

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 457**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2012 PCT/US2012/025086**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO2012112576**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 12705594 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2675464**

54 Título: **Tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica utilizando células derivadas umbilicales**

30 Prioridad:

14.02.2011 US 201113026995

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

13.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOSIEWSKA, ANNA;
HARMON, ALEXANDER M.;
KIHM, ANTHONY J.;
FANG, CARRIE H. y
DHANARAJ, SRIDEVI**

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 2 616 457 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica utilizando células derivadas umbilicales

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** Esta invención se refiere en general a composiciones, métodos y kits para terapia en base a células o regenerativa para las enfermedades neurológicas y trastornos tales como la esclerosis lateral amiotrófica. En particular, esta invención proporciona células derivadas de tejido del cordón umbilical para uso en la preservación de la función de neurona motora en un paciente con esclerosis lateral amiotrófica.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] Se hace referencia a varias patentes y otras publicaciones a lo largo de la memoria descriptiva.

15 **[0003]** Las enfermedades neurológicas y otros trastornos del sistema nervioso central y periférico están entre los más debilitantes que pueden sufrirse por un individuo, no sólo por sus efectos físicos, sino también por su permanencia. Una de estas enfermedades es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (también conocida como enfermedad de Lou Gehrig).

20 **[0004]** La ELA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta principalmente a las neuronas motoras que resulta en debilidad muscular y atrofia. La enfermedad se caracteriza por degeneración prematura selectiva y muerte de las neuronas motoras. Las neuronas afectadas muestran pérdida de dendritas, cambios en el citoesqueleto y acumulación de proteínas y cuerpos de inclusión. La ELA da lugar a una parálisis progresiva que es típicamente fatal dentro de unos años debido a la insuficiencia respiratoria que resulta de la parálisis de los músculos respiratorios. La duración media de la enfermedad desde el inicio hasta la muerte es de tres a cinco años.
25 Sólo alrededor del 10% de los pacientes con ELA sobreviven durante diez o más años. Hasta 20.000 a 30.000 personas en los Estados Unidos sufren de ELA y 5.000 adicionales se diagnostican cada año.

30 **[0005]** Los mecanismos patogénicos de la ELA no se entienden completamente, pero se cree que una variedad de procesos contribuyen a ELA incluyendo la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, excitotoxicidad, así como alteraciones en el citoesqueleto, en el transporte axonal, procesamiento de proteínas, y la homeostasis de calcio (Ilieva y otros (2009), J. Cell Biol. 187: 761 - 72). A pesar del intenso esfuerzo, han surgido opciones terapéuticas muy limitadas para el curso de la enfermedad, aunque se han hecho avances en la terapia paliativa. La terapia celular alogénica puede proporcionar una terapia multifactorial eficaz para el tratamiento de la ELA mediante la elaboración de factores tróficos, que disminuyen la degeneración de las neuronas motoras, preservan la función neuronal motora y prolongan la vida.

35 **[0006]** Teniendo en cuenta los efectos debilitantes de la ELA y la falta de tratamiento, existe una gran necesidad para el tratamiento de ELA en un paciente, mejorando con ello la calidad de vida del paciente.

40 **RESUMEN DE LA INVENCION**

[0007] La invención proporciona células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso en la preservación de la función de las neuronas motoras en un paciente con esclerosis lateral amiotrófica, en el que las células derivadas de tejido del cordón umbilical se pueden aislar a partir de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, pueden sufrir al menos 40 duplicaciones, y tienen las siguientes características:

- (a) expresan cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C;
- (b) no expresan ninguno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD 178, B7-H2, HLA-G, o HLA-DR, DP, DQ; y
- (c) han aumentado la expresión de interleuquina-8; reticulón 1; y el ligando del receptor de quimioquina (motivo CXC) ligando 3, con relación a la de una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca.

55 **[0008]** Los problemas presentados están resueltos por las composiciones, métodos y kits de las realizaciones ilustrativas descritas en este documento. Esta invención proporciona composiciones y métodos aplicables a la terapia celular o regenerativa para enfermedades neurológicas y trastornos tales como esclerosis lateral amiotrófica. En particular, la invención presenta composiciones farmacéuticas, dispositivos y métodos para la regeneración o reparación de tejido neural utilizando células derivadas de tejido del cordón umbilical.

60 **[0009]** Un aspecto de la invención presenta una célula derivada de tejido de cordón umbilical aislada sustancialmente libre de sangre, en el que la célula es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y tiene el potencial para diferenciarse en una célula de un fenotipo neural; donde la célula requiere L-valina para el crecimiento y es capaz de crecimiento en al menos aproximadamente 5% de oxígeno. Esta célula comprende además una o más de las siguientes características: (a) potencial para al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; (b) unión y expansión en un recipiente de cultivo de tejidos recubierto o no revestido, en el que el recipiente de cultivo

de tejidos revestidos comprende un revestimiento de gelatina, laminina, colágeno, polioritina, vitronectina o fibronectina; (c) producción de al menos uno de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa; (d) producción de al menos uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; (e) ausencia de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ, según se detecta por citometría de flujo; (f) expresión de un gen que, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de la médula ósea de cresta iliaca, se incrementa para al menos uno de un gen que codifica: interleucina 8; reticulón 1; quimiocina (motivo CXC) ligando 1 (actividad estimulante del crecimiento del melanoma, alfa); quimioquina (motivo CXC) ligando 6 (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); quimioquina (motivo CXC) ligando 3; factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; (g) expresión de un gen, el cual en relación con una célula humana que es fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de la médula ósea de la cresta iliaca, se reduce para al menos uno de un gen que codifica: homeobox 2 de estatura baja; choque térmico 27 kDa proteína 2; quimioquina (motivo CXC) ligando 12 (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); mesénquima homeobox 2 (homeobox de detención de crecimiento específico); homeobox sine oculis homólogo 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador desalineado asociado de la morfogénesis 2; proteína DKFZp586B2420; similar a la neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); src homología tres (SH3) y el dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con el runt 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la C-endopeptidasa de pro-colágeno; homólogo rizado 7 (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquión); iroquois homeobox proteína 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína de vesícula sináptica 2; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, 36 kDa; ADNc *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citoquinas; potasio intermedio/pequeño conducto activado por calcio canal, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homeobox sine oculis homólogo 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína 1 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta de crecimiento temprano 3; distal-menos homeobox 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro C3 (deshidrogenasa hidroxiesteroide 3-alfa, tipo II); biglican; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, beta-1 (con dominios de repetición EGF); clon EUROIMAGE de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm *Homo sapiens* 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de peptídico natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus E1B 19kDa que interactúa con la proteína de tipo 3; proteína de unión a AE 1; polipéptido 1 de la subunidad VIIa de oxidasa de citocromo c (músculo); similar a la neuralina 1; gen 1 de translocación de células B; proteína hipotética FLJ23191; y DKFZp586L151; (h) secreción de al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES y TIMP1; y (i) falta de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, I309, MDC y VEGF, según se detecta mediante ELISA.

[0010] En realizaciones específicas, la célula derivada de ombligo tiene todas las características de identificación de cualquiera de: tipo de células UMB 022803 (P7) (ATCC N° de acceso PTA-6067); o tipo de célula UMB 022803 (P17) (N° de Acceso ATCC PTA-6068).

[0011] En ciertas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se aíslan en presencia de una o más actividades de enzimas que comprenden la actividad de metaloproteasa, actividad mucolítica y actividad de la proteasa neutra. Preferiblemente, las células tienen un cariotipo normal, que se mantiene a medida que las células se pasan en cultivo. En las realizaciones preferidas, las células derivadas del posparto comprenden CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C y no comprende ninguna de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, según se detecta mediante citometría de flujo.

[0012] Otro aspecto de la invención presenta una población de células que comprende las células derivadas de tejido de cordón umbilical tal como se describe anteriormente. En una realización, la población es una población sustancialmente homogénea de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. En una realización específica, la población comprende una línea celular clonal de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. En otra realización, la población es una población heterogénea que comprende las células derivadas de tejido del cordón umbilical y al menos otro tipo celular. En ciertas realizaciones, el otro tipo celular es un astrocito, oligodendrocito, neurona, progenitor neural, célula madre neural u otra célula madre pluripotente o multipotente. En otras realizaciones, la población de células se cultiva en contacto con uno o más factores que estimulan la diferenciación de células madre hacia un linaje neural.

[0013] También se ofrece un lisado celular preparado a partir de células derivadas de tejido del cordón umbilical. El lisado celular puede separarse en una fracción enriquecida en membrana y una fracción celular soluble. La descripción también presenta una matriz extracelular producida por las células derivadas de tejido del cordón umbilical, así como un medio acondicionado en el que las células han sido cultivadas.

[0014] Otro aspecto incluye un método de tratamiento de un paciente que tiene una condición neurodegenerativa, comprendiendo el método la administración a las células derivadas de tejido de cordón umbilical del paciente como se describe anteriormente, en una cantidad eficaz para tratar la afección neurodegenerativa. En ciertas

realizaciones, la condición neurodegenerativa es una afección neurodegenerativa aguda, tal como un traumatismo cerebral, trauma de la médula espinal o trauma del nervio periférico. En otras realizaciones, es una enfermedad neurodegenerativa crónica o progresiva, tal como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, tumor, esclerosis múltiple o lesión crónica del nervio periférico.

[0015] En una realización, las células derivadas de tejido de cordón umbilical son inducidas *in vitro* para diferenciarse en un linaje de células neurales antes de la administración. En otra realización, las células se manipulan genéticamente para producir un producto génico que promueve el tratamiento de la afección neurodegenerativa.

[0016] En ciertas realizaciones, las células se administran con al menos otro tipo celular, tal como un astrocito, oligodendrocitos, neuronas, progenitores neurales, células madre neurales u otras células madre multipotentes o pluripotentes. En estas realizaciones, el otro tipo de células se puede administrar simultáneamente con, o antes, o después de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. De manera similar, en estas u otras realizaciones, las células se administran con al menos otro agente, tal como un fármaco para terapia neuronal, u otro agente adyuvante beneficioso tal como un agente antiinflamatorio, agentes antiapoptóticos, antioxidantes o factores de crecimiento. En estas realizaciones, el otro agente puede administrarse simultáneamente con, o antes, o después, de las células derivadas del tejido del cordón umbilical.

[0017] En ciertas realizaciones, las células se administran en un sitio predeterminado en el sistema nervioso central o periférico del paciente. Pueden administrarse por inyección o infusión, o encapsularse dentro de un dispositivo implantable, o mediante implantación de una matriz o almacén que contiene las células.

[0018] Una realización es un método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, que comprende la administración de las células derivadas de tejido de cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la esclerosis lateral amiotrófica a un paciente. En esta realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se aíslan de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, pueden sufrir por lo menos 40 duplicaciones y tienen las siguientes características: (a) expresión de cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; (b) no expresan ninguno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD 117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G o HLA-DR, DP, DQ; y (c) aumento de la expresión de interleuquina-8; reticulón 1; y el ligando 3 del ligando del receptor de quimioquina (motivo CXC), con relación a la de una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca. En otra realización del método, las células derivadas de tejido del cordón umbilical no expresan hTERT ni telomerasa. En aún otra realización, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran por inyección (tal como, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa o intratecal. En una realización, las células derivadas de cordón umbilical de tejido ejerce un efecto trófico sobre el sistema nervioso del paciente.

[0019] Otra realización es un método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una población sustancialmente homogénea de células derivadas de tejido de cordón umbilical a un paciente. En esta realización, la población de células derivadas de tejido del cordón umbilical se aísla de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, puede sufrir al menos 40 duplicaciones y tiene las siguientes características: (a) expresa cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; (b) no expresa ninguno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD 117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, o HLA-DR, DP, DQ; y (c) aumento de la expresión de interleuquina-8; reticulón 1; y el ligando 3 del ligando del receptor de quimioquina (motivo CXC), con relación a la de una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca. En una realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical no expresan hTERT ni telomerasa. En otra realización, la población sustancialmente homogénea de células derivadas de tejido del cordón umbilical se administra por inyección o infusión. En una realización alternativa, la población sustancialmente homogénea de células derivadas de tejido del cordón umbilical se administra por inyección intravenosa o intratecal. En otra realización más, la población sustancialmente homogénea de células derivadas de tejido del cordón umbilical ejerce un efecto trófico sobre el sistema nervioso del paciente.

[0020] Otra realización es un método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, que comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende células derivadas de tejido de cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la esclerosis lateral amiotrófica a un paciente. En esta realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se aíslan de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, pueden sufrir por lo menos 40 duplicaciones y tienen las siguientes características: (a) expresa cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; (b) no expresa ninguno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD 117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, o HLA-DR, DP, DQ; y (c) aumento de la expresión de interleuquina-8; reticulón 1; y el ligando 3 del ligando del receptor de quimioquina (motivo CXC), con relación a la de una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca. En una realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical no expresan hTERT ni

telomerasa. En otra realización más, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran por inyección o infusión (tal como, por ejemplo, inyección intravenosa o intratecal). En una realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical ejercen un efecto trófico sobre el sistema nervioso del paciente.

5 **[0021]** Otro aspecto de la invención presenta una composición farmacéutica para tratar un paciente que tiene una condición neurodegenerativa, esclerosis lateral amiotrófica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y las células derivadas de tejido de cordón umbilical descritas anteriormente. La afección neurodegenerativa a tratar puede ser una afección neurodegenerativa aguda, o puede ser una afección crónica o progresiva.

10 **[0022]** En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende células que han sido inducidas *in vitro* para diferenciarse en células del linaje neural antes de la formulación de la composición, o células que han sido genéticamente manipuladas para producir un producto de gen que promueve el tratamiento de la condición neurodegenerativa.

15 **[0023]** En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos otro tipo de células, tales como astrocitos, oligodendrocitos, neuronas, progenitoras neurales, células madre neurales u otras células madre multipotentes o pluripotentes. En estas u otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos otro agente, tal como un fármaco para terapia neuronal, u otro agente coadyuvante beneficioso tal como un agente antiinflamatorio, agentes antiapoptóticos, antioxidante o factor de crecimiento.

20 **[0024]** En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración por inyección o infusión. Alternativamente, puede comprender un dispositivo implantable en el que las células están encapsuladas, o una matriz o armazón que contiene las células.

25 **[0025]** De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un kit para tratar un paciente que tiene una afección neurodegenerativa. El kit comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, una población de las células derivadas de tejido del cordón umbilical descritas anteriormente e instrucciones para usar el kit en un método de tratamiento del paciente. El kit puede comprender además al menos un reactivo e instrucciones para cultivar las células derivadas de tejido del cordón umbilical. También puede comprender una población de al menos otro tipo celular, o al menos otro agente para tratar una afección neurodegenerativa.

35 **[0026]** De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para tratar un paciente que tiene una afección neurodegenerativa (como *p.ej.* esclerosis lateral amiotrófica), que comprende la administración al paciente de una preparación hecha de la de las células derivadas del tejido del cordón umbilical antes descritas. Dicha preparación puede comprender un lisado celular (o una fracción de los mismos) de las células derivadas del tejido del cordón umbilical, una matriz extracelular de las células derivadas del tejido del cordón umbilical o un medio acondicionado en el que crecen las células derivadas del tejido del cordón umbilical. Otro aspecto presenta una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una preparación hecha a partir de las células derivadas de tejido del cordón umbilical, que puede ser un lisado celular (o fracción de éste) de las células derivadas de tejido del cordón umbilical, una matriz extracelular de las células derivadas de tejido del cordón umbilical o un medio acondicionado en el que se crecieron las células derivadas de tejido del cordón umbilical. También se proporcionan kits para practicar este aspecto de la invención. Estos pueden incluir uno o más de un vehículo farmacéuticamente aceptable u otro agente o reactivo, uno o más de un lisado celular o fracción de los mismos, una matriz extracelular o un medio acondicionado de las células derivadas de tejido del cordón umbilical e instrucciones para uso de los componentes del kit.

45 **[0027]** Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y los ejemplos que siguen.

50 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0028]

55 **La Figura 1** muestra el control de peso de los animales durante toda la duración del estudio.

La Figura 2 muestra la respuesta de los diferentes grupos de células al reto de amorfina.

La Figura 3 muestra el seguimiento de la diferencia en el número de cabezas gira de izquierda y derecha a lo largo de la duración del estudio.

60 **La Figura 4** muestra el seguimiento del consumo de alimentos por los animales durante toda la duración del estudio utilizando un reto de escalera.

La Figura 5 muestra gráficos de barras que ilustran la evaluación cualitativa de (a) Iba-1; (b) ED-1; y (c) tinción con DAPI realizada en el injerto celular de acuerdo con los siguientes criterios: 0 = Ninguno (ausencia de células); 1 = Tinción visible; 2 = tinción abundante; 3 = Tinción muy abundante; 4 = Denso.

65 **La Figura 6** muestra gráficos de barras que ilustran la evaluación cualitativa de (a) GFAP y (b) la tinción de vimentina realizada en el injerto de células de acuerdo con los siguientes criterios: 0 = Ninguno (ausencia de células); 1 = Tinción visible; 2 = Tinción abundante; 3 = Tinción muy abundante; 4 = Denso.

La **Figura 7** muestra el efecto de las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano ("hUTC") en la Supervivencia del SOD1 (G93A) Modelo de rata de ELA para grupos (A) 1 y 2 (B) y grupos 3 y 4.

La **Figura 8** muestra la duración de vida de los animales en los grupos a los que se administró el vehículo de control y el hUTC (véase el Ejemplo 21). El diagrama de barras muestra que los grupos tratados con células, especialmente en el brazo 2, tienen una vida útil más larga en 15,75 días (2,25 semanas, $P < 0,035$) que los grupos de vehículos aunque la edad de inicio de la enfermedad es similar.

La **Figura 9** muestra la actividad de la locomoción de los animales tratados con o sin hUTC. La Figura 9A muestra las puntuaciones de los tests Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) para los grupos 1 y 2. La Figura 9B muestra los resultados de las pruebas de rendimiento del plano inclinado para los grupos 1 y 2. La Figura 9C muestra las puntuaciones BBB para los grupos 3 y 4. La Figura 9D muestra Las puntuaciones del plano inclinado para los grupos 3 y 4. Los datos demuestran la separación en las dos principales medidas de debilidad muscular en el vehículo y los grupos tratados con células.

La **Figura 10** muestra la curva de supervivencia para el grupo de 10 semanas (para todos los sujetos).

La **Figura 11** muestra la curva de supervivencia para el grupo de 12 semanas (para todos los sujetos).

La **Figura 12** muestra la curva de supervivencia para el grupo de 12 semanas (últimos dos pares).

La **Figura 13** muestra los resultados de plano inclinado para el brazo de 10 semanas.

La **Figura 14** muestra las puntuaciones BBB para el brazo de 10 semanas.

La **Figura 15** muestra los resultados de plano inclinado para el brazo de 12 semanas durante los primeros seis pares.

La **Figura 16** muestra los resultados de plano inclinado para el brazo de 12 semanas para los dos últimos pares.

La **Figura 17** muestra las puntuaciones de BBB para el grupo de 12 semanas durante los primeros seis pares.

La **Figura 18** muestra las puntuaciones de BBB para el grupo de 12 semanas para los dos últimos pares.

La **Figura 19** muestra el aspecto de secciones de la médula lumbar teñidas cresilo-violeta de ratas SOD1 G93A.

La Figura 19A muestra la aparición de secciones de cordón lumbar teñidas con creysl-violeta de animales de número impar. La Figura 19B muestra la aparición de secciones de cordón lumbar teñidas con creysl-violeta de animales de número par. La Figura 19C muestra la aparición de secciones de cordón lumbar manchadas con creysl-violeta de animales normales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Definiciones

[0029] Varios términos utilizados a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se definen como se expone a continuación.

[0030] Las *células madre* son células indiferenciadas definidas por la capacidad de una sola célula, tanto para autorenovarse, como para diferenciarse para producir células de progenie, incluyendo progenitores auto-renovables, progenitores no renovadores y células terminalmente 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 tras el trasplante, y de contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos los tejidos después de la inyección en blastocistos.

[0031] Las células madre se clasifican en función de su potencial de desarrollo como: (1) *totipotentes*; (2) *pluripotentes*; (3) *multipotentes*; (4) *oligopotentes*; y (5) *unipotentes*. Células *totipotentes* son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Células *pluripotentes* son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias. Células *multipotentes* incluyen aquellos capaces de dar lugar a un subconjunto de los linajes de células, pero todo dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico en particular (por ejemplo, células madre hematopoyéticas (HSC) puede producir una progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes con restricción de células sanguíneas y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre). Las células que son *oligopotentes* pueden dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes de células que las células madre multipotentes; y las células que son *unipotentes* son capaces de dar lugar a un único linaje celular (*por ejemplo*, células madre de espermatogénesis).

[0032] 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 del adulto puede renovarse. Bajo circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir los tipos de células especializadas del tejido del que se originó, y posiblemente otros tipos de tejidos. Una *célula madre embrionaria* es una célula pluripotente de la masa celular interna de un embrión en 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 *postparto* 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 descubierto que estas células poseen características de las células madre pluripotentes, incluyendo la proliferación rápida y el potencial de diferenciación en muchos linajes celulares. Células madre postparto pueden ser derivadas de la sangre (por ejemplo, como las obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical) o no derivadas de sangre (*p.ej.*, como se obtiene a partir de los tejidos no de sangre del cordón umbilical y

la placenta).

[0033] *Tejido embrionario* se define típicamente como de tejidos 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 placenta (que a su vez forma la corión y la decidua basalis materna).

[0034] *Diferenciación* es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula *diferenciada* 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 celular diferente o vuelven a un tipo celular menos diferenciado. *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*, las células de las que procedía y las células a las que puede dar lugar. El linaje de una célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

[0035] En un sentido amplio, una *célula progenitora* es una célula que tiene la capacidad de crear una progenie que es más diferenciada que ella, y sin embargo, conserva la capacidad para reponer el depósito de progenitores. Por esa definición, las células madre son también células progenitoras, al igual que los precursores más inmediatos a las células terminalmente 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 intermedio en la vía de diferenciación, *es decir*, surge de una célula madre y es intermedio 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 se refiere a este tipo de célula en el presente documento, se referirá a él como una *célula progenitora de no renovación* o como un *progenitor intermedio* o *células precursora*.

[0036] Tal como se utiliza aquí, la expresión *se diferencia en un linaje neural o fenotipo* se refiere a una célula que llega a comprometerse parcial o totalmente con un fenotipo neuronal específico del SNC o SNP, *es decir*, una neurona o una célula glial, incluyendo la última categoría sin limitación los astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y microglia.

[0037] Las células de la presente invención se denominan generalmente como *células derivadas de tejido de cordón umbilical* (o *UTC* o *hUTC* s). A veces también puede denominarse como *células derivadas del cordón umbilical* (*UDC*). Además, las células pueden ser descritas como células madre o progenitoras, utilizándose este último término en el sentido amplio. El término *derivado* se usa 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 las células madre umbilicales y las características únicas de las células de ombligo derivadas de la presente invención se describen en detalle a continuación.

[0038] 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 cultivo" o "cultivadas"). Un *cultivo de células primarias* es un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo antes de la primera subcultura. Las células se *expandieron* 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*.

[0039] 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 se ha pasajeado. 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 se ha pasajeado diez veces puede denominarse como un cultivo *P10*. El cultivo primario, *es decir*, el primer cultivo tras el aislamiento de células a partir de tejido, se designa *P0*. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (*P1* o el pasaje 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (*P2* o el el pasaje 2), y así sucesivamente. Se entenderá por los expertos en la técnica que puede haber muchas duplicaciones de población durante el período de pases; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de las células (*es decir*, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo comprendido entre los pases depende de muchos factores, incluyendo pero no limitado a la densidad de siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento, y el tiempo entre los pases.

[0040] Un *medio acondicionado* es un medio en el que una célula específica o población de células ha sido cultivada, y después se retira. Cuando las células se cultivan en un medio, pudiendo secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, pero no se limitan a hormonas, citoquinas, la matriz extracelular (MEC), proteínas, vesículas, anticuerpos, y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio condicionado.

[0041] Generalmente, un *factor trófico* se define como una sustancia que promueve la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y/o la maduración de una célula, o estimula un aumento de la actividad de una célula. La interacción entre las células a través de factores tróficos se puede producir entre las células de diferentes tipos. La interacción de la célula por medio de factores tróficos se encuentra esencialmente en todos los tipos de células, y es un medio particularmente significativo de la comunicación entre los tipos de células neuronales. Los factores tróficos también pueden funcionar en una forma autocrina, es decir, una célula puede producir factores tróficos que afectan a su propia supervivencia, el crecimiento, la diferenciación, proliferación y/o maduración.

[0042] 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 conocido como *límite de Hayflick*). A pesar de que la senescencia celular fue descrita por primera vez mediante 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 el cultivo incapaz de dividirse). La senescencia no depende de tiempo cronológico, sino que se mide por el número de divisiones celulares o duplicaciones de población que 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, llevan a cabo el mismo número de duplicaciones como células equivalentes cultivadas continuamente. Del mismo modo, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de varios números de duplicaciones de la población y después se descongelan y cultivan, se someten a sustancialmente el mismo número de duplicaciones que células mantenidas en cultivo no congelado. Las células senescentes no están muertas o células moribundas; en realidad son resistentes a la muerte celular programada (apoptosis), y se han mantenido en su estado no dividido de hasta tres años. Estas células son muy vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. No se ha encontrado que el estado no dividido de las células senescentes sea reversible por cualquier agente biológico, químico, o viral.

[0043] El término *afección neurodegenerativa (ni desorden)* es un término inclusivo que abarca enfermedades agudas y crónicas, trastornos o enfermedades del sistema nervioso central o periférico. Una condición neurodegenerativa puede ser relacionada con la edad, o puede ser el resultado de una lesión o trauma, o puede estar relacionada con una enfermedad o trastorno específico. Condiciones neurodegenerativas agudas incluyen, pero no se limitan a afecciones asociadas con la muerte celular neuronal o compromiso incluyendo insuficiencia cerebrovascular, focal o trauma cerebral difuso, daño cerebral difuso, lesión de la médula espinal o el trauma de nervio periférico, por ejemplo, como resultado de quemaduras físicas o químicas, cortes profundos o separación de extremidades. Los ejemplos de trastornos neurodegenerativos agudos son: la isquemia cerebral o infarto incluyendo oclusión embólica y oclusión trombótica, reperfusión tras isquemia aguda, lesión hipóxico-isquémica perinatal, paro cardíaco, así como hemorragia intracraneal de cualquier tipo (por ejemplo, epidural, subdural, subaracnoidea e intracerebral), y lesiones intracraneales e intravertebrales (tales como contusión, penetración, cizallamiento, compresión y laceración), así como el latigazo cervical y el síndrome de niño sacudido. Condiciones neurodegenerativas crónicas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad corporal difusa de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steel-Richardson), degeneración multisistémica (síndrome de Shy-Drager), condiciones epilépticas crónicas asociadas con la neurodegeneración, enfermedades de las neuronas motoras incluyendo esclerosis lateral amiotrófica, ataxias degenerativas, degeneración cortical basal, complejo de demencia de ELA-Parkinson de Guam, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías (incluyendo atrofia sistémica múltiple), afasia progresiva primaria, degeneración estriatonigral, enfermedad de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelosa de tipo 3 y degeneraciones olivopontocerebelares, enfermedad de Gilles de La Tourette, parálisis bulbar y pseudobulbar, la médula y espinobulbar atrofia muscular (enfermedad de Kennedy), esclerosis lateral primaria, paraplejía espástica familiar, enfermedad de Werdnig-Hoffmann, enfermedad de Kugelberg-Welander, enfermedad de Tay-Sach, enfermedad de Sandhoff, enfermedad espástica familiar, enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander, paraparesia espástica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, disautonomía familiar (síndrome de Riley-Day), y enfermedades de priones (incluyendo, pero no limitado a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Straussler Scheinker, Kuru y el insomnio familiar fatal), enfermedades de desmielinización y trastornos que incluyen esclerosis múltiple y enfermedades hereditarias, tales como leucodistrofias.

[0044] Otras condiciones neurodegenerativas incluyen tumores y otras condiciones neoplásicas que afectan al SNC y SNP. Aunque la enfermedad subyacente se considera proliferativa (en lugar de neurodegenerativa), los tejidos circundantes pueden verse comprometidos. Además, la terapia celular puede ser utilizada para entregar las

moléculas antineoplásicas apoptóticas o de otro tipo para el sitio del tumor, *por ejemplo, a través de* la entrega de células modificadas genéticamente que producen tales agentes.

[0045] Otras condiciones neurodegenerativas incluyen diversas neuropatías, tales como neuropatías multifocales, neuropatías sensoriales, neuropatías motoras, neuropatías sensomotoras, neuropatías relacionadas con infecciones, neuropatías autonómicas, neuropatías sensoriales-autónomas, neuropatías desmielinizantes (incluyendo, pero no limitado a, síndrome de Guillain-Barre y síndrome de la polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica), otras neuropatías inflamatorias e inmunes, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por tratamientos farmacológicos, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías traumáticas (incluyendo, pero no limitado a, la compresión, aplastamiento, laceración y segmentación), neuropatías metabólicas, neuropatías endocrinas y neuropatías paraneoplásicos, entre otros.

[0046] Otras condiciones neurodegenerativas incluyen demencias, independientemente de la etiología subyacente, incluyendo demencia relacionada con la edad y otras demencias y afecciones con pérdida de memoria incluyendo demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, enfermedad de materia blanca difusa (enfermedad de Binswanger), demencia de endocrina o origen metabólico, la demencia de traumatismo craneoencefálico y daño cerebral difuso, demencia pugilística y demencia del lóbulo frontal.

[0047] El término *tratamiento (ni tratamiento de) una condición neurodegenerativa* se refiere a la mejora de los efectos de, o retrasar, detener o invertir el progreso de, o retrasar o prevenir la aparición de, una afección neurodegenerativa tal como se define en el presente documento.

[0048] El término *cantidad eficaz* se refiere a una concentración o cantidad 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 afección neurodegenerativa tal como se describe en el presente documento. Con respecto a los factores de crecimiento, una cantidad eficaz puede variar de aproximadamente 1 nanogramo/mililitro a alrededor de 1 microgramo/mililitro. Con respecto a las células como se administra a un paciente *in vivo*, una cantidad eficaz puede variar desde tan pocos como varios cientos o menos a tanto como varios millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad eficaz puede variar de 10^3 - 10^{11} , más concretamente al menos aproximadamente 10^4 células. Se apreciará que el número de células a administrarse 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.

[0049] 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.

[0050] 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.

[0051] El término *vehículo farmacéuticamente aceptable (o medio)*, que se puede usar de forma intercambiable con el término *portador biológicamente compatible o mediano*, se refiere a formas reactivas, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que no sólo son compatibles con las células y otros agentes a administrar terapéuticamente, pero también son, dentro del alcance del juicio médico, adecuado para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otra complicación acorde con una relación razonable de beneficio/riesgo. Como se describe en mayor detalle en el presente documento, los vehículos farmacéuticamente adecuados para uso en la presente invención incluyen líquidos, materiales semi-sólidos (*por ejemplo*, geles) y sólidos (*por ejemplo*, andamios celulares y matrices, hojas, tubos y otros materiales tales como los conocidos en la técnica y se describe en mayor detalle en este documento). Estos 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 reparación de averías y eliminación a través de vías naturales.

[0052] 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 los 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 los 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 una 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 *transferencia xenogénica, trasplantes xenogénicos, xenoinjertos* y similares se refieren a los tratamientos en los que el donante de la célula es de una especie diferente

que el destinatario de la terapia de reemplazo celular.

Descripción

5 **[0053]** Condiciones neurodegenerativas, que abarcan los trastornos y las enfermedades agudas, crónicas y
 progresivas que tienen causas muy divergentes, tienen como característica común la disfunción o pérdida de un
 grupo específico o vulnerables de las células neuronales. Esta coincidencia permite el desarrollo de enfoques
 terapéuticos similares para la reparación y regeneración de tejido neural vulnerable o dañado, una de las cuales es
 10 la terapia basada en células. En sus diversas realizaciones descritas en el presente documento, la presente
 invención presenta métodos y composiciones farmacéuticas para la reparación y regeneración que utilizan células
 progenitoras y poblaciones de células derivadas de tejido del cordón umbilical neural. La divulgación es aplicable a
 cualquier condición neurodegenerativa, pero se espera que sea particularmente adecuada para una serie de
 15 trastornos neuronales para cuyo tratamiento o cura ha sido hasta ahora difícil o no disponible. Estos incluyen, sin
 limitación, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, accidente
 cerebrovascular, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal y lesión del nervio
 periférico (*por ejemplo*, como asociado con la neuropatía diabética). En una realización de la invención, la afección
 neurodegenerativa es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

20 **[0054]** Tal como se ha resumido anteriormente, la invención, en uno de sus aspectos se dirige generalmente a
 células derivadas de tejido de cordón umbilical aislado (UTCs), que se han hecho sustancialmente libre de sangre.
 Los UTCs son capaces de auto-renovación y expansión del cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células
 de fenotipos neuronales. Ciertas realizaciones tienen poblaciones que comprenden tales células, composiciones
 farmacéuticas que comprenden las células o componentes o productos de los mismos, y métodos de uso de las
 25 composiciones farmacéuticas para el tratamiento de pacientes con enfermedades neurodegenerativas agudas o
 crónicas. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical se han caracterizado por sus propiedades de
 crecimiento en cultivo, por sus marcadores de superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad de
 producir ciertos factores tróficos bioquímicos, y por sus propiedades inmunológicas.

Preparación del ombligo y las células de tejido derivadas de placenta

30 **[0055]** De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, una placenta de los mamíferos y el cordón
 umbilical se recuperan en o poco después de la terminación de cualquiera de un embarazo a término el o embarazo
 antes de término, por ejemplo, después de la expulsión después del nacimiento. El tejido puede ser transportado
 desde el lugar de nacimiento a un laboratorio en un recipiente estéril, tal como un frasco, matraz, placa de cultivo, o
 35 una bolsa. El recipiente puede tener una solución o medio, incluyendo, pero no limitado a una solución de sal, tal
 como, por ejemplo, de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o
 cualquier solución utilizada para el transporte de órganos utilizados para el trasplante, tales como la solución de
 Universidad de Wisconsin o solución perfluorada. Uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos, tales como, pero
 40 no limitado a la penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, pueden añadirse al medio o
 tampón. El tejido umbilical y la placenta puede enjuagarse 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 las
 células. Es aún más preferible que el tejido no se congele antes de la extracción de las células umbilicales o
 derivados de la placenta.

45 **[0056]** El aislamiento de las células tiene lugar preferiblemente en un ambiente aséptico. El cordón umbilical se
 puede separar de la placenta por medios conocidos en la técnica. Alternativamente, el cordón umbilical y la placenta
 se utilizan sin separación. La sangre y los desechos se eliminan preferiblemente del tejido antes del aislamiento de
 las células. Por ejemplo, el tejido se puede lavar con una solución tampón, tal como pero no limitado a tampón de
 50 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, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

[0057] Tejido que comprende un cordón umbilical en conjunto, placenta entera o un fragmento o sección del mismo
 se desglosa por fuerza mecánica (fuerzas de picado o cizallamiento). En una realización actualmente preferida, el
 procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. Muchas enzimas son conocidas en
 55 la técnica por ser útiles para el aislamiento de células individuales a partir de matrices de tejidos complejos para
 facilitar el crecimiento en cultivo. Desde las débilmente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y proteasa
 neutra, dispasa) hasta las fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina), tales enzimas están disponibles
 comercialmente. Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles incluye actividades mucolíticas de enzimas,
 metaloproteasas, proteasas neutras, proteasas de serina (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa) y
 60 desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas,
 proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, colagenasas son conocidas por ser útiles para aislar
 diversas células de los tejidos. Desoxirribonucleasas pueden digerir el ADN de una sola cadena y pueden minimizar
 la aglutinación celular durante el aislamiento. Los métodos preferidos implican el tratamiento enzimático con, por
 ejemplo, colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa, y hialuronidasa, y se proporcionan tales métodos en los que
 65 en ciertas formas de realización preferidas, una mezcla de colagenasa y la dispasa de proteasa neutra se utilizan en
 la etapa de disociación. Más preferidos son los métodos que emplean la digestión en presencia de al menos una

colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y, o bien de la actividad de la proteasa, termolisina y dispasa. Aún más preferidos son los métodos que emplean la digestión tanto con colagenasa como con actividades de enzima de dispasa. También son preferidos los métodos que incluyen digestión con una actividad hialuronidasa además de las actividades de la colagenasa y dispasa. El experto en la técnica apreciará que muchos de estos tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para el aislamiento de células de diversas fuentes de tejido. Por ejemplo, la serie LIBERASE™ Blendzyme (Roche) de combinaciones de enzimas son adecuadas para su uso en los presentes procedimientos. Otras fuentes de enzimas son conocidas, y el experto en la técnica también puede 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 otras realizaciones preferidas, se incuba el tejido a 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disociación.

[0058] En algunas realizaciones de la invención, el tejido se separa en secciones que comprenden diversos aspectos del tejido, tales como aspectos neonatales neonatales/maternos, y maternos de la placenta, por ejemplo. 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 neonatal o pueden identificarse por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, por análisis de cariotipo o hibridación *in situ* para un cromosoma Y.

[0059] Las células aisladas o tejido del que hUTC s crecen se pueden utilizar para iniciar, o sembrar cultivos celulares. Las células aisladas se transfirieron a recipientes de cultivo de tejidos estériles o bien no recubiertos o con la matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (nativo, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina, y otras proteínas de la matriz extracelular. hUTC s 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), DMEM avanzada, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, y Cellgro Free™. El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero bovino fetal (SBF), preferiblemente alrededor de 2-15% (v/v); suero equino (SE); suero humano (SH); betamercaptoetanol (BME o 2-ME), preferiblemente de aproximadamente 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (FIL) y la eritropoyetina; aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más y agentes de antibiótico/antimicótico para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, 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, y un agente antibiótico).

[0060] Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. En una realización preferida, las células se cultivaron a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO₂ en el aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivaron a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O₂ en el aire, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O₂ en el aire. Las células preferiblemente se cultivan a aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C y más preferiblemente se cultivan a 37°C. Las células son preferiblemente cultivadas en una incubadora. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Las células preferiblemente se cultivan en bajo estrés oxidativo (*por ejemplo*, con la adición de glutatión, vitamina C, la catalasa, la vitamina E, N-acetilcisteína). "Estrés oxidativo Bajo", como se usa aquí, se refiere a condiciones daño del radical libre a las células cultivadas inexistente o mínimo.

[0061] Los métodos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación del medio, y técnicas de cultivo de células son bien conocidos 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.

[0062] Después de cultivar las células aisladas o fragmentos de tejido durante un período de tiempo suficiente, UTCs se habrán cultivado, ya sea como resultado de la migración de la división de tejido o célula, o ambos. En algunas realizaciones de la invención, UTCs se pasan, o se trasladan a un recipiente de cultivo separado que contiene un medio fresco o un tipo diferente que el utilizado inicialmente, donde la población de células se puede expandir mitóticamente. Las células de la invención se pueden usar en cualquier punto entre el pasaje 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.

[0063] En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos de células presentes en el tejido del cordón umbilical se fraccionan en subpoblaciones de las que las células pueden ser aisladas. Esto puede conseguirse usando técnicas estándar para la separación celular, incluyendo, pero no limitado a, tratamiento enzimático para

disociar el tejido 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 negativa); 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; filtración; centrifugación convencional y zonal; la decantación centrífuga (centrifugación contra-corriente); unidad de separación por gravedad; distribución en contracorriente; electroforesis; y la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Para una revisión de selección y separación de células clonales técnicas, véase Freshney, 1994, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, 3ª ed., Wiley-Liss, Inc., Nueva York.

[0064] 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 pueden removerse y las células restantes se tripsinizaron utilizando técnicas estándar o utilizando un rascador de células. Después de tripsinización, se recogen las células, se eliminan 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 UTCs.

[0065] UTCs pueden ser criopreservados. En consecuencia, en una realización preferida se describe con mayor detalle a continuación, UTCs para la transferencia autóloga (ya sea para la madre o el niño) se pueden derivar de tejidos posparto apropiados después del nacimiento de un niño, criopreservados a continuación de manera que esté disponible en caso de que se necesiten más tarde para el trasplante.

Característico de células derivados del ombligo y de la placenta

[0066] Células derivadas del cordón umbilical y de la placenta se pueden caracterizar, por ejemplo, por las características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de población, tiempo de duplicación, pasajes a la senescencia), análisis de cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos), perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices de chips de genes; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, y PCR convencional)), matrices de proteínas, la secreción de proteínas (por ejemplo, por ensayo de coagulación de plasma o el análisis de medio acondicionado PDC, por ejemplo, por análisis de inmunoabsorción enzimática (ELISA)), reacción mixta de linfocitos (por ejemplo, como medida de la estimulación de PBMCs), y/u otros métodos conocidos en la técnica.

[0067] Los ejemplos de células derivadas de tejido de la placenta se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se asignan números de acceso ATCC de la siguiente manera: (1) la designación de cepa PLA 071003 (P8) se depositó el 15 de junio 2004 y se asignó N° de adhesión PTA-6074; (2) la designación de cepa PLA 071003 (P11) se depositó el 15 de junio de 2004 y se asignó el número de acceso PTA-6075; y (3) la designación de la cepa PLA 071003 (P16) se depositó el 16 de junio de 2004 y se asignó el número de acceso PTA-6079. Los ejemplos de células derivadas de tejido de cordón umbilical se depositaron en la American Type Culture Collection el 10 de junio de 2004, y se asignaron números de acceso ATCC de la siguiente manera: (1) a la designación de cepa UMB 022803 se asignó (P7) N° de acceso PTA-6067; y (2) a la designación de la cepa UMB 022803 (P17) se asignó el número de acceso PTA-6068.

[0068] En diversas realizaciones, las células poseen una o más de las siguientes características de crecimiento (1) que requieren valina L- para el crecimiento en cultivo; (2) que son capaces de crecimiento en atmósferas que contienen oxígeno de aproximadamente 5% a al menos aproximadamente 20% (3) que tienen el potencial para al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de llegar a la senescencia; y (4) que conceden y se expanden en un recipiente de cultivo de tejidos recubiertos o sin recubrir, en el que el recipiente de cultivo de tejido revestido comprende un revestimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

[0069] En ciertas realizaciones, las células poseen un cariotipo normal, que se mantiene como se pasajea las células. El cariotipo es particularmente útil para identificar y distinguir las células neonatales de las maternas derivadas de placenta. Los métodos para la determinación del cariotipo están disponibles y conocidos por los expertos en la técnica.

