0528]** Toda la manipulación de los ratones SCID se produjo bajo una tapa. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketaset (hidrocloruro de ketamina [60 miligramos/kilogramo]), ROMPUN (xilazina [10 miligramos/kilogramo]), y solución salina.

**[0529]** Después de la inducción de la anestesia, toda la parte posterior del animal desde el área cervical dorsal a la zona lumbosacra dorsal se recorta libre de pelo usando maquinilla para animales eléctricos. El área fue borrado con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó, y se pinta con una solución de yodóforo acuosa de 1% de yodo disponible. Pomada oftálmica se aplicó a los ojos para evitar el secado del tejido durante el periodo de anestesia. El animal anestesiado y preparado quirúrgicamente se colocó en la posición reclinada deseada.

##### C. Técnica de implantación subcutánea:

**[0530]** Una incisión en la piel aproximada de 2 cm se hizo lateralmente a la columna torácica paralela a la columna vertebral. La piel fue separada del tejido conectivo subyacente por medio de disección roma. Cada ratón SCID recibió 2 tratamientos que se colocaron en los bolsillos subcutáneos creados por disección roma en cada hemitórax

a través de una incisión en la piel. Suturas viradas de 5-0 ETHIBOND EXCEL (poliéster) se utilizaron para virar la piel para la musculatura alrededor de cada andamio para evitar la migración subcutánea. Los andamios se implantaron durante 6 semanas y después se recogieron. El diseño experimental se describe en la Tabla 29-1.

5 **Tabla 29-1. Diseño Experimental: Tratamiento (N=3 por tratamiento)**

**[0531]**

- 10 A. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de la placenta, EP, TGFbeta3  
 B. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5  
 C. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5 + TGFbeta3  
 D. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de la placenta, EP, el control  
 E. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de la placenta, LP, TGFbeta3  
 15 F. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5  
 G. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5 + TGFbeta3  
 H. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de la placenta, LP, el control  
 I. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, TGFbeta3  
 J. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de cordón umbilical, del PE, rhGDF-5  
 20 K. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de cordón umbilical, EP, rhGDF-5 + TGFbeta3  
 L. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de cordón umbilical, de EP, de control  
 M. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, TGFbeta3  
 N. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, rhGDF-5  
 25 O. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, rhGDF-5 + TGFbeta3  
 P. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con células derivadas de cordón umbilical, LP, el control  
 P. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con hMSC, TGFbeta3  
 R. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con hMSC, rhGDF-5  
 30 S. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con hMSC, rhGDF-5 + TGFbeta3  
 T. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con hMSC, el control  
 U. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con fibroblastos, TGFbeta3 adulto  
 V. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con fibroblastos, Adulto rhGDF-5  
 W. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con fibroblastos, Adulto rhGDF-5 + TGFbeta3  
 35 X. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivada con fibroblastos, control de los adultos  
 Y. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla, TGFbeta3  
 Z. 65/35 PGA/PCL malla de espuma + PDS, rhGDF-5  
 AA. 65/35 PGA malla/PCL Espuma + PDS, rhGDF-5 + TGFbeta3  
 BB. 65/35 PGA malla/PCL Espuma + PDS, el control  
 40 *D. Necropsia y preparación histológica*

**[0532]** El examen macroscópico se realizó en todos los animales que murieron durante el curso del estudio o fueron sacrificados en estado moribundo. Tejidos seleccionados se guardan en la discreción del director del estudio y/o patólogo.

45 **[0533]** Los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub> en sus intervalos denominados. Se registraron observaciones brutas de los sitios implantados. Las muestras de los sitios de implantación subcutánea con su piel suprayacente se extirparon y se fijaron en 10% de formalina tamponada. Cada implante se dividía en dos mitades, una mitad y fue enviado a MPI Research (Mattawan, MI) para la inclusión en parafina, seccionada y tinción con hematoxilina y eosina (H & E) y safranina O (SO).

**[0534]** Los datos obtenidos en este estudio no se analizaron estadísticamente.

**Resultados**

55 **[0535]** la formación de nuevo cartílago y hueso se observó en la mayoría de las muestras, incluyendo el factor de carga de crecimiento, andamios sembrados de células, andamios de control de sembrado de células, y andamios cargados con factor de crecimiento solo. El alcance de la nueva formación de cartílago y hueso varía dentro de los grupos de tratamiento y control.

60 **[0536]** Andamios celulares sembrados derivados de placenta de pasaje temprano y tardío mostraron nuevo cartílago y la formación de hueso dentro de los andamios. No se observaron diferencias evidentes en la nueva formación de cartílago y hueso entre los diferentes andamios celulares sembrados cargado de factor de crecimiento y andamios sembrados de células solas. En comparación con los armazones de control (sin factores de crecimiento y sin células), parecía que había una mayor extensión de la nueva formación de cartílago en andamios sembrados de células con y sin factores de crecimiento y en el crecimiento de los andamios cargado de factor solo. Nueva

65

formación de cartílago con andamios sembrados de células derivadas de placenta fue similar a andamios sembrados de MSC y fibroblastos.

5 **[0537]** Se observaron nuevo cartílago y formación de hueso en el crecimiento de los andamios de los factores tratados y de control sembrados con células derivadas del cordón umbilical a pasaje temprano y tardío. La extensión de la formación de cartílago parecía ser menor que la observada con células derivadas de la placenta. Ninguna muestra mostró extensa formación de cartílago como se observa en las células derivadas de la placenta. La formación ósea parece ser mayor en los andamios sembrados con células de cordón umbilical derivados en los andamios contienen tanto TGFbeta-3 como rhGDF-5.

10 **[0538]** Andamios cargados de hMSC también mostraron nuevo cartílago y formación de hueso. La extensión de la formación de nuevo cartílago y el hueso fue similar para todos los grupos de tratamiento hMSC. Andamios de fibroblasto humano adulto sembrados también mostraron nuevo cartílago y formación de hueso. Los resultados fueron similares a los obtenidos con células derivadas de la placenta y hMSCs

15 **[0539]** En el grupo de control, en el que andamios cargados de factor de crecimiento o andamios solos se colocaron en anillos de cartílago y se implantan, también se observaron nuevo cartílago y formación de hueso. No es sorprendente que la medida de nueva formación de cartílago fue mayor en los andamios con factor de crecimiento que en los andamios sin factor de crecimiento. El aumento de la formación de hueso estaba presente en el control con la combinación de los dos factores de crecimiento ensayados.

20 **[0540]** Se observó formación de cartílago nuevo adyacente a los anillos de cartílago de explantes, así como dentro de los andamios. Nueva formación de cartílago dentro de los andamios adyacentes a los anillos de cartílago puede ser un resultado de la migración de condrocitos. La formación de cartílago vista como islas dentro de los armazones puede ser el resultado de cualquiera de la migración de condrocitos dentro de los andamios, la diferenciación de las células sembradas o la diferenciación de células endógenas progenitoras de ratón. Esta observación se deriva del hecho de que en andamios cargados de factor de control de crecimiento sin células sembradas, se observaron islas de diferenciación condrogénica. Se observó la formación de hueso nuevo dentro de los andamios de forma independiente y también asociada a condrocitos. La formación de hueso puede haber surgido de la diferenciación de osteoblastos, así como la osificación endocondral.

25 **[0541]** Es difícil separar el nuevo cartílago y la formación de hueso asociada con condrocitos que migraron frente a cualquier diferenciación condrogénica y osteogénica de células sembradas que pueda haber ocurrido. La tinción de secciones con anticuerpos humanos específicos puede distinguir la contribución de las células sembradas a la condrogénesis y la osteogénesis observada. También es posible que las células derivadas de la placenta y células derivadas del cordón umbilical estimularon la migración de condrocitos.

30 **[0542]** Se observó la abundancia de nuevos vasos sanguíneos con los andamios cargados de células derivadas de la placenta y las células derivadas del cordón umbilical. Los vasos sanguíneos eran abundantes en las zonas de formación de hueso. Los nuevos vasos sanguíneos también se observaron en los andamios hMSC y de fibroblastos sembrados asociados con la formación de hueso nuevo.

35 **[0543]** Los efectos sistémicos del andamio adyacente (con factor de crecimiento (GF)) en los andamios de control (sin GF, sin células) en la promoción de nuevo cartílago y la formación ósea no pueden descartarse. Análisis de nuevo cartílago y formación de hueso en los andamios, tomando en consideración los andamios implantados adyacentes en ratones SCID, no mostró ningún patrón claro de efecto sistémico de factor de crecimiento desde el andamio adyacente.