[0070] En otras realizaciones, las células pueden ser caracterizados por la producción de ciertas proteínas, incluyendo (1) la producción de al menos uno de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa; y (2) la producción de al menos uno de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C marcadores de superficie celular, como se detecta por citometría de flujo. En otras realizaciones, los UTCs se pueden caracterizar por la falta de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR, DP, DQ marcadores de superficie celular, tal como se detecta por citometría de flujo. Particularmente preferidos son las células que producen al menos dos de factor tisular, vimentina y actina de

músculo liso alfa. Más preferidas son las células que producen los tres del factor de proteínas del tejido, vimentina y actina de músculo liso alfa.

[0071] En otras realizaciones, las células se pueden caracterizar por la expresión de genes, 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 un gen que codifica al menos una de interleucina 8; reticulon 1; quimiocina (motivo CXC) ligando 1 (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); Okine Chem (CXC motivo) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); quimiocina (motivo CXC) ligando 3; factor de necrosis tumoral y proteína inducida por alfa 3.

[0072] En otras realizaciones, las células se pueden caracterizar por la expresión de genes, 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 un gen que codifica al menos una de: homeobox de baja estatura 2; choque térmico 27 de proteína kDa 2; quimiocina (motivo CXC) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina (estenosis aórtica supravascular, síndrome de Williams-Beuren); *Homo sapiens* ARNm; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox de mesénquima 2 (homeobox específico a crecimiento detenido); homólogo de homeobox sine oculis 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado desalineado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); homología src tres (SH3) y el dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de endopeptidasa de procolágeno C; homólogo rizado 7 (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteínas homeobox Iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; vesículas sinápticas glicoproteína 2; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina 2, 36 kDa; *Homo sapiens* ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor de citoquina similar a receptor 1; canales de calcio activados/pequeña conductancia intermedia de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ); homeobox homólogo sine oculis 2 (*Drosophila*); Proteína KIAA1034; proteína asociada a vesículas de membrana 5 (miobrevina); proteína de matriz extracelular que contiene EGF de tipo fibulina 1; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro de C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; co-activador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); *Homo sapiens* ARNm inserto de larga duración clon ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; Proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus E1B proteína interactuante 19kDa tipo 3; proteína de unión AE 1; y citocromo c oxidasa subunidad VIIa polipeptídica 1 (músculo).

[0073] En otras realizaciones, las células se pueden caracterizar por la secreción de al menos una de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP- 2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES, y TIMP1. En realizaciones alternativas, las células pueden ser caracterizados por la falta de secreción de al menos una de TGF-beta2, ANG2, PDGFBB, MIP1b, I309, MDC, y VEGF, como se detecta por ELISA.

[0074] En realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más del crecimiento, la producción de marcador de proteína/superficie, la expresión génica antes indicada o características de la sustancia-secreción. Más preferidas son las células que comprenden, tres, cuatro, o cinco o más de las características. Aún más preferidas son células que comprenden seis, siete, u ocho o más de las características. Son aún más preferidas actualmente aquellas células que comprenden la totalidad de las características anteriores.

[0075] En una realización de la invención, las células son células derivadas de tejido de cordón umbilical que se aíslan de tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, puede someterse a al menos 40 duplicaciones, y tienen las siguientes características: (a) expresan cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-a, B, C; (b) no expresan ninguno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD 117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, o HLA-DR, DP, DQ; y (c) aumentan la expresión de la interleucina-8; reticulon 1; y el ligando de receptor de quimiocina (motivo CXC) ligando 3, respecto a la de una célula humana, que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca. En una realización, estas células derivadas del cordón umbilical también tienen una o más de las siguientes características: (a) la secreción de cada uno del factor de MCP-1, MIP1beta, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, RANTES, y TIMP1; y (b) no secreción de cualquiera de los factores de SDF-1 alfa TGF-beta2, Ang2, PDGFBB, MIP1a y VEGF. En otra realización, estas células derivadas de tejido de cordón umbilical no expresan hTERT o telomerasa.

[0076] Entre las células que se prefieren actualmente para su uso con la invención en varios de sus aspectos son células derivadas de tejido de cordón umbilical que tienen las características descritas anteriormente y más particularmente aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con pasajes, y aún más en el que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, y HLA-a, B, C, en el que las células producen las proteínas detectables inmunológicamente corresponden a los marcadores enumerados. Aún más preferidas son aquellas células que además de lo anterior no

producen proteínas correspondientes a cualquiera de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, detectados por citometría de flujo.

[0077] Ciertas células que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de las líneas que conducen a diferentes fenotipos son inestables y por lo tanto pueden diferenciarse de forma espontánea. Actualmente se prefieren para su uso con la invención células que no se diferencian de forma espontánea, por ejemplo a lo largo de líneas neuronales. Las células preferidas, cuando se cultivan en medio de crecimiento, son sustancialmente estables con respecto a los marcadores de células producidas en su superficie, y con respecto al patrón de expresión de diversos genes, por ejemplo como se determina usando un GeneChip® Affymetrix. Las células permanecen sustancialmente constantes, por ejemplo en sus características de marcador de superficie sobre los pasajes, a través de múltiples duplicaciones de la población.

[0078] Sin embargo, una característica de las células es que puede inducirse deliberadamente para diferenciarse en fenotipos de linaje neural sometidos a condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación. Esto puede lograrse por uno o más métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, como se ejemplifica en el presente documento, las células derivadas de tejido de cordón umbilical puede sembrarse en matraces recubiertos de laminina en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contienen B27 (suplemento B27, Invitrogen), L-glutamina y penicilina/estreptomicina, la combinación de los cuales se denomina aquí como medio de progenitoras neurales de expansión (NPE). Medios NPE podrán completarse además con bFGF y/o EGF. Alternativamente, los UTCs pueden ser inducidos a diferenciarse *in vitro* por (1) co-cultivo de los UTCs con células progenitoras neurales, o (2) el cultivo de los UTCs en medio condicionado por células progenitoras neurales.

[0079] La diferenciación de los UTCs se puede demostrar por una morfología celular bipolar con procesos largos. Las poblaciones de células inducidas pueden manchar positivamente para la presencia de nestina. UTCs diferenciados pueden ser evaluados mediante la detección de nestina, TuJ1 (tubulina BIII), GFAP, hidroxilasa de tirosina, GABA, 04 y/o MBP. En algunas realizaciones, UTCs han exhibido la capacidad de formar cuerpos tridimensionales característicos de la formación de células madre neuronales de neuroesferas.

Poblaciones UTC, modificaciones, componentes y productos

[0080] Otro aspecto de la invención presenta las poblaciones de los UTCs descritos anteriormente. 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% de UTCs de la invención. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender además células madre u otras células progenitoras, tales como células progenitoras neurales, o puede comprender además células neuronales completamente diferenciadas. En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo UTCs (preferiblemente al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más UTCs). La población de células homogénea de la invención comprende células derivadas del cordón umbilical. Poblaciones homogéneas de células derivadas del cordón umbilical son preferiblemente libres de células de linaje materno. La homogeneidad de una población de células se puede conseguir mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por clasificación de células (p.ej., citometría de flujo) o por la expansión clonal de acuerdo con métodos conocidos. Por lo tanto, las poblaciones homogéneas UTC preferidas pueden comprender una línea celular clonal de células derivadas de tejido del cordón umbilical. Tales poblaciones son particularmente útiles cuando se ha aislado un clon de células con funcionalidad altamente deseable.

[0081] También se proporcionan en este documento poblaciones de células incubadas en presencia de uno o más factores, o en condiciones, que estimulan la diferenciación celular a lo largo de una vía neurogénica madre. Dichos factores se conocen en la técnica y el experto en la materia apreciarán que la determinación de condiciones adecuadas para la diferenciación se puede lograr con la experimentación de rutina. La optimización de tales condiciones se puede lograr mediante el diseño experimental estadístico y el análisis, por metodología de superficie de respuesta de ejemplo permite la optimización simultánea de múltiples variables, por ejemplo en un cultivo biológico. Actualmente factores preferidos incluyen, pero no se limitan a factores, tales como el crecimiento o factores tróficos, agentes de demetilación, co-cultivo con células neuronales de linaje o cultivo en medio acondicionado de células de linaje neuronal, así como otras condiciones conocidas en la técnica para estimular vástago la diferenciación celular a lo largo de una vía neurogénica o linaje (véase, *por ejemplo*, Lang, KJD et al, 2004, J. Neurosci Res 76: 184-192; Johe, KK et al, 1996, Genes Devel 10: 3129- 3140; Gottlieb, D., 2002, Ann Rev. Neurosci 25: 381-407).

[0082] UTCs también pueden modificarse genéticamente para producir productos génicos neuroterapéuticamente útiles, o para producir agentes antineoplásicos para el tratamiento de tumores, por ejemplo. La modificación genética puede lograrse usando 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; vectores replicantes no integrantes, por ejemplo, vectores de virus papiloma, vectores de SV40, vectores adenovirales; o vectores virales de replicación defectuosa. Otros métodos de introducción de ADN en las células incluyen el uso de liposomas, la electroporación, un disparador de partículas, o por inyección directa del ADN.

- 5 **[0083]** Las 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 potenciador, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable de preferencia. Cualquier promotor puede ser utilizado para conducir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan a, el promotor/potenciador CMV, SV 40, papilomavirus, virus de Epstein-Barr o promotor del gen de la elastina. En algunas realizaciones, los elementos de control utilizados para controlar la expresión del gen de interés pueden 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. Alternativamente, los promotores inducibles se podrían utilizar para conducir la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, los asociados con las proteínas de la metalotioneína y de choque térmico.
- 10
- 15 **[0084]** Después de la introducción del ADN extraño, las células manipuladas pueden dejarse crecer en medio enriquecido y después cambió a medio selectivo. El marcador seleccionable en el DNA extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en las líneas celulares. Este método se puede utilizar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan el producto del gen.
- 20
- 25 **[0085]** Las células de la invención pueden ser modificadas genéticamente para la expresión "knock out" o "tumbar" de factores 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 producto de gen diana en relación con el nivel y/o actividad del producto del gen diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo de una neurona o célula glial puede reducirse o eliminarse utilizando un número de técnicas que incluyen, por ejemplo, inhibición de la expresión mediante la inactivación del gen usando la técnica de recombinación homóloga. Típicamente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exon 5' para dicha región) es interrumpido 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 deleción 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 -3087). Antisentido, ADNzimas, ribozimas, ARN interferente pequeño (ARNsi) y otras moléculas que inhiben la expresión del gen diana también se puede utilizar para reducir el nivel de actividad del gen objetivo. 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 utilizarse en la reducción del nivel de actividad del gen diana. Estas técnicas se describen en detalle por L.G. Davis et al. (eds), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, CN.
- 30
- 35
- 40 **[0086]** En otros aspectos, la descripción proporciona lisados de células y fracciones solubles de células preparadas a partir de UTCs, o poblaciones de células heterogéneas o homogéneas que comprenden UTCs, así como UTCs o poblaciones de los mismos que han sido modificados genéticamente o que han sido estimulados para diferenciar a lo largo de una vía neurogénica. Tales lisados y fracciones de los mismos tienen muchas utilidades. El uso de la fracción soluble de lisado UTC (*es decir*, sustancialmente libre de membranas) *in vivo*, por ejemplo, permite que el medio intracelular beneficioso se utilice alogeneicamente en un paciente sin la introducción de una cantidad apreciable de las proteínas de la superficie celular con más probabilidades de provocar el rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. 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 que contienen por lo tanto factores de crecimiento secretados y similares, o se pueden preparar a partir de células lavadas del medio, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células lavadas se pueden volver a suspender en concentraciones mayores que la densidad de población original, si se prefiere.
- 45
- 50
- 55 **[0087]** En una realización, lisados de células enteras se preparan, *por ejemplo*, mediante la interrupción de las células sin la posterior separación de las fracciones celulares. 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, por ejemplo, centrifugación, filtración, o métodos similares.
- 60
- 65 **[0088]** Los lisados celulares o fracciones de células solubles preparados a partir de poblaciones de células derivadas de tejido de cordón umbilical se pueden utilizar, concentrados adicionalmente por, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secados, parcialmente purificados, en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables o diluyentes como se conocen en la técnica, o en combinación con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo para composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares o fracciones de los mismos pueden ser utilizados *in vitro* o *in vivo*, solos o por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. Los lisados, si se introducen *in vivo*, pueden introducirse de forma local en un sitio de

tratamiento, o de forma remota para proporcionar, por ejemplo, factores de crecimiento celular necesario a un paciente.

[0089] En una realización adicional, UTCs pueden cultivarse *in vitro* para producir productos biológicos con alto rendimiento. Por ejemplo, tales células, que producen de forma natural un producto en particular biológico de interés (*por ejemplo*, un factor trófico), o han sido genéticamente modificadas para producir un producto biológico, se pueden ampliar por clonación utilizando las técnicas de cultivo descritas en el presente documento. Alternativamente, las células se pueden expandir en un medio que induce la diferenciación de un linaje neuronal. En cualquiera de los casos, los productos biológicos producidos por la célula y secretados en el medio se pueden aislar fácilmente a partir del medio 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 HPLC, para nombrar unos pocos. Un "biorreactor" se puede utilizar para aprovechar el método de flujo para la alimentación, por ejemplo, de un cultivo tridimensional *in vitro*. Esencialmente, como medio fresco se hace pasar a través del cultivo en tres dimensiones, el producto biológico se lava fuera del cultivo y puede aislarse de la salida, como se describe anteriormente.

[0090] 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, como se describió anteriormente. El producto biológico puede entonces purificarse usando una cualquiera o más de las técnicas enumeradas anteriormente.

[0091] En otras realizaciones, la descripción proporciona medio condicionado de UTCs cultivadas para uso *in vitro* e *in vivo* como se describe a continuación. El uso del medio acondicionado UTC permite que los factores tróficos beneficiosos secretados por los UTCs se utilicen alogeneicamente en un paciente sin la introducción de células intactas que podrían provocar rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. El medio acondicionado se prepara mediante el cultivo de células en un medio de cultivo, eliminando a continuación las células del medio.

[0092] El medio acondicionado preparado a partir de poblaciones de células derivadas de tejido de cordón umbilical se pueden utilizar, concentrado adicionalmente por, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secado, parcialmente purificado, en combinación con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables como son conocidos en la técnica, o en combinación con otros compuestos tales como productos biológicos, para composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. El medio acondicionado se puede usar *in vitro* o *in vivo*, solo o por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. El medio acondicionado, si se introduce *in vivo*, puede introducirse de forma local en un sitio de tratamiento, o de manera remota para proporcionar, por ejemplo crecimiento celular necesario o factores tróficos a un paciente.

[0093] En otra realización, se prepara una matriz extracelular (MEC) producida por cultivo de UTCs en sustratos líquidos, sólidos o semi-sólidos, se recoge y utiliza como una alternativa a la implantación de células en vivo en un sujeto en necesidad de reparación de tejidos o reemplazo. UTCs se cultivan *in vitro*, en un marco de tres dimensiones como se describe en otra parte en este documento, en condiciones tales que una cantidad deseada de MEC se secreta en el marco. El nuevo tejido se eliminan, y el MEC se procesa para su uso posterior, por ejemplo, como una preparación inyectable. Para lograr esto, las células en el marco mueren y cualquier desecho celular se retira de la estructura. Este proceso puede llevarse a cabo de un número de maneras diferentes. Por ejemplo, el tejido vivo puede congelarse instantáneamente en nitrógeno líquido sin un criopreservativo, o el tejido puede ser sumergido en agua destilada estéril de modo que las células estallen en respuesta a la presión osmótica.

[0094] Una vez que se han matado las células, las membranas celulares pueden interrumpirse y los desechos celulares se eliminan por tratamiento con un enjuague de detergente suave, como EDTA, CHAPS o un detergente zwitteriónico. Alternativamente, el tejido puede ser enzimáticamente digerido y/o se extrae con reactivos que rompen las membranas celulares y permiten la eliminación de contenido de células. Un ejemplo de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas. Los ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alcohol de poliéter de alquilarilo (TRITON X-100), polietoxi-etanol de octilfenoxi (Rohm y Haas Philadelphia, PA), BRIJ-35, un éter de laurilo de polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, CA), polisorbato 20 (TWEEN 20), un monolaurato de sorbitán de polietoxietanol (Rohm y Haas), éter de laurilo de polietileno (Rohm y Haas); y detergentes iónicos tales como, por ejemplo, sulfato de dodecilo de sodio, 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.

[0095] La colección de la MEC se puede lograr de una variedad de maneras, dependiendo, por ejemplo, de si el nuevo tejido se ha formado en una estructura tridimensional que es biodegradable o no biodegradable. Por ejemplo, si el marco no es biodegradable, el MEC 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.

[0096] Si el marco es biodegradable, el MEC puede ser recogido, por ejemplo, al permitir que el marco se degrade o disuelva en solución. Alternativamente, si el marco biodegradable se compone de un material que puede en sí mismo inyectarse junto con el MEC, el marco y el MEC se pueden procesar *en su totalidad* para la inyección

posterior. Alternativamente, el MEC puede ser retirado del marco biodegradable por cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la recolección de MEC de un marco no biodegradable. Todos los procesos de recogida están diseñados preferiblemente para no desnaturalizar la MEC.

5 **[0097]** Después de recogerse, el MEC puede procesarse adicionalmente. Por ejemplo, el MEC se puede homogeneizar a las partículas finas utilizando técnicas bien conocidas en la técnica tales como por tratamiento con ultrasonidos, de modo que pueda pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes de la MEC se pueden reticular, si se desea, por irradiación gamma. Preferiblemente, el MEC puede irradiarse entre 0,25 a 2 mega rads para esterilizar y reticular el MEC. Reticulación química que utiliza agentes que son tóxicos, tal como glutaraldehído, es posible, pero no se prefiere generalmente.

15 **[0098]** Las cantidades y/o proporciones de proteínas, tales como los diversos tipos de colágeno presente en el MEC, se puede ajustar mediante la mezcla de la MEC producida por las células de la invención con MEC 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 el MEC. Los ejemplos de sustancias biológicamente activas incluyen factores de tejido de crecimiento, como TGF-beta, y similares, que promueven la curación y la reparación de tejidos en el sitio de la inyección. Tales agentes adicionales se pueden utilizar en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento anteriormente, por ejemplo, con lisados enteros de células, fracciones de células solubles, o los componentes más purificados y los productos producidos por los UTCs.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden UTCs, componentes o productos UTC

25 **[0099]** En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que utilizan los UTCs, poblaciones UTC, componentes y productos de UTCs en varios métodos para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. Ciertas formas de realización abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas (UTCs solo o mezclado con otros tipos de células). Otras formas de realización abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden componentes UTC celulares (por ejemplo, lisados celulares, fracciones celulares solubles, medio acondicionado, MEC, o componentes de cualquiera de los anteriores) o productos (por ejemplo, factores biológicos tróficos y otros producidos naturalmente por UTCs o a través de modificación genética, medio condicionado del cultivo UTC). En cualquier caso, la composición farmacéutica puede comprender además otros agentes activos, tales como agentes anti-inflamatorios, agentes anti-apoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores neurotróficos o neuroregeneradora o fármacos neuroprotectores como se conocen en la técnica.

35 **[0100]** Ejemplos de otros componentes que pueden añadirse a composiciones farmacéuticas UTC incluyen, pero no se limitan a: (1) otros fármacos neuroprotectores o neurobeneficiosos; (2) 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 drogas (alternativamente, UTCs pueden modificarse genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes anti-apoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimeticuerpo de EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I, inhibidores de caspasa IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos.); (4) compuestos anti-inflamatorios (por ejemplo, inhibidores de quinasa p38 MAP, inhibidores de TGF-beta, estatinas, IL-6 e inhibidores IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE®, SIROLIMUS, y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) (como TEPOXALINA, TOLMETINA, y SUPROFENO); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos, (6) antioxidantes tales como probucol, vitaminas C y E, conenzima Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína, y (7) los anestésicos locales, para nombrar unos pocos.

50 **[0101]** Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden UTCs, o componentes o productos de los mismos, formulados con un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable. 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 WO 96/05309.

60 **[0102]** Por lo general, aunque no exclusivamente, las composiciones farmacéuticas que comprenden componentes o productos UTC, pero no las células vivas, se formulan como líquidos (o tabletas sólidas, cápsulas y similares, cuando la administración oral es apropiada). Estos se pueden formular para administración por cualquier vía aceptable conocida en la técnica para lograr la entrega de medicamentos y moléculas biológicas en el tejido neural objetivo, incluyendo, pero no limitado a, administración oral, nasal, oftálmica o parenteral, incluyendo intravenosa. Rutas particulares de administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o rutas perivertebrales de administración por entrega a través de agujas intracraneales o intravertebrales y/o catéteres con o sin dispositivos de bomba.

[0103] Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas UTC se formulan típicamente en forma de líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, andamios y similares, según sea apropiado para la ingeniería de tejidos neural). Las composiciones líquidas se formulan para administración por cualquier vía aceptable conocido en la técnica para lograr la entrega de células vivas a los tejidos neuronales diana. Normalmente, estos incluyen la inyección o infusión en el SNC o SNP, ya sea de una manera difusa o dirigida al sitio de la enfermedad neurológica o la angustia, por una vía de administración incluyendo, pero no limitada a administración intraocular, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o periespinal de administración mediante la entrega a través de agujas intracraneales o intravertebrales y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

[0104] Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas en un vehículo semi-sólido o sólido se formulan típicamente para la implantación quirúrgica en el sitio de daño neurológico o angustia. Se apreciará que las composiciones líquidas también se pueden administrar mediante procedimientos quirúrgicos. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas semisólidas o sólidas pueden comprender geles semi-permeables, celosías, andamios celulares y similares, que pueden ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede ser deseable o apropiado secuestrar las células exógenas de su entorno, pero permitir que las células secreten y entreguen las moléculas biológicas (*p.ej.* Factores neurotróficos) a células neuronales del entorno. En estas realizaciones, las células se pueden formular como implantes autónomos que comprenden UTCs vivos o población de células que comprenden UTCs rodeados por una barrera no degradable, selectivamente permeable que separa físicamente las células trasplantadas de tejido del huésped. A dichos implantes a veces se refiere como "inmunoprotectores," ya que tienen la capacidad de evitar que las células inmunes y las macromoléculas maten las células trasplantadas en ausencia de inmunosupresión farmacológicamente inducida (para una revisión de tales dispositivos y métodos, véase, *por ejemplo*, P.A. Tresco et al, 2000, *Adv. Drug Delivery Rev.* 42: 3-27).

[0105] En una realización de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden células derivadas de tejido de cordón umbilical, las poblaciones sustancialmente homogéneas que comprenden células derivadas de tejido de cordón umbilical o las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran por vía intravenosa y/o intratecal. En otra realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden células derivadas de tejido de cordón umbilical, las poblaciones sustancialmente homogéneas que comprenden células derivadas de tejido de cordón umbilical o las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran repetidamente por inyección intravenosa y/o intratecal.

[0106] En otras realizaciones, diferentes variedades de geles y redes degradables se utilizan para las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, materiales degradables particularmente adecuados para formulaciones de liberación sostenida incluyen polímeros biocompatibles, tales como poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno, y similares. La estructura, selección y uso de polímeros degradables en vehículos de administración de fármacos se han revisado en varias publicaciones, incluyendo, A. Domb et al, 1992, *Polymers for Advanced Technologies*. 3:279.

[0107] En otras realizaciones, *p.ej.*, para la reparación de lesiones neuronales grandes, tales como una médula espinal dañada o cortada o un cordón neural de una extremidad cortada, puede ser deseable o apropiado para entregar las células sobre o en un andamio o matriz biodegradable, preferiblemente biorreabsorbible o bioabsorbible. Estos biomateriales normalmente tridimensionales contienen las células vivas unidas al andamio, dispersos dentro del andamio, o incorporados en una matriz extracelular atrapada en el andamio. Una vez implantados en la zona objetivo del cuerpo, estos implantes se integran con el tejido del huésped, en el que las células trasplantadas se establezcan gradualmente (véase, *por ejemplo*, PA Tresco *et al.*, 2000, *supra*; véase también DW Hutmacher, 2001, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 12: 107-174).

[0108] Ejemplos de material de andamio o matriz (a los que a veces se hace referencia colectivamente como "marco") que pueden utilizarse en la presente invención incluyen esterillas no tejidas, espumas porosas, o péptidos de autoensamblaje. Esterillas no tejidas pueden, por ejemplo, formarse usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se vende bajo el nombre comercial VICRILLO (Ethicon, Inc., Somerville, NJ), espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procesos tales como liofilización, o liofilizada, como se discute en la Patente de Estados Unidos N° 6.355.699, también se puede utilizar. Los hidrogeles tales como péptidos de autoensamblaje (*por ejemplo*, RAD16) también se pueden utilizar. Redes degradables formadoras *In situ* son también adecuadas para uso en la invención (véase, *por ejemplo*, Anseth, KS et al, 2002, *J. Controlled Release* 78: 199-209; Wang, D. et al, 2003, *Biomaterials* 24: 3969-3980, Patente de EE.UU. 2002/0022676 a He et al.). Estos materiales se formulan como fluidos adecuados para inyección, a continuación, pueden inducirse por una variedad de medios (por ejemplo, cambio en la temperatura, pH, exposición a la luz) para formar redes de hidrogel degradables *in situ* o *in vivo*.

[0109] En otra realización, el marco es un fieltro, que puede estar compuesto de un hilo de multifilamento de un material bioabsorbible, *p.ej.*, PGA, PLA, copolímeros o mezclas de PCL, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro utilizando técnicas de procesamiento textil estándar que consiste en prensar, cortar, cardado y punzonado.

En otra forma de realización, las células se siembran en los andamios de espuma que pueden ser estructuras compuestas.

[0110] En muchas de las realizaciones antes mencionadas, el marco se puede moldear en una forma útil, tal como la de la médula espinal con columnas separadas para la reparación de las vías nerviosas, por ejemplo (Friedman JA et al, 2002, Neurocirugía 51: 742 -51). Además, se apreciará que UTCs pueden ser cultivadas en los dispositivos pre-formados, no degradables quirúrgicos o implantables, *por ejemplo*, de una manera correspondiente a la utilizada para la preparación de bobinas endovasculares GDC que contiene fibroblastos, por ejemplo (Marx, WF et al., 2001, Am. J. Neuroradiol 22: 323-333).

[0111] La matriz, andamio o dispositivo se puede tratar antes de la inoculación de las células con el fin de mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación, las 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. Las superficies externas de un marco también pueden ser modificadas para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tales como por recubrimiento de plasma del marco o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular, y/o otros materiales tales como, pero no limitado a, gelatina, alginatos, agar, de agarosa, y gomas de plantas, entre otros.

[0112] Marcos que contienen UTC se preparan de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden ser cultivadas libremente en un recipiente de cultivo a sub-confluencia o confluencia, levantado a partir del cultivo y se inocularon en el marco. Los factores de crecimiento se pueden añadir al medio de cultivo antes de, durante, o después de la inoculación de las células para desencadenar la formación de la diferenciación y el tejido, si se desea. Alternativamente, los propios marcos pueden ser modificados de manera que el crecimiento de las células sobre el mismo es mayor, o por lo que el riesgo de rechazo del implante se reduce. Por lo tanto, uno o más compuestos biológicamente activos, incluyendo, pero no limitado a, anti-inflamatorios, inmunosupresores o factores de crecimiento, se pueden añadir al marco para la liberación local.

Métodos de uso de las UTC, componentes o productos UTC

[0113] UTCs, o poblaciones de células que comprenden UTCs, o componentes de o productos producidos por UTCs, se pueden usar en una variedad de maneras para apoyar y facilitar la reparación y la regeneración de células y tejidos neuronales. Dichas utilidades abarcan métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Por ejemplo, UTCs, o poblaciones de células que comprenden UTCs, o componentes de o productos producidos por UTCs, se puede utilizar para tratar la esclerosis lateral amiotrófica.

Métodos *in vitro* y *ex vivo*:

[0114] En una realización, UTCs pueden utilizarse *in vitro* para detectar una amplia variedad de compuestos para la eficacia y la citotoxicidad de agentes farmacéuticos, factores de crecimiento, factores reguladores, y similares. Por ejemplo, dicho examen se puede realizar en poblaciones sustancialmente homogéneas de UTCs para evaluar la eficacia y toxicidad de compuestos candidatos a formularse con, o co-administrarse con UTCs, para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. Alternativamente, tal cribado se puede realizar en UTCs que han sido estimulados para diferenciarse en una célula neural o célula progenitora neural, para el propósito de evaluar la eficacia de nuevos fármacos candidatos farmacéuticos. En esta realización, los UTCs se mantienen *in vitro* y se expusieron al compuesto a ensayar. La actividad de un compuesto potencialmente citotóxica 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 crecimiento o factores de regulación se puede evaluar mediante el análisis del número o la robustez de las células cultivadas, en comparación con las células no expuestas a los factores. 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.

[0115] En una realización adicional, como se discutió anteriormente, UTCs pueden ser cultivadas *in vitro* para producir productos biológicos que o bien son producidas naturalmente por las células, o producidas por las células cuando se inducen a diferenciarse en linajes neuronales, o se producen por las células a través de modificación genética. Por ejemplo, se encontró que TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC, e IL-8 se secretaron a partir de células derivadas del cordón umbilical cultivadas en Medio de Crecimiento. Se encontró que TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC, eotaxina e IL-8 se secretó a partir de células derivadas de placenta cultivadas en Medio de Crecimiento (véase ejemplos). Algunos de estos factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen un papel importante en la regeneración neural. Otros factores tróficos, todavía no detectados o no examinados, de uso en la reparación y la regeneración neural, son susceptibles de producirse por UTCs y posiblemente secretarse en el medio.

[0116] En este sentido, otra realización dispone el uso de UTCs para la producción de medio acondicionado, ya sea desde UTCs no diferenciadas o de UTCs incubadas bajo condiciones que estimulan la diferenciación en un linaje

neural. Tales medios acondicionados se contemplan para uso *in vitro* o *ex vivo* de cultivo de células precursoras neurogénicas, o *in vivo* para apoyar células trasplantadas que comprenden poblaciones homogéneas de UTCs o poblaciones heterogéneas que comprenden UTCs y progenitores neurales, por ejemplo.

5 **[0117]** Aún otra realización comprendel el uso de lisados de células UTC, fracciones de células solubles o componentes de las mismas, o MEC o componentes de los mismos, para una variedad de propósitos. Como se mencionó anteriormente, algunos de estos componentes se pueden usar en composiciones farmacéuticas. En otras formas de realización, un lisado celular o MEC se utiliza para recubrir o tratar de otro modo las sustancias o dispositivos para que se utilicen quirúrgicamente, o para la implantación, o para propósitos *ex vivo*, para promover la curación o la supervivencia de células o tejidos en contacto en el curso de tales tratamientos.

10 **[0118]** Como se describe en los Ejemplos 13 y 15, células derivadas del cordón umbilical y placenta han demostrado la capacidad para apoyar la supervivencia, el crecimiento y diferenciación de células progenitoras neurales de adultos cuando se cultiva en co-cultivo con esas células. Por consiguiente, en otra realización, UTCs se utilizan ventajosamente en co-cultivos *in vitro* para proporcionar soporte trófico a otras células, en células neurales particulares y progenitores neurales. Para co-cultivo, puede ser deseable que los UTCs y las otras células deseadas para co-cultivo 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, los UTCs primero pueden cultivarse hasta confluencia y, a continuación servirán como un sustrato para el segundo tipo de célula deseado en cultivo. En esta última realización, las células pueden además estar físicamente separadas, *p.ej.*, por un dispositivo de membrana o similar, de manera que el otro tipo de células puede ser retirado y utilizado por separado, después del período de co-cultivo. El uso de las UTC en co-cultivo para promover la expansión y diferenciación de tipos de células neuronales puede encontrar aplicabilidad en la investigación y en áreas clínicas/terapéuticas. Por ejemplo, el co-cultivo de UTC puede ser utilizado para facilitar el crecimiento y diferenciación de células neuronales en cultivo, para los propósitos de investigación básica o para uso en ensayos de cribado de fármacos, por ejemplo. Co-cultivo de UTC se puede utilizar también para la expansión *ex vivo* de progenitores neurales para la administración posterior para fines terapéuticos. Por ejemplo, las células progenitoras neurales pueden ser cosechadas a partir de un individuo, expandidas *ex vivo* en co-cultivo con las UTC, regresadas a ese individuo (transferencia autóloga) o de otro individuo (singénico o alogénico de transferencia). En estas formas de realización, se apreciará que, tras expansión *ex vivo*, la población mixta de células que comprenden los UTCs y progenitores neurales podrían administrarse 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 los progenitores neurales autólogos para la administración al paciente.

35 **Métodos in vivo:**

40 **[0119]** Como se expone en los Ejemplos 16 y 17, UTCs han demostrado ser trasplantadas con eficacia en el cuerpo, y al suministro de pérdida de la función neural en un modelo animal aceptado para su previsibilidad de la eficacia en seres humanos. Estos resultados apoyan una forma de realización preferida de la invención, en la que UTCs se utilizan en la terapia celular para el tratamiento de una condición neurodegenerativa, como la esclerosis lateral amiotrófica. Una vez trasplantadas en una ubicación neural diana en el cuerpo, UTCs pueden diferenciarse en uno o más de los nervios fenotipos, o pueden proporcionar apoyo trófico para progenitores neurales y células neuronales *in situ*, o pueden ejercer un efecto beneficioso en esas dos modas, entre otros.

45 **[0120]** UTCs pueden administrarse solos (*por ejemplo*, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. Como se describió anteriormente, UTCs se pueden administrar tal como se formula en una preparación farmacéutica con una matriz o estructura, o con vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Cuando UTCs se administran con otras células, se pueden administrar simultánea o secuencialmente con las otras células (ya sea antes o después de las otras células). Las células que se pueden administrar en conjunción con UTCs incluyen, pero no se limitan a, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células progenitoras neuronales, células madre neurales y/o otros multipotentes o las células madre pluripotentes. Las células de diferentes tipos se pueden mezclar con las UTCs inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden co-cultivarse juntos durante un período de tiempo antes de la administración.

50 **[0121]** Las UTCs se pueden administrar con otros medicamentos neuro-beneficiosos o moléculas biológicas, u otros agentes activos, tales como agentes anti-inflamatorios, agentes anti-apoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores neurotróficos o neuroregenerativos o fármacos neuroprotectores como se conoce en la técnica. Cuando UTCs se administran con otros agentes, se pueden administrar juntos en una sola composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas, simultáneamente o secuencialmente con los otros agentes (ya sea antes o después de la administración de los otros agentes).

55 **[0122]** Ejemplos de otros componentes que se pueden administrar con UTCs incluyen, pero no se limitan a: (1) otros fármacos neuroprotectores o neurobeneficiosos; (2) seleccionar los componentes de la matriz extracelular, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas, y fármacos (alternativamente, UTCs pueden ser modificadas genéticamente para expresar y producir factores de

crecimiento); (3) agentes anti-apoptóticos (por ejemplo, la eritropoyetina (EPO), mimeticuerpo, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I EPO, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasas); (4) compuestos antiinflamatorios (*p.ej.*, inhibidores de p38 MAP quinasa, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE®, SIROLIMUS, y fármacos no esteroideos y anti inflamatorios (AINE) (tales como TEPOXALIN, TOLMETINA, y SUPROFENO); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como agentes inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) antioxidantes tales como probucol, vitaminas C y E, conenzima Q-10, el glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; y (7) los anestésicos locales, para nombrar unos pocos.

[0123] En una realización, UTCs se administran como células no diferenciadas, *es decir*, como cultivadas en Medio de Crecimiento. Alternativamente, UTCs se pueden administrar después de la exposición en la cultura a las condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo neural deseado, por ejemplo, los astrocitos, los oligodendrocitos o las neuronas, y más específicamente, neuronas serotoninérgicas, dopaminérgicas, colinérgicas, GABA-érgicas o glutamatérgicas (*véase, por ejemplo*, Isacson, O., 2003. *The Lancet (Neurology)* 2: 417-424).

[0124] Las células de la invención pueden ser implantadas quirúrgicamente, inyectadas, entregadas (*por ejemplo*, por medio de un catéter o jeringa), o de otra manera se administra directa o indirectamente con el sitio de daño neurológico o angustia (*por ejemplo*, para el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica). Las vías de administración de las células de la invención o composiciones de las mismas incluyen, pero no se limitan a la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o peri-espinal de administración por suministro a través de agujas intracraneales o intravertebrales y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

[0125] 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 en el SNC o SNP (por ejemplo, a lo largo de un área difusa afectada, tal como sería el caso en la enfermedad de Parkinson o lesión isquémica difusa, por ejemplo), en la medida que células progenitoras neuronales se han demostrado capaces de la migración extensa desde un punto de entrada al sistema nervioso a un lugar determinado, *por ejemplo*, siguiendo las células gliales radiales o respondiendo a señales químicas.

[0126] De hecho, esta capacidad migratoria de las células madre neurales ha abierto una nueva vía para el tratamiento de los tumores cerebrales malignos, *es decir*, el uso de células progenitoras para la entrega de genes terapéuticos/productos genéticos para el tratamiento de estos tumores migratorios. Por ejemplo, se ha informado de que las células madre neurales, cuando se implanta en gliomas intracraneales *in vivo* en roedores adultos, se distribuyen de forma rápida y extensamente a través del lecho del tumor y migran en yuxtaposición con expansión y el avance de las células tumorales, sin dejar de expresar de manera estable un gen extraño (Abody, K. et al, 2000, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 97: 12.846-12.851). También se espera que UTCs sean adecuadas para este tipo de uso, *es decir*, UTCs modificadas genéticamente para producir un agente de apoptosis u otro antineoplásico, *por ejemplo*, IL-12 (Ehtesham, M. et al, 2002, *Cancer Research* 62: 5657- 5663) o de necrosis tumoral ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor (Ehtesham, M. et al, 2002, *Cancer Research* 62: 7170-7174) se puede inyectar o administrar de otro modo a un sitio general de un tumor maligno (*p.ej.*, glioblastoma), de lo cual las UTCs pueden migrar a las células tumorales para la entrega local del agente terapéutico.

[0127] Otras formas de realización abarcan métodos de tratamiento de condiciones neurodegenerativas (tales como *por ejemplo* la esclerosis lateral amiotrófica) mediante la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden los componentes celulares UTC (por ejemplo, lisados de células o componentes de los mismos) o productos (por ejemplo, trófico y otros factores biológicos producidos naturalmente por UTCs o a través de la modificación genética, el medio de cultivo acondicionado UTC). Una vez más, estos métodos pueden comprender además la administración de otros agentes activos, tales como factores de crecimiento, factores neurotróficos o fármacos neuroregeneradores o neuroprotectores como se conoce en la técnica.

[0128] Las formas de dosificación y los regímenes para la administración de UTCs 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, *p.ej.*, la naturaleza y extensión de la condición neurodegenerativa, edad, sexo, peso corporal y estado médico general, y otros factores conocidos por los médicos. Por lo tanto, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica a administrarse a un paciente se determina por estas consideraciones tal como se conoce en la técnica.

[0129] Debido a que el sistema nervioso central es un tejido un tanto inmunoprivilegiado, puede que no sea necesario o deseable inmunosuprimir un paciente antes de la iniciación de la terapia celular con las UTC. Además, como se expone en el Ejemplo 11, UTCs han demostrado no estimular PBMC alogénicas en una reacción mixta de linfocitos. De acuerdo con ello, el trasplante con UTCs alogénicas, o incluso xenogénicas, puede ser tolerado en algunos casos.

[0130] Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente 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 entrega de las células en un dispositivo de encapsulado, tal como se describe anteriormente. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidas en la técnica. Alternativamente, UTCs se pueden modificar genéticamente para reducir su inmunogenicidad, como se mencionó anteriormente.

[0131] La supervivencia de UTCs trasplantadas en un paciente vivo se puede determinar mediante el uso de una variedad de técnicas de exploración, *p.ej.*, tomografía axial computarizada (TAC o TC), resonancia magnética (RM) o tomografía por emisión de positrones (TEP). La determinación de la supervivencia del trasplante también puede hacerse *post mortem* mediante la eliminación del tejido neural, y examinándolo visualmente o por medio de un microscopio. Alternativamente, las células pueden ser tratadas con manchas que son específicas para las células neurales o productos de los mismos, *p.ej.*, neurotransmisores. Las células trasplantadas también pueden identificarse mediante la incorporación previa de colorantes trazadores tales como microesferas con rodamina o marcados con fluoresceína, azul rápido, micropartículas férricas, bisbenzamida, o productos genéticos informadores introducidos genéticamente, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

[0132] La integración funcional de las UTC trasplantadas en el tejido neuronal de un sujeto puede evaluarse mediante el examen de la restauración de la función neuronal que fue dañada o enferma. Tales funciones incluyen, pero no se limitan a las funciones motoras, cognitivas, sensoriales y endocrinas, de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los neurobiólogos y médicos.

Kits y bancos que comprenden UTCs, componentes o productos UTC

[0133] En otro aspecto, la descripción proporciona kits que utilizan las UTCs, poblaciones UTC, componentes y productos de UTCs en varios métodos para la regeneración y reparación neuronal como se describió anteriormente. En una realización, los kits son útiles para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. Cuando se usa para el tratamiento de condiciones neurodegenerativas, u otro tratamiento programado, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, incluyendo al menos UTCs y el portador 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 hospital de campaña, tales como para uso militar pueden incluir suministros de procedimiento completos 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) UTCs o componentes o productos de UTCs, (2) los reactivos para la práctica del método *in vitro*, (3) células o poblaciones de células, cuando proceda, e (4) instrucciones para la realización del método *in vitro*.

[0134] En otro aspecto, se da a conocer la banca de tejidos, células, componentes celulares y poblaciones celulares. Como se discutió anteriormente, las células son fácilmente criopreservadas. Por consiguiente, la descripción proporciona métodos de crioconservación de las células en un banco, en el que las células se almacenaron congeladas y asociadas con una caracterización completa de las células en base a propiedades inmunológicas, bioquímicas y genéticas de las células. Las células congeladas pueden descongelarse y expandir o utilizarse directamente para terapia autóloga, singénica, alogénica o, dependiendo de los requisitos del procedimiento y de las necesidades del paciente. Preferiblemente, la información sobre cada muestra criopreservada se almacena en un ordenador, en el que se puede buscar en base a los requisitos del cirujano, del procedimiento y del 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 expanden 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 depositar mediante la congelación de las células y la introducción de 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 recuperó y se preparó para uso terapéutico. Los lisados celulares, MEC o componentes celulares preparados como se describe en este documento también pueden ser criopreservados o conservados (*p.ej.*, por liofilización) y depositados.

[0135] Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con mayor detalle. Están destinados a ilustrar, no limitar, la invención.