40 **[0544] Resumen.** Los resultados mostraron que se observó la formación de nuevos cartílagos y huesos en andamios de factor de crecimiento y de control sembrados con células derivadas de placenta y cordones umbilicales. Los resultados con células derivadas de la placenta fueron similares a los observados con células madre mesenquimatosas humanas, mientras que la medida de nuevo cartílago como la formación de tejido fue ligeramente menos pronunciada en las células derivadas del cordón umbilical. Andamios de crecimiento del factor-cargado implantados sin células también mostraron nuevo cartílago y la formación de hueso. Estos datos indican que la nueva formación de cartílago dentro de los andamios puede surgir de condrocitos que migraron de los explantes de las especies bovinas, a partir de la diferenciación condrogénica de las células progenitoras endógenas, y de la diferenciación condrogénica de las células sembradas.

45 **[0545]** Estos resultados sugieren que las células derivados de placenta y cordones umbilicales experimentan diferenciación condrogénica y osteogénica. Estos resultados también sugieren que las células derivadas de placenta y cordones umbilicales pueden promover la migración de los condrocitos a partir del explante de cartílago en los andamios. Abundantes nuevos vasos sanguíneos también se observaron en los andamios especialmente asociados con la formación de hueso nuevo.

50 **EJEMPLO 30**



**Utilización de células derivadas del posparto en la reparación de los nervios**

**[0546]** Lesiones celulares ganglionares de retina (RGC) se han utilizado ampliamente como modelos para diferentes estrategias de reparación en el SNC de mamíferos adultos. Se ha demostrado que la sección retrobulbar de axones RGC adultos roedores resultan en brotación abortiva (Zeng et al., 1995) y la muerte progresiva de la población de células madre (Villegas-Perez et al., 1993). Numerosos estudios han demostrado los efectos estimulantes de diversos factores exógenos y endógenos sobre la supervivencia de RGC axotomizado y regeneración de sus axones (Yip y Por lo tanto, 2000; Fischer et al., 2001). Además, otros estudios han demostrado que los trasplantes de células se pueden utilizar para promover la regeneración de los axones de los nervios seccionados (Li et al., 2003; Ramon-Cueto et al., 2000). Por lo tanto, estos y otros estudios han demostrado que la terapia basada en células puede utilizarse para el tratamiento de trastornos neuronales que afectan a la médula espinal, nervios periféricos, los nervios pudendos, nervios ópticos u otras enfermedades/trauma debido a una lesión en la que se puede producir daño nervioso.

**[0547]** Los péptidos de auto-montaje (PuraMatrix™, Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup>s. 5.670.483, 5.955.343, la solicitud publicada N<sup>o</sup> 2002/0160471, la publicación de patente Internacional n<sup>o</sup> WO 02/062969) han sido desarrollados para actuar como un andamio para vinculación celular a células de encapsulamiento en 3-D, células de placa en los revestimientos en 2-D, o como microportadores en cultivos en suspensión. Tres dimensiones de cultivo celular ha exigido ya sea materiales derivados de animales (extracto de sarcoma de ratón), con sus problemas inherentes reproducibilidad y la señalización celular, o andamios sintéticos mucho más grandes, que no logran aproximarse a la escala de nanómetro física y atributos químicos de ECM nativa. RAD 16 (NH<sub>2</sub>-RADARADARADA-COOH) y KLD (NH<sub>2</sub>-KLDLKLKLD-LKLDL-COOH) se sintetizan en pequeños fragmentos de oligopéptidos (RAD16 es de 5 nanómetros) que la auto-ensamblan en nanofibras a una escala similar a la matriz extracelular *in vivo* (ECM) (Matrix 3D, Inc Cambridge, MA). El autoensamblaje es iniciado por cationes mono- o divalentes que se encuentran en los medios de cultivo o el medio ambiente fisiológico. En los protocolos descritos en este ejemplo, RAD 16 se utilizó como un microvehículo para la implantación de las células después del parto en el defecto ocular. En este ejemplo, se demuestra que los trasplantes de posparto derivados de células (PPDCs) pueden proporcionar una eficacia en un modelo de nervio óptico de regeneración axonal de rata adulta.

**Métodos y materiales**

**[0548] Células.** Los cultivos de PPDCs humanos adultos (de cordón umbilical y la placenta) y células de fibroblastos (pasaje 10) se expandieron durante 1 pasaje. Todas las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento ((DMEM: La glucosa baja (Invitrogen, Carlsbad, CA), 15% (v/v) de suero bovino definido (Hyclone, Logan, UT; Lot#AND18475), 0,001% de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), 100 unidades por mililitro de penicilina, 100 microgramos por mililitro estreptomina, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA). En el pasaje 11, las células se trataron con tripsina y se determinó la viabilidad usando tinción con azul de tripano. brevemente, 50 microlitros de suspensión de células se combinó con 50 microlitros de 0,04% p/v de azul de tripano (Sigma, St. Louis MO) y el número de células viables, se estimó utilizando un hemocitómetro. Las células se lavaron a continuación tres veces en suplemento de libre medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se suspendieron entonces a una concentración de 200.000 células en 25 microlitros de RAD-16 (3DM Inc., Cambridge, MA), que fue tamponada y hecha isotónica según las recomendaciones del fabricante. Se añadieron cien microlitros de medio L-15 de Leibovitz libre de suplementos por encima de la suspensión de células/matriz para mantenerla húmeda hasta su uso. Estos cultivos de células/matriz se mantuvieron en condiciones atmosféricas estándar hasta que se produjo el trasplante. En el punto de trasplante se retiró el exceso de medio.

**[0549] Animales y Cirugía.** Se utilizaron ratas hembras Long Evans (220-240 g de peso corporal). Bajo anestesia tribromoetanol intraperitoneal (20 mg/100 gramos de peso corporal), el nervio óptico se expuso, y se realizó una incisión en la funda óptica intraorbitalmente a aproximadamente 2 milímetros desde el disco óptico, el nervio se levantó de la vaina para permitir transección completa con tijeras finas (Li et al., 2003). La integridad de la transección fue confirmada por observación visual de separación completa de los extremos proximal y distal. El grupo de control consistió de ratas lesionadas sin trasplantes. En las ratas de trasplante de células cultivadas de posparto sembradas en RAD-16 se insertaron entre los extremos proximal y distal tocones utilizando un par de micropinzas. Aproximadamente 75.000 células en RAD-16 se implantaron en el nervio óptico cortado. Célula/matriz se aplicó al corte seccionado con un par de micropinzas finas. La vaina del nervio óptico seccionado se cerró con 10/0 monofilamento de nylon negro (Ethicon, Edimburgo, Reino Unido). Por lo tanto, la brecha se cierra por el dibujo proximal corte y distal del nervio en proximidad entre sí.

**[0550]** Después, se llevaron a cabo inyecciones de células, los animales fueron inyectados con dexametasona (2 miligramos/kilogramo) durante 10 días después del trasplante. Durante la duración del estudio, los animales se mantuvieron en ciclosporina oral A (210 miligramos/litro de agua potable; concentración en sangre resultante: 250-300 microgramos/litro) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) a partir de 2 días pre-trasplante hasta el final del estudio. Comida y agua estaban disponibles *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados a los 30 ó 60 días después del trasplante.

**[0551] Aplicación CTB.** Tres días antes de sacrificarse los animales, bajo anestesia, una micropipeta de vidrio con una punta de 30 a 50 milímetros se insertó tangencialmente a través de la esclerótica detrás de la lente, y dos partes alícuotas de 4-5 microlitros de una solución acuosa de 1% toxina retrógrada trazadora de cólera B (CTB) (List Biologic, Campbell, CA) se inyectó en el humor vítreo. Los animales fueron perfundidos con fijador y los nervios ópticos se recogieron en el mismo fijador durante 1 hora. Los nervios ópticos se transfirieron a sacarosa durante la noche. Veinte secciones de criostato micrómetro se incubaron en glicina 0,1 molar durante 30 minutos y se bloquearon en una solución de PBS que contiene 2,5% de albúmina de suero bovino (BSA) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) y 0,5% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO), seguido de una solución que contiene anticuerpos de cabra anti-CTB (List Biologic, Campbell, CA) diluidos 1: 4000 en un PBS que contenía 2% de suero de conejo normal (NRS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2,5% de BSA, y 2% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) en PBS, y se incubaron en anticuerpo IgG anti-cabra de conejo biotinilado (vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido 1: 200 en 2% de Triton-X100 en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Esto fue seguido por tinción en 1: 200 estreptavidina-verde (Alexa Flour 438; Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las secciones teñidas se lavaron en PBS y se contratiñeron con yoduro de propidio para la microscopía confocal.