[0136] Tal como se utiliza en los siguientes ejemplos y en otros lugares en la especificación, el término *medio de crecimiento* se refiere en general a un medio suficiente para el cultivo de UTCs. En particular, un medio actualmente preferido para el cultivo de las células de la invención comprende el medio esencial modificado de Dulbecco (también abreviado a *DMEM* en la presente memoria). Particularmente preferido es *DMEM*-de baja glucosa (también *DMEM-LG* en el presente documento) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El *DMEM*-de baja glucosa se complementa

preferiblemente con 15% (v/v) de suero bovino fetal (*por ejemplo*, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan UT), antibióticos/antimicóticos ((preferiblemente 50-100 unidades/mililitro de penicilina, 50-100 microgramos de estreptomycin/ml, y 0 a 0,25/mililitro de anfotericina B microgramo; Invitrogen, Carlsbad, CA)), y 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). Tal como se utiliza en los ejemplos siguientes, *medio de crecimiento* se refiere a DMEM-bajo de glucosa en suero con 15% fetal bovino y antibióticos/antimicóticos (cuando se incluyen penicilina/estreptomycin, es preferiblemente al 50 U/ml y 50 microgramos/mililitro, respectivamente; cuando la penicilina/estreptomycin/anfotericina B son el uso, es preferentemente al 100 U/ml, 100 microgramos/lilitero millones y 0,25 microgramos/mililitro, respectivamente). En algunos casos se utilizan diferentes medios de cultivo, o se proporcionan diferentes suplementos, y éstos normalmente se indican en el texto como administración de suplementos a medio de crecimiento.

[0137] También en relación con los siguientes ejemplos y utilizado en la especificación en otro lugar, el término *condiciones de crecimiento estándar* se refiere al cultivo de células a 37°C, en una atmósfera estándar que comprende 5% de CO₂. Mientras que las condiciones anteriores son útiles para el cultivo, es de entenderse que tales condiciones son capaces de variarse por el experto en la materia que apreciarán las opciones disponibles en la técnica para el cultivo de células.

[0138] Las siguientes abreviaturas pueden aparecer en los ejemplos y en otros lugares de la memoria y reivindicaciones: *ANG2* (o *Ang2*) para angiopoyetina 2; *APC* por 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); *CK18* para citoqueratina 18; *CNS* para el sistema nervioso central; *CXC ligando 3* para el ligando del receptor de quimioquinas 3; *DMEM* por medio esencial mínimo de Dulbecco; *DMEM: Ig* (o *DMEM:lg*, *DMEM-LG*) de DMEM con bajo nivel de glucosa; *EDTA* para ácido etilendiaminetetraacético; *EGF (ni E)* para el factor de crecimiento epidérmico; *FACS* para fluorescente clasificación de células activada; *FBS* para suero bovino fetal; *FGF (ni F)* para el factor de crecimiento de fibroblastos; *GCP-2* de la proteína quimiotáctica de granulocitos-2; *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* de factor de transcripción específico de hepatocitos 1 alfa; *HUVEC* para las células endoteliales de la vena umbilical humana; *I309* para una quimioquina y el ligando para el receptor de CCR8; *IGF-1* para el factor de crecimiento similar a insulina 1; *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; *LIF* para el factor inhibidor de la leucemia; *MBP* de la proteína básica de la mielina; *MCP-1* de monocitos de proteína quimiotáctica 1; *MDC* para quimioquina derivada de macrófagos; *MIP1alfa* para la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa; *MIP1beta* para la proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta; *MMP* de metaloproteasas de matriz (MMP); *MSC* para las células madre mesenquimáticas; *NHDF* para normales fibroblastos dérmicos humanos; *NPE* para los medios de expansión progenitores neurales; *O4* para oligodendrocitos o marcador de diferenciación glial O4; *PBMC* de células mononucleares de sangre periférica; *PBS* para solución salina tamponada con fosfato; *PDGFBB* para el factor de crecimiento derivado de plaquetas; *PO* para "per os" (por la boca); *PNS* para el sistema nervioso periférico; *Rantes* (o *RANTES*) para regulada en la activación normal de células T expresadas y secretadas; *rhGDF-5* para el crecimiento humano recombinante y factor de diferenciación 5; *SC* para subcutáneamente; *SDF-1 alfa* de factor derivado del estroma-1 alfa; *SHH* para el erizo sónico; *SOP* para el procedimiento operativo estándar; *TARC* para el timo y la quimioquina regulada por activación; *TCP* para el plástico de cultivo de tejidos; *TCPS* de poliestireno de cultivo de tejidos; *TGFbeta2* de factor de crecimiento transformante beta 2; *TGF beta-3* para la transformación del factor de crecimiento beta-3; *TIMP1* de tejido inhibidor de metaloproteinasas de matriz 1; *TPO* para la trombopoyetina; *TuJ1* para BIII tubulina; *VEGF* para el factor de crecimiento endotelial vascular; *vWF* para el factor de von Willebrand; y *alfaFP* de alfa-fetoproteína.

EJEMPLO 1

Derivación de células del tejido umbilicus y de placenta

[0139] Este ejemplo describe la preparación de las células de la placenta y los tejidos del cordón umbilical. Los cordones umbilicales y placentas fueron obtenidos después del nacimiento ya sea de un término o un embarazo prematuro. Las células se recogieron a partir de 5 donantes separados de ombligo y tejido placentario. 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, una característica común a las células madre, o 2) el potencial de proporcionar factores tróficos útiles para otras células y tejidos.

Métodos y Materiales

[0140] Aislamiento de células umbilical. Los cordones umbilicales se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Se obtuvieron los tejidos después de un parto normal. El protocolo de aislamiento de células se realizó asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los residuos, el cable 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 estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B). Los tejidos fueron entonces disociados mecánicamente en 150 cm² placas de cultivo de tejido en

presencia de 50 ml de medio (DMEM-baja glucosa o DMEM-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). El tejido se digiere o bien DMEM-medio de glucosa baja o DMEM-medio de glucosa alta, que contienen cada uno antimicótico y antibióticos como se describe anteriormente. En algunos experimentos, se utilizó una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C: D;" colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 unidades/mililitro, y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro en DMEM:-medio de baja 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 contienen el tejido, medio y enzimas de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

[0141] Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 xg durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento (DMEM: glucosa baja (Invitrogen), 15 por ciento (v) de suero v/bovino fetal (FBS; suero bovino definido; Lote#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), 1 mililitro por 100 mililitros de antimicótico/antimicótico como se describe anteriormente. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de células de 70 micrómetros de nylon (BD Biosciences). 5 mililitros adicionales de enjuague que comprende medio de crecimiento se pasaron a través del filtro. La suspensión de células se pasó después a través de un filtro de células de nylon de 40 micrómetros (BD Biosciences) y se aplicó un enjuague de un 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

[0142] El filtrado se volvió a suspender en medio de crecimiento (volumen total 50 ml) y se centrifugó a 150 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

[0143] Tras la centrifugación final el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros 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.

[0144] Las células aisladas a partir de cordones umbilicales se sembraron a 5.000 células/cm² en gelatina recubierta de T-75 cm² frascos (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento con antibióticos/antimicóticos como se describe anteriormente. Después de 2 días (en varios experimentos, las células se incubaron a partir de 2-4 días), el medio gastado se aspiró de los matraces. 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 pasaje 0) al pasaje 1. En pasajes posteriores (del pasaje 1 a 2 y así sucesivamente), células alcanzaron sub-confluencia (confluencia del 75-85 por ciento) en 4-5 días. Para estos pasajes posteriores, las células se sembraron a 5000 células/cm². Las células se cultivaron en un incubador humidificado con 5 por ciento de dióxido de carbono y el oxígeno atmosférico, a 37°C.

[0145] El aislamiento de la célula placentaria. El tejido placentario se obtuvo de NDRI (Filadelfia, PA). Los tejidos eran de un embarazo y se obtuvieron en el momento de la entrega quirúrgica normal. Se aislaron células de la placenta como se describe para aislamiento de células umbilical.

[0146] El siguiente ejemplo se aplica al aislamiento de poblaciones separadas de células maternas y derivados de origen neonatales de tejido placentario.

[0147] 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 (como se describe arriba) para eliminar la sangre y los residuos. Después, el tejido placentario se disecó en tres secciones: la primera línea (lado neonatal o aspecto), de la línea media (aislamiento de células mixtas neonatal y materna) y la línea de fondo (lado materno o aspecto).

[0148] 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 150 cm² de placas de cultivo de tejido en presencia de 50 ml de DMEM/baja glucosa, 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 medio DMEM-baja glucosa o DMEM-alta glucosa que contiene antibiótico antimicótico (100 U/mililitros de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro anfotericina B) 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-baja glucosa. En otros experimentos una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa se utilizó (C: H: D) (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro, y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro en DMEM-baja glucosa). Los tubos cónicos que contienen 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.

[0149] Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 xg durante 5 minutos, el sobrenadante resultante se aspiró. El sedimento se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento con penicilina/estreptomina/anfotericina

B. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de células de nylon 70 micrómetro (BD Biosciences), aplicándose un enjuague con 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento. La suspensión total de células se pasó por un filtro de células de nylon de 40 micrómetros (BD Biosciences) con 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento como un enjuague.

[0150] El filtrado se volvió a suspender en medio de crecimiento (volumen total 50 ml) y se centrifugó a 150 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más. Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento fresco. Un recuento de células se determinó usando el ensayo de exclusión de azul de tripano. Las células fueron cultivadas en condiciones normales.

[0151] **Aislamiento de células LIBERASE™.** Las células fueron aisladas de tejidos ombligo en medio de DMEM-baja glucosa con LIBERASE™ (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) y hialuronidasa (5 unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y aislamiento de las células era como se describe anteriormente para otros digestiones de proteasa, utilizando la mezcla de LIBERASE™/hialuronidasa en lugar de la C: D o C: mezcla de enzimas H: D. La digestión del tejido con LIBERASE™ resultó en el aislamiento de poblaciones de células de cordón umbilical y tejidos de la placenta que se expandieron fácilmente.

[0152] **Aislamiento de células usando otras combinaciones de enzimas.** Procedimientos se compararon para el aislamiento de células del cordón umbilical utilizando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas para la digestión en comparación incluyen: i) colagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) colagenasa: mezcla de dispasa (C; D); v) colagenasa: mezcla de hialuronidasa (C: H); vi) dispasa: mezcla de hialuronidasa (D: H); y vii) la colagenasa: dispasa: mezcla de hialuronidasa (C: D: H). Las diferencias en el aislamiento de células que utilizan estas diferentes condiciones de digestión enzimática se observaron (Tabla 1-1).

Tabla 1-1: Aislamiento de células de tejido del cordón umbilical utilizando diferentes combinaciones de enzimas

Digestión con enzimas	Células aisladas	Expansión de células
Colagenasa	X	X
Dispasa	+ (> 10 h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa: dispasa	++ (< 3 h)	++
Colagenasa: hialuronidasa	++ (< 3 h)	+
Dispasa: hialuronidasa	+ (> 10 h)	+
Colagenasa: dispasa: hialuronidasa	+++ (< 3 h)	+++

Clave: + = bueno, ++ = muy bueno, +++ = excelente, x = sin éxito probado en condiciones

[0153] **El aislamiento de células de la sangre residual, en los cables.** Se hicieron otros intentos de aislar grupos de células de cordón umbilical por diferentes enfoques. En un ejemplo del cordón umbilical fue cortado en lonchas y se lavaron con medio de crecimiento a desalojar a los coágulos de sangre y material gelatinoso. Se recogió la mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de crecimiento y se centrifugó a 150 x g. El sedimento se resuspendió y se sembró en matraces recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. A partir de estos experimentos se aisló una población de células que fácilmente se expandieron.

[0154] **El aislamiento de las células de sangre de cordón.** Las células también se han aislado de muestras de sangre de cordón alcanzado desde NDRI. El protocolo de aislamiento utilizado aquí era el de la solicitud de patente internacional PCT/US2002/029971 por Ho et al. (Ho, TW et al., WO 2003025149 A2). Las muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de la sangre del cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) se mezclaron con tampón de lisis (155 mM de cloruro de amonio, esterilizado por filtración, 10 bicarbonato milimolar de potasio, 0,1 milimolar de EDTA tamponada a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron en una proporción de 1:20 sangre del cordón a tampón de lisis. La suspensión de células resultante se agitó con vórtex durante 5 segundos, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 xg). El sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contiene 10 por ciento de suero fetal bovino (Hyclone, Logan UT), 4 milimolar de glutamina (Mediatech Herndon, VA), 100 Unidades de penicilina por 100 mililitros y 100 microgramos de estreptomina por 100 mililitros (Gibco, Carlsbad, CA). Se centrifugaron las células resuspendidas (10 minutos a 200 xg), se aspiró el sobrenadante, y el sedimento celular se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en cualquiera de matraces T75 (Corning, NY), frascos recubiertos con laminina T75, T175 o matraces recubiertos de fibronectina (tanto Becton Dickinson, Bedford, MA).

[0155] **El aislamiento de las células utilizando diferentes combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento.** Para determinar si las poblaciones de células podrían aislarse en diferentes condiciones y expandirse

bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, se digirieron las células en medio de crecimiento con o sin 0,001 por ciento (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), utilizando la combinación de enzimas de C: D: H, de acuerdo con los procedimientos previstos anteriormente. Células de la placenta derivadas así aisladas se sembraron bajo una variedad de condiciones. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina/estreptomicina. (Tabla 1-2).

Tabla 1-2: El aislamiento y la expansión del cultivo de células bajo condiciones variables:

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

[0156] El aislamiento de las células utilizando diferentes combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento. En todas las condiciones de las células unidas y expandidas entre el pasaje 0 y 1 (Tabla 1-2). Las células en condiciones 5-8 y 13-16 se demostraron a proliferaron hasta 4 pasajes después de la siembra, en cuyo momento se criopreservaron y se depositaron.

Resultados

[0157] El aislamiento de células utilizando diferentes combinaciones de enzimas. La combinación de C: D: H, proporcionó el mejor rendimiento de células después del aislamiento, y las células generadas que se expandieron para muchas más generaciones en el cultivo de las demás condiciones (Tabla 1). Una población de células expandible no se logró usando colagenasa o hialuronidasa. No se hizo ningún intento para determinar si este resultado es específico para el colágeno que se probó.

[0158] El aislamiento de las células utilizando diferentes combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento. Células unidas y ampliadas entre el pasaje 0 y 1 en todas las condiciones ensayadas para la digestión enzimática y el crecimiento (Tabla 2). Las células en condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pasajes después de la siembra, momento en el que se criopreservaron. Todas las células se depositaron para una mayor investigación.

[0159] El aislamiento de las células de la sangre residual en los cables. Células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron por citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas por digestión enzimática.

[0160] El aislamiento de las células de sangre de cordón. Las preparaciones contenían células rojas de la sangre y plaquetas. No hay células nucleadas se unieron y dividieron durante las primeras 3 semanas. El medio se cambió 3 semanas después de la siembra y no se observó que células se unieran y crecieran.

5 **[0161] Resumen.** Las poblaciones de células pueden ser derivadas de cordón umbilical y tejido de la placenta de manera eficiente utilizando la colagenasa de combinación de enzimas (una metaloproteasa de matriz), dispasa (una proteasa neutra) y hialuronidasa (una enzima mucolítica que rompe el ácido hialurónico). LIBERASE™, que es un Blendzyme, también se puede utilizar. Específicamente, Blendzyme 3, que es la colagenasa (4 Wunsch unidades/g) y la termolisina (1.714 caseína Unidades/g) también se utilizó junto con hialuronidasa para aislar células. Estas
10 células se expandieron fácilmente sobre muchos pasajes cuando se cultivaron en medio de crecimiento en el plástico recubierto de gelatina.

[0162] Las células también se aislaron de sangre residual en las cuerdas, pero no la sangre del cordón. La presencia de células en los coágulos de sangre se ha lavado de los tejidos, que se adhieren y crecen bajo las
15 condiciones utilizadas, puede deberse a las células que se liberan durante el proceso de disección.

EJEMPLO 2

Características de crecimiento de las células derivadas del cordón umbilical y placenta

20 **[0163]** El potencial de expansión de las células del tejido del cordón umbilical y células provenientes 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 L. (1974) J Apgeriatr Soc. 22: 1-12; Hayflick L. (1974) Geontologist 14: 37-45). Células derivadas de tejido de cordón umbilical son muy adecuadas para uso terapéutico ya
25 que pueden fácilmente ampliarse para el número de células suficientes.

Materiales y métodos

30 **[0164] Matraces de recubrimiento de gelatina.** Matraces de plástico de cultivo de tejidos se recubrieron mediante la adición de 20 mililitros 2% (w/v) de gelatina porcina (tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a un matraz T75 (Corning, Corning, NY) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de gelatina, solución salina tamponada con fosfato de 10 mililitros (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) se añadió y después se aspiró.

35 **[0165] Comparación de la expansión potencial de UTCs con otras poblaciones celulares.** Para la comparación del crecimiento potencial de expansión 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 Estados Unidos número 6.555.374 B1; Sol. Apl. de EE.UU. 2004/0058412); iii) fibroblastos de la piel dérmica normal (CC-2509 Lote#9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); iv) derivados de las células ombligo; y v) las células derivadas de la
40 placenta (Sol. Apl. de EE.UU. 2004/0048372). Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento con penicilina/estreptomizina/anfotericina B. Para pasajes 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. La suspensión celular (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 mililitros, Sigma, St. Louis MO). El número de células viables se estimaron usando un hemocitómetro.

45 **[0166]** Después del conteo, las células se sembraron a 5.000 células/cm² en recubiertos de gelatina T 75 matraces en 25 mililitros de medio de crecimiento fresco. Las células se cultivaron en condiciones estándar a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia que se pasaron; este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron la senectud.

50 **[0167]** En cada pasaje, se trataron con tripsina y se contaron las células. El rendimiento de células viables, duplicación de la población [E_n (final celular/inicial de células)/ln 2] y 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
55 factor de expansión para cada pasaje ($i.E.$, La expansión = factor de célula inicial final/célula).

[0168] Potencial de expansión de los bancos de células a baja densidad. El potencial de expansión de las células en bancos en el Pasaje 10 se ensayó también, utilizando un conjunto diferente de condiciones. Se ensayaron células ombligo, derivados, así como células derivados de la placenta; fibroblastos normales de la piel dérmica (Cambrex, Walkersville, MD CC-2509 Lote#9F0844). Estas poblaciones de células habían sido almacenadas en el Pasaje 10 anteriormente, después de haberse cultivado a 5.000 células/cm² y cultivado hasta confluencia en cada Pasaje a ese punto. Se determinó el efecto de la densidad celular en las poblaciones de células tras descongelación de células en el Pasaje 10. Las células se descongelaron en condiciones estándar y se contaron usando tinción de azul de tripano. Las células descongeladas se sembraron a continuación, 1000 células/cm² en DMEM: bajo medio de crecimiento de glucosa con antibiótico/antimicótico como se describe anteriormente. Las células fueron cultivadas en
60 condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces a la semana y se pasaron

las células a medida que alcanzaron aproximadamente 85% de confluencia. Las células se pasaron posteriormente hasta la senectud, *i.e.*, hasta que no pudieron ser ampliarse más. Las células se trataron con tripsina y se contaron en cada pasaje. El rendimiento celular, 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). El rendimiento total de células por Pasaje se determinó multiplicando el rendimiento total para el Pasaje anterior por el factor de expansión para cada Pasaje (es decir, expansión = factor de célula final/célula inicial).

[0169] Expansión de las UTC a baja densidad de siembra de células inicial. El potencial de expansión de las UTC recién aisladas en condiciones de baja siembra de células se puso a prueba. UTCs se prepararon como se describe en este documento. Las células se sembraron a 1000 células/cm² 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 ($\ln(\text{célula final}/\text{célula inicial})/\ln 2$) 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, factor de expansión = célula final/célula inicial). Las células se cultivaron en matraces recubiertos y no recubiertos de gelatina.

[0170] La expansión de células derivadas de la placenta neonatales clonales. La clonación se utilizó con el fin de expandir una población de células neonatales de tejido placentario. Después del aislamiento de tres poblaciones de células diferenciales a partir de la placenta (como se describe en el presente documento), estas poblaciones de células se expandieron en condiciones de crecimiento estándar y después cariotipo para revelar la identidad de las poblaciones de células aisladas. Debido a que las células fueron aisladas de una madre que parió un niño, era fácil de distinguir entre los cromosomas masculinos y femeninos mediante la realización de metafasa para untar. Estos experimentos demostraron que las células fetales-aspecto eran cariotipo positivo para fenotipos neonatales, células de capa intermedia eran cariotipo positivo tanto para fenotipos neonatales como maternos y células maternas-aspecto eran cariotipo positivo para células maternas.

[0171] La expansión de las células en condiciones de poco cultivo de oxígeno. Se ha demostrado que las condiciones de cultivo de células bajas en oxígeno pueden mejorar la expansión de células en ciertas circunstancias (Sol. Pub. EE.UU. 2004/0005704). Para determinar si la expansión de células de UTCs podría mejorarse mediante la alteración de las condiciones de cultivo de células, cultivos de Células derivadas de cordón umbilical se cultivaron en condiciones de bajo oxígeno. Las células se sembraron a 5000 células/cm² en medio de crecimiento en matraces recubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente bajo condiciones atmosféricas normales a través del Pasaje 5, momento en el que fueron transferidas a condiciones de cultivo de bajos niveles de oxígeno (5% O₂).

[0172] Otras condiciones de crecimiento. En otros protocolos, las células se expandieron en placas no recubiertas, recubiertas de colágeno, recubiertas de fibronectina, recubiertas de laminina y recubiertas de proteína matriz extracelular. Los cultivos se han demostrado expandir bien en estos diferentes matrices.

Resultados

[0173] Comparación del potencial de expansión de UTCs con otras células madre y las poblaciones de células no madre. Tanto células derivadas de umbilical como las derivadas de la placenta se expandieron para más de 40 pasajes que generan rendimientos celulares de > células 1E17 en 60 días. Por el contrario, las MSC y los fibroblastos seniles después de <25 días y <60 días, respectivamente. Aunque las células derivadas de tejido adiposo expandido por casi 60 días, se generaron los rendimientos totales de células de 4.5E12. Por lo tanto, cuando se sembraron a 5000 células/cm² en las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas de posparto se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células cultivadas bajo las mismas condiciones (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células cultivadas a la senescencia

Tipo de célula	Senectud	Duplicaciones de población total	Rendimiento total de la célula
MSC	24 d	8	4,72 E7
Adiposo	57 d	24	4,5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2,82 E13
Ombligo	65 d	42	6,15 E17
Placenta	80 d	46	2,49 E19

[0174] Potencial de expansión de los bancos de células a baja densidad. Células derivadas del cordón

umbilical, derivadas de la placenta y fibroblastos se expandieron durante más de 10 pasajes que generan rendimientos celulares > células 1E11 en 60 días (Tabla 2-2). Después de 60 días en estas condiciones, los fibroblastos se hicieron senescentes mientras que las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical y derivadas de placenta llegó a la senectud después de 80 días, completando > 50 y > 40 duplicaciones de la población, respectivamente.

Tabla 2- 2: Características de crecimiento para las diferentes poblaciones celulares usando la expansión de bajo crecimiento de la densidad del Pasaje 10 hasta la senescencia

Tipo de célula	Senectud	Duplicaciones de población total	El rendimiento total de la célula
Fibroblastos (P10)	80 d	43,68	2,59 E11
Ombligo (P10)	80 d	53,6	1,25 E14
Placenta (P10)	60 d	32,96	6,09 E12

[0175] La expansión de las UTC a baja densidad de siembra de células inicial. UTCs se ampliaron a baja densidad (1.000 células/cm²) 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 5000 células/cm² 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. Sin embargo, las células parecían fenotípicamente mucho más pequeñas en matraces recubiertos de gelatina y se observaron más fenotipos de células más grandes en frascos no recubiertos.

[0176] La expansión clonal de neonatal o células derivadas de la placenta materna. Una población de células neonatales clonales o maternas se puede ampliar a partir de células derivadas de placenta aisladas del aspecto neonatal o el aspecto materno, 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/cm² en medio de crecimiento. La subclonación se lleva a cabo para asegurar que una población clonal de las células ha sido identificada. Para experimentos de subclonación, las células se trataron 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 cm²/matraz. Las células se pasaron a 5.000 células cm²/matraz T75. Las características de crecimiento de un clon se pueden trazar para demostrar la expansión celular. El análisis de cariotipo puede confirmar que el clon es ya sea neonatal o materna.

[0177] La expansión de las células en condiciones de poco cultivo de oxígeno. Las células se expandieron bien bajo condiciones de oxígeno reducido, sin embargo, el cultivo en condiciones de bajo oxígeno no parece tener un efecto significativo en la expansión de células de UTCs en las condiciones utilizadas.

[0178] Resumen. Condiciones de la expansión de células que comprenden células en crecimiento derivadas de tejido de cordón umbilical aisladas a densidades de alrededor de 5000 células/cm², en medio de crecimiento en matraces recubiertos de gelatina o sin recubrimiento, de conformidad con el oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar grandes números de células en el Pasaje 11. Además, los datos sugieren que las células pueden expandirse fácilmente utilizando condiciones de cultivo de densidad más bajas (por ejemplo, 1000 células/cm²). La expansión de células derivadas de tejido de cordón umbilical en condiciones de bajo oxígeno también facilita la expansión de las células, aunque todavía no se ha observado mejora incremental en el potencial de la expansión de células cuando se utilizan estas condiciones de crecimiento. En la actualidad, el cultivo de células derivadas de tejido del cordón umbilical en condiciones atmosféricas normales se prefiere para la generación de grandes grupos de células. Sin embargo, cuando se alteran las condiciones de cultivo, la expansión de células derivadas de tejido del cordón umbilical puede igualmente alterarse. Esta estrategia se puede utilizar para mejorar la capacidad de proliferación y diferenciación de estas poblaciones de células.

[0179] En las condiciones utilizadas, mientras que el potencial de expansión de células derivadas de tejido de MSC y adiposo es limitado, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se amplía fácilmente a un gran número.

EJEMPLO 3

Evaluación de medios de crecimiento de las células derivadas de placenta

[0180] 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

5 **[0181]** Las células derivadas de la placenta en el Pasaje 8 (P8) se sembraron a 1 x 10³ células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento con penicilina/estreptomicina. Después de 8 horas el medio se cambió como se describe a continuación y se incubaron las células en oxígeno normal (atmosférico) o bajo (5% v/v) a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 horas. MTS se añadió al medio de cultivo (Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI) durante 3 horas y la absorbancia medida a 490 nanómetros (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

Tabla 3-1. Medios de cultivo

Medio de cultivo	Proveedor	suero bovino fetal Añadido% (v/v)
DMEM de baja glucosa	Gibco Carlsbad CA	0, 2 10
DMEM rico en glucosa	Gibco	0, 2 10
RPMI 1640	Mediatech, Inc. Herndon, VA	0, 2 10
Cell gro-free (libre de suero, libre de proteínas)	Mediatech, Inc.	-
F10 de Ham	Mediatech, Inc.	0, 2 10
MSCGM (completo con suero)	Cambrex, Walkersville, MD	0, 2 10
Completo libre de suero c/albúmina	Mediatech, Inc.	-
Medio de crecimiento	N/A	-
F12 de Ham	Mediatech, Inc.	0, 2 10
Iscove	Mediatech, Inc.	0, 2 10
Medio Basal de Eagle	Mediatech, Inc.	
DMEM/F12 (1:1)	Mediatech, Inc.	0, 2 10

Resultados

35 **[0182]** 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.

40 **[0183] El efecto de suero.** 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. 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 apreciablemente en Cellgro Free™, F10 y DMEM de Ham.

45 **[0184] El efecto del oxígeno.** Oxígeno reducido pareció aumentar la tasa de crecimiento de las células en medio de crecimiento, F10 de Ham, y MSCGM. Con el fin de crecimiento decreciente, los medios de comunicación que resulta en el mejor crecimiento de las células eran Medio de Crecimiento >MSCGM> de Iscove + 10% FBS = DMEM-H + 10% FBS = F12 de Ham + 10% FBS = RPMI 1640 + 10% FBS.

50 **[0185] Resumen.** Células derivadas de placenta pueden cultivarse en una variedad de medios de cultivo en oxígeno normal o bajo. Crecimiento a corto plazo de células derivadas de la placenta se determinó en doce medios basales con suero de 0, 2 y 10% (v/v) en 5% o el oxígeno atmosférico. En general, las células derivadas de la placenta no crecieron tan bien en condiciones libres de suero con la excepción de F10 de Ham y Cellgro FREE™, que también están exentos de proteínas. El crecimiento de estos medios libres de suero era de aproximadamente 25-33% del crecimiento máximo observado con los medios de comunicación que contiene 15% de suero.

EJEMPLO 4

El crecimiento del tejido del cordón umbilical y células derivadas de placenta en medio que contiene D-valina

60 **[0186]** 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 J. 2000. Cell Biol Int 24: 1- 7; Sordillo et al 1988. Cell Biol Int Rep.12: 355-64). No se sabía con anterioridad si el tejido del

cordón umbilical y células derivadas de la placenta podrían crecer en medio que contiene D-valina.

Métodos y Materiales

5 [0187] Las células derivadas de la placenta (P3), fibroblastos (P9) y células derivadas umbilicales (P5) se sembraron a 5×10^3 células/cm² 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 medio residual. El medio se reemplazó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (orden de Gibco especial), 15% (v/v) suero fetal bovino dializado (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) betamercaptoetanol (Sigma), penicilina/estreptomicina (Gibco)).

Resultados

15 [0188] Células derivadas de placenta, derivadas umbilicalmente y de fibroblastos sembrados 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 separada de la superficie del matraz después de 4 semanas. Estos resultados indican que el medio que contiene D-valina no es adecuado para las células derivadas posparto de crecimiento selectivo.

EJEMPLO 5

Medios de criopreservación para las células derivadas del Placenta

25 [0189] Se evaluaron los medios de criopreservación para la criopreservación de células derivadas de placenta.

Métodos y Materiales

30 [0190] Las células derivadas de la placenta se cultivan en medio de crecimiento en un matraz T75 recubierto con gelatina se lavaron con PBS y se tripsinizaron usando 1 mililitro de tripsina/EDTA (Gibco). El tratamiento con tripsina se detuvo añadiendo 10 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 xg, el sobrenadante eliminado, y el sedimento celular se resuspendió en 1 mililitro de Medio de Crecimiento. Una parte alícuota de suspensión celular, 60 microlitros, se retiró y se añadió a 60 microlitros de azul de tripano (Sigma). El número de células viables se estimó utilizando un hemocitómetro. La suspensión celular se dividió en cuatro alícuotas iguales que contienen cada uno 88×10^4 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).

- 35 1.) Medio de Crecimiento +10% (v/v) de DMSO (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO)
- 40 2.) Medio de congelación de células w/DMSO, c/celulosa de metilo, libre de suero (C6295, Sigma, St. Louis, MO)
- 3.) Medio de congelación de células (C2639, Sigma, St. Louis, MO) libre de suero
- 4.) Medio de congelación de células c/glicerol (C6039, Sigma, St. Louis, MO), las células se enfriaron a aproximadamente -1°C/min durante la noche en un congelador a -80°C usando un contenedor "Mr Frosty" 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 descongelarse rápidamente en un baño de agua 45 37°C. Las células se añadieron a 10 mililitros de medio de crecimiento y se centrifugaron antes de estimarse el número de células y la viabilidad. Las células se sembraron en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm² para determinar si las células se conectan y proliferan.

Resultados

50 [0191] La viabilidad inicial de las células a criopreservarse se evaluó mediante tinción con azul de tripano al 100%. La viabilidad inicial de las células a criopreservarse se evaluó mediante tinción con azul de tripano para ser 100%.

55 [0192] Se observó una reducción proporcional en el número de células con la viabilidad de las células C6295 debido a la lisis. Las células viables criopreservadas en las cuatro soluciones unieron, dividieron, y produjeron una monocapa confluyente dentro de 3 días. No hubo diferencia apreciable en la tasa de crecimiento estimada.

60 [0193] **Resumen.** La criopreservación de células es un procedimiento disponible para la preparación de un banco de células o un producto celular. Cuatro mezclas de criopreservación se compararon por su capacidad para proteger las células derivadas de la placenta humana de daños por congelación. Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y 10% (v/v) sulfóxido de dimetilo (DMSO) es el medio preferido de los comparados para la criopreservación de células derivadas de la placenta.

EJEMPLO 6

Análisis de cariotipo de tejido del cordón umbilical y las células derivadas de Placenta

[0194] Las líneas celulares utilizadas en la terapia celular son preferentemente homogéneas y libres de cualquier tipo de célula contaminante. Las células utilizadas en la terapia de células deben tener un número normal de cromosomas (46) y estructura. Para identificar líneas celulares derivadas de placenta y umbilical que son homogéneas y libres de células de origen no de tejido post-parto, se analizaron los cariotipos de las muestras de células.

Materiales y métodos

[0195] UTCs de tejido post-parto de un recién nacido macho se cultivaron en medio de crecimiento que contiene penicilina/estreptomycin. Tejido posparto de un recién nacido macho (X, Y) se selecciona para permitir la distinción entre las células derivadas neonatales y células derivadas de la madre (X, X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron a 80% de confluencia. Un matraz T25 que contiene células se llenó hasta el cuello con Medio de Crecimiento. Las muestras fueron entregadas a un laboratorio de citogenética clínica por mensajería (el tiempo de transporte de laboratorio a laboratorio es de una hora). Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células contadas en metafase, cinco fueron analizadas por el número cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra de células se caracterizó como homogéneas cuando 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

[0196] Todas las muestras de células enviadas para análisis cromosómico se interpretaron de modo que presentaba un aspecto normal. Tres de las dieciséis líneas celulares analizadas mostraron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) que indica la presencia de células derivadas de ambos orígenes neonatal y materno (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 era heterogénea (XX/XY), lo que indica una presencia no detectada previamente de las células de origen materno.

Tabla 6-1. Resultados del análisis de cariotipo de células

Tejido	Pasaje	contaron las células en metafasa	analizaron las células en metafasa	número de cariotipo	Cariotipo ISCN
Placenta	22	20	5	2	46, XX
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Placenta	2	20	5	2	46, XX
Umbilical	3	20	5	2	46,XX
Placenta-N	0	20	5	2	46, XY
Placenta-V	0	20	5	2	46, XY
Placenta-M	0	21	5	4	46, XY[18]/46,XX[3]
Placenta-M	4	20	5	2	46,XX
Placenta-N	9	25	5	4	46, XY[5]/46,XX[20]
Placenta-N C ₁	1	20	5	2	46, XY
Placenta N-C ₃	1	20	6	4	46, XY[2]/46,XX[18]
Placenta N-C ₄	1	20	5	2	46, XY
Placenta N-C ₁₅	1	20	5	2	46, XY
Placenta N-C ₂₀	1	20	5	2	46, XY

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

[0197] **Resumen.** El análisis cromosómico identificó células derivadas de placenta de ombligo cuyos cariotipos parecían normales tal como se interpretó por un laboratorio de citogenética clínica. El análisis de cariotipo también identificó líneas de células libres de células maternas, como se determina por el cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 7**Evaluación del cordón umbilical humano de tejidos y marcadores de superficie celular derivada de placenta por citometría de flujo**

[0198] 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. Las líneas celulares aisladas de la placenta y ombligo se caracterizaron (por citometría de flujo), proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

Materiales y métodos

[0199] **Los vasos de medios y cultivo.** Las células fueron cultivadas en Medio de Crecimiento (Gibco Carlsbad, CA) con penicilina/estreptomicina. Las células fueron cultivadas en matraces de cultivo tisular tratados con plasma T75, T150 y T225 (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.

[0200] **La tinción de anticuerpos y análisis de citometría de flujo.** Las células adherentes en matraces se lavaron en PBS y se desprendieron con tripsina/EDTA. Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. De acuerdo a las especificaciones del fabricante, el anticuerpo para el marcador de superficie celular de interés (véase más adelante) se añadió a un centenario de 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. Citometría de flujo El análisis se realizó con un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

[0201] Se utilizaron los siguientes anticuerpos frente a marcadores de superficie celular.

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

[0202] **Comparación de placenta y ombligo.** Células derivadas de la placenta se compararon con células derivadas del cordón umbilical en el Pasaje 8.

[0203] Comparación de Pasaje a Pasaje. Células derivadas de placenta y ombligo se analizaron en pasajes 8, 15, y 20.

[0204] Comparación de donante a donante. Para comparar las diferencias entre los donantes, células derivadas de la placenta de diferentes donantes se compararon entre sí, y las células derivadas del cordón umbilical de diferentes donantes se compararon entre sí.

[0205] 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. Células derivadas del cordón umbilical cultivadas en matraces recubiertos de gelatina se comparó con células derivadas del cordón umbilical cultivadas en matraces recubiertos.

[0206] Comparación de 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/dispa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispa se compararon.

[0207] Comparación de capa placentaria. Las células derivadas desde el aspecto maternal de tejido de la placenta se compararon a las células derivadas de la región de las vellosidades de tejido de la placenta y células derivadas del aspecto fetal neonatal de placenta.

Resultados

[0208] Comparación placenta vs. ombligo. Células derivadas de placenta y ombligo analizadas por citometría de flujo mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, indicados por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD 141, y HLA-DR, DP, DQ, indicadas por los valores de fluorescencia comparable a la de control de IgG. Las variaciones en los valores de fluorescencia de curvas positivas fueron contabilizados. La media (*es decir*, CD 13) y el rango (*es decir*, CD90) de las curvas positivas mostraron alguna variación, pero las curvas parecían normales, lo que confirma una población homogénea. Ambas curvas individualmente exhibieron valores mayores que el control de IgG.

[0209] Comparación Pasaje a Pasaje - células derivadas de placenta. Células derivadas de placenta en pasajes 8, 15, y 20 se analizaron por citometría de flujo eran positivos para la expresión 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 expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ teniendo valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0210] Comparación Pasaje a Pasaje - células derivadas del cordón umbilical. Células derivadas del ombligo en el Pasaje 8, 15, y 20 se analizaron por citometría de flujo todos expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, indicado por el aumento de la fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicado por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0211] Comparación donante a donante - células derivadas de placenta. Células derivadas de placenta aisladas de donantes independientes analizadas 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 expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD 141, y HLA-DR, DP, DQ como se indica por valor de fluorescencia de acuerdo con el control de IgG.

[0212] Comparación donante a donante - células derivadas del cordón umbilical. Células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes independientes analizadas por citometría de flujo mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, que se refleja en el aumento de los valores de la fluorescencia relativa a la control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD 117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0213] El efecto de recubrimiento de la superficie con la gelatina en las células derivadas de placenta. Células derivadas de placenta expandidas en cualquiera de los matraces recubiertos de gelatina o sin recubrimiento analizadas por citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ indicado por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0214] El efecto de recubrimiento de la superficie con la gelatina en las células derivadas del cordón umbilical. Células derivadas del cordón umbilical se ampliaron en gelatina y matraces sin recubrimiento analizados por citometría de flujo fueron positivos para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, con un aumento de los valores de fluorescencia relativos al control de IgG. Estas células fueron negativas

para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0215] Efecto de procedimiento de digestión enzimática utilizada para la preparación de las células sobre el perfil de marcador de superficie celular. Células derivadas de placenta aisladas usando 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 de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión 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.

[0216] Comparación de capa placentaria. Las células aisladas de las capas materna, de vellosidades, y neonatales de la placenta, respectivamente, analizadas por citometría de flujo mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, alfa PDGFR y HLA-A, B, C, como se indica por el aumento del valor de la fluorescencia en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión 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.

[0217] Resumen. Análisis de células derivadas de placenta y de ombligo por citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Las células derivadas de placenta y de ombligo son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, alfa PDGFR, HLA-A, B, C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad era consistente entre las variaciones de variables que incluyen el donante, Pasaje, revestimiento de la superficie recipiente de cultivo, las enzimas de digestión, y la capa de la placenta. Alguna variación en medios y rangos de curva de histograma de valor de fluorescencia individual se observó, 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.

EJEMPLO 8

Caracterización inmunohistoquímica de cordón umbilical y fenotipos de tejido de placenta

[0218] Los fenotipos de células que se encuentran dentro del cordón umbilical y de la placenta humana se analizaron por inmunohistoquímica.

Materiales y métodos

[0219] Preparación de tejidos. El cordón umbilical humano y el tejido de placenta se cosechó y la inmersión fijada en 4% (w/v) de paraformaldehído durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los epítomos siguientes: vimentina (1: 500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150, generado contra conejo; Sigma; o 1: 300, generado contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa de músculo liso-actina (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (Clase CD34 humana III; 1: 100; Dako, Carpintería, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores: GROalfa anti-humana - PE (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor LDL oxidado 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 del compuesto de incrustación OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contiene etanol. Los bloques congelados se seccionaron a continuación (10 µM de espesor) usando un estándar de criostato (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para la tinción.

[0220] La inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica se realizó similarmente a los estudios anteriores (por ejemplo, Messina, et al, 2003, Exper. Neurol 184: 816-829). Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de 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 Pasajes 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 periodo 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 IgG anti-conejo de cabra - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes) o IgG anti-cabra de burro - FITC (1: 150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicó 10 DAPI micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0221] Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio epi-fluorescencia invertido de Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representa

por la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Imágenes representativas fueron tomadas 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

[0222] Caracterización del cordón umbilical. Vimentina, desmina, marcadores SMA, CK18, de vWF, y CD34 se expresaron en un subconjunto de las células que se encuentran dentro del cordón umbilical. En particular, el vWF y la expresión de CD34 se limita a los vasos sanguíneos contenidos en el cable. CD34 + células estaban en la capa más interna (lado lumen). La expresión de vimentina fue encontrada por toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón umbilical. SMA se limita a la matriz y las paredes exteriores de la arteria y la vena, pero no contenía los propios vasos. CK18 y desmina fueron observados solamente en los vasos, limitándose la desmina a las capas intermedia y exterior.

[0223] Caracterización de placenta. Vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 se observaron dentro de la placenta y regionalmente específica.

[0224] Expresión tisular GRO α , GCP-2, ox-LDL R1 y Nogo A. Ninguno de estos marcadores se observaron dentro del cordón umbilical o el tejido placentario.

[0225] Resumen. Vimentina, desmina, actina de músculo liso alfa, citoqueratina 18, von Willebrand Factor, y CD 34 se expresan en células dentro de cordón umbilical humano y placenta.

EJEMPLO 9

El análisis de las células utilizando matrices de oligonucleótidos

[0226] Matrices de Affymetrix GENECHIP® se utilizan para comparar los perfiles de expresión de células derivadas del cordón umbilical y placenta con fibroblastos, células madre mesenquimatosas humanas, y otra línea celular derivada de la médula ósea humana. Este análisis proporciona una caracterización de las células y se identificaron los marcadores moleculares únicos para estas células.