**[0552] Histología Preparación.** Brevemente, 5 días después de la inyección CTB, las ratas se perfundieron con paraformaldehído al 4%. A las ratas se les dio 4 centímetros cúbicos de uretano y después se sometieron a perfusión con PBS (0,1 molar), después con 4% paraformaldehído. La médula espinal se cortó y el hueso se retiró de la cabeza para exponer el colículo. A continuación, el colículo se retiró y se colocó en 4% de paraformaldehído. El ojo se eliminó cortando alrededor de la parte exterior del ojo y llegando tan lejos como fuera posible. Se tuvo cuidado de no cortar el nervio óptico que se encuentra en la parte inferior del ojo. El ojo se retiró y se cortaron los músculos para exponer el nervio óptico. Después éste se colocó en 4% de paraformaldehído.

## **Resultados**

**[0553] Lesiones solas.** Un mes después de la sección retrotubular del nervio óptico, se identificaron un número de axones marcados con CTB en el segmento de nervio unido a la retina. En los 200 micrómetros más cercanos al corte, se observaron los axones emitir un número de colaterales en ángulo recto al eje principal y terminar como una maraña de neuronas en la superficie de corte. En este corte, entre los extremos proximal y distal, se observó que la brecha se salvaba progresivamente por un segmento de 2 a 3 milímetros de tejido conectivo vascularizado; sin embargo, no se observó un avance de axones en esta área en puente. Así, en los animales que recibieron solo lesión no se observó que el crecimiento axonal alcanzase el extremo distal.

**[0554] RAD-16 trasplante.** Tras el trasplante de RAD-16 en el corte, se observó crecimiento hacia el interior visible del tejido conectivo vascularizado. Sin embargo, no se observó crecimiento axonal entre los extremos proximal y distal. Los resultados demuestran que la aplicación de RAD-16 por sí sola no es suficiente para inducir la regeneración axonal en esta situación.

**[0555] Trasplante de células derivadas de posparto.** El trasplante de células derivadas de posparto en el nervio óptico cortado estimula la regeneración del nervio óptico. Cierta nuevo crecimiento también se observó en condiciones en las que se implantaron células de fibroblastos, aunque esto fue mínimo en comparación con el nuevo crecimiento observado con las células derivadas de placenta trasplantadas. Se observó nuevo crecimiento del nervio óptico en 4/5 animales trasplantados con células derivadas de la placenta, 3/6 animales trasplantados con fibroblastos dérmicos adultos, y en 1/4 animales trasplantados con células derivadas de cordón umbilical. En situaciones donde se observó nuevo crecimiento, el etiquetado CTB confirmó la regeneración de axones de las células ganglionares de la retina, que se demostraron penetrar a través de la zona del trasplante. También se realizó el etiquetado GFAP para determinar el nivel de la cicatrización glial. La expresión de GFAP se intensificó en el extremo proximal con cierta inmunotinción observada a través del injerto reinervado.

**[0556] Resumen.** Estos resultados demuestran que las células adultas humanas trasplantadas derivadas del posparto son capaces de estimular y guiar la regeneración de axones de las células ganglionares de la retina de corte.

## **Referencias**

### **[0557]**

- 1) POR Zeng, Anderson PN, Campbell G, Lieberman AR. 1995. J. Anat. 186: 495-508.
- 2) Villegas Pérez-MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. 1988. J Neurosci. 8: 265-80.
- 3) Yip HK, Así KF. 2000. Prog Retin Eye Res. 19: 559-75.
- 4) Fischer D, Heiduschka P, Thanos S. 2001. Exp Neurol. 172: 257-72.
- 5) Ramón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Ávila J. 2000. Neuron 25: 425-35.