Materiales y métodos

[0227] Aislamiento y cultivo de células. 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 (usando DMEM-LG) en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

[0228] Los fibroblastos dérmicos humanos fueron adquiridos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Número de lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen). Las células fueron cultivadas en plástico estándar tratado de tejido.

[0229] Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) fueron adquiridas 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 cultivado en tejido estándar a 37°C con 5% de CO₂.

[0230] La médula ósea de cresta ilíaca humana se recibió de NDRI con el consentimiento del paciente. La médula ósea se procesó de acuerdo con el método descrito por Ho, *et al.* (WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (155 mM NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃, y 0,1 mM EDTA, pH 7,2) en una proporción de médula ósea de 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 mM. Las células se centrifugaron de nuevo 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 10⁴ células/cm². Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, ya sea en O₂ atmosférica estándar o al 5% de O₂. 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.

[0231] El aislamiento de ARNm y análisis GENECHIP®. Activamente crecientes cultivos de células se retiraron de los frascos con un raspador de células en PBS frío. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El

sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en PBS fresco y se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se eliminó y el sedimento de células se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C. ARNm celular se extrajo y se transcribió en ADNC, que después se transcribe en ARNc y marcado con biotina. La biotina marcada ARNc 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 de micromatrices" 1.21 software de ordenador (Universidad de Stanford; Tusher, VG y otros, 2001, Proc Natl Acad Sci EE.UU.. 98: 5116-5121).

Resultados

[0232] Se analizaron catorce poblaciones diferentes de células. Las células junto con la información del Pasaje, sustrato de cultivo, y medios de cultivo se enumeran en la Tabla 9-1.

Tabla 9-1. Las células analizadas por el estudio de micromatrices. Las líneas celulares se enumeran por código de identificación junto con el Pasaje en el momento de análisis, sustrato de crecimiento celular y medio de crecimiento.

Población celular	Pasaje	Sustrato	Medio
Ombliigo (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Ombliigo (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Ombliigo (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
ICBM (070,203) (5% 02)	3	Plastico	MEM, 10% FBS
ICBM (062.703) (std. 02)	5	Plastico	MEM, 10% FBS
ICBM (062,703) (5% 02)	5	Plastico	MEM, 10% FBS
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plastico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plastico	MSCGM
hMSC (Lote 2F 1657)	3	Plastico	MSCGM
hFibroblast (9F0844)	9	Plastico	DMEM-F12, 10% de FBS
hFibroblast (CCD39SK)	4	Plastico	DMEM-F12, 10% de FBS

[0233] 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 9-2 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 (es decir, cuanto mayor sea la distancia, cuanto menos similitud existe).

Tabla 9-2. Las distancias euclidianas para las parejas de células.

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

[0234] Tablas 9-3, 9-4, y 9-5 muestran la expresión de genes incrementados en las células derivadas de placenta

(Tabla 9-3), el aumento en las células derivadas del cordón umbilical (Tabla 9-4), y se redujeron a ombligo y células derivadas de placenta (Tabla 9-5). La columna titulada "Juego de sondas de identificación" 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 9-3. Los genes que se muestran a han aumentado específicamente la expresión en las células derivadas de placenta en comparación con otras líneas celulares ensayadas

Juego de sondas de identificación	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
209732_at	Tipo C (dependiente de calcio, carbohidratos dominio de reconocimiento) lectina, miembro de superfamilia 2 (inducida por activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor de Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	aldehído de deshidrogenasa 1 familia, miembro A2	AB015228
206367_at	renina	NM_000537
210004_at	lipoproteína de baja densidad oxidada (lectina) receptor 1	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGEN: 4179671, ARNm, cds parcial	AF070642
202178_at	quinasa de proteína C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	regulado hacia abajo en el cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 9-4. Los genes que se muestran a han aumentado específicamente la expresión en las células derivadas del ombligo en comparación con otras líneas celulares ensayadas

Juego de sondas de identificación	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
202859_x_at	interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	interleucina 8	AF043337
210222_s_at	reticulon 1	BC000314
204470_at	quimiocina (motivo CXC) ligando 1 (actividad estimuladora del crecimiento de melanomas)	NM_001511
206336_at	quimiocina (motivo CXC) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2)	NM_002993
207850_at	quimiocina (motivo CXC) ligando 3	NM_002090
203485_at	reticulon 1	NM_021136
202644_s_at	factor de necrosis tumoral, proteína alfa inducida por 3	NM_006290

Tabla 9-5. Los genes muestran una disminución la expresión en células derivadas de ombligo y de placenta, en comparación con otras líneas celulares ensayadas		
Juego de sondas de Identificación	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
210135_s_at	homeobox de baja estatura 2	AF022654.1
205824_at	proteína de choque térmico 27kDa 2	NM_001541.1
209687_at	quimiocina (motivo CXC) ligando 12 (estroma por células de factor derivado de 1)	U19495.1
203666_at	quimiocina (motivo CXC) ligando 12 (estroma por células factor derivado de 1)	NM_000609.1
212670_at	elastina (estenosis aórtica supraavalvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	homeobox mesénquimo 2 (homeobox específico de arresto de crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	homólogo de homeobox sine oculis 1 (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador asociado desalineado de morfogénesis 2	BF513244
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	tetranectina (proteína de unión del plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	src homología tres (SH3) y el dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	De células B translocación gen 1, anti-proliferativa	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción relacionados con runt-3	AA541630
219747_at	hipotética proteína FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	interleucina 11 receptor, alfa	NM_004512.1
202465_at	procolágeno C-endopeptidasa potenciador	NM_002593.2
203706_s_at	homólogo rizado 7 (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
212736_at	BC008967 hipotético gen	BE299456
214587_at	colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	tenascina C (hexabrachion)	NM_002160.1
210239_at	proteínas homeobox Iroquois 5	U90304.1
203903_s_at	hefaestina	NM_014799.1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	sináptica glicoproteína vesícula 2	NM_014849.1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799

Tabla 9-5. Los genes muestran una disminución la expresión en células derivadas de ombligo y de placenta, en comparación con otras líneas celulares ensayadas		
Juego de sondas de Identificación	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
206315_at	citoquina similar al receptor del factor 1	NM_004750.1
204401_at	potasio intermedio/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	sine homólogo oculis homeobox 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 familia de reductasa 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 repetir dominios similares a EGF)	NM_004791.1
214927_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm inserto de longitud completa de 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 atrionatriuretic receptor C)	AI628360
219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina)	NM_006634.1
201843_s_at	EGF que contiene proteína de la matriz extracelular fibulin tipo 1	NM_004105.2
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

[0235] Tablas 9-6, 9-7, y 9-8 muestran la expresión de genes aumentada en los fibroblastos humanos (Tabla 9-6), células ICBM (Tabla 9-7), y MSCs (Tabla 9-8).

5	Tabla 9-6. Los genes que se han demostrado tener expresión aumentada en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.
	fosfatasa de doble especificidad 2
	proteína KIAA0527
10	Homo sapiens ADNc: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G)
	inhibina, beta A (activina A, activina AB polipéptido alfa)
15	pirofosfatasa de ectonucleótido/fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	proteína KIAA1053
	proteína asociada a microtúbulos 1A
	proteína con dedos de zinc 41
	proteína HSPC019
20	Homo sapiens ADNc: FLJ23564 fis, clon LNG10773
	ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	proteína LIM (similar al enigma de proteína de rata quinasa C vinculante)
25	inhibidor de potenciador del gen de polipéptido ligero kappa en las células B, proteína de complejo de quinasa asociado
	proteína hipotética FLJ22004
	secuencia de ARNm humano (clon CTG-A4)
30	EST, moderadamente similares a factor similar al receptor de citoquina 2; receptor de citoquinas precursor de CRL2 [Homo sapiens]
	factor de crecimiento transformante, beta 2
	proteína hipotética MGC29643
	antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2
35	proteína putativa de retinopatía ligada al cromosoma X

Tabla 9-7. Los genes que se han mostrado a una mayor expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas

40	<ul style="list-style-type: none"> • anquirina cardiaca de proteína repetida • región de clase I MHC ORF
	ointegrina, alfa 10
	• proteína hipotética FLJ22362
45	• UDP-N-acetilo-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
	• proteína inducida por interferón 44
	• SRY (región determinante del sexo Y)-caja 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)
	• proteína asociada por queratina 1-1
	• tipo hipocalcina 1
50	• dentada 1 (síndrome de Alagille)
	• proteoglicano 1, gránulo secretor

55

60

65

Tabla 9-8. Los genes que se han mostrado tener una mayor expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

-
- 5
- interleucina 26
 - maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
 - subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
 - v-fos FBJ osteosarcoma murino homólogo oncogén viral

10

 - proteína hipotética DC42
 - subfamilia de receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2
 - FBJ osteosarcoma murino viral oncogén homólogo B
 - WNT1 proteína de ruta de señalización inducible 1
 - MCF.2 secuencia de transformación derivada de línea celular

15

 - canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
 - homeoproteína de tipo emparejado de cartílago 1
 - Homo sapiens ADNc FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
 - Homo sapiens ADNc FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
 - jun B proto-oncogén

20

 - CLL de células B/linfoma 6 (proteína de dedo de zinc 51)
-
- proteína con dedos de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)
-

25 **[0236] Resumen.** El presente examen se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células derivadas de cordón umbilical y la placenta. Este análisis incluye células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y tres placentas diferentes. El examen incluyó también 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 utilizando una matriz de oligonucleótidos que contenía sondas para

30 22.000 genes. 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 placenta y siete genes aumentaron específicamente en las células derivadas del cordón umbilical. Se han encontrado cincuenta y cuatro genes que tienen menores niveles de expresión específicamente en placenta y del cordón umbilical, en comparación con los otros tipos de células. La expresión de genes seleccionados ha sido confirmada por PCR (véase el ejemplo siguiente). Estos resultados demuestran que las células tienen un perfil de expresión de genes distintos, por ejemplo, en comparación con las células y los fibroblastos derivados de médula ósea.

40 **EJEMPLO 10**

Los marcadores de células en el tejido del cordón umbilical y las células derivadas de placenta

45 **[0237]** En el ejemplo anterior, similitudes y diferencias en las células derivadas de placenta humana y el cordón umbilical humano se evaluaron mediante la comparación de sus perfiles de expresión de genes con los de las células derivadas de otras fuentes (usando una matriz de oligonucleótidos). Se identificaron seis genes "de firma": receptor oxidizado LDL 1, interleucina-8, renina, reticulon, ligando del receptor de quimioquinas 3 (CXC ligando 3), y la proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes "de firma" se expresaron en niveles relativamente altos en las células.

50 **[0238]** Los procedimientos descritos en este ejemplo se llevaron a cabo para verificar los datos de micromatrices y encuentran concordancia/discordancia entre la expresión génica y proteica, así como para establecer una serie de ensayo fiable para la detección de identificadores únicos a células derivadas de placenta y del cordón umbilical.

55 **Métodos y Materiales**

60 **[0239] Las células.** Células derivadas de placenta (tres aislamientos, incluyendo una cepa predominantemente neonatal como se identifica por análisis de cariotipo), células derivadas del cordón umbilical (cuatro cepas aisladas), y fibroblastos normales humanos dérmicos (NHDF; neonatales y de adultos) cultivadas en Medio de Crecimiento con penicilina/estreptomina en un matraz T75 recubierta con gelatina. Células madre mesenquimales (MSC) se cultivaron en kit de bala del medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

65 **[0240]** Para el protocolo de IL-8, las células se descongelaron a partir de nitrógeno líquido y se sembraron en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm², cultivadas durante 48 horas en medio de crecimiento y después cultivadas por otras 8 horas en 10 mililitros del medio de privación de suero [DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina/estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA) y 0,1% (w/v) albúmina de suero bovino (BSA; Sigma,

St. Louis, MO)]. Después de este tratamiento se extrajo ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 xg durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares. Los sobrenadantes se congelaron a -80°C para el análisis ELISA.

5 **[0241] El cultivo de células para el ensayo ELISA.** Las células derivadas de placenta y del cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células se congelaron a Pasaje 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de centrifugación a 150 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se contaron. Las células fueron cultivadas en un matraz de 75 cm² que contenía 15 ml de medio de crecimiento a 10 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El medio de privación de suero se recogió al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 xg durante 5 minutos (y se almacenó a -20°C).

15 **[0242]** Para estimar el número de células en cada matraz, 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) se añadió a cada matraz. Después de células desprendidas del matraz, la actividad de 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 xg durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y 1 mililitro de medio de crecimiento se añadió a cada tubo para resuspender las células. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

20 **[0243] Ensayo ELISA.** La cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero se analizó utilizando los ensayos de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se ensayaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

25 **[0244] Aislamiento de ARN total.** Se extrajo ARN de células derivadas de placenta y del cordón umbilical confluentes y los fibroblastos o para expresión IL-8 a partir de células tratadas como se describe anteriormente. 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). 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 eluye con 50 microlitros DEPC-agua tratada y se almacenó a -80°C.

30 **[0245] La transcripción inversa.** ARN también se extrajo de placenta humana y del cordón umbilical. El tejido (30 miligramos) se suspendió en 700 microlitros de tampón que contiene RLT 2-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente y la extracción de ARN procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ARN se extrajo con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. ARN transcrito se invirtió 35 utilizando hexámeros al azar con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, y 95°C durante 10 minutos. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

40 **[0246]** Los genes identificados por micromatriz de ADNc regulado únicamente en las células posparto (genes de firma - incluyendo receptor de LDL oxidada, interleucina-8, renina y reticulon), se investigaron adicionalmente usando PCR en tiempo real y convencional.

45 **[0247] PCR en tiempo real.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión de genes Assays-on-Demand™: receptor de LDL oxidado (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); Ligando CXC 3 (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) 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 min y 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min. Los 50 datos de PCR se analizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario con el n° 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

55 **[0248] PCR convencional.** PCR convencional se realizó utilizando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Massachusetts, EE.UU.) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. PCR se realizó con 2 microlitros de solución de ADNc, 1 X AmpliTaq Gold mezcla universal de tampón de reacción PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) y desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. La amplificación se optimiza para cada conjunto de cebadores. Para 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 durante 38 ciclos); para el receptor de LDL oxidada y GAPDH 60 (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores utilizados para la amplificación se enumeran en la Tabla 1. concentración de cebador en la reacción de PCR final era de 1 micromolar a excepción de GAPDH, que era 0,5 micromolar. Cebadores GAPDH fueron los mismos que PCR en tiempo real, excepto que la sonda TaqMan por el 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, 65 MO). Las imágenes fueron tomadas utilizando una lámina de 667 Twinpack universal (VWR International, South Plainfield, NJ) utilizando una cámara Polaroid de longitud focal (VWR International, South Plainfield, Nueva Jersey).

Tabla 10-1: Cebadores usados

	Nombre de cebador	Cebadores
5	Receptor de LDL oxidado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO: 1) A: 5'-AGAATGGAAAACCTGGAATAGG-3' (SEQ ID NO: 2)
	Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (SEQ ID NO: 3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 4)
10	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'-CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC-3' (SEQ ID NO: 8)
15	Quimioquinas (CXC) ligando 3	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO: 9) A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC-3' (SEQ ID NO: 10)

20 **[0249] Inmunofluorescencia.** Células derivadas se fijaron con 4% paraformaldehído frío (w/v) de (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Un aislado cada uno de las células derivadas de la placenta y del cordón umbilical y en el pasaje 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y el Pasaje 11 (P11) (dos aislados de derivados de la placenta, cordón umbilical de dos aislados derivados de células) 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 - contra conejo, o 1: 300; Chemicon, Temecula, CA - contra ratón), actina de músculo-alfa liso (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (CD34 humano de Clase III; 1: 100; Dako, Carpinteria, CA). Además, los siguientes marcadores fueron probados en células posparto en Pasaje 11: alfa - PE de GRO anti-humano (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor LDL oxidado anti-humano 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGA-A anti-humano (1: 100; Santa Cruz, Biotech).

35 **[0250]** 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 Pasajes 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. Los anticuerpos primarios, se diluyó en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 40 1 hora a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpos primarios se retiraron y se lavaron los cultivos 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 IgG anti-conejo de cabra - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes) o IgG anti-cabra de burro - FITC (1: 150, Santa Cruz Biotech). Después, los cultivos se lavaron y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) se aplicaron durante 45 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

50 **[0251]** 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 fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario. Imágenes representativas fueron tomadas 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).

55 **[0252] 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 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por 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 de acuerdo con las especificaciones de fabrica y se incubaron las células 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. Se añadió anticuerpo secundario de acuerdo con 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 secundario. Las células lavadas se

resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: receptor LDL oxidado 1 (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), groa (555 042; BD Pharmingen, Bedford, MA), el IgG1 de ratón kappa, (P-4685 y M-5284; Sigma), IgG burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech). Análisis de citometría de flujo se realizó con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

Resultados

[0253] Resultados de PCR en tiempo real de los genes seleccionados "de firma" realizados en ADNc a partir de células derivadas de placenta humana, de adultos y fibroblastos neonatales y células madre mesenquimales (MSCs) indican que tanto receptor LDL oxidado como renina se expresaron en un nivel más alto en las células derivadas de placenta en comparación con otras células. Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el método $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. Los niveles de reticulon y expresión del receptor de LDL oxidada fueron más altos en las células derivadas del cordón umbilical en comparación con otras células. No hay diferencia significativa en los niveles de expresión de CXC ligando 3 y GCP-2 se encuentra entre las células y los controles derivados de la placenta. Los resultados de PCR en tiempo real fueron confirmados por PCR convencional. La secuenciación de productos de PCR validó aún más estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de CXC ligando 3 entre las células derivadas de placenta y los controles utilizando cebadores PCR CXC ligando 3 convencionales mencionados anteriormente.

[0254] La producción de la citoquina, IL-8 en posparto fue elevado tanto en células derivadas cultivadas en medio de crecimiento como las privadas de suero. Todos los datos PCR en tiempo real se validaron con la PCR convencional y mediante la secuenciación de productos de PCR.

[0255] Cuando los sobrenadantes de las células cultivadas en medio libre de suero se examinaron para la presencia de IL-8, se detectaron las cantidades más altas en medios derivados de las células umbilicales y algunos aislados de células de la placenta (Tabla 10-1). No se detectó IL-8 en un medio derivado de fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 10-1: Cantidad de proteína IL-8 se mide por ELISA

Tipo de célula	IL-8
hFibro	ND
Aislado de placenta 1	ND
Aislado de 1 UMB	2058,42 ± 144,67
Aislado de placenta 2	ND
Aislado Umb 2	2368,86 ± 22,73
Aislado de Placenta 3 (O ₂ normal)	17,27 ± 8,63
Aislado de Placenta 3 (O ₂ bajo, W/O BME)	264,92 ± 9,88
Los resultados del ensayo ELISA para la interleucina-8 (IL-8) se realizaron en células derivadas de placenta y del cordón umbilical, así como fibroblastos de piel humana. Los valores que se presentan aquí son picogramos/millón de células, n = 2, sem.	
ND: No detectado	

[0256] También se examinaron las células derivadas de placenta para la producción de receptor de LDL oxidado, GCP-2 y GROalfa por análisis FACS. Las células dieron positivo por GCP-2. Receptor de LDL oxidado y GRO no se detectaron por este método.

[0257] También se ensayaron las células derivadas de placenta para la producción de proteínas seleccionadas por el análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (Pasaje 0), las células derivadas de 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 positivo tanto para alfa-actina de músculo liso y vimentina. Este patrón se conserva a través del Pasaje 11. Sólo unas pocas células (<5%) en el pase 0 tiñeron positivo para citoqueratina 18.

[0258] Las células derivadas del cordón umbilical humano en el Pasaje 0 se probaron para la producción de proteínas seleccionadas por el análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (Pasaje 0), las células se fijaron con 4% de paraformaldehído y se expusieron a los anticuerpos para seis proteínas: Factor von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina del músculo liso alfa, y vimentina. Células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para actina de músculo liso alfa y vimentina, con el patrón de tinción consistente a través del Pasaje 11.

[0259] Resumen. La concordancia entre los niveles de expresión de genes medidos por micromatriz y PCR (tanto en tiempo real y convencional) se ha establecido para cuatro genes: receptor de LDL oxidado 1, renina, reticulon, e

IL-8. La expresión de estos genes se regula diferencialmente en el nivel de ARNm en las células derivadas de placenta y tejido umbilical, con IL-8 también regulado diferencialmente a nivel de proteínas. La presencia de receptor de LDL oxidado no se detectó a nivel de proteínas por análisis FACS en células derivadas de placenta. Expresión diferencial de GCP-2 y CXC ligando 3 no se confirmó en el nivel de ARNm, no se detectó sin embargo GCP-2 a nivel de proteínas por análisis FACS en las células derivadas de placenta. Aunque este resultado no se refleja por los datos obtenidos originalmente a partir del experimento de micromatrices, esto puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

[0260] Inmediatamente después del aislamiento (Pasaje 0), las células derivadas de placenta humana tiñieron positivo tanto para actina de músculo liso alfa como vimentina. Este patrón también se observó en las células en el Pasaje 11. Estos resultados sugieren que la vimentina y expresión actina de músculo liso alfa se pueden conservar en las células con los pases, en el medio de crecimiento y en las condiciones utilizadas en estos procedimientos. Las células derivadas del cordón umbilical humano en el Pasaje 0 se probaron para la expresión de actina de músculo liso alfa y vimentina, y fueron positivos para ambas. El patrón de tinción se conservó a través del Pasaje 11.

EJEMPLO 11

Evaluación inmunológica *in vitro* del tejido del cordón umbilical y las células derivadas de placenta

[0261] Se evaluaron las células UTC *in vitro* por sus características inmunológicas en un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica que, en su caso, estas células podrían provocar en trasplantes *in vivo*. UTCs se analizaron por citometría de flujo para determinar la presencia 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 ingenuas células T CD4⁺ (Abbas y Lichtman, Celular y Molecular Immunology, 5ª Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171). Las líneas celulares también se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas y Lichtman, 2003, *supra*), CD 178 (Coumans, et al., (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196), y PD-L2 (Abbas y Lichtman, 2003, *supra*; Brown, et al (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266). La expresión de estas proteínas por las células que residen en tejidos de la placenta se cree que media el estado inmuno-privilegiado de tejidos de la placenta *en el útero*. Para predecir el grado en que líneas celulares derivadas de placenta y del cordón umbilical provocan una respuesta inmune *in vivo*, las líneas de células se ensayaron en una reacción mixta de linfocitos de una sola vía (MLR).

Materiales y métodos

[0262] **El cultivo celular.** Las células se cultivaron hasta la confluencia en Medio de Crecimiento que contiene penicilina/estreptomycin en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertas con 2% de gelatina (Sigma, St. Louis, MO).

[0263] **La tinción de anticuerpos.** Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y separadas con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1x10⁷ por mililitro. Anticuerpo (Tabla 11-1) se añadió a un centener 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 FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 11-1. Anticuerpos

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

5 **[0264] La reacción mixta de linfocitos.** Células derivadas del cordón umbilical de viales criopreservados de Pasaje
10 10 etiquetadas como células derivadas de placenta de línea celular A y Pasaje 11 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 N° CAC-031. Se recogieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de
donantes voluntarios femeninos y masculinos múltiples. El estimulador (donante) alogénico PBMC, autólogo PBMC,
10 y líneas celulares de cordón umbilical y de placenta se trataron con células estimuladoras C tratadas de mitomicina
C se añadieron a PBMCs respondedores (receptores) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, [³H]
timidina se añadió a cada muestra y se cultivó durante 18 horas. Después de la cosecha de las células, se extrajo el
ADN radiomarcado, e incorporación [³H]-timidina se midió utilizando un contador de centelleo.

15 **[0265]** El índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) se calculó como la proliferación media de receptor
más mitomicina donante alogénica C-tratada dividida por la proliferación de línea de base del receptor. El índice de
estimulación de las UTCs se calculó como la media de proliferación de la línea celular posparto C tratada con
receptor más mitomicina dividido por la proliferación de línea de base del receptor.

20 **Resultados**

[0266] Reacción mixta de linfocitos - células derivadas de placenta. Siete donantes de sangre voluntarios
humanos fueron examinados para identificar un único donante alogénico que exhibir 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 alogénico de control positivo. Los seis donantes de sangre restantes fueron
25 seleccionados como receptores. El donante de control positivo alogénico y las líneas de células derivadas de
placenta se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción de linfocitos mezclados con los seis
receptores alogénicos individuales. 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).

30

ES 2 616 457 T3

Tabla 11-2. Reacción mixta de linfocitos de datos - línea de células B (placenta)

DPM para matraz de proliferación									
		Placa ident: Placa							
Analítico	Cultivo	Replicados							
número	Sistema	1	2	3		Media	SD	CV	
IM03-7769	Proliferación de línea de base de receptor	79	119	138		112,0	30,12	26,9	
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	241	272	175		229,3	49,54	21,6	
	MLR alogénico IM03-7768 donante (tratado con mitomicina C)	23971	22352	20921		22414,7	1525,97	6,8	
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células B)	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	
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	1091	602	524		739,0	307,33	41,6	
	MLR alogénico IM03-7768 donante (tratado con mitomicina C)	45005	43729	44071		44268,3	660,49	1,5	
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células B)	533	2582	2376		1830,3	1128,24	61,6	
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	
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	293	138	508		313,0	185,81	59,4	
	MLR alogénico IM03-7768 donante (tratado con mitomicina C)	24497	34348	31388		30077,7	5054,53	16,8	
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células B)	601	643	a		622,0	29,70	4,8	
SI (donante)						243			
SI (línea celular)						5			

ES 2 616 457 T3

(continuación)

Número Analítico	Sistema de Cultivo	Replicados			Media	SD	CV
		1	2	3			
IM03-7772	Proliferación de línea de base de receptor	56	98	51	68,3	25,81	37,8
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	133	120	213	155,3	50,36	32,4
	MLR alogénico IM03-7768 donante (tratado con mitomicina C)	1422	200	221	1882	4118,	21,
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células 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
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	361	617	304	427,3	166,71	39,0
Línea celular de tipo B	Proliferación de línea de base de receptor	126	124	143	131,0	10,44	8,0
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	822	1075	487	794,7	294,95	37,1
Placa ident: Placa							
Número analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	SD	CV
		1	2	3			
IM03-7773	Proliferación de línea de base de receptor	908	181	330	473,0	384,02	81,2
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	269	405	572	415,3	151,76	36,5
	MLR alogénico IM03-7768 donante (tratado con mitomicina C)	291	286	283	2871	418,7	1,5
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células B)	567	732	905	734,7	169,02	23,0
SI (donante)					61		
SI (línea celular)					2		

(continuación)

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

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

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

[0267] Reacción mixta de linfocitos - células derivadas del cordón umbilical. Seis donantes de sangre voluntarios humanos fueron examinados para identificar un único donante alogénico que exhibirá una robusta respuesta de proliferación en una reacción de linfocitos mezclados con los otros cinco donantes de sangre. Este donante fue seleccionado como el donante alogénico de control positivo. Los cinco donantes de sangre restantes fueron seleccionados como receptores. El donante de control positivo alogénico y líneas de control de placenta se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción de linfocitos mezclados con los cinco receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 11-4). El índice medio de estimulación varió de 6.5 (placa 1) a 9 (placa de 2) y los controles positivos de donante alogénico oscilaron entre 42,75 (placa 1) a 70 (placa de 2) (Tabla 11-5).

ES 2 616 457 T3

Tabla 11-4. Datos de reacción de linfocitos mixtos A (cordón umbilical)

DPM para matraz de proliferación Placa ident: Placa 1									
Número Analítico	Sistema de Cultivo	Replicados			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM03-2478	Proliferación de línea de base de receptor	107 4	406	391	623,7	390,07	62,5		
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	672	510	140 2	861,3	475,19	55,2		
	MLR alogénico IM03-2477 donante (tratado con mitomicina C)	437 77	483 91	382 31	43466 ,3	5087,12	11,7		
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células A)	291 4	562 2	610 9	4881, 7	1721,36	35,3		
SI (donante) SI (línea celular)					70 8				
IM03-2479	Proliferación de línea de base de receptor	530	508	537	521,7	11,93	2,3		
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	701	567	111 1	793,0	283,43	35,7		
	MLR alogénico IM04-2477 donante (tratado con mitomicina C)	255 93	247 32	227 07	24344 ,0	1481,61	6,1		
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células A)	508 6	393 2	149 7	3505, 0	1832,21	52,3		
SI (donante) SI (línea celular)					47 7				
IM03-2480	Proliferación de línea de base de receptor	119 2	854	133 0	1125, 3	244,90	21,8		
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	296 3	993	219 7	2051, 0	993,08	48,4		
	MLR alogénico IM04-2477 donante (tratado con mitomicina C)	254 16	297 21	237 57	26298 ,0	3078,27	11,7		
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células A)	259 6	507 6	342 6	3699, 3	1262,39	34,1		

ES 2 616 457 T3

(continuación)

DPM para matraz de proliferación Placa ident: Placa 1									
Número Analítico	Sistema de Cultivo	Replicados			Media	SD	CV		
		1	2	3					
SI (donante) SI (línea celular)						23 3			
IM03-2481	Proliferación de línea de base de receptor	695	451	555	567,0	122,4	21,6		
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	738	125 2	464	818,0	400,04	48,9		
	MLR alogénico IM04-2477 donante (tratado con mitomicina C)	131 77	248 85	154 44	17835, 3	6209,5 2	34,8		
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células A)	449 5	367 1	467 4	4280,0	534,95	12,5		
SI (donante) SI (línea celular)					31 8				
Placa 10: Placa 2									
Número Analítico	Sistema de Cultivo	Replicados			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM03-2482	Proliferación de línea de base de receptor	432	533	274	413,0	130,5 4	31,6		
	Control de autostimulation (células autólogas de mitomicina C tratadas)	145 9	633	598	896,7	487,3 1	54,3		
	MLR alogénico IM04-2477 donante (tratado con mitomicina C)	242 86	308 23	313 46	28818, 3	3933, 82	13,7		
	MLR con la línea celular (tratado con mitomicina C tipo de células A)	276 2	150 2	672 3	3662,3	2724, 46	74,4		
SI (donante) SI (línea celular)					70 9				
IM03-2477 (donante alogénico)	Proliferación de línea de base de receptor	312	419	349	360,0	54,34	15,1		
	Control de autostimulation (células autólogas tratadas por mitomicina)	567	604	374	515,0	123,5 0	24,0		
Línea de células de tipo A	Proliferación de línea de base de receptor	510 1	373 5	297 3	3936,3	3933, 82	27,4		
	Control de autostimulation (células autólogas tratadas por mitomicina)	192 4	457 0	215 3	2882,3	1466, 04	50,9		

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

Índice Medio de Estimulación		
	Recipiente	Cordón umbilical
Placa 1 (receptores 1-4)	42,75	6,5
Placa 2 (receptor 5)	70	9

[0268] Marcadores de células presentadores de antígeno - células derivadas de placenta. Histogramas de células derivadas de placenta analizados por el flujo muestran citometría de expresión negativa 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 células T CD4⁺.

[0269] Marcadores de inmunomodulación - células derivadas de placenta. Histogramas de células derivadas de placenta analizados por el flujo muestran citometría de expresión positiva de PD-L2, como se ha señalado por el incremento del valor de fluorescencia relativa al control de IgG, y la expresión negativa de la EC 178 y HLA-G, como se ha señalado por valor de fluorescencia coherente con el control de IgG.

[0270] Marcadores de células presentadores de antígeno - células derivadas del cordón umbilical. Histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizados por el flujo muestran citometría de expresión negativa 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 umbilicales carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente células T CD4⁺.

[0271] Marcadores de células inmunomoduladoras - células derivadas del cordón umbilical. Histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizados por el flujo muestran citometría de expresión positiva de PD-L2, como se ha señalado por el incremento del valor de fluorescencia relativa al control de IgG, y la expresión negativa de la EC 178 y HLA-G, como se ha señalado por valor de fluorescencia coherente con el control de IgG.

[0272] Resumen. En las reacciones de linfocitos mixtos realizadas con líneas de células derivadas de placenta, el índice medio de estimulación oscilaron desde 1,3 hasta 3, y el de los controles positivos alogénicas varió de 46,25 a 279. En las reacciones de linfocitos mixtos realizados con líneas de células derivadas del cordón umbilical el índice medio de estimulación varió desde 6,5 hasta 9, y el de los controles positivos alogénicas varió de 42,75 a 70. Líneas celulares derivadas de placenta y del cordón umbilical fueron negativos para la expresión de las proteínas estimulantes de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2, tal como se mide por citometría de flujo. Líneas celulares derivadas de placenta y del cordón umbilical fueron negativas para la expresión de proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD 178 y positivas para la expresión de PD-L2, medida por citometría de flujo. PBMCs de donantes alogénicos contienen células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DR, DQ, CD8, CD86, y B7-H2, permitiendo de este modo la estimulación de células T CD4⁺ naive. La ausencia de moléculas de superficie celular presentadoras de antígeno en células derivadas de placenta y del cordón umbilical necesarias para la estimulación directa de las células T CD4⁺ naive y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, pueden explicar el índice de baja estimulación exhibida por estas células en un MLR en comparación con los controles alogénicos.

EJEMPLO 12

La secreción de factores tróficos por el tejido del cordón umbilical y las células derivadas de la placenta

[0273] Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados a partir de células derivadas de placenta y cordón umbilical. Factores seleccionados para la detección incluyen: (1) los conocidos por tener actividad angiogénica, tal como el 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), 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 vascular endotelial (VEGF) (Hughes et al (2004). Ann Thorac Surg 77: 812-8), metaloproteína de la matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), el factor derivado del estroma 1 alfa (SDF-1 alfa); (2) los conocidos por tener actividad neurotrófica/neuroprotectora, tal como el 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); y (3) los que se sabe que tienen actividad de quimioquinas, tales como proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1b), quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), Rantes (regulado en

activación, células T normales expresadas y secretadas), I309, timo y quimiocina regulada por activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

Métodos y materiales

[0274] Cultivo celular. Las células de la placenta y del cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano se cultivaron en medio de crecimiento con penicilina/estreptomicina en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células fueron crioconservadas en el Pasaje 11 y se almacenaron 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 xg 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 375.000 células/75 cm² matraz que contenía 15 ml 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/estreptomicina (Gibco)) durante 8 horas. El medio libre de suero acondicionado se recogió al final de la incubación por centrifugación a 14.000 xg durante 5 minutos y se almacenó a -20°C. Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con PBS y se separaron por medio de 2 mililitros de tripsina/EDTA. La actividad de la tripsina fue inhibida por la adición de 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 xg durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de Medio de Crecimiento. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

[0275] Matraz ELISA. Las células se cultivaron a 37°C en dióxido de carbono 5% y oxígeno atmosférico. Las células derivadas de placenta (lote 101503) 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-beta 2 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.

[0276] Searchlight™ matriz ELISA multiplexado. Las quimioquinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, RANTES, I309, TARC, eotaxina MDC, IL8), BDNF, y de los factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-BB, TPO, HB-EGF se midieron usando matrices de proteoma SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteoma son ELISA sándwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. las matrices se producen mediante la detección de un 2 x 2, 3 x 3, o 4 x 4 patrón 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 la imagen 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

[0277] Ensayo ELISA. MCP-1 e IL-6 se secretan por las células derivadas de la placenta y del cordón umbilical y fibroblastos dérmicos (Tabla 12-1). SDF-1 alfa fue secretada por las células derivadas de placenta cultivadas en 5% de O₂ y por los fibroblastos. GCP-2 e IL-8 se secretan por las células derivadas de la placenta y del cordón umbilical cultivadas en presencia de BME o 5% de O₂. GCP-2 también se secretó por los fibroblastos humanos. TGF-beta2 no era detectable mediante el ensayo de ELISA .

Tabla 12-1. Los resultados del ensayo ELISA

(Valores presentados son picogramos/millón de células/mililitro (n = 2, sem)							
	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1	GCP-2	IL-8	TGF-β2
Fibroblastos	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Placen TI (042303)	60±3	41±2	ND	ND	ND	ND	ND
Cordón umbilical (022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
Placenta (071003)	125±16	10±1	ND	ND	ND	ND	ND
Cordón umbilical (071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND
Placenta (101503) BME	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
Placenta (101503) 5% de O ₂ , W O BME	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND

Clave: ND: No detectado.

[0278] Searchlight™ Matriz ELISA Multiplexado. TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC, y la IL-8 se secretan a partir de células derivadas de cordón umbilical (Tablas 12-2 y 12-3). TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC, eotaxina, y la IL-8 se secretan a partir de células derivadas de placenta (Tablas 12-2 y 12-3). No se detectaron Ang2, VEGF o PDGF-BB.

Tabla 12-2. Resultados de matriz ELISA Multiplexado Searchlight™

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
Hfb	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
P1	24299,5	ND	ND	546,6	8,8	16,4	ND	ND	3,81,3	ND
U1	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
P3	14176,8	ND	ND	568,7	5,2	10,2	ND	ND	1,9	33,6
U3	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

Clave: HFB (fibroblastos humanos), P1 (células derivadas de placenta (042303)), U1 (células derivadas de cordón umbilical (022803)), P3 (células derivadas de placenta (071003)), U3 células derivadas del cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

Tabla 12-3. Resultados de matriz ELISA Multiplexado Searchlight™

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	1309	TARC	Eotaxina	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
P1	79,5	ND	228,4	4,1	ND	3,8	12,2	ND	413,5
U1	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
P3	ND	ND	102,7	ND	ND	0,4	ND	ND	63,8
U3	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

Clave: HFB (fibroblastos humanos), P1 (células derivadas de placenta (042303)), U1 (células derivadas de cordón umbilical (022803)), P3 (células derivadas de placenta (071003)) U3 células derivadas de cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

[0279] Resumen. Células derivadas de placenta y cordón umbilical secretan una serie de factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, bFGF, MCP-1 y IL-8, desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen un papel importante en la regeneración neural.

EJEMPLO 13

Diferenciación neural a corto plazo del tejido del cordón umbilical y células derivadas de placenta

[0280] Se examinó la capacidad de las células derivadas de placenta y cordón umbilical de diferenciarse en células de linaje neural.

Materiales y métodos

[0281] El aislamiento y expansión de células derivadas de cordón umbilical y placenta. Las células de la placenta y tejidos umbilicales se aislaron y se expandieron tal como se describe en el Ejemplo 1.

[0282] Protocolo Woodbury-Negro modificado. (A) Este matraz es una adaptación de un matraz originalmente realizado para probar el potencial de inducción neural de las células estromales de la médula ósea (1). Las células derivadas del cordón umbilical (022803) P4 y células derivadas de placenta (042203) P3 se descongelaron y el cultivo se expandió en Medios de Crecimiento a 5.000 células/cm² hasta sub-confluencia (75%). 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), las células derivadas de tejido adiposo (Artecel, US6555374 B1) (P6; Donantes 2) y fibroblastos dérmicos humanos neonatales (P6 ; CC2509; Cambrex) también se sembraron en las mismas condiciones.

[0283] 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/estreptomocina (Invitrogen). Después de cuatro días, las células se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen) y se cultivaron posteriormente en medio DMEM/F12 + 20% (v/v) FBS + penicilina/estreptomocina durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se enjuagaron con PBS. Las células fueron cultivadas durante 1 - 6 horas en un medio de inducción que estaba compuesto de DMEM/F12 (exento de suero) que contenía 200 mM butilhidroxianisol, 10 mM de cloruro de potasio M, 5 miligramos/mililitro de insulina, 10 µM forskolina, 4 µM ácido valproico y 2 µM de hidrocortisona (todos los productos químicos de Sigma, St. Louis, MO). Las células fueron fijadas en metanol al 100% enfriado con hielo y se realizó inmunocitoquímica (véase los siguientes métodos) para evaluar la expresión de la proteína de nestina humana.

[0284] (B) células derivadas (cordón umbilical (022803) P11; placenta (042203) P11) y fibroblastos dérmicos humanos adultos (1F1853, P11) se descongelaron y el cultivo se expandió en medio de crecimiento a 5.000 células/cm² hasta que se alcanzó sub-confluencia (75%). Las células fueron tripsinizadas y sembradas a una densidad similar como en (A), pero en (1) 24 placas tratadas de cultivo de tejido de pocillos (TCP, marca Falcon, VWR International), (2) pocillos TCP + 2% (w/v) gelatina adsorbida durante 1 hora a temperatura ambiente, o (3) pocillos TCP + 20 µg/mililitro laminina de ratón adsorbido (adsorbido durante un mínimo de 2 horas a 37°C; Invitrogen).

[0285] Exactamente como en (A), las células se expandieron inicialmente y medios conmutados en los marcos de tiempo antes mencionados. Un conjunto de cultivos se fija, como antes, a los 5 días y seis horas, esta vez con helado de 4% (w/v) de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. En la segunda serie de cultivos, se retiró el medio y se cambió a medio progenitoras neurales de expansión (NPE) que consiste en medio Neurobasal-A (Invitrogen) que contiene B27 (suplemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 mM), y penicilina/estreptomycin (Invitrogen). Medio NPE se complementó adicionalmente con ácido retinoico (RA; 1 µM; Sigma). Este medio se retiró 4 días más tarde y los cultivos se fijaron con helado de 4% (w/v) paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la nestina, GFAP, y expresión de proteínas TuJ1 (véase la Tabla 13 -1).

Tabla 13-1. Resumen de los 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
Tirosina hidroxilasa (TH)	1: 1000	Chemicon
GABA	1: 400	Chemicon
Desmina (ratón)	1: 300	Chemicon
alfa - actina de músculo liso alfa	1: 400	Sigma
Proteína nuclear humana (hNuc)	1: 150	Chemicon

[0286] **Protocolo de diferenciación de dos etapas.** Células derivadas (cordón umbilical (042203) P11, placenta (022803) P11), los fibroblastos adultos humanos dérmicos (P11; 1F1853; Cambrex) se descongelaron y el cultivo se expandió en medio de crecimiento a 5.000 células/cm² hasta alcanzarse la sub-confluencia (75%). Las células fueron tripsinizadas y se sembraron a 2.000 células/cm², pero en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en presencia de medios NPE suplementados con bFGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech) [composición de medio completo al que se hace referencia en adelante como NPE + F + E]. Al mismo tiempo, progenitores neurales de rata adulta aislada a partir de hipocampo (P4; (062603) 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 período de 6 días (células se alimentaron una vez durante ese tiempo) en el que el medio de tiempo se cambió a las condiciones de diferenciación listadas en la Tabla N1-2 por un período adicional de 7 días. Los cultivos se fijaron con helado de 4% (w/v) de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para nestina humana o de rata, GFAP, y expresión de proteínas TuJ1.

Tabla 13-2. Resumen de las condiciones de dos pasajes protocolo de diferenciación

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

- 5 **[0287] Protocolo de factor de crecimiento múltiple.** Células derivadas del cordón umbilical (P11; (042203)) se descongelaron y el cultivo expandido en Medio de Crecimiento a 5.000 células/cm² hasta que se alcanzó sub-confluencia (75%). Las células fueron tripsinizadas y se sembraron a 2.000 células/cm², en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences) en presencia de NPE + F (20 nanogramos/liliter millones) + E (20 nanogramos/mililitro). Además, algunos pocillos contenían NPE + F + E + 2% de FBS o 10% de FBS. Después de cuatro días de condiciones de "pre-diferenciación", todos los medios se retiraron y las muestras fueron cambiadas a medio de NPE suplementado con sonic hedgehog (SHH; 200 nanogramos/mililitro; Sigma, St. Louis, MO), FGF8 (100 nanogramos/mililitro; Peprotech), BDNF (40 nanogramos/mililitro; Sigma), GDNF (20 nanogramos/mililitro; Sigma), y el ácido retinoico (1 µM; Sigma). Siete días después del cambio de medio, los cultivos se fijaron con helado de 4% de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para nestina humana (v/w), GFAP, TuJ1, desmina, y la expresión de actina de músculo liso alfa.
- 10
- 15 **[0288] Protocolo de co-cultivo de progenitores neurales.** Progenitores de hipocampo de ratas adultas (062603) se cultivaron como esferas neurológicas o células individuales (10.000 células/pocillo) en placas de 24 pocillos recubiertos con laminina (BD Biosciences) en NPE + F (20 nano gramos/mililitro) + E (20 nanogramos /mililitro).
- 20 **[0289]** Por otra parte, células derivadas de cordón umbilical (042.203) P11 y células derivadas de placenta (022803) P11 se descongelaron y el cultivo se expandió en NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro) a 5.000 células/cm² durante un período 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% (w/v) de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la proteína nuclear humana (hNuc; Chemicon) (Tabla NU1-1 anteriormente) para identificar las células derivadas de placenta y tejido de cordón umbilical.
- 25
- 30 **[0290] Inmunocitoquímica.** La inmunocitoquímica se llevó a cabo utilizando los anticuerpos enumerados en la Tabla NU1-1. 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 los 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 IgG anti-ratón de cabra - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y IgG anti-conejo de cabra - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes). Después, los cultivos se lavaron y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) se aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.
- 35
- 40 **[0291]** 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). 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 tomadas 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).

5 Resultados

[0292] **Protocolo Woodbury-Negro.** (Woodbury, D. et al (2000) J Neurosci. Research 61 (4): 364-70). (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 tiñeron positivamente para nestina, un marcador de células madre y progenitoras neurales multipotentes.

[0293] (B) Cuando se repite en platos de plástico de cultivo de tejidos (TCP), no se observó la expresión de nestina a no ser que laminina fue pre-adsorbida en la superficie de cultivo. A fin de evaluar si las células de expresión de nestina podría generar neuronas maduras, células derivadas del tejido del cordón umbilical, células derivadas de placenta y los fibroblastos se expusieron a NPE + RA (1 μ M), una composición de medios conocidos para inducir la diferenciación de las células madre y progenitoras neuronales en tales células (Jang, YK et al (2004) J. Neurosci. Research 75 (4): 573-84; Jones-Villeneuve, EM et al (1983) Mol Cel Biol. 3 (12): 2271-9; Mayer-Proschel, M. et al (1997) Neuron 19 (4): 773-85). Las células se tiñeron para TuJ1, un marcador de neuronas inmaduras y maduras, GFAP, un marcador de astrocitos, y nestina. Bajo ninguna condición se detectó TuJ1, ni eran células con morfología neuronal observada, lo que sugiere que las neuronas no se generaron en el corto plazo. Además, nestina y GFAP ya no se expresan por células derivadas de cordón umbilical y de placenta, tal como se determina por inmunocitoquímica.

[0294] **Diferenciación de dos etapas.** Aislados de cordón umbilical y de placenta (así como fibroblastos humanos y progenitores neurales de roedores como tipos de células de control negativo y positivo, respectivamente) se sembraron en laminina (promoción neural) recubiertas con platos y se expusieron a 13 condiciones diferentes de crecimiento (y dos condiciones de control) que se sabe que promueve 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 celular. En general, un enfoque de diferenciación de dos etapas se tomó, donde las células se colocaron primero en condiciones de expansión progenitoras neurales durante un período de 6 días, seguidas por condiciones de diferenciación completas durante 7 días. Morfológicamente, tanto las células derivadas de cordón umbilical como de placenta exhibieron cambios fundamentales en la morfología celular en todo el curso de tiempo de este procedimiento. Sin embargo, no se observaron células neuronales o en forma de los astrocitos, a excepción de en condiciones de control de placa progenitora neurales. La inmunocitoquímica, negativa para nestina humana, TuJ1, y GFAP confirmó las observaciones morfológicas.

[0295] **Factores de crecimiento múltiple.** Después de la exposición de una semana a una variedad de agentes de diferenciación neuronales, las células se tiñeron para los marcadores indicativos de progenitores neurales de nestina (humana), neuronas (TuJ1), y los astrocitos (GFAP). Las células cultivadas en la primera etapa en medio que no contiene suero tenían diferentes morfologías que aquellas células en medios que contienen suero (2% o 10%), lo que indica potencial de diferenciación neural. Específicamente, después de un procedimiento de dos pasos de exponer las células derivadas de cordón umbilical a EGF y bFGF, seguido por SHH, FGF8, GDNF, BDNF, y el ácido retinoico, las células mostraron procesos de larga extensión similares a la morfología de astrocitos en cultivo. Cuando 2% de FBS o 10% de FBS se incluyó en la primera etapa de diferenciación, el número de células se incrementó y la morfología celular se mantuvo sin cambios a partir de cultivos de control a alta densidad. La diferenciación neuronal potencial no se evidenció por inmunoanálisis de nestina humana, TuJ1, o GFAP.

[0296] **Co-cultivo de progenitores neurales y UTC.** Las células derivadas de cordón umbilical y de la placenta se sembraron en cultivos de progenitores neurales de rata sembrados dos días antes en condiciones de expansión neural (NPE + F + E). Si bien la confirmación visual de las UTC chapadas y células derivadas de placenta demostró que estas células se sembraron como células individuales, humanas específicas de tinción nuclear (hNuc) 4 días después de chapado (6 días en total) mostraron que tendían a encogerse y evitar el contacto con progenitores neurales. Además, cuando las UTCs se unieron, estas células se dispersaron y parecían estar invadidas por las neuronas diferenciadas que eran de origen de rata, lo que sugiere que las UTCs pueden diferenciarse en células musculares. Esta observación se basó en la morfología bajo microscopio de contraste de fase. Otra observación era que cuerpos celulares típicamente 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 haberse fundido con progenitores de rata y asumido su fenotipo. Los pocillos de control que contienen solamente progenitores neurales tuvieron menos progenitores totales y células diferenciadas aparentes que hicieron pocillos de co-cultivo que contenían derivadas de cordón umbilical y de placenta, lo que indica, además, que tanto las células derivadas de cordón umbilical y placenta influyeron en la diferenciación y el comportamiento de los progenitores neurales, ya sea por liberación de citocinas y quimiocinas, o por efectos mediados por contacto.

[0297] **Resumen.** Se llevaron a cabo los protocolos múltiples para determinar el potencial a corto plazo de UTCs y

células derivadas de placenta de diferenciarse en células del linaje neural. Éstas 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.

[0298] Varias observaciones se hicieron notables en co-cultivos de UTC y células derivadas de placenta con progenitores neuronales. Este enfoque, utilizando UTCs humanas y células derivadas de placenta junto con un tipo de célula xenogénica permitido para la determinación absoluta de la procedencia de cada célula 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 lejos del cuerpo de la célula, sin embargo, sólo la mitad del cuerpo marcado con proteína hNuc. Esas células pueden haber sido UTCs humanos y células derivadas de placenta que se habían diferenciado en células de linaje neural o pueden haber sido UTCs y células derivadas de placenta que se había fusionado con progenitores neurales. En segundo lugar, parece que los progenitores neurales extienden neuritas a UTCs y células derivadas de placenta de una manera que indica que los progenitores se diferenciaron en neuronas e inervaron las UTCs y células derivadas de placenta. En tercer lugar, los cultivos de progenitoras neurales y las UTC y células derivadas de placenta tenían más células de origen de rata y grandes cantidades de diferenciación que los cultivos de control de progenitores neurales solos, lo que indica, además, que las UTC chapadas y células derivadas de placenta proporcionaron factores solubles y/o mecanismos dependientes de contacto que estimulan la supervivencia de progenitoras neurales, proliferación, y/o diferenciación.

EJEMPLO 14

Diferenciación neural a largo plazo del tejido del cordón umbilical y células derivadas de placenta

[0299] Se evaluó la capacidad de las células derivadas de cordón umbilical y placenta para someterse a la diferenciación a largo plazo en las células de linaje neural.

Materiales y métodos

[0300] **El aislamiento y la expansión de las células.** Las células fueron aisladas y expandidas como se describe en los Ejemplos anteriores.

[0301] **Deshielo de células y la siembra.** Alícuotas congeladas de células (cordón umbilical (022803) P11; (042203) P11; (071003) P12; placenta (101,503) P7) previamente cultivadas en Medio de Crecimiento se descongelaron y se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T-75 revestidos de laminina (BD, Franklin Lakes, NJ) en Neurobasal-A medio (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27 (suplemento B27, Invitrogen), L-glutamina (4 mM), y penicilina/estreptomicina (10 mililitros), la combinación de los cuales se denomina aquí como medios de progenitores neurales de expansión (NPE). El medio NPE se suplementó adicionalmente con bFGF (20 ng/mililitros, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitros, Peprotech, Rocky Hill, NJ), se hace referencia en este documento como NPE + bFGF + EGF.

[0302] **Chapado de células de control.** Además, los fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11, Cambrex, Walkersville, MD) y las células madre mesenquimales (P5, Cambrex) se descongelaron y se sembraron a la misma densidad de la siembra de células en matraces T-75 recubiertas con laminina en NPE + bFGF + EGF. Como control adicional, se cultivaron fibroblastos, células derivados de placenta en el medio de crecimiento para el período especificado para todos los cultivos.

[0303] **Expansión celular.** Los medios de todos los cultivos se sustituyen por medio nuevo una vez por semana y las células observadas para la expansión. En general, cada cultivo se pasó una sola vez durante un período de un mes debido a un crecimiento limitado en la NPE + bFGF + EGF.

[0304] **Inmunocitoquímica.** Después de un período de un mes, todos los matraces se fijaron con paraformaldehído frío al 4% (v/v) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra TuJ1 (BIII tubulina; 1: 500; Sigma, St. Louis, MO) y GFAP (proteína ácida fibrilar glial; 1: 2000; DakoCytomation, Carpintería, CA). 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, 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 removidos 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 IgG anti-ratón de cabra - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) e IgG anti-conejo de cabra - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes). Después, los cultivos se lavaron y DAPI de 10 micromolares (Molecular Probes) se aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0305] 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). En todos los casos, la tinción positiva representó 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 tomadas 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 14-1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

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

Resultados

[0306] Medios de NPE + bFGF + EGF disminuyen la proliferación de las UTC y altera su morfología. Inmediatamente después de chapado, un subconjunto de células se unió a los matraces de cultivo recubiertos con laminina. Esto puede deberse a la muerte celular como una función del proceso de congelación/descongelación o debido a las nuevas condiciones de crecimiento. Las células que se unieron adoptaron morfologías diferentes de las observadas en el crecimiento de medios.

[0307] Tras la confluencia, los cultivos se pasaron y se observaron durante el crecimiento. Muy poca expansión tuvo lugar de las células que sobrevivieron el pasaje. En este punto, muy pequeñas células con morfología sin difusión y con características de fase brillante comenzaron a aparecer en los cultivos de células derivadas del cordón umbilical. Estas áreas del matraz se siguieron con el tiempo. A partir de estas pequeñas células, los procesos de bifurcación surgieron con varicosidades a lo largo de sus longitudes, características muy similares a PSA-NCAM+ progenitores neuronales previamente descritos y neuronas inmaduras TuJ1 + derivadas de cerebro y médula espinal (Mayer-Proschel, M. et al. (1997) *Neuron* 19 (4): 773-85; Yang, H. et al (2000) *PNAS* 97 (24): 13366-71). Con el tiempo, estas células se hicieron más numerosos, y aún así sólo se encontraron en los clones.

[0308] Los clones de células derivadas del cordón umbilical expresan las proteínas neuronales. Los cultivos se fijaron en un mes posterior a la descongelación/placas y se tiñeron para la proteína neuronal TuJ1 y GFAP, un filamento intermedio que se encuentra en los astrocitos. Si bien se encontró que todos los cultivos de control cultivados en Medio de Crecimiento y fibroblastos humanos y las MSC cultivadas en medio NPE + bFGF + EGF se demostraron TuJ1-/GFAP, TuJ1 en las células derivadas de cordón umbilical y de placenta. Se observó expresión en las células con y sin morfologías neuronales similares. No se observó expresión de GFAP, ya sea en cultivo. El porcentaje de células que expresan TuJ1 con morfologías de tipo neuronales era de menos de o igual a 1% de la población total (n = 3 aislados de células derivadas del cordón umbilical). Si bien no se ha cuantificado, el porcentaje de células TuJ1 + sin morfologías neuronales fue mayor en cultivos de células derivadas del cordón umbilical que los cultivos celulares derivados de la placenta. Estos resultados parecían específicos como controles emparejados por edad en medio de crecimiento que no expresó TuJ1.

[0309] Resumen. Los métodos para generar neuronas diferenciadas (basadas en la expresión TuJ1 y la morfología neuronal) a partir de células derivadas del cordón umbilical se desarrollaron. Mientras que la expresión para TuJ1 no fue examinada antes de un mes *in vitro*, es claro que al menos una pequeña población de células derivadas del cordón umbilical puede dar lugar a neuronas o bien a través de la diferenciación por defecto o por medio de inducción a largo plazo después de la exposición a un mes a un mínimo medio suplementado con L-glutamina, FGF básico, y EGF.

EJEMPLO 15

Los factores tróficos para apoyo de progenitores neurales

[0310] Se examinó la influencia de las células derivadas de cordón umbilical y placenta en supervivencia de células madre neuronales adultas y progenitoras y la diferenciación a través de mecanismos (tróficos) no dependientes de contacto.

Materiales y métodos

[0311] Aislamiento de células madre neuronales adultas y progenitoras. Ratas adultas Fisher 344 se sacrificaron por CO₂ asfixia seguido por dislocación cervical. Cerebros completos fueron retirados intactos usando unas pinzas de hueso y tejido del hipocampo diseccionado basado en incisiones coronales posteriores al motor y regiones somatosensoriales del cerebro (Paxinos, G. y Watson, C. 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*).

El tejido se lavó en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27 (suplemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 mM; Invitrogen), y penicilina/estreptomina (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.

[0312] 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. ADNasa (100 microlitros por 8 mililitros de volumen total, Sigma, St. Louis, MO) se añadió también. A continuación, el tejido/media se pasó secuencialmente a través de una aguja de calibre 18, aguja de calibre 20, 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 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 células de 40 micrómetros (Becton Dickinson), se colocan en matraces T-75 recubiertos con laminina (Becton Dickinson) o placas de 24 pocillos de bajo racimo (Becton Dickinson), y se cultivaron en medio NPE + bFGF + EGF hasta obtenerse números de células suficientes para los estudios indicados.

[0313] Siembra de la célula. Células derivadas (cordón umbilical (022803) P12, (042103) P12, (071003) P12; placenta (042203) P12) previamente cultivadas en Medio de Crecimiento se sembraron a 5.000 células/inserto transwell (clasificado para placa de 24 pocillos) y se cultivaron durante un período de una semana de medio de crecimiento en insertos para alcanzar la confluencia.

[0314] Siembra de progenitores neurales adultos. Progenitores neuronales, cultivados como neuroesferas o como 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 acuerdo con el siguiente esquema:

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

[0315] Inmunocitoquímica. Después de 7 días en el co-cultivo, todas las condiciones fueron fijadas con paraformaldehído frío al 4% (w/v) (Sigma) durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los epítomos enumerados en la Tabla 15-1. 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 diluyeron 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 los 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 IgG anti-ratón de cabra - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y de IgG anti-conejo de cabra - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes). Después, los cultivos se lavaron y DAPI de 10 micromolares (Molecular Probes) se aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0316] 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). En todos los casos, la tinción positiva representó 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 tomadas 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 15-1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

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

[0317] El análisis cuantitativo de la diferenciación de progenitor neural. Se examinó la cuantificación de diferenciación progenitor neural de hipocampo. Un mínimo de 1000 células fue contado por condición o, si es menor, el número total de células observado 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).

[0318] El análisis de espectrometría de masas y electroforesis en gel 2D. Con el fin de identificar los factores únicos, secretados como resultado del co-cultivo, 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). Residuos se aplicaron a cromatografía de inmunoafinidad (anti-Hu-albúmina; IgY) (inmunoafinidad no eliminó la albúmina de las muestras). El filtrado se analizó por MALDI. El pase se aplicó a cromatografía de afinidad Cibachron Blue. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y electroforesis en gel 2D.

Resultados

[0319] Co-cultivo de células derivadas estimula la diferenciación de adultos progenitoras neurales. Después de cultivo con células derivadas del cordón umbilical de placenta, células progenitoras neurales co-cultivadas derivadas de hipocampo de ratas adultas exhiben diferenciación significativa 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 elaboran procesos complejos y pierden sus características de fase brillante propias de la división de las células progenitoras. A la inversa, progenitores neurales cultivados solos en la ausencia de bFGF y EGF aparecieron poco saludables y la supervivencia fue limitada.

[0320] 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 positivas entre la mayoría de las células. Mientras que tanto las células derivadas del cordón umbilical como de placenta indujeron la diferenciación celular, el grado de diferenciación para los tres linajes fue menor en co-cultivos con células derivadas de placenta que en co-cultivos con células derivadas del cordón umbilical.

[0321] El porcentaje de progenitores neurales diferenciados tras co-cultivo con células derivadas del cordón umbilical se cuantificó (Tabla 15-2). Células derivadas del cordón umbilical mejoraron de forma significativa el número de oligodendrocitos maduros (MBP) (24,0% frente al 0% en ambas condiciones de control). Por otra parte, el co-cultivo aumentó el número de astrocitos GFAP + y neuronas TuJ1 + en cultivo (47,2% y 8,7% respectivamente). Estos resultados se confirmaron mediante tinción con nestina que indica que el estado de progenitoras se perdió después del co-cultivo (13,4% frente a 71,4% en condición de control 4).

[0322] A pesar de que 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, los fibroblastos no parecen mejorar la supervivencia de los progenitores neurales.

Tabla 15-2. La cuantificación de la diferenciación de progenitores de control frente a co-cultivo transwell con células derivadas de cordón umbilical (E = EGF, bFGF = F)

Anticuerpo	F + E/Umb [Cond. 1]	F + E/F + E [Cond. 4]	F + E/retirado [Cond. 5]
TuJ1	8,7%	2,3%	3,6%
GFAP	47,2%	30,2%	10,9%
MBP	23,0%	0%	0%
Nestina	13,4%	71,4%	39,4%

[0323] Identificación de compuestos únicos. Medios acondicionados de co-cultivos derivados del cordón umbilical y placenta, junto con los controles apropiados (medios NPE 6 1,7% de suero, los medios de co-cultivo con fibroblastos), se examinaron para diferencias. Potencialmente se identificaron compuestos únicos y extirpados de sus respectivos geles 2D.

[0324] Resumen. Co-cultivo de células progenitoras neurales adultas con células derivadas del cordón umbilical o de placenta resulta en la diferenciación de esas células. Los resultados presentados en este ejemplo indican que la diferenciación de células progenitoras neurales adultas tras co-cultivo con células derivadas del cordón umbilical es particularmente profunda. En concreto, un porcentaje significativo de los oligodendrocitos maduros fue generado en co-cultivos de células derivadas del cordón umbilical. En vista de la falta de contacto entre las células derivadas del cordón umbilical y los progenitores neurales, este resultado parece ser una función de factores solubles liberados de las células derivadas del cordón umbilical (efecto trófico).

[0325] Varias otras observaciones se llevaron a cabo. 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, 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 de que el contacto entre progenitores indujo esta diferenciación (Song, H. et al 2002. *Naturaleza* 417 (6884): 39-44).

EJEMPLO 16

El trasplante de células derivadas de cordón umbilical y placenta

[0326] Las células derivadas de cordón umbilical y placenta son útiles para las terapias regenerativas. Se evaluó el tejido producido por el tejido del cordón umbilical y células derivadas de placenta trasplantadas en ratones SCID con un material biodegradable. Los materiales evaluados fueron vicrilo no tejido, 35/65 espuma de PCL/PGA, y hidrogel péptido de auto-montaje de RAD 16.

Métodos y Materiales

[0327] Cultivo de células. Células derivadas del cordón umbilical y placenta se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM de baja glucosa (Gibco, Carlsbad CA), 15% (v/suero bovino fetal (Cat v) # SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 0.001 % (v/v) betamercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), penicilina/estreptomocina (Gibco)) en un matraz recubierto de gelatina.

[0328] Preparación de la muestra. Un millón de células viables fueron sembradas en medio de crecimiento de 15 microlitros a 5 mm de diámetro, andamios no tejidos de vicrilo de un espesor de 2,25 mm (64.33 miligramos/cc; Lote#3547-47-1) o 5 mm de diámetro espuma 35/65 PCL/PGA (Lote#3415-53). 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.

[0329] Péptidos de auto-montaje RAD16 (3D Matrix, Cambridge, MA bajo un acuerdo de transferencia de material) en forma de una solución de 1% estéril (w/v) en agua, que se mezcló 1:1 con 1×10^6 células en 10% (w/v) de sacarosa (Sigma, St Louis, MO), HEPES 10 mM en medio modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) inmediatamente antes de su uso. La concentración final de células en hidrogel RAD16 era de 1×10^6 células/100 microlitros.

MATERIAL DE PRUEBA (N=4/Rx)

1. Vicrilo no tejido + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
2. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
3. RAD 16 péptidos de auto-montaje + 1×10^6 células derivadas del cordón umbilical
4. Vicrilo no tejido + 1×10^6 células derivadas de placenta
5. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1×10^6 células derivadas de placenta
6. Péptidos de auto-montaje RAD 16 + 1×10^6 células derivadas de placenta
7. Espuma 35/65 PCL/PGA
8. Vicrilo no tejido

[0330] Preparación de los animales. Los animales 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.

[0331] Ratones (*Mus Musculus*)/Fox Chase SCID/Macho (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana), 5

semanas de edad. Toda la manipulación de los ratones SCID se llevaron a cabo bajo una campana. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kg KETASET (hidrocloruro de ketamina, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) y 10 miligramos/kg 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. A continuación, el área fue borrada con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó, y se pinta con una solución de yodóforo acuoso de 1% de yodo disponible. Pomada oftálmica se aplicó a los ojos para evitar el secado del tejido durante el periodo de anestesia.

[0332] Técnica de implantación subcutánea. Cuatro incisiones en la piel, cada una 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 mm caudal al borde inferior palpado de la escápula, 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, sobre 5-mm caudal a la cresta ilíaca palpada, con una a cada lado de la línea media. Los implantes se colocaron al azar en estos sitios, de acuerdo con el diseño experimental. La piel se separó del tejido conectivo subyacente para hacer un pequeño bolsillo y el implante se colocó (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.

[0333] Alojamiento 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 ciclo de luz/12 horas ciclo de oscuridad. La temperatura y humedad relativa se mantuvieron dentro de los intervalos indicados en la mayor medida posible. La dieta consistía en Irradiated Pico Mouse Chow 5058 (Purina Co.) y agua alimentada *ad libitum*.

[0334] Los ratones fueron sacrificados en sus intervalos designados por inhalación de dióxido de carbono. Los sitios de implantación subcutánea con su piel suprayacente fueron extirpados y congelados para la histología.

[0335] Histología. La piel extirpada con implante se fija con 10% de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Las muestras con tejido suprayacente y adyacente fueron biseccionadas centralmente, procesadas en parafina, y embebidas 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 (Poli Bay Scientific Shore, NY) usando métodos de rutina.

Resultados

[0336] Hubo crecimiento interno mínimo de tejido en espumas (sin células) implantadas subcutáneamente en ratones SCID después de 30 días. En cambio, hubo relleno de tejido extenso en espumas implantadas con células derivadas del cordón umbilical o células derivadas de placenta. Cierta cantidad de crecimiento de tejido se observó en andamios no tejidos de vicrilo. Andamios no tejidos sembrados con células derivadas del cordón umbilical de placenta mostraron una mayor deposición de la matriz y los vasos sanguíneos maduros.

[0337] Resumen. Discos sintéticos absorbibles no tejidos/de espuma (5,0 mm de diámetro x 1,0 mm de espesor) o hidrogel de péptido de auto-montaje se sembraron con células derivadas del cordón umbilical humanas o placenta e implantadas subcutáneamente bilateralmente en la región de columna vertebral dorsal de ratones SCID. Los resultados demostraron que las células derivadas de posparto podrían dramáticamente aumentar la formación de tejido de buena calidad en estructuras biodegradables.

EJEMPLO 17

El uso de reparación del nervio de celsina derivado de tejido de cordón umbilical y de placenta

[0338] Lesiones de células ganglionares de la 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 de roedores adultos resulta en brotación abortiva (Zeng et al POR J. Anat.186.: 495-508 (1995)) y la muerte progresiva de la población de células madre (Villegas Pérez et al., J Neurosci.8: 265-80 (1988)). 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 So, Prog Retin Eye Res. 19: 559-75 (2000); Fischer et al D Exp Neurol.172: 257-72 (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-CuetoA et al, Neuron 25: 425-35 (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, nervios pudendos, nervios ópticos u otras enfermedades/trauma debido a una lesión donde se puede producir daño nervioso.

[0339] Se han desarrollado péptidos de auto-montaje (PuraMatrix™, Patentes de Estados Unidos 5,670,483,

5.955.343, aplicaciones US/PCT US2002/0160471, WO 02/062969) para actuar como un andamio para unión celular para encapsular las células en 3-D, células de placa en recubrimientos 2-D, o como microportadores en cultivos en suspensión. El cultivo de células en tres dimensiones ha requerido materiales derivados de animales (extracto del sarcoma de ratón), con su reproducibilidad inherente y problemas de señalización celular, o andamios sintéticos mucho más grandes, que no logran aproximarse a la escala nanométrica física y atributos químicos de MEC nativa. RAD 16 (NH₂ (RADA)₃-COOH) y KLD (NH₂ (KLDL)₃-COOH) se sintetizan en pequeños (RAD16 es 5 nanómetros) fragmentos de oligopéptidos que se auto-ensamblan para formar nanofibras en una escala similar a la matriz extracelular in vivo (MEC) (3D Matrix, Inc Cambridge, MA). El autoensamblaje es iniciado por cationes mono- o divalentes encontrados 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 células derivadas del tejido del cordón umbilical y de placenta en el defecto ocular. En este ejemplo, se demuestra que los trasplantes de tejido de cordón umbilical y células derivadas de placenta pueden proporcionar eficacia en un modelo de regeneración axonal de nervio óptico de ratas adultas.

15 **Métodos y Materiales**

[0340] **Células.** Los cultivos de células derivadas de cordón umbilical humano adulto y de placenta y células de fibroblastos (Pasaje 10) se expandieron durante 1 pasaje. Todas las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento con 100 unidades por mililitro de penicilina, 100 microgramos por mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos por mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA). En el Pasaje 11 se tripsinizaron las células y se determinó la viabilidad usando tinción con azul tripán. 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 fueron lavadas tres veces en suplemento de medio libre L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células fueron suspendidas 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 de suplemento libre por encima de la suspensión de células/matriz para mantenerlo húmedo 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.

[0341] **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 intraorbitalmente en la funda óptica a aproximadamente 2 milímetros desde el disco óptico, el nervio se levantó de la vaina para permitir la transección completa con tijeras finas (Li Y et al, 2003, J. of Neuro. 23 (21): 7.783-7788). La integridad de la transección se confirmó mediante la observación visual de la separación completa de los extremos proximal y distal. El grupo de control consistió en ratas lesionadas sin trasplantes. En las ratas de trasplante, células cultivadas posparto sembradas en RAD-16 se insertaron entre los extremos proximal y distal utilizando un par de microfórceps. Aproximadamente 75.000 células en RAD-16 se implantaron en el nervio óptico cortado. Celular/matriz se aplica en el corte seccionado con un par de microfórceps finas. La vaina del nervio óptico seccionado se cerró con 10/0 monofilamento de nylon negro (Ethicon, Inc., Edimburgo, Reino Unido). Por lo tanto, la brecha se cierra por acercar el corte proximal y distal del nervio entre sí.

[0342] 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 resultante en sangre: 250-300 microgramos/litro) (Bedford Labs, Bedford, Ohio) a partir de 2 días pre-trasplante hasta el final del estudio. Alimentos y agua estaban disponibles *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados a los 30 ó 60 días después del trasplante.

[0343] **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 un 1% solución acuosa de toxina retrógrada trazador-cólera B (CTB) (List Biologic, Campbell, CA) se inyectó en el 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 de micrómetro se incubaron en 0,1 glicina 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 anti-CTB cabra (Lista biológica, Campbell, CA) diluido 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 de IgG anti-cabra de conejo biotinilado (vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido 1: 200 en 2% de Triton-X100 en PBS durante 2 hora a temperatura ambiente. Esto fue seguido por tinción en 1: 200 de 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.

[0344] **Preparación de histología.** 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), entonces con 4% de formaldehído. La médula espinal se cortó y el hueso retirado 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 llega tan lejos como sea 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 este se colocó en 4% de paraformaldehído.

Resultados

[0345] 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 observó que los axones emitían un número de colaterales en ángulo recto al eje principal y terminaban como una maraña neurómata en la superficie de corte. En este corte entre los extremos proximal y distal, se observó que la brecha se puentesaba progresivamente por un segmento de 2 a 3 milímetros de tejido conectivo vascularizado; sin embargo, no se observó que axones avanzaran en esta área en puente. Así, en los animales que recibieron solo lesión no se observó crecimiento axonal para alcanzar el extremo distal.

[0346] Trasplante RAD-16. 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.

[0347] El trasplante de tejido del cordón umbilical o células derivadas de placenta. El trasplante de células 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 trasplantadas derivadas de placenta. Se observó nuevo crecimiento del nervio óptico en 4/5 animales trasplantados con células derivadas de placenta, 3/6 animales trasplantados con fibroblastos dérmicos adultos y en 1/4 animales trasplantados con células derivadas del cordón umbilical. En situaciones donde se observó nuevo crecimiento, el CTB etiquetado confirmó la regeneración de axones de las células ganglionares de la retina, que se demostraron a 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 un poco de inmunotinción se observa a través del injerto reinervado.

[0348] Resumen. Estos resultados demuestran que placenta adulta humana trasplantada y células derivadas del tejido de cordón umbilical son capaces de estimular y guiar la regeneración de axones de las células ganglionares de la retina de corte.

EJEMPLO 18

El uso de células del cordón umbilical y placenta en reparación de los nervios dopaminérgicos

[0349] Se ensayaron células posparto derivadas del cordón umbilical y de la placenta por su capacidad para impartir mejoras funcionales en roedores lesionados de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) como un modelo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (Eisenhofer, G. et al (2003) FASEB J. 17L1248-1255; Rios M. et al (1999) J. Neurosci 1999: 3519-26; Xu Y. et al (1998) J. Neurosci Res 54: 691-7).

Métodos y Materiales

[0350] Modelo animal y agrupamiento. Lesión neuroquímica intraparenquimatosa del cuerpo estriado, SNc, o por vía nigroestriatal 6-hidroxidopamina (6-OHDA) se usa comúnmente como un modelo de roedor fiable para la enfermedad de Parkinson. 6-OHDA destruye las neuronas dopaminérgicas, lo que lleva al desarrollo de Parkinson. Ratas Sprague-Dawley hembra de dos meses de edad (275-300g) que iban a ser lesionadas con 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior, induciendo un fenotipo parkinsoniano, fueron compradas directamente de Charles River Laboratories (Montreal, Canadá).

[0351] A su llegada, a los animales se les dio un plazo de una semana para la habituación antes de someterse a un trasplante, y se les permitió alimentarse *ad libitum* durante todo el período experimental, excepto durante el ayuno requerido por la prueba de alcance de pata experto descrita a continuación. Las ratas fueron alojadas dos por jaula, bajo la supervisión diaria de la variación de peso y puestas a prueba durante la fase de luz de un ciclo de luz:oscuridad 12:12. El cuidado de los animales y los experimentos se llevaron a cabo de conformidad con la Guía Canadiense para el Cuidado y Uso de Animales de laboratorio y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado de Animales de la Universidad Laval. Déficits de comportamiento asociados con la lesión 6-OHDA se evaluaron dos semanas y media después de la cirugía por la estimulación con apomorfina.

[0352] Puntuaciones de rotación se utilizaron para asignar los animales a los cuatro grupos. El injerto se realizó a ciegas por dos investigadores involucrados en este estudio. Tres grupos fueron injertados con diferentes tipos de

células (n = 18 según el tipo de célula; desconocido para el grupo de investigación), y un grupo recibió vehículo (medios de cultivo celular) y sirvió como control (n = 6). Las ratas se sacrificaron a las 4, 8 y 16 semanas después (tipos n = 6 por célula y n = 2 de control en cada punto de tiempo) del trasplante. Antes de cada sacrificio, las ratas fueron evaluadas periódicamente mediante tres medidas conductuales: la estimulación con apomorfina, prueba de alcance de pata experto y el giro de la cabeza.

[0353] Trasplantes celulares. Los cultivos de células adultas humanas derivadas del cordón umbilical, de la placenta y fibroblastos (originales) se expandieron (Pasaje 10) para un pasaje. Todas las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. Para pasajes posteriores, todas las células se trataron como sigue. Después de tripsinización, las células viables se contaron después de la tinción de azul de tripano para la viabilidad. Brevemente, 50 microlitros de suspensión de células se combinaron con 50 microlitros de azul tripán (Sigma, St. Louis MO) y el número de células viables se estimó usando un haemocitómetro. Las células se trataron con tripsina y se lavaron tres veces en DMEM: medio bajo de glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA) (este medio es suero y libre de suplemento). Los cultivos de células humanas derivadas de cordón umbilical y de placenta, se trataron con tripsina y fibroblastos (Pasaje 11) y se lavaron dos veces en Leibovitz, medio L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células (2 x 10⁵ células por inyección) se resuspendieron en 2 microlitros de Leibovitz, medio L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

[0354] Cirugía Animal. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por la IACUC (Centre de Recherche du Chul, Local RC-9800, 2705 Blvd Laurier, Ste-Foy, Quebec, Canadá G1V 4G2). El trasplante se realizó bajo ketamina/xilacina (75/10 mg/kg ip) anestesia con los animales montados en un marco estereotáxico de animales pequeños (Modelo 900, David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Cada trasplante se llevó a cabo mediante la infusión de las células a través de un acero inoxidable de aguja biselada de calibre 26 (45°) unido a un 5 µl microjeringa (Hamilton Company, Reno, NV) montada en una unidad de microinyección motorizada (Modelo UMPII, David Kopf Instruments, Tujunga, CA) de la bomba de infusión. Las células (o medios de cultivo) se infunden en el cuerpo estriado a una velocidad de 1,0 µl/min/sitio a una concentración media de 100.000 células/µl para un total de 2 µl por animal de acuerdo con las siguientes coordenadas (si la concentración fue inferior, el volumen de inyección se ajustó a trasplantar consistentemente el mismo número de células en todos los animales): a = 0,5 mm anterior al bregma, L = 3,0 mm lateral a la línea media, V = -4,7 mm (sitio 1) y -4,5 mm (sitio 2) vertical por debajo de la duramadre, con la barra incisiva fijada -2,5 mm por debajo de la línea interauricular. Después de la terminación de la inyección de células, se dejó la aguja en su lugar por un adicional de 3 min para permitir la difusión de las células antes de retirar la aguja. Las ratas fueron tratadas con 30 mg/kg de ciclosporina A (25 mg CsA/ml diluido en aceite de oliva, Bedford Laboratories, Bedford, OH) un día antes del trasplante y dado 15 mg/kg/día de CsA para el período restante del experimento mediante inyección subcutánea (s.c.). Los animales que sirvieron como controles no recibieron CsA. Todos los animales recibieron 10 ml de lactato y 0,03 mg/kg de buprenorfina antes de la cirugía como tratamiento pre-operatorio y dos veces al día (lactato una vez al día) durante tres días después de la cirugía.

[0355] Prueba de comportamiento rotacional de apomorfina. Las ratas fueron expuestas inicialmente dos semanas y media antes del trasplante y, posteriormente, 2 días antes de los diversos puntos de tiempo de sacrificio (4, 8 y 16 semanas después del trasplante). Cada rata recibió una dosis de 0,05 mg/kg por inyección i.p. y se colocó inmediatamente en el aparato de estimulación con apomorfina (cuenco esférico). Un arnés que consta de un elástico colocado alrededor del pecho de la rata justo detrás de los codos se une por un velcro apropiado a una cuerda aproximadamente 16 pulgadas ajustadas en un rotámetro conectado a un ordenador registrando el número total de vueltas de cuerpo completos que efectúe la rata y la dirección de rotación (Rotometer System, San Diego Instruments, San Diego, CA). La puntuación final utilizada para el análisis se deriva de la sustracción del número total de vueltas ipsilaterales del número total de vueltas contralaterales. El análisis estadístico se realizó mediante medidas repetidas ANOVA utilizando (programa estadístico SAS).

[0356] Giros de cabeza. Los animales fueron probados antes del trasplante para establecer la línea de base, y después desafiados cada dos semanas después del trasplante. Cada rata fue probada en cuanto a la posición de la cabeza con respecto al cuerpo durante 60 segundos cada cinco minutos tres veces por desafío. El número total de desviación de la cabeza de su cabeza (una desviación superior a 10° se considera que es un giro de la cabeza) se registró para los lados izquierdo y derecho por separado y se calculó el número medio de giro por minuto durante tres minutos para las dos partes. La evaluación se hizo independientemente de la actividad de la rata, incluida la cría y cuidado. La diferencia entre el número medio de giros a la izquierda y derecha se calculó para determinar la recuperación del comportamiento y de medidas repetidas ANOVA se realizaron como para el desafío de apomorfina.

[0357] Alcance de pata experto. La capacidad de alcance de pata experto se evaluó a las 4, 8 y 16 semanas después del post trasplante a través de un protocolo publicado previamente (Moore et al, 2001 Exp Neurol 2001 172 (2): 363-76). El aparato se compone de un recipiente de vidrio plexiforme que tiene dos compartimentos. La cámara principal (300 mm de largo x 115 mm de altura x 103 mm de ancho), donde se coloca la rata, tiene otra pieza de deslizamiento con los agujeros de aire. Una sección más estrecha se conduce de esta cámara (185 mm X 115 mm X 60 mm) y contiene una amplia plataforma central 22 mm que funciona a lo largo de su longitud, a una altura de 62 mm. A ambos lados de la plataforma es un canal de 19 mm, donde se encuentra una escalera de siete pasajes. La rata se sube a la plataforma y recoge bolas de comida 45 mg de pequeños pocillos dentro de cada pasaje. La

plataforma sobre la que sube la rata es lo suficientemente estrecha para evitar que la rata de la vuelta y llegando a la bandeja derecha con la pata izquierda o viceversa. Para asegurarse de que la rata no se limita a raspar bolitas de comida por el lado de la plataforma, la parte superior de la plataforma sobresale 5 mm a cada lado (Moore *et al.*, 2001). Esta versión de la prueba se lleva a cabo más de 12 días dividido en cuatro componentes: alojamiento, formación, privación de alimentos y de prueba. Alojamiento: (días 1-3) ratas se ponen en cajas vacías durante 20 minutos todos los días, después de lo cual se sacan de las cajas y se devuelven a sus jaulas. Formación: (días 4 y 5) ratas se colocan en jaulas de ensayo, con la escalera 2-6 cebadas con gránulos 6x45 mg de comida al pasaje para un total de 30 gránulos por cada lado para cada sesión de pruebas. Las ratas se dejaron en el aparato durante 20 minutos, después de lo cual las ratas se volvieron a la casa jaula. La privación de alimentos: (días 6 y 7) Las ratas están privadas de alimentos y se les permite comer durante cuatro horas directamente después de la prueba/entrenamiento de cada día (el agua permanece todo el tiempo). Pruebas: (días 8-12) cada rata se pone a prueba durante 20 minutos, durante cinco días. Escaleras 2-6 se ceban, como en el protocolo de entrenamiento. Después de la prueba, las ratas se retiran de sus jaulas, volvieron a su jaula y se les permitió comer libremente durante cuatro horas. El número de pastillas tomadas y comidas por cada rata se calcula y se registra para ambas patas izquierda y derecha por separado. Las proporciones fueron en promedio para los últimos 5 días de pruebas, dando una puntuación media de precisión para cada rata y se analizan utilizando ANOVA de medidas repetidas.

[0358] Histología. En el momento del sacrificio, los animales se anestesiaron profundamente con una inyección i.p. de pentobarbital (60 mg/ml, [0,1 ml/100 g]) y se perfundieron por vía intracardiaca con solución salina 0,9% que contiene 0,1% de heparina seguida de paraformaldehído (PFA) 4% en solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) pH 7,4. Después de la perfusión, se recogieron los cerebros y se fijaron posteriormente durante seis horas en PFA 4% y después se colocaron en sacarosa al 20% en PBS. Los cerebros se seccionaron 35 µm de espesor en un micrótopo de congelación (Leica Microsystems, Montreal, Canadá) y recogido y almacenado en serie en los anticongelantes, posteriormente recuperados y lavados en PBS para cada experimento.