**[0558]** Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las realizaciones actualmente preferidas, se entiende que la invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas



<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 <400> 5  
 c ttacaagcag tgcagaaaac 21  
 10 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 <400> 6  
 20 agtaaacatt gaaaccacag cc 22  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 30 <400> 7  
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20  
 <210> 8  
 <211> 22  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 40 <400> 8  
 ctcaaaaac ttctccaca cc 22  
 <210> 9  
 45 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> Construcción Sintética  
 <400> 9  
 cccacgccac gctctcc 17  
 55 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 <400> 10  
 65 tcctgtcagt tgggtctcc 19  
 <210> 11

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
  
 <400> 11  
 ctggattggc gttgtttgtg 20  
 10  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
  
 <400> 12  
 tccaaggtag gtagtctgta g 21  
 20  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 30 <400> 13  
 c ctgttgcgca catccctgcc 21  
  
 <210> 14  
 <211> 22  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> construcción sintética  
 40  
 <400> 14  
 ggcagtctgg ctttctcaga tt 22  
  
 <210> 15  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 50  
 <400> 15  
 ccctctccct tacccttagc una 21  
  
 <210> 16  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
  
 <400> 16  
 ctgtgaaagg acctgtctgt CGC 23  
 60  
 65

**Reivindicaciones**

- 5 **1.** Un aislado de células derivadas de placenta obtenible a partir de tejido de la placenta después del parto humano sustancialmente libre de sangre, en el que dicha célula se auto-renueva y se expande en cultivo, es multipotente, requiere L-valina para el crecimiento, crece en oxígeno de aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, y tiene las siguientes características adicionales:
- 10 a) producción de vimentina y actina de músculo liso alfa;  
 b) expresión de la proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2) como se detecta por citometría de flujo;  
 c) falta de producción de GRO-alfa y receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada, tal como se detecta por citometría de flujo;  
 d) producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C, tal como se detecta por citometría de flujo;  
 15 e) falta de producción de CD31, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD 178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DP, DQ, DR, tal como se detecta por citometría de flujo;  
 f) expresión, la cual es relativa a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta iliaca, se reduce para homeobox de baja estatura 2; proteína 27kDa de choque térmico 2; quimiocina (C-X-C con motivos) ligando 12 (estromal el factor 1 derivado de células); elastina; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox de mesenquimio 2; homólogo de homeobox sine oculis 1; cristalina, alfa B; activador asociado desgreñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina; src homología tres (SH3) y el dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt-3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; procolágeno promotor de C-endopeptidasa; homólogo rizado 7; gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C; homeobox de proteínas Iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína vesícula sináptica 2; ADNc FLJ12280 fis, Clon de MAMMA1001744; citoquina del receptor del factor-1 como; potasio intermedio/pequeña conductancia de calcio canal activado, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína de DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ); homólogo de homeobox sine oculis 2; proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa de hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina beta tipo 1 (con EGF igual que los dominios de repetición); clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ADNc DKFZp564B222 (a partir de DKFZp564B222 clon); proteína de membrana asociada a vesículas 5; fibulina que contiene EGF como la proteína de la matriz extracelular 1; BCL2/adenovirus E1B 19kDa proteína de interacción tipo 3; proteína de unión AE 1; citocromo c oxidasa subunidad polipeptídica VIIa 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; y proteína de unión de factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa como se ensayó por microensayo;  
 20 g) secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), quimiotáctica de granulocitos en proteínas 2 (GCP-2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), heparina de unión al factor de crecimiento epidérmico (HB-EGF), inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz 1 (TIMP1), trombopoyetina (TPO), Rantes (reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas) y el timo y quimiocina regulada por activación (TARC), como detectada por ELISA;  
 25 h) falta de secreción de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2), proteína inflamatoria de macrófagos 1beta (MIP1b), 1309, y quimioquina derivada de macrófagos (MDC), como se detecta por ELISA;  
 30 i) tiene la capacidad de someterse a al menos 40 duplicaciones de la población en cultivo; y  
 j) la expresión, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta iliaca, se incrementa para miembro de superfamilia de lectina de tipo C A2, tumor de Wilms 1, deshidrogenasa de aldehído miembro 1 de la familia A2, renina, receptor de lipoproteínas oxidado de baja densidad 1, quinasa de proteína C zeta, clon IM-EDAD: 4179671, proteína hipotética DKFZp564F013, subregulado en el cáncer de ovario 1, y el clon DKFZp547K1113 como se ensayó mediante microensayos.
- 35 **2.** La célula de la reivindicación 1 en la que dicha célula tiene una o más de las siguientes características adicionales:
- 40 a) secreción de factor derivado del estroma 1 alfa (SDF-1 alfa) como se detecta por ELISA;  
 b) secreción de interleucina 8 (IL8) como se detecta por ELISA;  
 c) secreción de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) como se detecta por ELISA;  
 d) secreción de proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a) como se detecta por ELISA; y/o  
 e) secreción de eotaxina como se detecta por ELISA.
- 45 **3.** La célula de la reivindicación 1 en la que dicha célula es una célula derivada de placenta neonatal.