[0359] Para la inmunohistología, las secciones se lavaron tres veces en PBS (0,1 M pH 7,4) y se pre-incubaron en una solución que contiene 0,4% de Triton X-100, 5% de NGS en PBS durante 60 minutos. Las secciones fueron incubadas durante la noche a 4°C en los anticuerpos primarios de acuerdo con las siguientes combinaciones: conejo anti-Iba-1 (Wako Pure Chemicals Industries, Richmond, VA; 1: 1000) y anti-ED1 de ratón (Serotech, Raleigh, NC; 1: 1000), proteína ácida fibrilar de conejo anti-glial (GFAP, DakoCytomation, Mississauga, ON; 1: 4000) y mitocondrias anti-humanas de ratón (Chemicon, Temecula, CA; 1: 500) o anti-GABA de conejo (Chemicon, Temecula, CA; 1: 200) (también combinarse con mitocondrias anti-humanas), diluido en PBS con 0,4% de Triton X-100. Después de lavarse en PBS, las secciones se incubaron en anticuerpos secundarios; Alexa Fluor® 488 anti-conejo de cabra altamente adsorbido en cruz (Molecular Probes, Eugene, OR; 1: 200) y Rodamina Red-X anti-ratón de cabra altamente adsorbido en cruz (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; 1: 200) en PBS durante dos horas y media a temperatura ambiente (TI). Después de lavarse, las secciones se incubaron en PBS que contenía 0,022% DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR), se lavaron y se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina, con cubreobjetos de montaje de medios DABCO casero (alcohol de polivinilo, DABCO, Tris-HCl 1,0 M pH 8,0, agua destilada, glicerol) y sellados con esmalte de uñas. La tinción de fluorescencia se evaluó utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon i90 acoplado a una cámara monocromática ORCA-285 Hamamatsu 1394 y explotado por la versión de software Simple PCI 5.3.0.1102 (Compix Inc Imaging Systems, PA, EE.UU.).

[0360] En el caso de doble inmunofluorescencia donde se hicieron ambos anticuerpos primarios en las mismas huéspedes, las secciones se lavaron en PBS 0,1 M y se preincubaron en PBS 0,1 M que contiene 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,4% de Triton X-100 (ambos de Sigma, St. Louis, MO). Seguido de una hora de incubación a TI con el primer anticuerpo primario; ratón anti-vimentina (Sigma, St Louis, MO; 1: 5000), anti-tubulina isoforma β III (Chemicon, Temecula, CA) o anti-ratón de proteína nuclear específica de neuronas (NeuN, Chemicon, Temecula, CA; 1: 5000), las secciones se lavaron y se incubaron una hora en una solución que contiene anticuerpo secundario de cabra conjugado con FITC anti-IgG de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1: 400) en PBS 0,1 M, 1% de BSA y 0,4% de Triton X-100. Después de lavarse en PBS, las secciones se incubaron durante una hora con 5% de suero de ratón normal (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), y después se lavaron de nuevo antes de incubarse con un exceso de fragmentos Fab de anticuerpos contra la especie huésped de anticuerpos primarios (20 µg/ml, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante una hora, se enjuaga adicionalmente con PBS. Las secciones se incubaron una hora a TI con el segundo anticuerpo primario a continuación; mitocondrias anti-humanas de ratón (Chemicon, Temecula, CA; 1: 500) en PBS que contiene 1% de BSA y 0,4% de Triton X-100. Después de lavarse en PBS, las secciones fueron finalmente incubadas con IgG anti-ratón de cabra de rodamina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1: 400) en PBS 0,1 M, 1% de BSA, 0,4% de Triton X-100 durante una hora. A continuación, las secciones se lavaron y se incubaron con DAPI para 7 min (Molecular Probes, Eugene, OR), montados y con cubreobjetos como se describe anteriormente.

[0361] Para la inmuno-tinción de hidroxilasa de tirosina (HT), las secciones se lavaron tres veces en PBS 0,1 M pH 7,4 y se colocó en peróxido de 3% durante 30 min a TI. Los cortes se lavaron posteriormente en PBS 0,1 M y después se preincubaron en una solución que contiene PBS 0,1 M, 0,1% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) y 5% suero de cabra normal (NGS, Wisent Inc., St-Jean -Baptiste de Rouville, QC) durante 30 min a TI. Las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con anti-HT (Pel-Freez, Rogers, AR; 1: 5000) en PBS, 0,1% Triton X-100 y 5% NGS. Después de la incubación durante la noche, las secciones se lavaron en PBS 0,1 M y se incubaron durante 1

hora a TI en una solución de PBS que contenía 0,1% de Triton X-100, 5% de NGS y biotina de anti-conejo de cabra (Vector Laboratories, Burlington, ON; 1: 1500). Después de tres lavados en PBS 0,1 M, las secciones se colocaron en una solución de complejo de peroxidasa de avidina-biotina (ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlington, ON) durante 1 hora a TI. Los anticuerpos se revelaron mediante la colocación de las secciones en solución tampón Tris que contenía un 0,05% 3,3'-tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO) y 0,1% de 30% de peroxidasa de hidrógeno a TI. La reacción se paró por lavado en tampón Tris 0,05 M y posteriores lavados con PBS. Los cortes se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina, secados al aire durante la noche, se deshidrataron en grados ascendentes de etanol y con cubreobjetos con medios de montaje DPX (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA).

Resultados

[0362] El control de peso. El peso del animal se controló diariamente. Como se muestra en la Figura 1, las ratas demostraron el aumento de peso lento y constante de 2 semanas después del trasplante. La pérdida de peso registrada en 3-4, 7 y 15 semanas después del trasplante fue factible debido al ayuno requerido para el ensayo de la escalera. Continuación de la pérdida de peso ligero después de la primera estimulación con apomorfina era probablemente debido a la pérdida temporal del apetito. Dos animales de tipo celular 1, programados para ser sacrificados a las 8 semanas, fueron intercambiados con dos ratas programadas para sacrificarse a las 4 semanas debido a su pérdida de peso progresiva (Ratas N° 27, 49). A las 8 semanas post-trasplante, rata #60 de tipo celular 1 tuvo que sacrificarse un día antes de lo previsto por razones similares. A las 10 semanas post-trasplante, una n = 2 adicional de animales de tipo celular 2 sufrían de diarrea y pérdida de peso significativa demostrada. Estos animales recibieron inyecciones diarias de lactato, pero fueron encontrados muertos en la jaula 24 horas después de estas precauciones adicionales. Otras dos ratas del grupo 2 empezaron a mostrar problemas de salud similares y se sacrificaron de forma preventiva. El resto de n = 2 en el grupo 2 se sacrificó en última instancia, (24 horas después de la última perfusión de animales de grupo 2). Rata #40 del grupo 3 también fue sacrificado en la semana 13 del protocolo experimental debido a problemas de salud similares a los observados en el grupo 2. La rata n° 66 del grupo 1 fue encontrado muerto en su jaula a las 15 semanas. Los síntomas anteriores se parecían a los observados en los animales enfermos de los grupos 2 y 3. En resumen, los animales del grupo 2 (n = 6 restante) se sacrificaron a las 10 semanas post-trasplante, los animales de los grupos 1 y 3 fueron sacrificados a las 16 semanas post-trasplante como se previó (n = 5 para cada grupo). Abreviaturas: BB: línea de base de comportamiento; TP: Trasplante.

[0363] Estimulación de apomorfina. Se analizaron los cuatro grupos (células 1, 2, 3, vehículo) usando medidas repetidas ANOVA (variable: n° de rotaciones), que reveló que sólo el factor "tiempo" era significativo ($p = 0,0048$) indicando un efecto de "tiempo" para todos los grupos. Comparaciones múltiples mostraron una recuperación funcional significativa (disminución en el número de rotaciones) de todos los grupos entre el punto de tiempo "0" (línea de base) y 4 semanas después del trasplante (Figura 2). Esta disminución se mantiene en el tiempo después del punto de tiempo de 4 semanas. El último punto de las 16 semanas post-trasplante de tiempo no pudo analizarse utilizando medidas repetidas ANOVA desde el grupo 2 se sacrificaron antes de este punto del tiempo (Figura 2).

[0364] Un grupo de cinco animales, lesionados de forma independiente con 6-OHDA, pero no se sometió a ninguna intervención quirúrgica (trasplante), se añadió a las medidas repetidas de análisis de ANOVA. Cuando se añade este grupo a los cálculos de medidas repetidas ANOVA, sólo el grupo de interacción/tiempo tiene una fuerte tendencia a la significación estadística ($p = 0,0985$). Es posible que un número más significativo de animales habría reforzado esta tendencia a resultados significativos. Teniendo en cuenta que esta tendencia era indicativa de la recuperación funcional en el tiempo, un análisis más detallado reveló que sólo las células umbilicales (teléfonos 1) indujeron efectos beneficiosos significativos en el tiempo ($p = 0,0056$) y que los animales lesionados que no se sometieron a intervenciones quirúrgicas intracraneales mostraron una tendencia hacia la no recuperación funcional en el tiempo (este resultado no es significativo a $p = 0,0655$).

[0365] Giros de la cabeza. Giros de la cabeza representan el número total de rotaciones ipsilaterales realizadas por los animales después del trasplante celular. En los puntos de tiempo ensayados (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, y 16 semanas después del trasplante) no se observaron diferencias significativas entre los animales trasplantados con células o animales que recibieron el vehículo solo (Figura 3). Giros de la cabeza son puramente subjetivos y determinan la tendencia natural de la rata para girar la cabeza hacia la izquierda o la derecha después de la lesión. Todos los grupos se analizaron mediante medidas repetidas ANOVA (variable: diferencia entre el número de giros de cabeza izquierdo y derecho). A medida que aumentaba el tiempo en este estudio, se observó una mejora en términos de no sesgo para el giro de la cabeza, sin embargo, esto era evidente en todos los grupos (Figura 3).

[0366] Prueba de escalera. No se identificaron diferencias significativas entre los grupos de control trasplantado o el uso de esta prueba. La prueba de escalera midió la ingesta de alimentos en períodos de prueba de 20 minutos, lo que requiere movimientos finos para recoger alimentos en las escaleras. Todos los grupos se analizaron mediante medidas repetidas ANOVA (variables: índices de gránulos comidos y tomados). Utilizando esta prueba se determinó a lo largo del tiempo una diferencia en los comportamientos alimentarios. Sin embargo, no se pudo determinar una diferencia significativa entre los grupos (Figura 4).

[0367] Inmuntotini3n. Secciones H&E demostraron buen injerto celular 1 dfa post-trasplante. Las c3lulas se identificaron en los sitios de trasplante de hasta 8 semanas despu3s del trasplante por tinci3n de antfgeno nuclear humano aunque el n3mero de c3lulas humanas se habfa reducido en respuesta a tiempo en el injerto. En la actualidad, no hay datos que han confirmado que las c3lulas derivadas posparto diferenciadas en un fenotipo neuronal despu3s de un trasplante *in vivo* en este modelo de sistema.

[0368] Injertos de c3lulas se analizaron para la presencia del marcador microglial Iba-1. Como se muestra en la Figura 5a, Iba-1 se expresa abundantemente por cada tipo de c3lulas, especialmente en relaci3n con los controles del vehfculo. Se encontr3 que expresi3n Iba-1 tendfa hacia el declive en el tiempo (Figura 5a). Evaluaci3n de ED-1 en animales trasplantados demostr3 que una respuesta de los macr3fagos era evidente despu3s de un trasplante, el nivel de tinci3n de ED-1 disminuy3 en todos los grupos excepto animales trasplantados con fibroblastos en el tiempo (Figura 5b). La tinci3n DAPI generalmente se mantuvo constante durante toda la duraci3n del estudio (Figura 5c).

[0369] De manera similar, la determinaci3n de los niveles de la protefna 3cida fibrilar glial (GFAP) en los injertos para determinar los n3meros de astrocitos reactivos tras injerto demostr3 que astrocitos inicialmente reactivos se identificaron despu3s de la administraci3n del trasplante o vehfculo un efecto que disminuye con el tiempo (Figura 6a). De acuerdo con otras observaciones que muestran la diferenciaci3n de las c3lulas en el injerto, se encontr3 que vimentina se expresa abundantemente en las c3lulas cuatro semanas despu3s del injerto, pero la expresi3n se redujo constantemente durante las siguientes doce semanas (Figura 6b).

[0370] La tinci3n para la hidroxilasa de tirosina humana fue negativa. Por lo tanto, ni las c3lulas umbilicales ni las placentarias se diferenciaron en c3lulas dopamin3rgicas en las condiciones de tratamiento utilizadas.

Resumen

[0371] Los resultados demostraron que la implantaci3n de c3lulas umbilicales proporcionaron mejora funcional con el tiempo en un modelo de 6-OHDA de Parkinson seg3n la evaluaci3n de la capacidad de respuesta de comportamiento a la estimulaci3n con apomorfina. Tanto la prueba de escalera y de giro de cabeza se llevaron a cabo para determinar los efectos sobre la activaci3n de diferentes trazados de circuito neuronal y/o mecanismos. No se identificaron diferencias usando estos par3metros de prueba, por lo tanto un mecanismo relacionado con el beneficio positivo visto a las 4 y 8 semanas en los animales que recibieron trasplantes umbilical sigue sin resolverse.

[0372] La tinci3n inmunohistoqufmica demostr3 que no habfa evidencia de diferenciaci3n celular tras el injerto de c3lulas. No se pudo demostrar diferenciaci3n neuronal, o m3s especficamente, dopamin3rgica en estos estudios. Por lo tanto, no se pudo verificar evidencia para la diferenciaci3n celular en el sitio del injerto. Esto sugiere, adem3s, que las mejoras observadas en el comportamiento de estimulaci3n con apomorfina despu3s de un trasplante de c3lulas umbilicales probablemente se debe a una respuesta tr3fica y no es resultado del potencial de c3lulas regenerativas.

[0373] No se observaron c3lulas HT-inmunopositivas en cualquier tipo de c3lula en cualquier punto de tiempo. Sin embargo, HT no es la 3nica vfa celular para la producci3n de dopamina. La dopamina se puede producir de forma independiente de la hidroxilasa de tirosina, a trav3s de la vfa de la tirosinasa. Por otra parte, la dopamina, en presencia de tirosinasa, modifica covalentemente e inactiva la hidroxilasa de tirosina. Adem3s, las c3lulas trasplantadas pueden permitir el procesamiento de DOPA (amino3cido de los alimentos) en el plasma despu3s de una comida a DOPA.

Ejemplo 19

Matrices de citoquinas RayBio® y BD Powerblot™

[0374] RayBio® Matriz de anticuerpos humanos de citoquinas Serie C 1000 se utiliz3 para analizar la expresi3n de 120 protefnas en c3lulas derivadas posparto y lisados. Este an3lisis proporciona una caracterizaci3n de las UTCs y se identific3 un espectro de expresi3n de factores tr3ficos clave para estas c3lulas.

Materiales y m3todos

[0375] Crecimiento celular y cosecha. C3lulas derivadas de cord3n umbilical se sembraron a 5.000 c3lulas por cm² en matraces recubiertos de gelatina con medio de crecimiento y se expandieron durante 3 a 4 dfa (25.000 c3lulas por cm² densidad de recogida diana). Las c3lulas se recogieron con tripsina, se retiraron y se centrifugaron a 300 rcf durante 5 minutos. La tripsina/medio se retir3 por aspiraci3n y las c3lulas se lavaron tres veces con soluci3n salina tamponada con fosfato (PBS).

[0376] Lavado celular y divisi3n en alfcuotas. Despu3s del lavado, las c3lulas se resuspendieron en 10⁷ c3lulas/ml en PBS y se entregan en forma de alfcuotas de 1 ml en tubos de microcentrifuga siliconada de 1,5 ml est3riles. Las c3lulas se centrifugaron a 300 rcf durante 5 minutos y el PBS se retir3 por aspiraci3n. Las c3lulas se lisaron bien y se analizaron por la matriz, o se lisaron y se liofilizaron para su an3lisis.

[0377] Preparación de las muestras liofilizadas. Tres lotes de células (UTC Lotes L040405, L052505, L050505) fueron preparados para la eventual liofilización mediante la inmersión en nitrógeno líquido (LN2) durante 60 segundos. Los tubos después se retiraron del LN2 e inmediatamente se sumergieron en un baño de agua a 37°C durante 60 segundos o hasta descongelarse (tiempo máximo de incubación de 3 minutos). Este proceso se repitió dos veces más. Las muestras de congelación-descongelación se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 RCF a 4°C y se colocaron en hielo. Se retiró el fluido sobrenadante de cada tubo. Para determinar el contenido total de proteína, el lisado se diluyó en PBS y la dilución se analizó por el ensayo de Bradford.

[0378] Para la liofilización, múltiples crioviales de 1,5 ml estériles marcados con lisado se cargaron en un bloque de transferencia de calor en autoclave y se enfrió. Las alícuotas de líquido sobrenadante de lisado a una concentración de proteína total definida fueron cargados en los crioviales. Crioviales destapados que contenían bloque de calor se cargaron asépticamente en la bolsa de autoclave de productos no utilizados en autoclave. La bolsa se carga en el liofilizador.

[0379] Los materiales de ensayo con lisado aplicado se cargaron en un FTS Systems Dura-Stop MP Stoppering Tray Dryer y se liofilizaron usando el siguiente programa de rampa. Todos los pasajes tuvieron una tasa de rampa de 2,5°C/minuto y un vacío de 100 mT.

Etapa	Estantería de temperatura (° C)	Mantenga Tiempo (minutos)
a	-40	180
b	-25	2160
c	-15	180
d	-5	180
e	5	120
f	20	120
g	20	60

[0380] Preparación de gránulos de células. Gránulos de células congelados (lotes 063004B, 022803, 050604B, 072804, 120304, 071404C, 090304) se lisaron usando una mezcla 1: 1 de tampón RIPA (50 mM Tris HCl, pH 8, NaCl 150 mM, 1% NP-40, 0,5% desoxicolato de sodio y 0,1% de SDS) y tampón de lisis celular proporcionado en el matriz de citoquinas RayBio® 1000,1 kit (RayBiotech Inc. Norcross, GA). Las perlas de vidrio (Sigma, MO) se utilizaron para lograr la lisis celular completa. La concentración de proteína se midió usando el kit de matriz de proteína BCA (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL).

[0381] Análisis de matriz RayBio®. Matrices RayBio® VI y VII, que constituyen la matriz 1000,1, se sondearon durante una noche con cantidades iguales de proteína de cada muestra. El protocolo restante fue seguido según las directrices del fabricante. Las manchas en la membrana se analizaron cualitativamente para determinar las proteínas de interés. Por comparación cuantitativa entre las muestras, estas manchas podrían ser analizadas por densitometría y cambios en expresión confirmados por ELISA.

Resultados

[0382] Se analizaron un total de diez diferentes poblaciones UTC. Cuarenta y ocho proteínas se identificaron cualitativamente y se enumeraron en la Tabla 19-1. Algunas proteínas se expresaron a concentraciones relativamente altas en todas las muestras analizadas, mientras que otras se expresaron en ciertas muestras.

Tabla 19-1. Proteínas UTC cualitativamente identificadas.		
Número	Factor trófico	Abreviatura
1	Factor neurotrófico derivado del cerebro	BDNF
2	Factor básico de crecimiento de fibroblastos	bFGF
3	Proteína morfogenética ósea-4	BMP-4
4	Proteína morfogenética ósea-6	BMP-6
5	MPIF-1	CK b 8-1
6	Factor neurotrófico ciliar	CNTF
7	CCL27 (quimiocina atraer cutáneo de células T)	CTACK
8	Factor de crecimiento epidérmico	EGF
9	CCL26	Eotaxina-3
10	Fas antígeno	Fas/TNFRSF6
11	Factor de crecimiento fibroblástico-6	FGF-6
12	Quinasa de tirosina relacionada con FMS 3	FIT-3 ligando
13	Quimiocina CS3C	Fractalquina
14	Factor estimulante de colonias de granulocitos	GCSF
15	Proteína relacionada con superfamilia inducida por glucocorticoides receptor de TNF	GITR ligando
16	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	GM-CSF
17	Factor de crecimiento de hepatocitos	HGF
18	CCL1	I-309
19	Moléculas de adhesión Intercelular 1	ICAM-1
20	Proteína de unión de factor de crecimiento similar a insulina-1	IGFBP-1
21	Proteína de unión de factor de crecimiento similar a insulina-2	IGFBP-2
22	Proteína de unión de factor de crecimiento similar a insulina-3	IGFBP-3
23	Proteína de unión de factor de crecimiento similar a insulina-6	IGFBP-6
24	Interleucina-10	IL-10
25	Interleucina-13	IL-13
26	Interleucina-1a	IL-1a
27	Interleucina-1Ra	IL-1Ra
28	Interleucina-3	IL-3
29	Interleucina-5	IL-5
30	Interleucina-6	IL-6
31	Interleucina-7	IL-7
32	Interleucina-8	IL-8
33	Quimiotáctica de células T IFN-inducible	I-TAC
34	Proteína quimiotáctica de monocitos-1	MCP-1
35	Factor inhibidor de la migración	MIF
36	Proteína inflamatoria de macrófagos-1	MIP-1a
37	Oncostatina M	Oncostatina M

(continuación)

Número	Factor trófico	Abreviatura
38	Fosfatidilinositol glicano F	PIGF
39	Cadena transductora soluble gp130-señal	sgp130
40	Factor de crecimiento transformante-B1	TGF-b1
41	Factor de crecimiento transformante-B3	TGF-b3
42	Trombopoyetina	Trombopoyetina
43	Inhibidor tisular de metaloproteinasa 2	TIMP-2
44	Factor de necrosis tumoral-alfa	TNF-a
45	Factor de necrosis tumoral-beta	TNF-b
46	Receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF-3	TRAIL-R3
47	Receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF-4	TRAIL-R4
48	Receptor activador de plasminógeno de tipo uroquinasa	uPAR

Resumen

[0383] La matriz RayBio® confirma la expresión de las proteínas previamente identificadas por el conjunto de genes y/o análisis ELISA. Se han identificado varios factores tróficos beneficiosos para el tratamiento específico de la enfermedad. Por ejemplo, FGF, TGF-b, y GCSF se identificaron en UTCs, y estos factores de crecimiento han sido previamente identificados con mejoras en los modelos animales de accidente cerebrovascular agudo y recuperación del accidente cerebrovascular. Además, BDNF, BMP-4, BMP-6 y TGF-b1, que están asociados positivamente con la enfermedad de Parkinson, se han identificado en UTCs. Todos los datos presentados son evaluadas cualitativamente; análisis cuantitativo del nivel de expresión de proteínas de interés está pendiente.

EJEMPLO 20**Expresión de telomerasa en células derivadas del cordón umbilical**

[0384] Funciones de telomerasa para sintetizar repeticiones teloméricas que sirven para proteger la integridad de los cromosomas y para prolongar la vida replicativa de las células (Liu, K, et al, PNAS, 1999; 96: 5147-5152). La telomerasa se compone de dos componentes, plantilla de ARN de telomerasa (hTER) y la transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT). La regulación de la telomerasa se determina por la transcripción de hTERT, pero no hTER. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) para hTERT ARNm, es por tanto un método aceptado para determinar la actividad de la telomerasa de las células.

[0385] **Aislamiento de células.** Se llevaron a cabo experimentos de PCR en tiempo real para determinar la producción de la telomerasa de las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. Se prepararon las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano de acuerdo a los ejemplos expuestos anteriormente. Generalmente, los cordones umbilicales obtenidos del National Disease Research Interchange (Philadelphia, Pa.) tras un parto normal se lavaron para eliminar la sangre y los residuos y se disociaron mecánicamente. Después, el tejido se incubó con enzimas de digestión, incluyendo la dispa de colagenasa, y hialuronidasa en medio de cultivo a 37°C. Células derivadas de tejido de cordón umbilical humano se cultivaron de acuerdo con los métodos establecidos en los ejemplos anteriores. Las células madre mesenquimales y fibroblastos normales de la piel dérmica (CC-2509 Lote#9F0844) se obtuvieron de Cambrex, Walkersville, Md. Un carcinoma embrionario testicular humano pluripotente (teratoma) de línea de células nTera-2 (NTERA-2 cl.DI), (véase, Plaia et al, células madre, 2006; 24 (3): 531-546) se adquirió de ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron de acuerdo con los métodos establecidos anteriormente.

[0386] **Aislamiento de ARN total.** Se extrajo el ARN de las células usando kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, Ca.). 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 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.

[0387] **PCR en tiempo real.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando el Applied Biosystems Assays-On-Demand™ (también conocido como TaqMan® Gene Expression Assays) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems). Este kit comercial es ampliamente utilizado para el ensayo de la telomerasa en las

células humanas. Brevemente, hTERT (gen humano de telomerasa) (HsOO162669) y GAPDH humanos (control interno) se mezclaron con ADNc y mezcla maestra TaqMan Universal de PCR usando un sistema de detección de secuencia 7000 con software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Datos de PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

[0388] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (ATCC N° de acceso PTA-6067), fibroblastos y células madre mesenquimales se ensayaron para hTERT y 18S ARN. Como se muestra en la Tabla 20-1, hTERT, y por lo tanto la telomerasa, no se detectó en las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

	hTERT	18S ARN
Células umbilicales (022803)	ND	+
Fibroblastos	ND	+
ND- no detectado; + Señal detectada		

[0389] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (aislado 022803, N° de acceso ATCC PTA-6067) y se analizaron las células NTERA-2 y los resultados no mostraron expresión de la telomerasa en dos lotes de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano, mientras la línea celular de teratoma reveló un alto nivel de expresión (Tabla 20-2).

Tipo de célula	hTERT		GAPDH		Norma hTERT
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	
NTERA2	22,85	27,31	16,41	16,31	0,61
022,803	-	-	22,97	22,79	-

[0390] Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas de tejido umbilical humano de la presente invención no expresan telomerasa.

EJEMPLO 21

El uso de células derivadas de tejido del cordón umbilical en el tratamiento de la ELA

[0391] Este estudio evaluó los efectos modificadores de enfermedad de células derivadas del tejido de cordón umbilical humano ("hUTC"), ya sea en la aparición o una semana después de inicio de la enfermedad para imitar el paradigma clínico en el que a los pacientes que presentan síntomas de ELA se les podría ser administrar hUTC. En particular, el objetivo de este estudio era determinar la eficacia de las células derivadas del tejido del cordón umbilical humano ("hUTC") en un modelo de rata SOD1 G93A de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). El efecto de la administración de hUTC en la supervivencia animal, y la función locomotora se evaluó después de la entrega hUTC a través de la inyección intratecal.

[0392] El fundamento para la administración local de hUTC a través de la inyección intratecal era la entrega de la célula correcta en el sitio de inicio de la enfermedad. Además, esta vía de administración no pasa la barrera sangre-cerebro, lo que permite un acceso rápido a los posibles sitios reactivos para el artículo de prueba en la médula espinal (Ochs G et al (1999) J Dolor Symptom Manage 18: 229Y32). Evaluaciones funcionales de la actividad locomotora se realizaron una vez por semana en la prueba Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso DM et al. (1996) Exp Neurol 139: 244-256) y la prueba de rendimiento de plano inclinado (Rivlin AS, Tator CH. (1977) J Neurosurg 47 (4): 577; Lindberg RL et al. (1999) J. Clin Invest 103 (8): 1127-34).

[0393] En la actualidad los modelos de roedores SOD 1 G93A son el único tipo de modelo animal para la esclerosis lateral amiotrófica. Es un método útil y rentable para el cribado de nuevas terapias para la enfermedad como se ha demostrado por otros investigadores para la eficacia de diversos agentes/compuestos de ELA (Karussis et al. (2010) Arch Neurol 67 (10): 1187-1194; Xu et al. (2009) J Comp Neurol 514 (4): 297-309; Xu et al. (2006) Transplantation. 82 (7): 865-75; Garbuzova-Davis S et al. (2003) J.Hematother Stem Cell Res 12 (3): 255-70; Galán et al. (2010) Neurología 25 (8): 467-469; Kim et al. (2010) Neurosci Lett 468 (3): 190-4; Gros-Louis et al. (2010) J Neurochem 113 (5): 1188-1199; Israelson A et al. (2010) Neuron 26; 67 (4): 575-87).

Métodos y materiales

[0394] Ratas macho SOD1 G93A suministradas por el Dr. David S. Howland, Universidad de Washington, Seattle,

fueron criadas para ratas hembras N (SD) de Taconic (Germantown, NY). Las ratas fueron criadas por una semana en pares de un macho: una hembra. Las crías fueron destetadas y genotipadas a los 21 días de edad y crías transgénicas positivas fueron identificadas para la inscripción en el estudio. La colonia se propaga por cría inversa de cachorros machos de la misma camada con los criadores femeninos originales para reducir la variación fenotípica. Todos los procedimientos de cuidado de los animales y la cirugía en este estudio se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Johns Hopkins Medical Institutions.

[0395] hUTC (aislado a partir de tejido de cordón umbilical humano) se descongelaron en stock congelado tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.510.873 y se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se centrifugaron a 1500 X g durante 5 minutos, después se resuspendieron en PBS de nuevo y se contaron. La concentración celular se ajustó a 20 millones de células por mililitro y 50 micro litros de esta suspensión se entregó a cada rata por vía intratecal.

[0396] Los animales positivos para el gen de la dismutasa superóxida 1 (SOD1) se inscribieron en el estudio. Estos animales se pesaron dos veces a la semana para determinar cuando su peso corporal se redujo durante dos mediciones consecutivas, cuyo momento se definió como la aparición de enfermedades. Esta es una medida sensible y muy objetiva para determinar la aparición de enfermedades en modelos de roedores de ELA (Xu et al. (2006) Transplantation 82 (7): 865-75). Las ratas con inicio de la enfermedad fueron asignadas al azar en el par prudente del vehículo o los grupos tratados con células.

[0397] El estudio tiene dos brazos (Tabla 21-1). Cada brazo contenía dos grupos. Brazo 1 Grupo 1 recibió una sola inyección intratecal de Salina Tamponada de Fosfato (PBS, control de vehículo) en el momento de aparición de la enfermedad. Brazo 1 Grupo 2 se trató con 1 millón de células de hUTC en inicio aproximado de enfermedad. Las células se entregan en PBS mediante inyección intratecal. Brazo 2 Grupo 3 se trató con una sola inyección intratecal con PBS (control vehículo) en 1 semana después de la aparición de la enfermedad aproximada. Brazo 2 Grupo 4 se trató con recombinante con 1 millón de células hUTC en 1 semana después de la aparición de la enfermedad aproximada. Las células se entregan en PBS mediante inyección intratecal.

Tabla 21-1. Los grupos de tratamiento

	Grupo de tratamiento	Número de animales	Género	Material de ensayo/Tiempo de Inyección
Brazo 1	1	10	Mezclado	PBS (al inicio de la enfermedad)
	2	10	Mezclado	HUTC (al inicio de la enfermedad)
Brazo 2	3	10	Mezclado	PBS (en 1 semana después de la aparición de la enfermedad)
	4	10	Mezclado	HUTC (en 1 semana después de la aparición de la enfermedad)

* PBS fue usado como vehículo en este estudio

[0398] Para minimizar las lesiones y maximizar la recuperación inmediata del animal, un método de inyección transcutánea se empleó para entregar las células por vía intratecal al LCR de la cisterna lumbar de ratas SOD1. Los animales fueron montados en el dispositivo estereotáxico Kopf y se anestesiaron con anestesia de gas (isoflurano: oxígeno: óxido nitroso = 1:33:66). La región lumbar se afeitó y un elemento de soporte cilíndrico situado bajo la parte inferior del abdomen de la rata para estirar los espacios intervertebrales de la columna lumbar. Las células se administran con 200 a 500 µl microjeringas provistas de una aguja 25Gx1". La aguja con microjeringa que contiene 50 células micro litros se inserta lentamente en el espacio subaracnoideo en espacios intervertebrales L4-5 o L6-S1. Cuando una señal de irritación física de la cola de caballo se observó (es decir, sastre o una lámina de pata trasera), las células se infundieron lentamente en el espacio subaracnoideo durante un período de 1 minuto. La jeringa se mantiene en su lugar durante 2 minutos y después se retira la aguja. El punto de entrada de aguja se presiona con una punta de hisopo de algodón sumergido en yodo durante 1 minuto, y después se desmontó el animal y se aplicó una almohadilla de calor para permitir la recuperación. Después de despertarse el animal, se devolvió a su jaula.

[0399] La progresión de la enfermedad y la eficacia terapéutica potencial se monitorizaron a través de dos evaluaciones funcionales: (1) la actividad locomotora (medida por semana); y (2) el peso corporal (medido dos veces a la semana). Las pruebas del aparato locomotor incluyen la prueba Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso et al. (1995) J Neurotrauma 1995; 12 (1): 1; Basso et al. (1996) Exp Neurol 139: 244 a 256) y la prueba de rendimiento inclinado plano (Rivlin AS, Tator CH (1977) J Neurosurg 47 (4): 577).

[0400] Para la acreditación de puntuación, las ratas se suavizaron y se adaptaron al campo abierto. Una vez que una rata se acercó de forma continua en el campo abierto, dos examinadores, cegados para el tratamiento, llevaron

a cabo una sesión de prueba de 4 minutos utilizando la escala de clasificación del locomotor BBB que es una escala de 21 puntos con alta reproducibilidad intra e interobservadora. La prueba de campo abierto se grabó en vídeo. A partir de esta cinta, dos examinadores evaluaron cuantitativamente el número de movimientos de las extremidades posteriores (HL) realizadas durante un periodo de 1 minuto; este periodo de tiempo fue una combinación de episodios durante la sesión de prueba de 4 minutos cuando cada HL está a la vista de la cámara. El límite de tiempo de 1 minuto aseguró que los HLs derecha e izquierda de cada animal fueron evaluados por el mismo período de tiempo, ya que ambos HLs no siempre están a la vista de la cámara. El material se volvió a evaluar a cámara lenta si las puntuaciones de los examinadores no estaban de acuerdo. La ausencia de movimiento de las extremidades posteriores observables se marcó en 0 y los puntos iniciales se otorgaron a los movimientos articulares aislados. La puntuación aumenta cuando más articulaciones mostraron movimiento y/o los movimientos eran más extensos. A medida que aumentaba la locomoción, se les dio puntos para la colocación plantar de la pata, el apoyo de peso y la coordinación entre la extremidad anterior y la extremidad posterior. Los puntos finales fueron alcanzados por el aclaramiento del dedo del pie, la estabilidad del tronco y la posición de la cola.

[0401] El plano inclinado es otra tarea de comportamiento que evalúa la capacidad del animal para mantener su posición en un cartón ondulado de caucho; esta placa se planteó en incrementos de 5°. El ángulo máximo en el que un animal puede soportar su peso durante 5 segundos se define como el ángulo de la capacidad. Este ensayo examina la retroalimentación sensorial, la coordinación y la fuerza muscular necesaria para la locomoción.

[0402] La etapa final de la enfermedad se determinó por una parálisis tan grave que el animal no podía enderezarse en 20 segundos cuando se coloca en su lado. Puntuaciones tanto de BBB como de plano inclinado en este punto son cero, lo cual es un punto final utilizado con frecuencia para ratas SOD1 mutantes y uno que es consistente con los requerimientos del Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Johns Hopkins.

[0403] Puntuaciones de BBB y de plano inclinado se analizaron mediante análisis de medidas repetidas de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc LSD de Fisher para evaluar las diferencias entre grupos vehículo y tratados con celulares. El curso de la enfermedad como un efecto del tratamiento se analizó mediante la comparación de la edad de inicio de la enfermedad y la edad de muerte entre los dos grupos (con la prueba t de Student), así como con el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier seguido por la prueba de log-rank.

El análisis histológico

[0404] El estado de la neurona motora de huesped se exploró mediante tinción con violeta de cresilo de las neuronas motoras en la protuberancia lumbar (L4-5) (datos no mostrados). El número de neuronas motoras se disminuye en gran medida y muchas neuronas aparecen como perfiles de degeneración en ambos grupos de células madre y grupos de control, un patrón consistente con el hecho de que todos los tejidos de la médula espinal son adquiridos en la etapa de la enfermedad final. No se encontraron células madre supervivientes dentro del parénquima de la médula espinal mediante la tinción de la CCI con el anticuerpo antinuclear humano específico. Raíces ventrales L4-L5 de ambos grupos fueron estudiados por tinción con azul de toluidina. La degeneración de axon y desmielinización fueron significativas y similares en ambos grupos de células madre y de control, de conformidad con la adquisición de estos preparados en la etapa terminal de la enfermedad.

Resultados

[0405] Los gráficos de Kaplan-Meier muestran un aumento de supervivencia de los animales en el grupo tratado de la célula en comparación con los animales de control (n = 10 para los grupos 1 y 2, n = 8 para los grupos 3 y 4) en todo el curso del tratamiento, iniciado en cualquiera de las enfermedades inicio (Figura 7A, el brazo 1) o una semana después de la aparición (Figura 7B, el brazo 2), excepto un animal en el Grupo 1 que vivieron más tiempo que el resto de los animales en el estudio (Figura 7A). Mientras que el tiempo medio de aparición de la enfermedad no fue diferente entre los animales que recibieron los vehículos y los animales que fueron inyectados con hUTC en ambos brazos (Figura 8), el promedio de vida se aumentó después de la administración intratecal de hUTC, especialmente en el brazo 2 en el que los animales tenían una vida más larga de 15,75 días (2,25 semanas, p <0,035) que el grupo de vehículos, aunque la edad de aparición de la enfermedad es similar.

[0406] La Figura 9 muestra que la administración de hUTC al inicio de la enfermedad (Figuras 9A y 9B) o 1 semana después de la aparición de la enfermedad (Figuras 9C y 9D) se asoció con un aumento de las puntuaciones en la prueba de acreditación y prueba de rendimiento de plano inclinado, lo que indica una progresión más lenta en debilidad muscular en los animales injertados con hUTC en comparación con los animales que sólo recibieron vehículo. Estos resultados sugieren que hUTC podrían ser capaces de preservar la actividad locomotora en este modelo.

[0407] Por lo tanto, los datos dados a conocer en este ejemplo, que se resumen en la Tabla 21-2 a continuación, muestran que la inyección intratecal de hUTC puede preservar la función de la neurona motora y prolongar la vida en el modelo de rata de ELA.

5

10

15

	Grupo de tratamiento	Días de comienzo de la enfermedad (Semanas)	Días de duración de la enfermedad (Semanas)	Esperanza de vida Días (Semanas)
Brazo 1	1. PBS	130,5 + 6,9 (18,64 + 0,99)	30,9 + 17 (4,41 + 2,43)	161,4 + 14,4 (23,06 + 2,06)
	2. hUTC	129,4 + 9,0 (18,49 + 1,29)	39,2+10,4 (5,6 + 1,49)	168,6 + 15,4 (24,09 + 2,20)
Brazo 2	3. PBS	122,0 + 8,4 (17,43 + 1,2)	26,9 + 6,8 (3,84 + 0,97)	148,9 + 10,7 (21,27 + 1,53)
	4. hUTC	123,8 + 8,7 (17,69 + 1,24)	40,9 + 19,3 (5,84 + 2,76)	164,6 + 15,8* (23,51 + 2,26)

Notas: * P<0,035

Definiciones para la Tabla 21-2

[0408]

Inicio de la enfermedad: El punto en el que se encontrará que el peso corporal se ha disminuido dos veces consecutivos. Esta es una medida sensible y muy objetiva para determinar la aparición de enfermedades en modelos de roedores delA (Xu L. *et al.* (2006)). *Determinación de la etapa terminal de la enfermedad:* La etapa donde la parálisis es tan grave que el animal no podía enderezarse dentro de los 20 s cuando se coloca en su lado (un punto final utilizado con frecuencia para ratas mutantes SOD1) y los animales tienen que sacrificarse (Israelson *et al.*, 2010).

Duración de Enfermedad: El período comprendido entre el momento de la aparición de la enfermedad y la etapa final de la *vida útil*: El período comprendido entre el momento del nacimiento y de la eutanasia.

EJEMPLO 22

El uso de células derivadas del cordón umbilical de tejido en el tratamiento preventivo de ELA

[0409] Los efectos de modificación de enfermedad de hUTC se evaluaron antes de la aparición de la enfermedad (10 o 12 semanas de edad) como tratamiento preventivo. Las células se administraron a través de una inyección intravenosa en la vena de la cola, lo que representa una ruta clínicamente ventajosa de administración. Las evaluaciones funcionales de la actividad locomotora se llevaron a cabo una vez por semana en la prueba Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) y la prueba de rendimiento de plano inclinado.

Objeto y ámbito del estudio

[0410] El objetivo de este estudio consistió en explorar la función preventiva de las células derivadas del cordón umbilical, auto-renovables y expansibles, en los aspectos clínicos de la ELA de ratas transgénicas, del modo que se produce en las ratas SOD1 G93A, de acuerdo con las principales líneas metodológicas publicadas en el trabajo de Koliatsos y sus compañeros (Yan *et al.* (2006) *Stem Cells*. 24: 1976-1985; Yan *et al.* (2007) *PLoS Med.* 4: e39; Xu *et al.* (2006) *Transplantation* 82: 865-875). Se eligieron dos brazos: (1) un brazo de 10-semanas que recibió las células derivadas del cordón umbilical o vehículo a las 10 semanas de edad; y (2) un brazo de 12 semanas que recibió las células o vehículo a las 12 semanas de edad. Dentro de cada brazo, el Grupo A (cegado en la mayoría de los casos como animales impares) se designó para recibir las células derivadas del cordón umbilical y del grupo B (cegado en la mayoría de los casos como animales de número par) se delegan al tratamiento con vehículo. No se realizó ninguna protección inmune de los acontecimientos del injerto contra huésped tal como se propuso en estudios anteriores por el Laboratorio de Koliatsos (Yan *et al.*; Xu (2006) *et al.* (2006)). El análisis que sigue no tiene en cuenta el fenotipo cambiante de la colonia de una población muy variable a una menos variable y, finalmente, optimizada con respecto a la aparición de la enfermedad y la gravedad.

Observaciones de optimización de cría y fenotipo de inicio de la enfermedad y vida útil

[0411] La colonia de ratas SOD1 se propagó por la cría inversa de cachorros machos de la misma camada con los criadores femeninos originales para reducir la variación fenotípica. La norma era que el tiempo de inicio de la enfermedad del criador macho debe estar dentro de 90-120 días. De lo contrario, se observó que el fenotipo de su progenie se convertía en "inestable", es decir, el inicio de la enfermedad podría llegar hasta los 180 días de edad y más allá. Los criadores iniciales que se habían utilizado para generar los animales utilizados para este estudio se encontraban fuera de este marco de 90 a 120 días, un problema que causó alteración sustancial fenotípica en su progenie. Para disminuir el impacto de la deriva fenotípica, cada animal designado para el grupo A fue emparejado inicialmente con un animal del mismo sexo de la misma camada designada al grupo de enfermedades B. Tiempos promedios de inicio para los grupos A y B en el brazo de 10 semanas eran $153,15 \pm 12,71$ y $154,0 \pm 13,75$ días y la

vida útil para los grupos A y B era $202,0 \pm 10,32$, $202,75 \pm 17,31$ días, respectivamente. El tiempo medio de aparición de la enfermedad para los grupos A y B en el brazo de 12 semanas era de $149,0 \pm 27,58$ y $146,5 \pm 28,53$ días; la vida útil para los grupos A y B era de $180,5 \pm 30,25$, $174,88 \pm 35,87$ días, respectivamente. Aunque tanto el tiempo de inicio de la enfermedad como su vida útil media en el grupo A eran más largos que en el grupo B, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Debido a que los dos últimos pares en el grupo de 12 semanas se componen de ratas SOD1 genotípicamente apretados, es decir progenie de ratas SOD1 con tiempos de inicio de enfermedad dentro del marco de 90-120 días, estas ratas se analizaron por separado de otras ratas en el mismo brazo. El tiempo medio de aparición de la enfermedad de estos dos pares en el grupo A y B eran de $114,5 \pm 0,5$ y $111,0 \pm 0,61$ días, una diferencia que no fue estadísticamente significativa. La vida útil de los sujetos de estos dos pares delegadas en el grupo A fueron $133,5 \pm 0,03$, es decir, 10 días más largo que la vida útil de los sujetos en el grupo B ($123,0 \pm 0,41$ días).