4. La célula de la reivindicación 1 en la que dicha célula es una célula derivada de placenta materna.
5. La célula de la reivindicación 1 en la que dicha célula se expande en el siguiente medio de cultivo con el fin de crecimiento: Medio de crecimiento> MSCGM> + 10% de suero de Iscove=DMEM-alto contenido de glucosa + 10% de suero=F12 de Ham + 10% de suero=RPMI1640 + 10% de suero.
6. La célula de la reivindicación 1 que está diseñada genéticamente para producir una proteína de interés.
7. Una población celular homogénea que comprende la célula de la reivindicación 1.
8. La célula de la reivindicación 6 que comprende además al menos un factor de crecimiento seleccionado del derivado de plaquetas de factor de crecimiento-bb, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, o el factor inhibidor de la leucemia.
9. Un cultivo celular homogéneo que comprende la población de células de la reivindicación 1.
10. El cultivo celular de la reivindicación 9 que comprende además al menos un factor de crecimiento seleccionado del factor de crecimiento derivado de plaquetas bb, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, o el factor inhibidor de la leucemia.
11. Una matriz que comprende la célula de la reivindicación 1.
12. La matriz de la reivindicación 11 en la que dicha matriz es un andamio tridimensional.
13. La matriz de la reivindicación 11 que comprende un andamio no tejido que comprende un copolímero de los ácidos glicólico y láctico, 35/65 PCL/PGA espuma, un gel *in situ* polimerizable, o un hidrogel péptido de auto-montaje.
14. Un método de aislamiento de una célula a partir de una placenta humana post-parto o fragmento del mismo que comprende dicha célula de disociación de dicha placenta o fragmento con dispasa, colagenasa y hialuronidasa, en el que la célula aislada tiene las características mencionadas en la reivindicación 1.
15. Un método de la reivindicación 14 que comprende además la disociación mecánica de dicha placenta o el fragmento antes de dicha etapa disociativa.
16. El método de la reivindicación 14 que comprende además el cultivo de dicha célula en medio de cultivo.
17. El método de la reivindicación 14 en el que dicho fragmento de dicha placenta es un fragmento del aspecto neonatal de la placenta.
18. El método de la reivindicación 14 en el que dicho fragmento de dicha placenta es un fragmento del aspecto materno de la placenta.
19. El método de la reivindicación 14 que comprende además la criopreservación de dicha célula.
20. El método de la reivindicación 14 que comprende además el almacenamiento de dicha célula.
21. Un método de la producción de una población de células mediante la ampliación de una célula de la reivindicación 14 en el cultivo.
22. El método de la reivindicación 21 en el que dicha etapa de expansión de dicha célula comprende cultivar dicha célula en RPMI1640, medio de Ham F10, medio de Ham F12, medios de cultivo de células madre mesenquimales, medio modificado de Dulbecco de Iscove, medio modificado de Dulbecco de Eagle (DMEM) de glucosa alta, DMEM de glucosa baja, DMEM avanzada, DMEM/MCDB201, condiciones libres de suero tales como DMEM libre de suero, condiciones libres de proteínas, DMEM/F12, o medio basal de Eagle.
23. El método de la reivindicación 21 en el que dicha etapa de expansión comprende el cultivo de dicha célula en un medio de cultivo que comprende DMEM de glucosa baja, suero, beta-mercaptoetanol, y un agente antibiótico.
24. Un kit que comprende al menos una célula de la reivindicación 1 y al menos un componente adicional de un andamio, un agente hidratante, un sustrato de cultivo de células, y medios de cultivo celular.
25. El kit de la reivindicación 24 en el que dicha célula es criopreservada.
26. El kit de la reivindicación 24 en el que dicha célula se siembra en dicho andamio.

**27.** La población de células de la reivindicación 7, en la que la célula es de linaje materno.

**28.** La población de células de la reivindicación 7, en la que la célula es de linaje neonatal.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65