Patrones de supervivencia de curva

[0412] Las curvas de Kaplan-Meyer estudiados con el análisis de log-rank no mostraron diferencias significativas entre los grupos A y B en los experimentos de los brazos de 10 y 12 semanas (Figura 10 y Figura 11). Sin embargo, en el experimento de brazo de 12 semanas, hubo una tendencia del grupo A para mostrar mejoría en la supervivencia; la mediana de supervivencia para los grupos A y B era de 194 y 185 días, respectivamente (véase la Figura 11). Aunque no hubo diferencia significativa entre los dos últimos pares en el experimento de brazo de 12 semanas, el análisis de curva de supervivencia muestra una tendencia prometedora para que el grupo A pueda sobrevivir más tiempo (Figura 12).

[0413] **Pruebas de comportamiento de los animales en el plano inclinado de dos brazos y datos BBB:** Los datos de serie a partir de estas dos pruebas con medidas repetidas ANOVA (RM ANOVA) se analizaron de dos maneras. En el primer modo, los datos empezaban a partir de una semana antes de que el primer animal mostrara muestras de la enfermedad y se recogieron y el análisis de comparación se llevó a cabo (paneles superior izquierda en las Figuras 13-18). En el segundo modo, los datos se recogieron empezando en el momento de inicio de la enfermedad (paneles inferiores a la izquierda en las Figuras 13-18). Al realizar estos análisis, también se aplicó una corrección "compensatoria" para eliminar el factor de curva de desviación causada por curvas de supervivencia muy dispares (debido a la varianza genotípica) (paneles de la derecha en las Figuras 13-18). En la aplicación de esta compensación, la calificación de la prueba el comportamiento más baja del animal cerca del momento de su muerte fue tomada y se ingresó junto con las puntuaciones de los animales supervivientes del mismo grupo en los puntos de tiempo posteriores (un método alternativo sería la eliminación de este punto de datos de posteriores conjuntos de datos de comportamiento y la realización del análisis en un número menor de animales). Resultados RM ANOVA en el plano inclinado y datos BBB no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos en las 10 y 12 semanas de experimentos de brazo, correcciones y ajustes para la aparición de la enfermedad y la supervivencia no obstante lo dispuesto (Figuras 13-15, 17). Sin embargo, cuando se analizaron los dos últimos pares del experimento de brazo de 12 semanas por razones explicadas en la sección de reproducción anterior, se encontró que los resultados de comportamiento tenían una varianza similar a los del estudio de la supervivencia (véase más arriba; Figuras 16, 18). Aunque no hubo diferencia estadística en las puntuaciones de comportamiento entre estos dos pares, hubo una tendencia para un mejor rendimiento del grupo A sobre el grupo B.

Análisis histológico

[0414] Todas las ratas SOD1 con o sin inyecciones de células madre fueron asesinadas cuando su enfermedad estaba en fase terminal (puntuación BBB <3). Después de la perfusión con PFA al 4%, se recogieron el cerebro y otros órganos del animal, se crioprotegieron y se congelaron para su posterior procesamiento. Para explorar si existían células madre humanas restantes en secciones de órganos/tejidos relevantes, se realizó inmunohistoquímica con el anticuerpo nuclear humano específico (HNU). Estos tejidos incluyen la médula espinal lumbar (como una terapéutica diana relevante) y pulmón (como control de órganos con alta concentración esperada de las células madre inyectadas). Tinción HNU no mostró ninguna supervivencia de las células injertadas en estos órganos en animales en fase terminal.

[0415] **Observaciones sobre secciones de médula espinal:** Las ratas SOD1 G93A recapitulan muchos síntomas cardinales de la humana. Degeneración motor de las neuronas en la médula espinal de ratas SOD1 procede de las neuronas motoras que inervan los músculos lumbares de miembros inferiores a las neuronas motoras cervicales y torácicas que inervan los músculos respiratorios. Los animales mueren de inanición e insuficiencia respiratoria. El objetivo histológico de este experimento era limitado debido a la falta de los tejidos apropiados, a partir de animales mediados de la enfermedad y una propagación fenotípica sustancial. Tejidos de la médula espinal disponibles eran animales muertos en la etapa final, habiéndose degenerado la mayoría de las neuronas motoras, incluso en animales con efectos protectores hipotéticos de inyección de las células madre. Por lo tanto, el único valor del análisis histológico consistió en representar la neuropatología bruta en la médula espinal de los animales tratados con células vivas o muertas. Se procesaron cinco de estos cordones espinales. Seis pares de secciones, equidistantes cada 300 μm por la zona de la región L4-6 espinal lumbar, fueron estudiados de cada uno. Una sección de la pareja se tiñó con violeta de cresilo y la otra con hematoxilina y eosina. Se tomaron tres casos de números impares y dos casos de animales de números pares.

[0416] Las secciones teñidas revelan el aspecto de la médula espinal bruta normal con todos los segmentos de la médula espinal claramente definidos (Figura 19A y la Figura 19B). No se detectaron tumores (Figura 19A y Figura 19B). Como se predijo en base al fenotipo de las neuronas motoras de animales SOD1 G93A, hubo una profunda pérdida de neuronas motoras tanto en animales pares como impares. Cuando se contaron los números de los dos grupos en función del número de nucleolos presentes en los perfiles de basófilos del asta ventral con una ampliación de 100X, no hubo tendencias apreciables en el número de células de las neuronas motoras entre los dos grupos (animales de número impar, 423; animales de número par, 418). Se utilizó el ajuste de Abercrombie para el error de células de división para corregir las posibles diferencias de diámetro nucleolar entre los dos grupos ($N_i = n_i \cdot t / t + d$, donde n_i = número contado, t = espesor de la sección, y d = diámetro medio de perfil).

[0417] La evaluación BBB y puntuaciones de los animales tratados con células muestran una tendencia mejor que los animales no tratados. Los resultados de este estudio sugieren, por tanto, que tiempos de administración más próximos o posteriores a la aparición de la enfermedad pueden tener mejor eficacia terapéutica.

EJEMPLO 23

Los factores tróficos para diferenciación de progenitoras neurales

[0418] Las células madre neurales en el sistema nervioso central (SNC) pueden autorenovarse y son multipotentes, ya que pueden diferenciarse en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Estas células pueden activarse después de un insulto e iniciar la neurogénesis. Sin embargo, esta eficiencia de diferenciación es muy baja y las neuronas recién generadas son en su mayoría de corta duración, posiblemente debido a la ausencia de la formación de cualquier sinapsis funcional. La administración exógena de productos basados en células puede aumentar la neurogénesis y la formación de nuevas sinapsis y, por consiguiente superar este problema y por lo tanto puede mejorar la recuperación funcional en trauma o condiciones degenerativas. Estudios recientes han sugerido que las tecnologías basadas en células pueden ser una terapia eficaz para varias condiciones neurológicas. Para entender el mecanismo subyacente, se determinó el efecto de hUTC en la diferenciación de células madre neurales adultas.

Materiales y métodos

Cultivo de células.

[0419] Se descongelaron las células derivadas del tejido umbilical humano (hUTC) (lote nº 22042008, al pasaje P3 o P4.) y se sembraron en matraces T75 y/o T225 y se cultivaron en medio de crecimiento Hayflick (DMEM - bajo nivel de glucosa (Gibco, Catálogo número 11885-084), 15% v/v de suero bovino fetal (FBS, Hyclone número de catálogo SH30070.031R), Glutamax 4 mM (Gibco, número de catálogo 3505-061) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco número de catálogo 15070063) durante la noche o durante 48 horas para formar una capa confluyente. Después de alcanzar las células una capa confluyente, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen, número de catálogo 25200-056) y se incubaron con medio libre de suero DMEM durante 8 horas o 24 horas como se indica. Las células fueron separadas utilizando TrypLE™ (Gibco, número de catálogo 12604-021) y se cuantificaron mediante el instrumento Guava® (Guava Technologies).

[0420] Las células madre neuronales de hipocampo de ratas adultas (Lote nº R0706F0009, Millipore, número de catálogo SCR022) se descongelaron (P3 o P4), se sembraron en poli-L-ornitina (Sigma, nº de catálogo. P3655) y laminina (Sigma, número de catálogo 2020) matraces recubiertos T75 (Corning, número de catálogo nº: 430641) y se cultivaron en DMEM/F12 (Millipore, número de catálogo DF-042-B) con suplemento B27 (Invitrogen, número de catálogo 17504044), 1% de penicilina/estreptomicina y FGF-2 (Millipore, número de catálogo GF003) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando las células eran 80% confluentes, se separaron usando Accutase® (Millipore, número de catálogo SCR005) y se cuantificaron usando un instrumento Guava®. Para el ensayo de diferenciación, las células se sembraron a 20.000 células/cm² en placas de 6 pocillos recubiertos (Millipore, número de catálogo PICL06P05).

Ensayo de co-cultivo.

[0421] Para el ensayo de co-cultivo, se utilizó un transwell de 6 pocillos (Corning número de catálogo 3450) del sistema. Las células madre neurales del hipocampo de rata adulta se cultivaron solas o con hUTC a 20.000 células/cm² en la parte inferior del pozo. Los cultivos se incubaron con DMEM/F12 con suplemento B27 y sin FGF; la mitad del medio se reemplazó con medio fresco cada dos días.

ARN/Extracción de proteína.

[0422] Se prepararon ARN y proteínas utilizando el Kit AllPrep ARN/Proteína (Qiagen, número de catálogo 80404) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de lisis utilizado para las células cultivadas en las placas de 6 pocillos se amplió en consecuencia.

Síntesis de ADNc y extracción de ADN genómico.

[0423] El procedimiento consistió en el aislamiento de ARNm y la posterior preparación de ADNc con el QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, número de catálogo 205313). La eliminación de ADN genómico se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante antes de la síntesis de ADNc. La síntesis de ADNc se realizó con 0,5 microgramos de ARN total aislado a partir de células madre neuronales del hipocampo de rata adulta utilizando el QuantiTect® RT Kit en un volumen total de 20 microlitros de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

TaqMan PCR Cuantitativa.

[0424] La PCR se realizó en el sistema de PCR ABI 7000 en tiempo real en placas de reacción de 96 pocillos ópticos (Applied Biosystems, número de catálogo 4306737) en un volumen final de 20 microlitros. Transcripciones de roedores se detectaron con una mezcla de reacción que contiene mezcla maestra de 10 microlitros 2x TaqMan PCR Universal (Applied Biosystems, número de catálogo 4364338), 1 microlitro - ensayo de la expresión de genes 20X TaqMan (Applied Biosystems, número de catálogo 4331182); GFAP (ensayo ID: Rn 00566603_m1), nestina (Rn00364394_R1), proteína básica de la mielina (ensayo ID: Rn00566745_m1), Sox2 (rn00584808_m1), tubulina beta III isoforma (ensayo ID: Rn 00594933_m1) y GAPDH (ensayo ID: 99999916_s1). Se preparó 1 microlitro de ADN de plantilla y 8 microlitros de agua libre de RNasa (Sigma, número de catálogo W4502). Las amplificaciones se realizan comenzando con una etapa de activación UNG a 50°C durante 2 minutos, seguido de una etapa de desnaturalización de plantilla de 10 minutos a 95°C. Se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y recocido de cebador/extensión combinada a 60°C durante 1 minuto.

Inmunotransferencia de proteína.

[0425] Los lisados de células enteras (20 microgramos) se desnaturalizaron por ebullición en tampón de Laemmli (Boston Bioproducts, número de catálogo BP-111R) durante 3 minutos. Posteriormente, las muestras resueltas por SDS-PAGE en un 10% de gel de Tris-Glicina (Invitrogen, número de catálogo: EC6078BOX) en tampón de funcionamiento de glicina Tris SDS (Boston Bioproducts, número de catálogo BP-150) a 40 mA durante 1 hora. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 0,45 micrómetros (Invitrogen, número de catálogo LC2005) utilizando una electroforética semi-seca de la célula Trans-Blot® (Bio-Rad) en tampón de transferencia (25 mM Tris-base; glicina 192 mM; 10% (v/v) de metanol). La transferencia se realizó a 25 V durante 45 minutos. La membrana se bloqueó con 3% de BSA en PBST (PBS más 0,1% (v/v) de Tween 20) a temperatura ambiente (w/v) durante 1 hora. Las transferencias se sondearon con anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se lavaron 3 veces con PBST y, posteriormente, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante durante 1 hora a temperatura ambiente a 1:5000 en PBS. Se detectaron señales utilizando el sustrato de duración prolongada SuperSignal® West Dura (Pierce, número de catálogo 34076). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-tubulina III isoforma beta (1: 250, Millipore, número de Catálogo MAB 1637); anti-GFAP (1: 2000, Dako, número de catálogo Z0334); anti-Sox (1: 1000, Abcam, número de catálogo ab59776); anti-MBP (1: 500, Millipore, número de catálogo 382 MAB) anti-GAPDH conjugado de peroxidasa (1: 5000, Sigma, número de catálogo G9295); IgG anti-ratón HRP de cabra (R&D Systems, número de catálogo HAF007); e IgG HRP anti-conejo de cabra (Sigma, número de catálogo A0545).

Citometría de flujo.

[0426] Las células madre neuronales adultas de rata del hipocampo fueron separadas con Accutase® después del ensayo de co-cultivo y se suspendieron brevemente en PBS que contenía 1% de paraformaldehído. Las células se resuspendieron y se incubaron con tampón de bloqueo (PBS con 0,3% de Triton X-100 (Sigma, número de catálogo T9284)) y suero de cabra al 0,3% (Millipore, número de catálogo S26) durante 15 a 30 minutos, seguido de anticuerpos primarios (1: 200, a excepción de GFAP en 1: 2000) en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con tampón (PBS con 0,3% de Triton-X100) con incubación previa con los anticuerpos secundarios de fluoróforo conjugado apropiados (1: 400), tales como por ejemplo, conjugado de IgG anti-conejo de cabra R-ficoeritrina (Molecular Probes, número de catálogo P-2771MP) e IgG anti-ratón de cabra conjugado 488 Alexa Fluor® (Molecular Probes, número de catálogo A-11029), en tampón de bloqueo durante 45 minutos. A continuación, las células teñidas se lavaron tres veces con tampón de lavado, se suspendieron en PBS y se sometieron a análisis mediante el uso de citometría de flujo (FAC ScaliburTM).

Inmunocitoquímica.

[0427] Las células madre adultas de la rata del hipocampo neuronales sembradas en una placa de 24 pocillos en el día 5 después del ensayo de co-cultivo se lavaron con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído al 3% durante 20 minutos a 4°C. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS, seguido por permeabilización con tampón de bloqueo (temperatura ambiente, 15 minutos) y la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora con anticuerpos primarios (1: 200, a excepción de GFAP en 1: 2000). Las células teñidas se lavaron tres veces en tampón de lavado antes de la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos adecuados. Después del lavado final (cinco veces en tampón de lavado), las células teñidas se examinaron por microscopía de fluorescencia confocal (Olympus). Todas las imágenes fueron tomadas con una lente objetivo de 20X.

Resultados**hUTC induce la diferenciación de células madre neurales.**

5 **[0428]** Para investigar el efecto de hUTC s en la diferenciación de células madre neuronales, un experimento de co-cultivo se llevó a cabo con o sin la adición de FGF-2. Sin complementado FGF-2, las células tienden a diferenciarse mal. Para analizar la capacidad de diferenciación de las células madre neurales con o sin hUTC después de 3 días, los fabricantes neuronales y no neuronales fueron cuantificados por PCR en tiempo real, análisis de Western y citometría de flujo. El fenotipo celular se identificó mediante la medición de la expresión de genes marcadores clave: SOX para las células progenitoras; proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para astrocitos; tubulina beta III para las neuronas y proteínas básicas de mielina (MBP) para oligodendrocitos. Los resultados muestran que hUTC indujo un aumento en las transcripciones de GFAP; el aumento era aún mayor en presencia de FGF-2 exógena. La expresión de tubulina beta isoforma III era tres veces más alta en presencia de hUTC y FGF-2. El nivel de la proteína GFAP también se incrementó. La citometría de flujo mostró: (1) una población clara de células que exhiben expresión GFAP; y (2) una población clara pero pequeña de células positivas de tubulina beta III. Se observó una expresión de la proteína similar en la ausencia o presencia de FGF-2 en el medio. El mismo sistema experimental se realizó utilizando células madre neurales, las cuales resultaron heridas químicamente por azida de sodio y desoxiglucosa. Cuando las células madre neuronales isquémicas fueron tratadas con hUTC, se observó una tendencia similar de transcripción y expresión de la proteína, excepto que las transcripciones GFAP aumentan en 100-200 veces en presencia de FGF-2.

Transcripciones neuronales y no neuronales cuantificadas mediante PCR en tiempo real.

25 **[0429]** Las células madre neuronales de hipocampo de ratas adultas fueron co-cultivadas ya sea indirectamente (Tabla 23-1) o directamente con hUTC s (Tabla 23-2). El nivel de transcripción se expresa como aumento sobre las células de control (células madre neurales solas). Los resultados se tabulan a partir de dos conjuntos independientes de experimentos. Los datos son medias de \pm S.D.

30 **Tabla 23-1: Transcripciones neuronales y no neuronales se cuantificaron mediante PCR en tiempo real para co-cultivo indirecto**

	Control (sin tratar)	Co-cultivo con hUTC (en presencia de FGF exógeno)
Sox (progenitores)	1	1,03 \pm 0,23
GFAP (astrocitos)	1	57,68 \pm 1,41
Neuronas (tubulina beta, isoforma III)	1	3,01 \pm 1,5
Proteína básica de mielina (oligodendrocitos)	1	0,93 \pm 0,04
Datos expresados como aumento sobre controles		

40 **Tabla 23-2: Transcripciones neuronales y no neuronales se cuantificó mediante PCR en tiempo real para co-cultivo directo**

	Control (sin tratar)	Co-cultivo con hUTC (en ausencia de FGF exógeno)
Sox (progenitores)	1	0,83 \pm 0,26
GFAP (astrocitos)	1	50,63 \pm 7,1
Neuronas (tubulina beta, isoforma III)	1	3,14 \pm 2,66
Proteína básica de la mielina (oligodendrocitos)	1	0,16 \pm 0,11

Datos expresados como aumento sobre controles

55 **[0430] Resumen.** Los factores secretados por hUTC s promueven la diferenciación de células madre neurales a gliales y neuronales *in vitro*.

EJEMPLO 24**Factores tróficos para diferenciación de progenitores neuronales utilizando células PC12 como modelo**

60 **[0431]** Células PC 12 son un sistema de modelo útil para la diferenciación neuronal. Estas células proliferan indefinidamente en cultivo, pero pueden diferenciarse en células similares a neuronas cuando se tratan con factores específicos, incluyendo el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y, posiblemente, la interleucina 6 (IL-6), de granulocitos de factor estimulante

de colonias (G-CSF) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF). Estudios previos han indicado que hUTC secretan factores neurotróficos *in vitro*. El objetivo del presente estudio consistió en determinar si los factores solubles de hUTC podrían promover la diferenciación de las células PC12.

5 **Materiales y métodos**

Cultivo de células y medio condicionado.

10 **[0432]** Se descongelaron cuatro millones de células derivadas de tejido umbilical humano (HUTC) (lote nº 1027, pasaje 2 o 4.), sembradas en matraces T75 y cultivadas en medio de crecimiento Hayflick (DMEM - baja glucosa (Gibco, número de catálogo 11885-084), 15% v/v de suero fetal bovino (FBS número de catálogo, Hyclone SH30070.03IR), 4 mM Glutamax (Gibco, número de catálogo 3505-061) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco número de catálogo 1070063) durante la noche. Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen, número de catálogo 25200-056) y se incubaron con Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, ATCC, número de catálogo 30-2001), 0,5% inactivado por calor suero de caballo (Gibco, número de catálogo O₂6050088) y 1% de penicilina/estreptomicina durante 48 horas. Se retiró el medio y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos.

20 **[0433]** Las células Neuroscreen-1, subclon de células PC12 (Lote nº NS1081219, Cellomics, número de catálogo R04-0001-C1) se descongelaron (P2 o P6), se sembraron en matraces recubiertos de colágeno I (Nunc, número de catálogo 132707) y se cultivaron en medio RPMI con 10% de suero de caballo inactivado por calor, 5% de FBS (ATCC, número de catálogo 30-2020), y 1% de penicilina/estreptomicina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando las células eran 70% confluentes, que se separaron usando TrypLE™ (Gibco, número de catálogo 12604-021) y se cuantificaron usando un instrumento Guava®. Para el ensayo de diferenciación, las células se sembraron a 20 a 30.000 células/cm² en placas recubiertas de colágeno de 6 pocillos (Millipore, número de catálogo PICL06P05).

Tratamiento con factores de crecimiento y medio condicionado.

30 **[0434]** Las células Neuroscreen-1 se lavaron tres veces con PBS y se dejaron en reposo durante 18-24 horas con RPMI y suero de caballo al 0,5% antes del tratamiento con 10 ng/ml de factor de crecimiento nervioso humano beta (NGF, Millipore, número de catálogo GF028) o medio acondicionado. Las células se cultivaron durante 4 días.

Ensayo de crecimiento de neuritas.

35 **[0435]** La evaluación inmunocitoquímica de crecimiento de las neuritas se realizó usando un kit de Crecimiento de Neuritas según las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). Después del tratamiento con medio acondicionado NGF o hUTC en el punto de tiempo indicado, las células se fijaron durante 20 minutos con 4% paraformaldehído en PBS a 37°C. Órganos y procesos celulares se marcaron usando un anticuerpo anti-beta III anticuerpo primario de tubulina, seguido por un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488-Fluor®. La tinción Hoechst 33258 se incluyó en el fijador para etiquetar núcleos celulares. Las placas se cargan en una plataforma de imágenes de alto contenido Cellomics ArrayScan® VTI para la toma de imágenes y análisis automatizado. Este sistema se basa en un microscopio de epifluorescencia invertido que se centra y escanea campos en pocillos individuales usando una platina motorizada automáticamente. Las imágenes de fluorescencia se produjeron usando un filtro de Pasaje de emisión de banda múltiple y filtros de excitación adaptados para el canal azul (núcleos) y el canal verde (cuerpo de células y los procesos) y adquiridos con una cámara de dispositivo de alta resolución de carga acoplada. Las imágenes adquiridas se analizaron mediante el software ArrayScan® usando la bioaplicación de perfil neuronal (Thermo Fisher Scientific) para medir diversos parámetros morfológicos incluyendo longitud total de las neuritas por célula, neuritas por célula, puntos de ramificación y la zona de cuerpo de la célula para cada célula válida en la imagen. Una célula se definió como diferenciada cuando se tenía una longitud total de neuritas > 5 micrómetros, lo cual es el doble de la longitud total de las neuritas en las células en ausencia de NGF. Mediante el uso de un objetivo 10³, se adquirió un número suficiente de campos para el análisis de al menos 500 células por pocillo.

55 **Resultados**

60 **[0436]** Para evaluar si la hUTC indujo neurogénesis en células neuroscreen-1, el medio acondicionado (de hUTC cultivadas) se utilizaron para el cultivo de células PC12 quiescentes durante 4 días. Para el control positivo, las células neuroscreen-1 se trataron con 10 ng/ml de NGF. El efecto de NGF o medio acondicionado se observó por microscopía. En ausencia de NGF o medio acondicionado de hUTC, las células son relativamente pequeñas y redondeadas y tienen muy pocas neuritas visibles. El tratamiento con NGF o medio acondicionado durante 2 a 4 días dio como resultado cuerpos celulares ligeramente más grandes con una red de extensión de neuritas. Hubo un aumento gradual de la longitud de neuritas después de la exposición a NGF o medio acondicionado. Más de 40% de las células se diferenciaron en el cuarto día después de la exposición al medio acondicionado. Para cuantificar diferenciación celular neuroscreen-1, las células se marcaron con anticuerpos beta-tubulina isoforma III; las imágenes fueron tomadas y analizadas por la Bioaplicación de Perfil Neuronal. En células PC 12 tratadas tanto en

medio acondicionado NGF como en hUTC, hubo aumentos en la longitud de las neuritas, número de neuritas y puntos de ramificación por células. Por lo tanto, medio acondicionado hUTC es suficiente para inducir diferenciación celular PC 12.

5 **Células Neuroscreen-1 inducidas por medio acondicionado NGF y hUTC de 48 horas (Tabla 24-1).**

10 [0437] Las células Neuroscreen-1 se cultivaron en placas de 12 pocillos durante 4 días en 0,5% de suero de caballo RPMI (control negativo), o con 20 ng/ml de NGF (control positivo) o medio acondicionado de 48 horas. Después de 4 días, las células se fijaron y se tiñeron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se tabulan a partir de dos conjuntos independientes de experimentos. Los datos son medias de \pm S.D.

15

20

	Longitud total de neuritas por neurona (μ m)	Recuento total de punto de ramificación por cada 500 células	Índice de crecimiento de las neuritas (%)
Control negativo	2.45 \pm 1.32	7.48 \pm 4.77	8.03 \pm 5.53
Control Positivo (20 ng/ml NGF)	9.83 \pm 1.75	34,46 \pm 1,68	32.73 \pm 6.73
medio condicionado de 48 horas hUTC	16,44 \pm 0,11	68,27 \pm 19	41.4 \pm 1.59

25 [0438] **Resumen:** Los resultados indicaron que los factores solubles secretados por hUTC inducen neurogénesis en células PC 12 como se indicó por cambios morfológicos.

EJEMPLO 25

30 **Protocolo profético para la administración múltiple de hUTC para la esclerosis lateral amiotrófica**

[0439] Los resultados del estudio sugieren que hUTC pueden ser eficaces en el modelo de rata SOD1 G93A de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), con una sola administración. Como tal, los estudios adicionales pueden demostrar que la administración repetida de hUTC puede tener eficacia añadida en este modelo de enfermedad.

35 [0440] SOD1 G93A se puede tratar con hUTC en o cerca del momento de la aparición de la enfermedad con hUTC inyectada directamente en el espacio intratecal o cisterna magna. Las células se pueden inyectar por semana o más o menos frecuentemente. Para minimizar las lesiones y maximizar la pronta recuperación del animal, se puede utilizar un método de inyección transcutánea para administrar intratecalmente el producto celular hUTC en el LCR de la cisterna lumbar de ratas SOD1. Los animales están montados en el dispositivo estereotáxico Kopf y se anestesiaron con anestesia de gas (isoflurano: oxígeno: óxido nitroso = 1:33:66). La región lumbar se afeita y un elemento de soporte cilíndrico se coloca debajo de la parte inferior del abdomen de la rata para estirar los espacios intervertebrales de la columna lumbar. Las células se entregan con microjeringas de 200 a 500 μ l provistas de una aguja 25Gx1". La aguja con microjeringa vacía se inserta lentamente en el espacio subaracnoideo en los espacios intervertebrales L4-5 o L6-S1. Cuando se obtenga una señal física de la irritación de la cauda equina, *es decir*, movimiento de la cola o de la pata trasera, las células se infunden lentamente en el espacio subaracnoideo durante un período de 1 minuto. La jeringa se mantiene en su lugar durante 2 minutos y después se retira. El punto de entrada de la aguja se presiona con un hisopo de algodón sumergido en yodo durante 1 minuto, y después se desmonta el animal y se resucita en una almohadilla de calor. Después de despertarse el animal, se devuelve a su jaula.

50 [0441] Los animales pueden ser tratados con hUTC a diferentes niveles de dosis con la entrega de una cantidad constante de volumen de inyección total. Los animales pueden ser tratados con hUTC a intervalos de aproximadamente cada dos semanas y evaluados hasta la etapa final.

55

60

65

Tabla 25-1: Estudio de diseño para evaluar múltiples inyecciones de HUTC

Número de grupo	Número de animales	Material de ensayo	Número de dosis/dosis	Volumen de dosis (µl)	Vía de administración	Tiempo de eutanasia
	Sexo mixto					
1	15	Vehículo	4/0	50	IT	Etapa final
2	15	HUTC	1/0	50	IT	Etapa final
3	15	HUTC	4/0,3 x 10 ⁶ células	50	IT	Etapa final
4	15	HUTC	4/1 x 10 ⁶ células	50	IT	Etapa final
5	15	El riluzol	Por día/44 mg/kg	2 ml	Oral	Etapa final
6	15	Vehículo	2/0	50	IT	Punto
7	15	HUTC	2/1 x 10 ⁶ células	50	IT	Punto medio

[0442] La progresión de la enfermedad y la eficacia terapéutica potencial se controlan a través de dos mediciones de resultados: (1) la actividad locomotora funcional (medida por semana); y (2) el peso corporal (medido dos veces a la semana). Las pruebas del aparato locomotor incluyen la prueba Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) (Basso et al. (1995) J Neurotrauma 1995; 12 (1): 1; Basso et al. (1996) Exp Neurol 139: 244-256) y la prueba de rendimiento inclinado plano (Rivlin AS, Tator CH. (1977) J Neurosurg 47 (4): 577).

[0443] Para la puntuación BBB, las ratas se suavizaron y se adaptaron para el campo abierto. Una vez que una rata camina de forma continua en el campo abierto, dos examinadores, cegados para el tratamiento, llevan a cabo una sesión de prueba de 4 minutos utilizando la escala de calificación locomotora BBB que es una escala de 21 puntos con alta reproducibilidad intra e interobservadora. La prueba de campo abierto se graba en vídeo. A partir de esta cinta, dos examinadores evaluaron cuantitativamente el número de movimientos de las extremidades posteriores (HL) llevadas a cabo durante un período de 1 minuto; este período es un compuesto de episodios durante la sesión de prueba de 4 minutos cuando cada HL está a la vista de la cámara. El límite de tiempo de 1 minuto asegura que los HLs derecho e izquierdo de cada animal se evalúen durante el mismo período de tiempo, ya que ambos HLs no siempre están a la vista de la cámara. El material de archivo se volverá a evaluar en cámara lenta si las puntuaciones de los examinadores no concuerdan. La ausencia de movimiento de las extremidades posteriores observables se marcó en 0 y los puntos iniciales se evaluaron para movimientos articulares aislados. La puntuación se incrementa cuando más articulaciones muestran movimiento y/o los movimientos son más extensos. A medida que aumente la locomoción, se dan puntos para la colocación plantar de la pata, el apoyo de peso y la coordinación entre la extremidad anterior y la extremidad posterior. Los puntos finales se alcanzan por el aclaramiento de dedo del pie, la estabilidad del tronco y la posición de la cola.

[0444] El plano inclinado es otra tarea de comportamiento que evalúa la capacidad del animal para mantener su posición en un cartón ondulado de caucho; esta placa se planteó en incrementos de 5°. El ángulo máximo en el que un animal puede soportar su peso durante 5 segundos se define como el ángulo de la capacidad. Este ensayo examina la retroalimentación sensorial, la coordinación y la fuerza muscular necesaria para la locomoción.

[0445] La etapa final de la enfermedad se determina por la parálisis tan grave que el animal no podía enderezarse en 20 segundos cuando se coloca sobre su lado, que es un punto final de uso frecuente para ratas mutantes SOD1. Puntuaciones BBB y de plano inclinado en este punto son cero.

[0446] La presente invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente. Es capaz de variación y modificación dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0447]

- <110> Messina, Darin J.
- Mistry, Sanjay
- Harmon, Alexander M.
- Harris, Ian Ross
- Kihm, Anthony J.
- Seyda, Agnieszka
- Yi, Chin-Feng
- Gosiewska, Anna

ES 2 616 457 T3

<120> regeneración y reparación del tejido nervioso utilizando células derivadas del posparto

<130> CBAT-0006

5 <140> US 10/877.269
<141> 2004-06-25

<150> US 60/555.908
<151> 2004-03-24

10 <150> US 60/483.264
<151> 2003-06-27

<160> 10

15 <170> versión de patentia 3.3

<210> 1
<211> 22
20 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> construcción sintética

25 <400> 1
gagaaatcca aagagcaaat gg 22

<210> 2
30 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> construcción sintética

<400> 2
agaatggaaa actggaatag g 21

40 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> construcción sintética

<400> 3
50 tcttcgatgc ttcggattcc 20

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

55 <220>
<223> construcción sintética

<400> 4
60 gaattctcgg aatctctgtt g 21

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
65 <213> Artificial

<220>
 <223> construcción sintética

5 <400> 5
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

10 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> construcción sintética

15 <400> 6
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22

20 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> construcción sintética

25 <400> 7
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20

30 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> construcción sintética

35 <400> 8
 ttctccacaa cc cttcaaaaac 22

40 <210> 9
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> construcción sintética

50 <400> 9
 cccacgccac gctctcc 17

55 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> construcción sintética

60 <400> 10
 tcctgtcagt tgggtctcc 19

65

Reivindicaciones

- 5
1. Células derivadas de tejido del cordón umbilical para la preservación de la función de neurona motora en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, cuando las células derivadas de tejido del cordón umbilical se pueden aislar a partir de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión del cultivo, tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, pueden someterse a al menos 40 duplicaciones, y tienen las siguientes características:
 - 10 (a) expresan cada uno de CD 10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C;
 - (b) no expresan ninguna de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD 178, B7-H2, HLA-G, o HLA-DR, DP, DQ; y
 - (c) tienen una mayor expresión de interleucina-8; reticulon 1; y ligando de receptor de quimiocina (motivo CXC) ligando 3, respecto a la de una célula humana, que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula de cresta ilíaca ósea.
 - 15 2. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que las células derivadas de tejido de cordón umbilical no expresan hTERT o telomerasa.
 - 20 3. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que las células derivadas de tejido de cordón umbilical se inducen *in vitro* para diferenciarse en una línea celular neural antes de la administración.
 - 25 4. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que la preservación comprende la administración de células derivadas de tejido de cordón umbilical con al menos otro tipo de célula de un astrocito, oligodendrocitos, neuronas, progenitoras neurales, células madre neurales u otras células madre multipotentes o pluripotentes.
 - 30 5. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que la preservación comprende la administración de células derivadas de tejido de cordón umbilical en un sitio predeterminado en el sistema nervioso del paciente.
 - 35 6. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que la preservación comprende la administración de células derivadas de tejido del cordón umbilical por inyección o infusión.
 - 40 7. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que la preservación comprende la administración de células derivadas de tejido del cordón umbilical por inyección intravenosa o intratecal.
 - 45 8. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que la preservación comprende la administración de células derivadas de tejido de cordón umbilical encapsuladas dentro de un dispositivo implantable.
 - 50 9. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que la preservación comprende la administración de células derivadas de tejido de cordón umbilical mediante la implantación de una matriz o estructura que contiene las células.
 - 55 10. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que las células derivadas de tejido de cordón umbilical ejercen un efecto trófico sobre el sistema nervioso del paciente.
 - 60 11. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para el uso de la reivindicación 1, en el que las células derivadas de tejido del cordón umbilical se han diseñado genéticamente para la generación de un producto de gen que promueve el tratamiento de la condición neurodegenerativa.

55

60

65

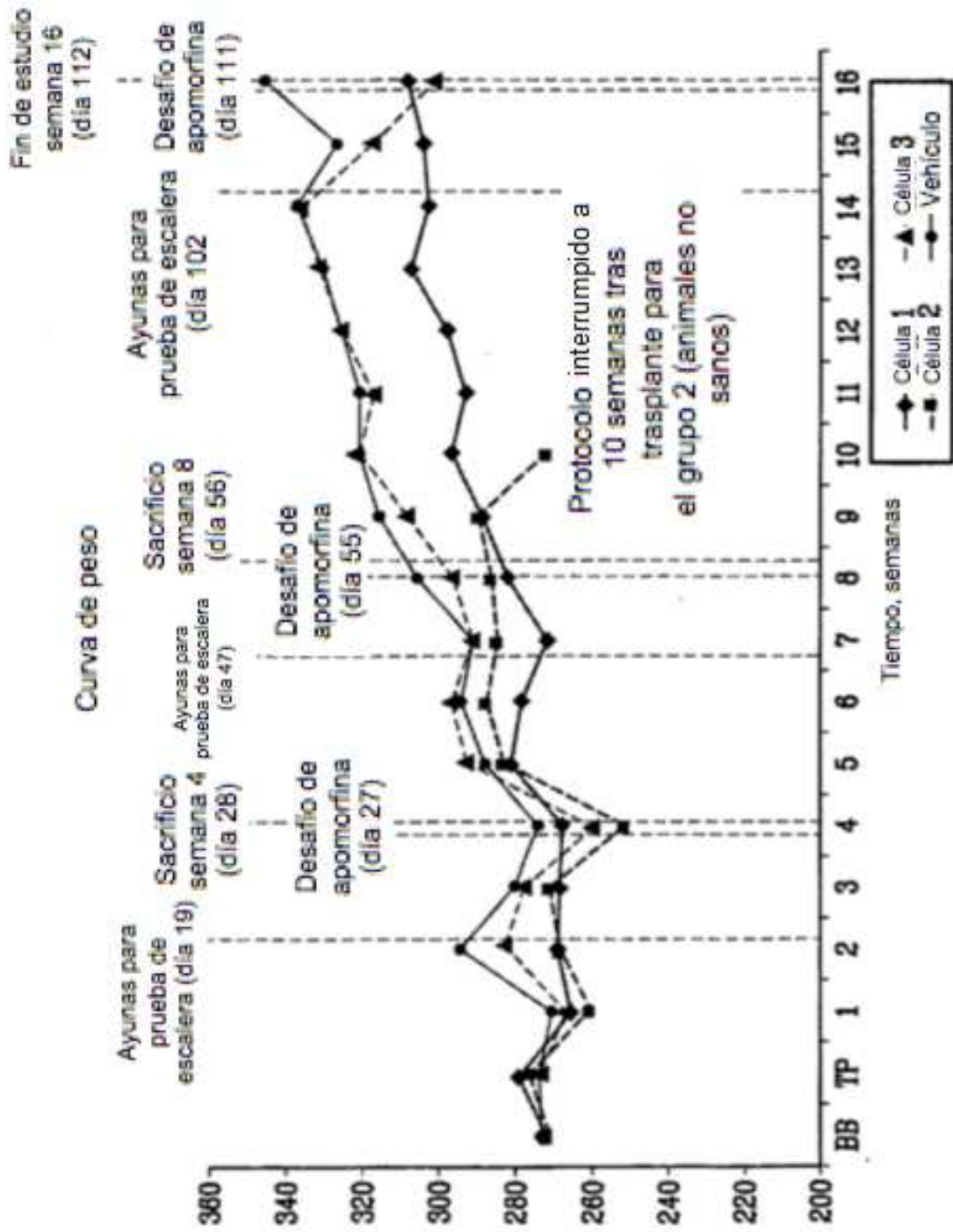


Fig. 1

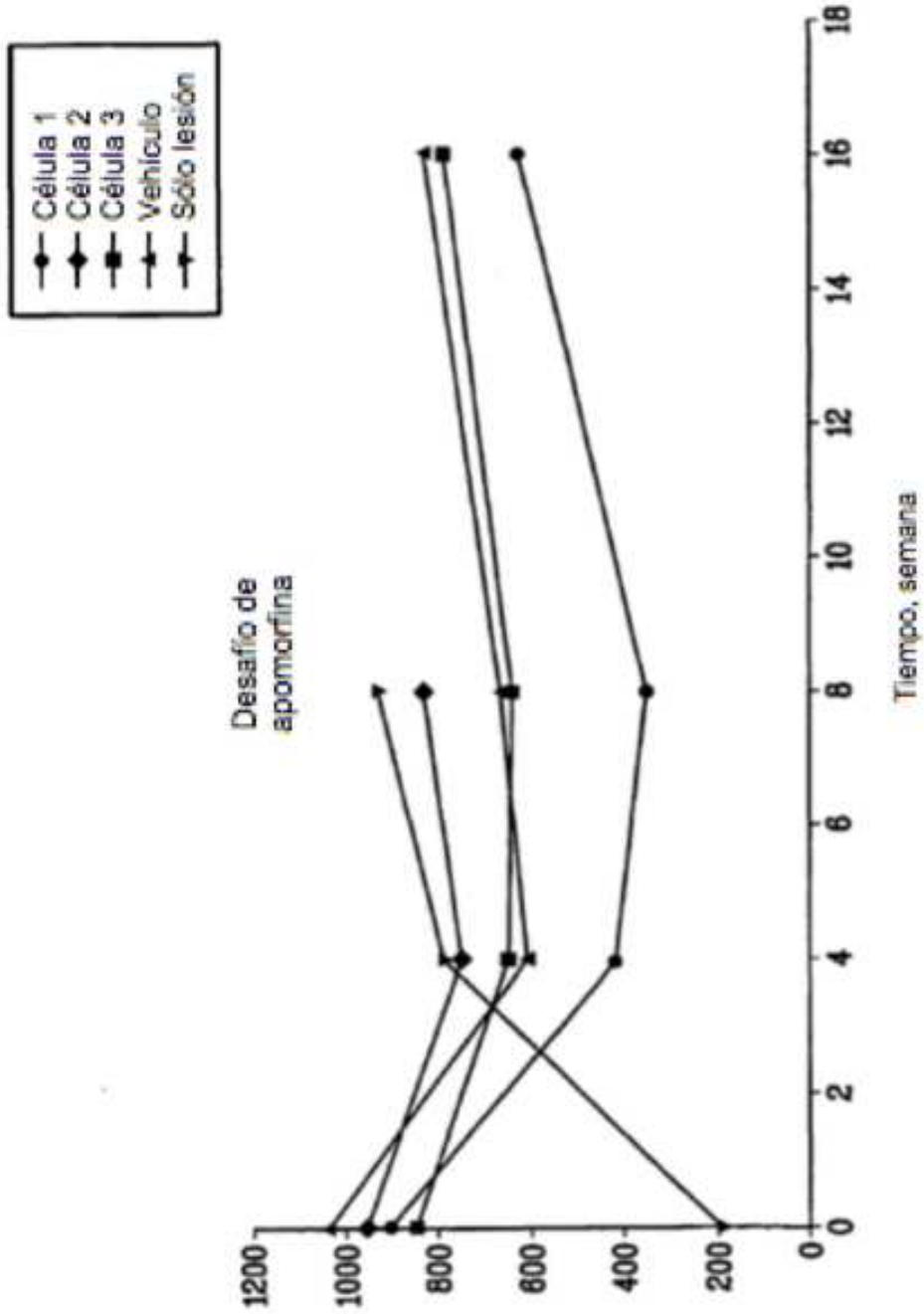


Fig. 2

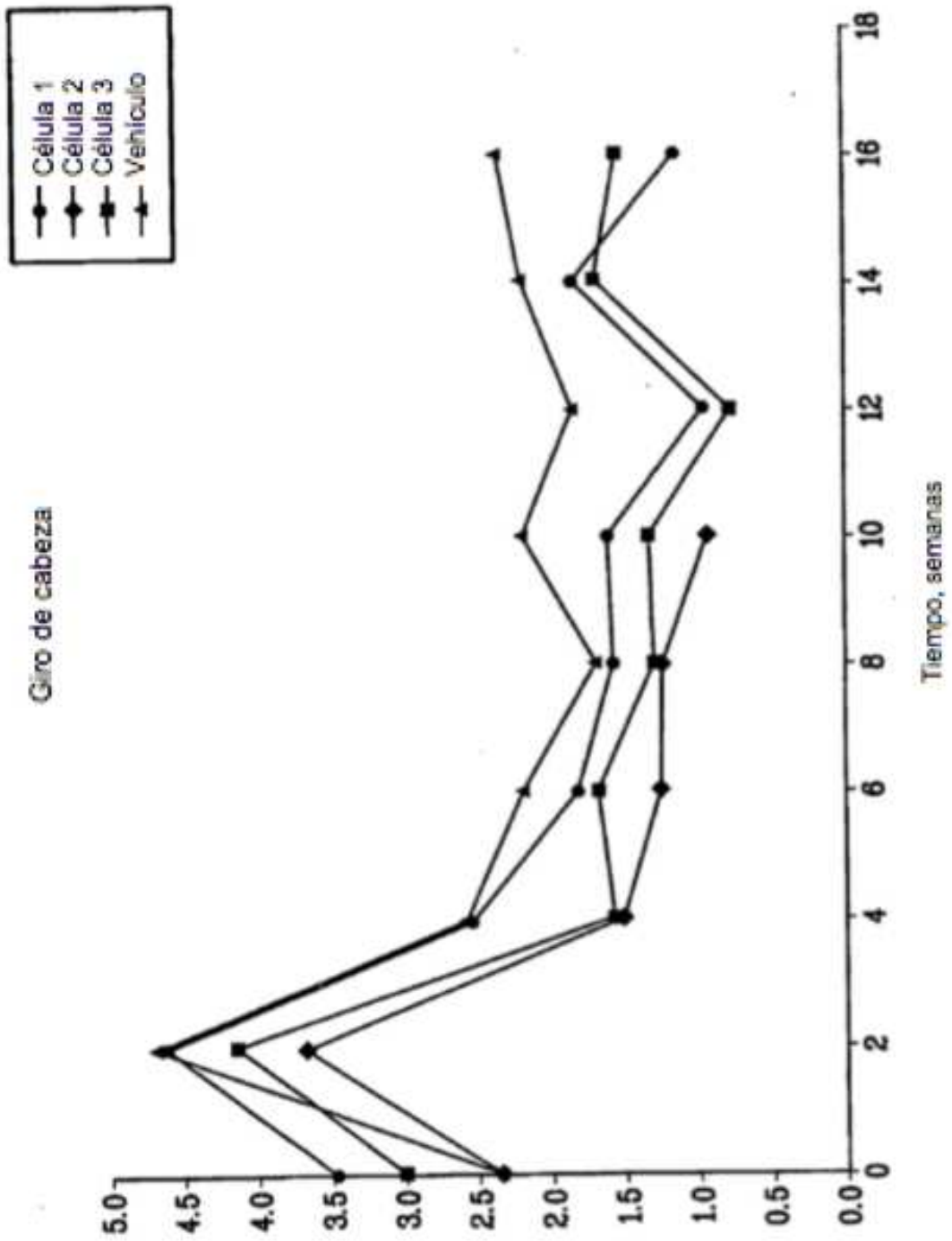


Fig. 3

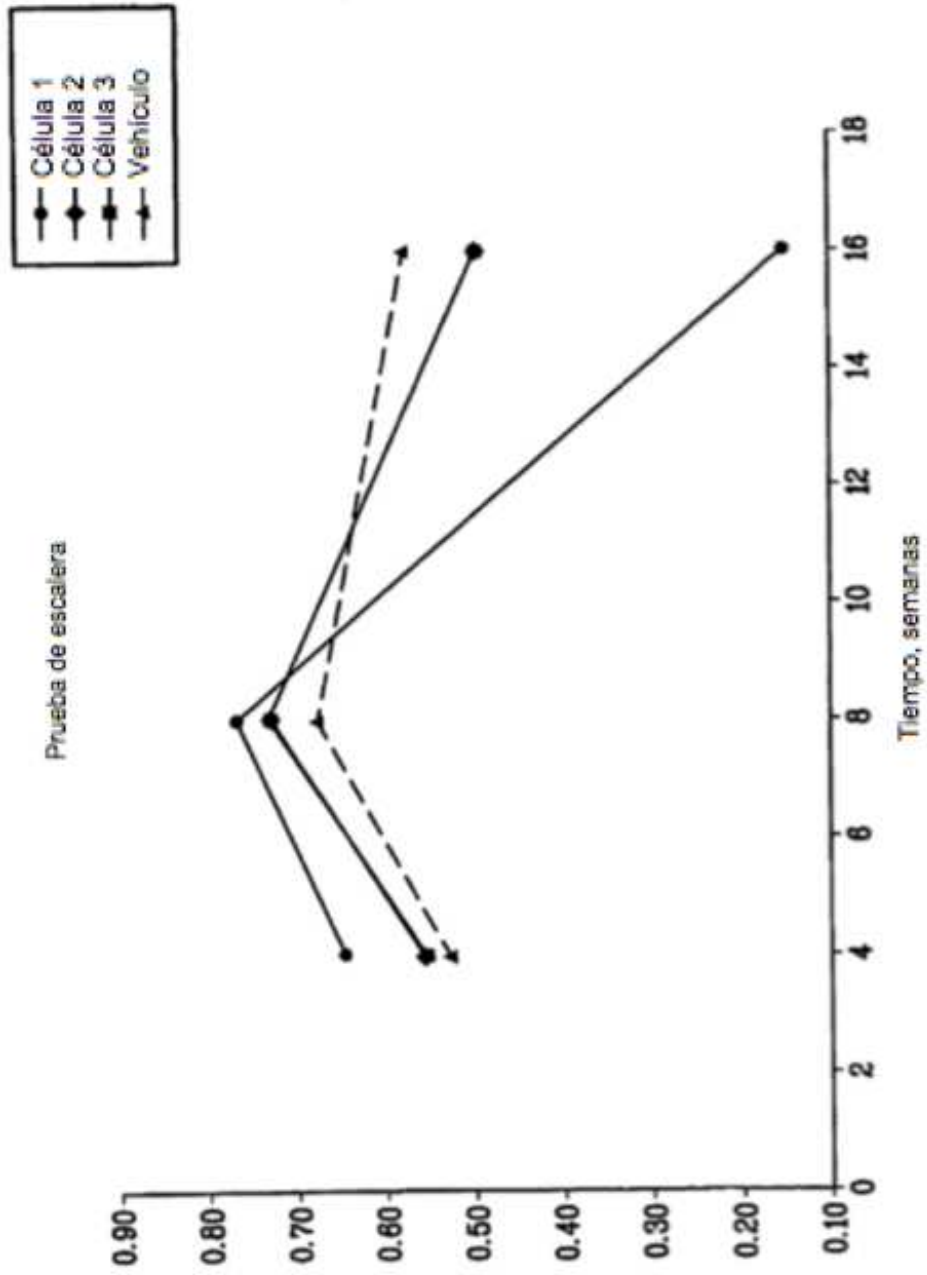
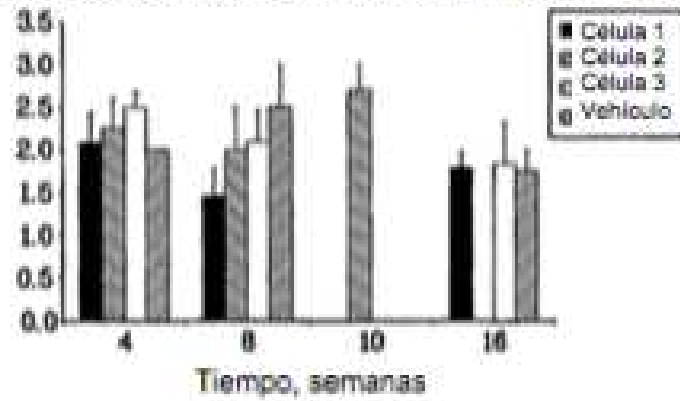


Fig. 4

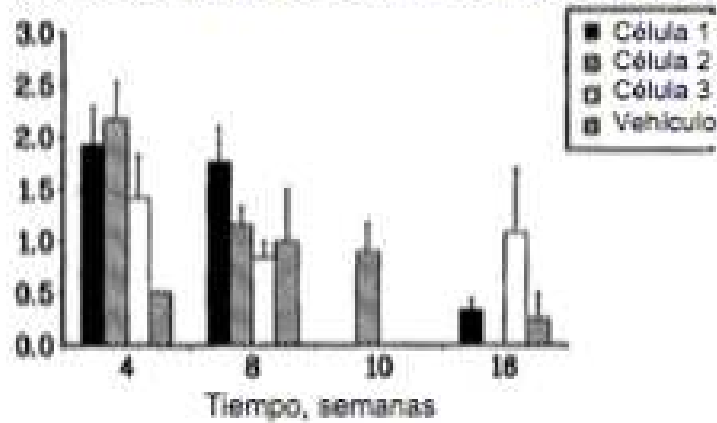
A.

Análisis cualitativo de tinción DAPI en injerto de células



B.

Análisis cualitativo de tinción Iba-1 en injerto de células



C.

Análisis cualitativo de tinción ED1 en injerto de células

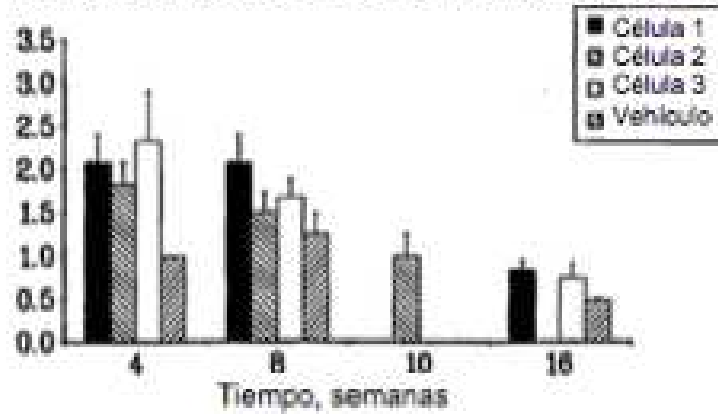
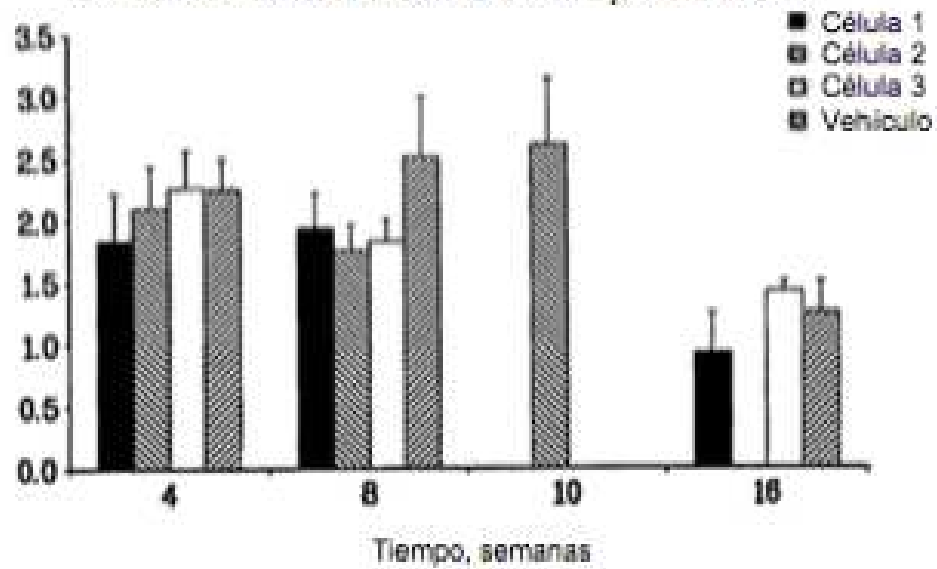


Fig. 5

A.

Análisis cualitativo de tinción GPAP en injerto de células



B.

Análisis cualitativo de tinción de vimentina en injerto de células

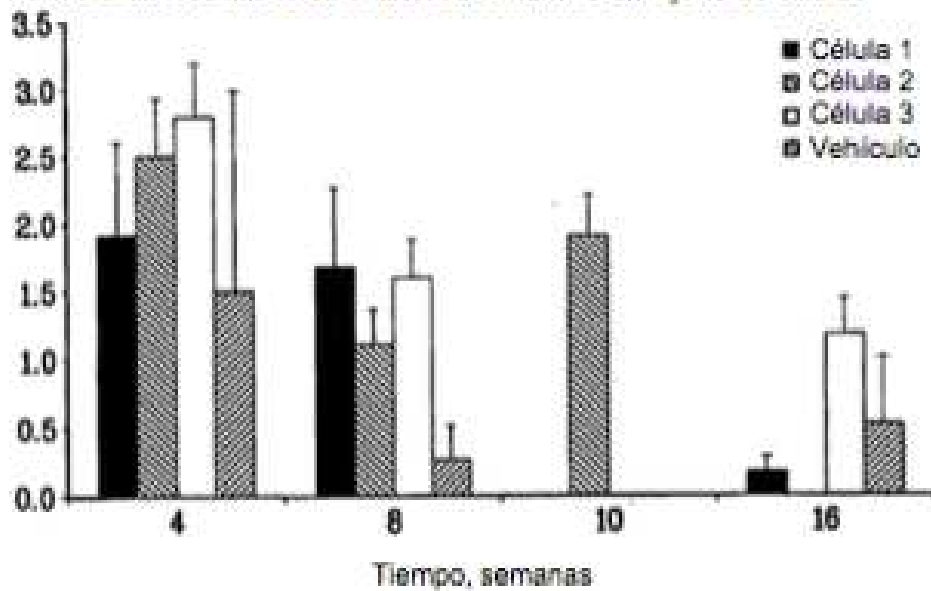
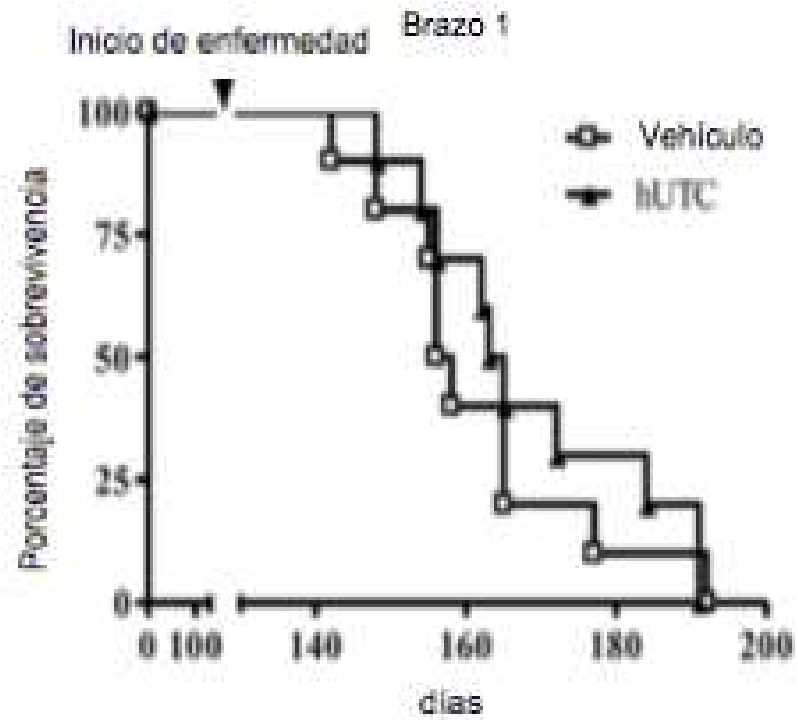


Fig. 6

A.



B.

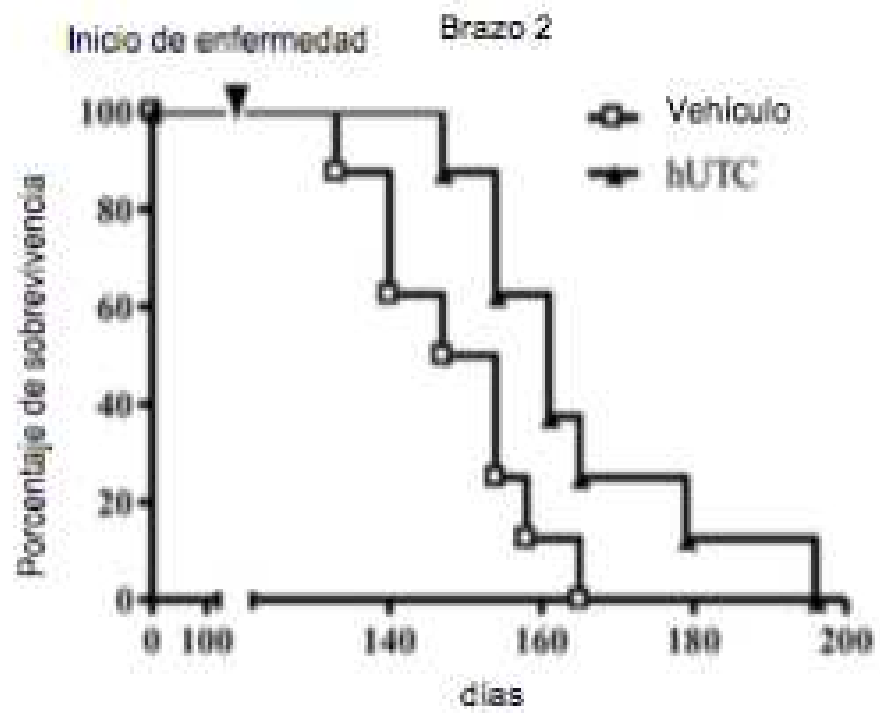


Fig. 7

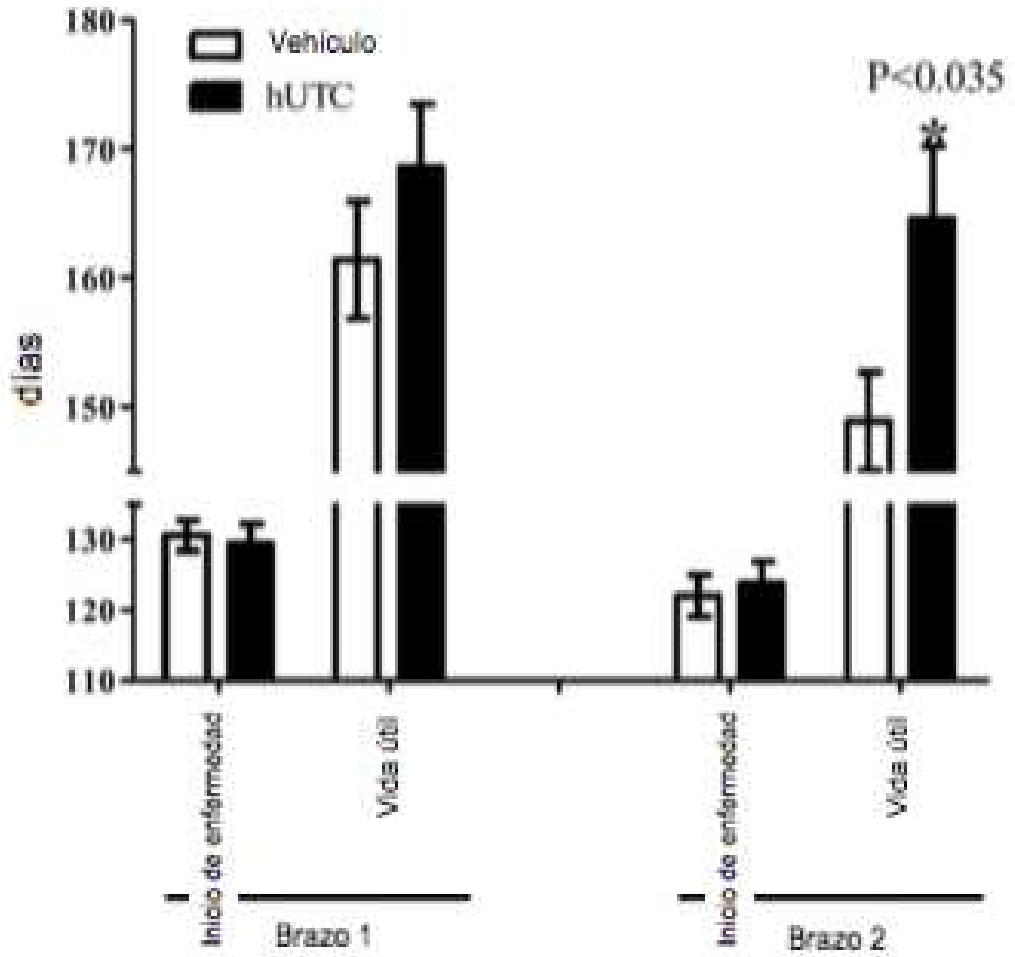


Fig. 8

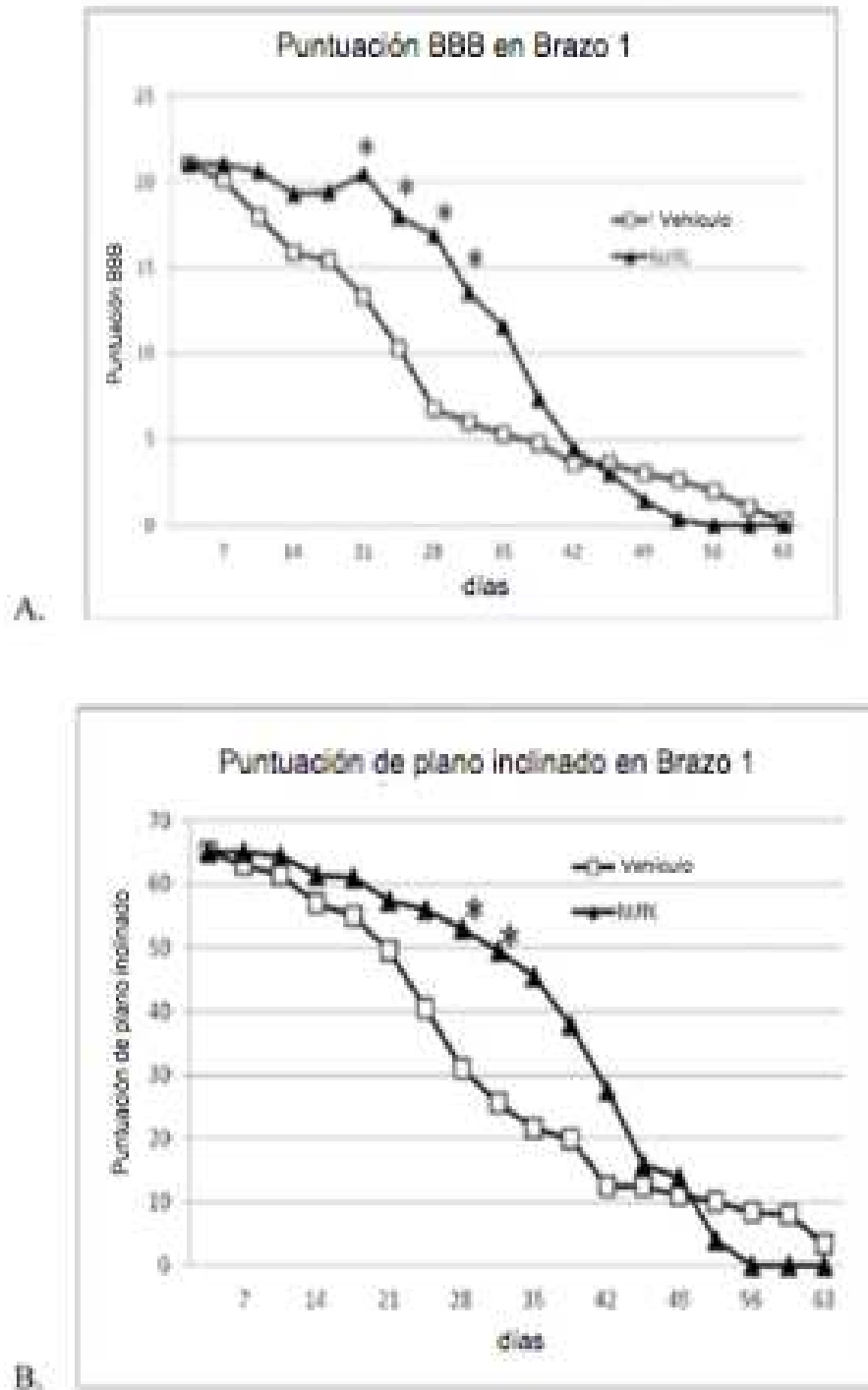


Fig. 9



Fig. 9

Curva de sobrevivencia de brazo de diez semanas

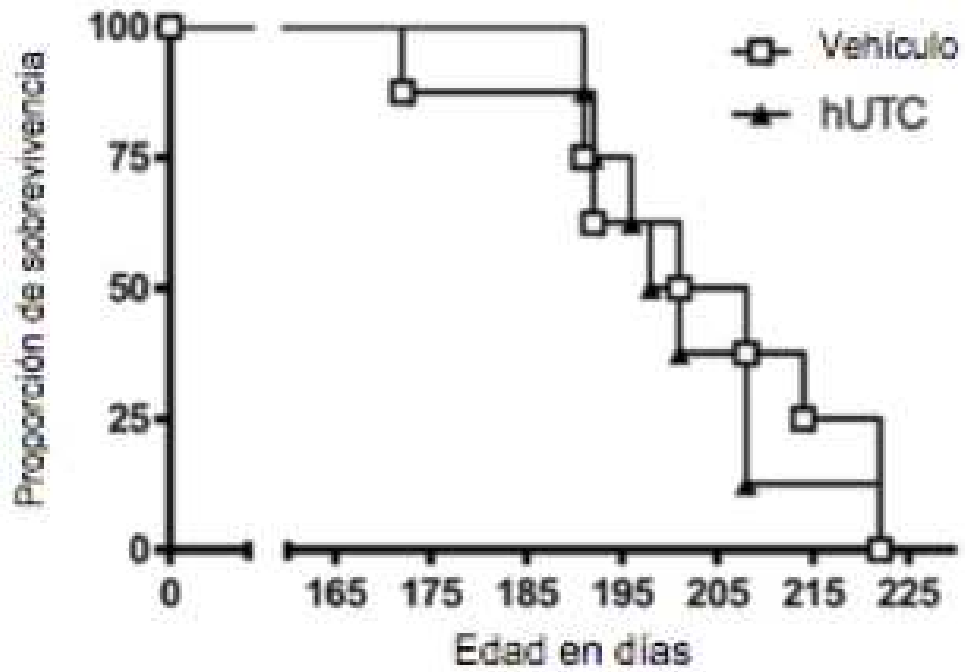


Fig. 10

Curva de sobrevivencia de brazo de doce semanas

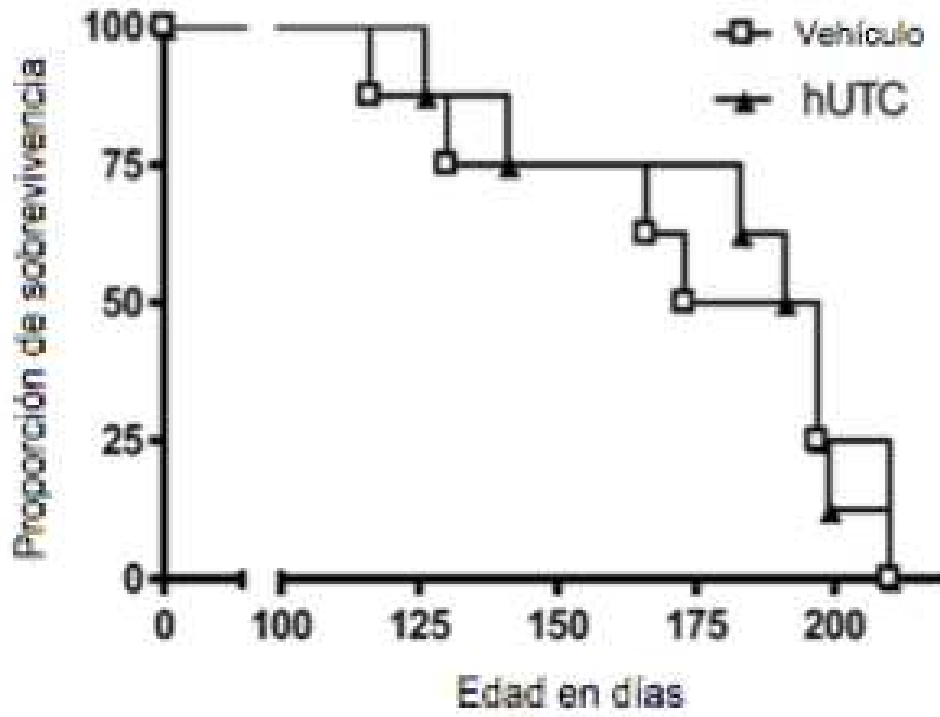


Fig. 11

Curva de supervivencia de brazo de diez semanas

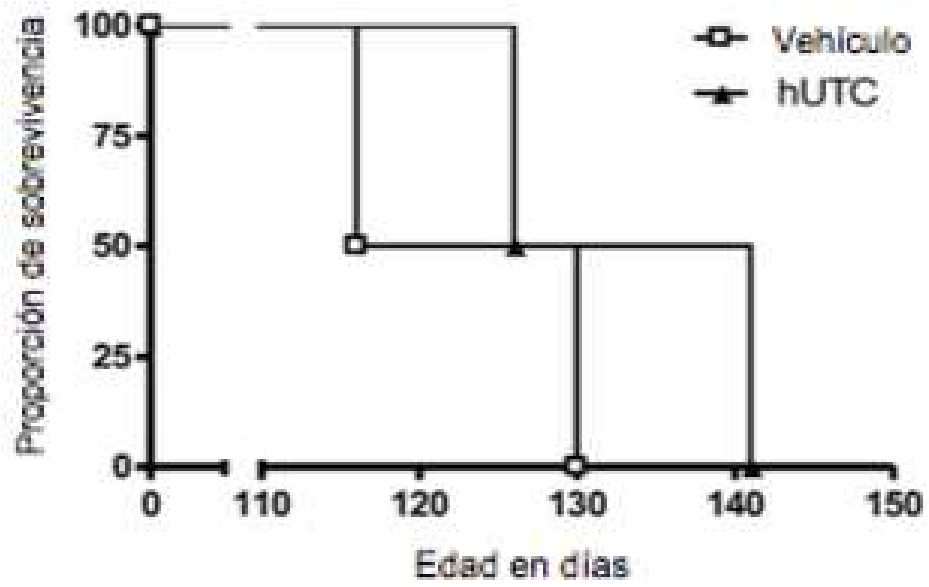


Fig. 12

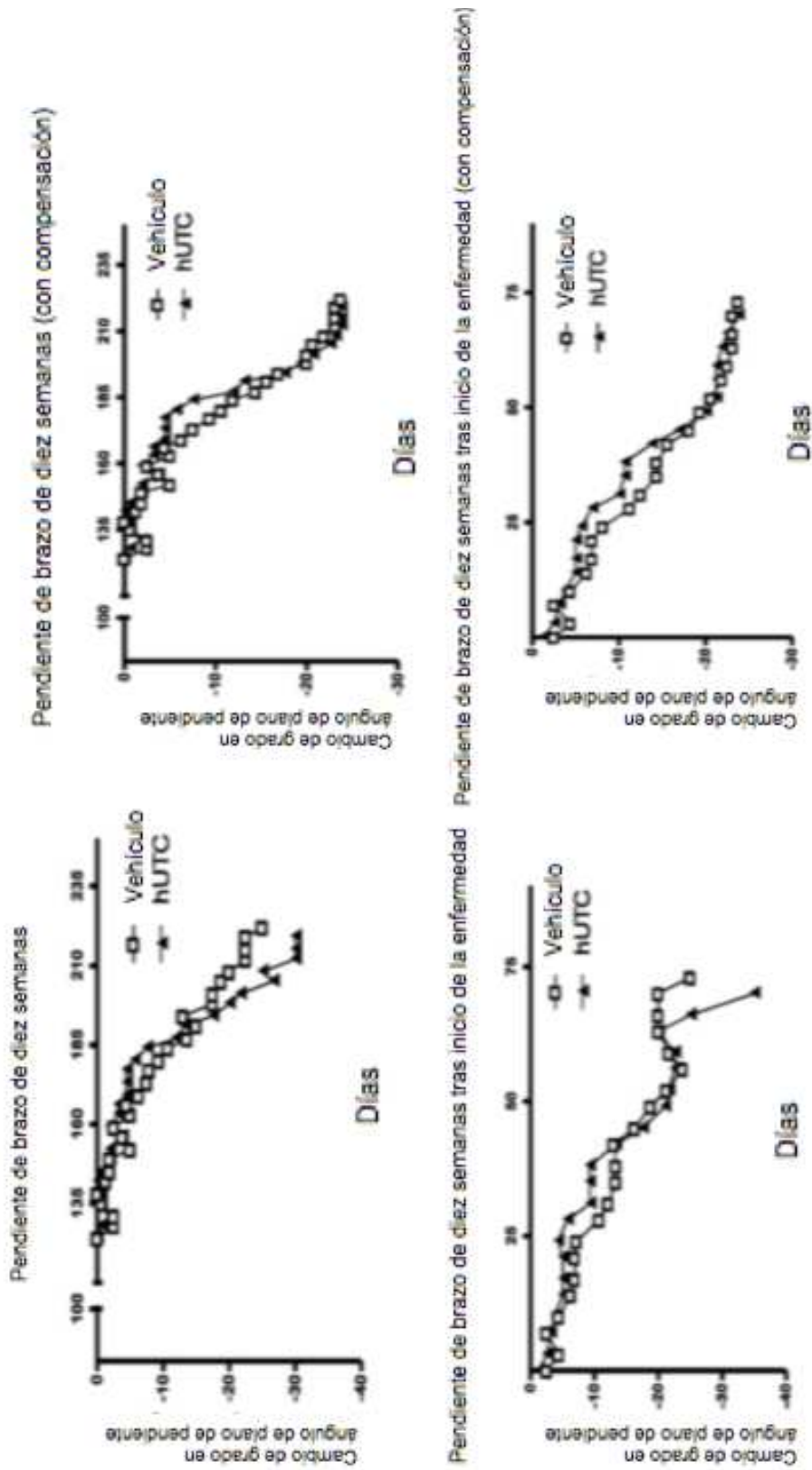


Fig. 13

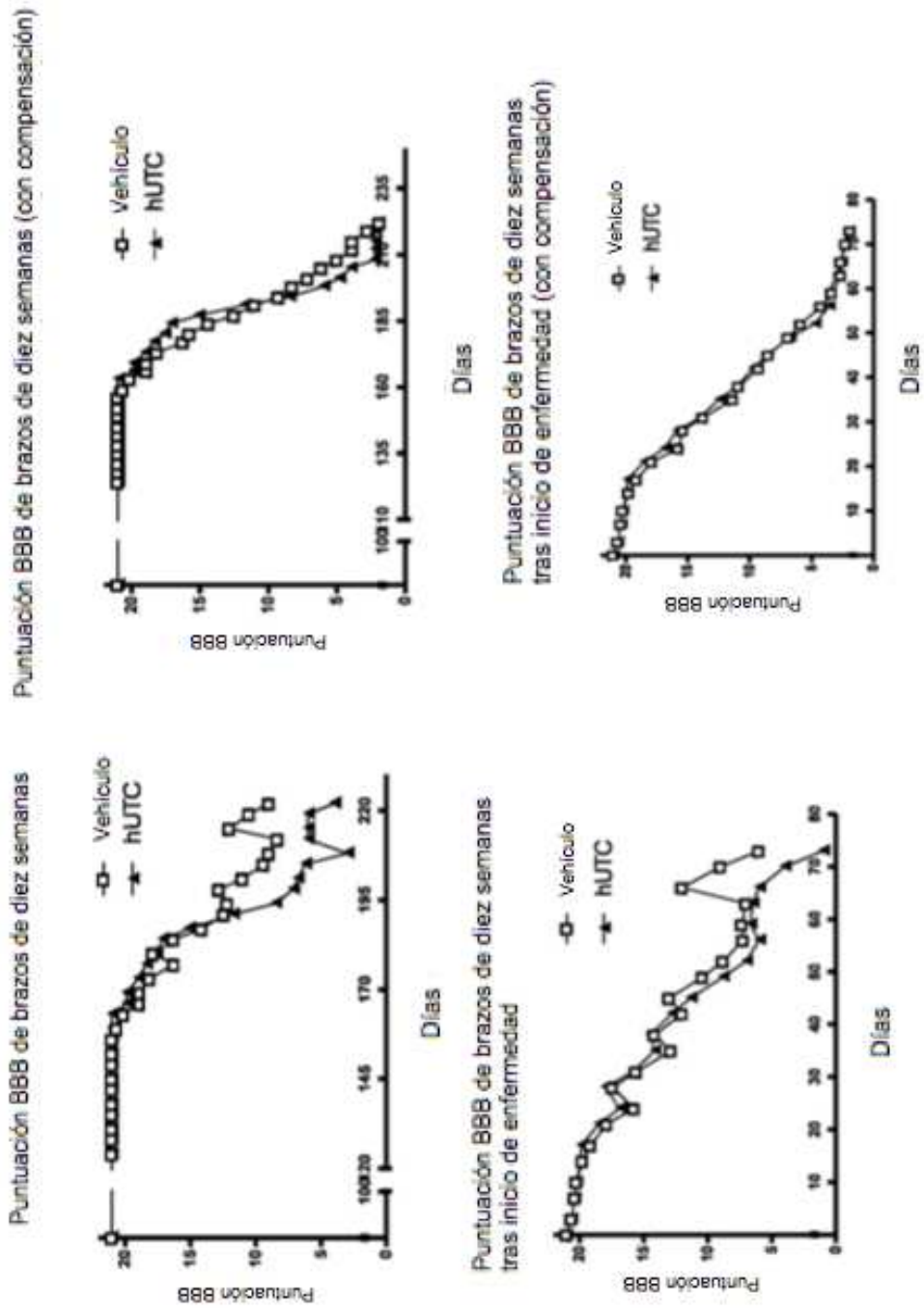


Fig. 14

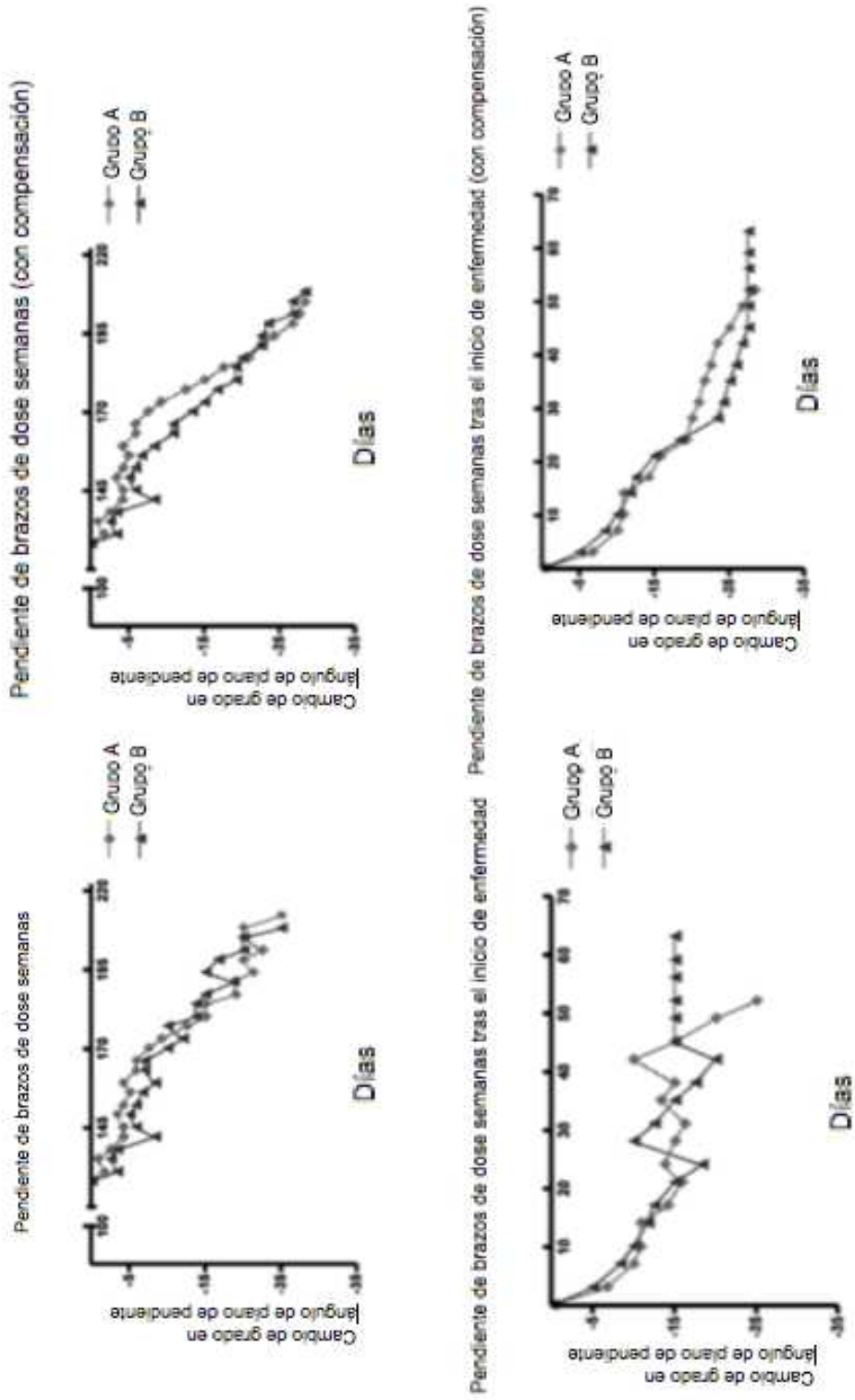


Fig. 15

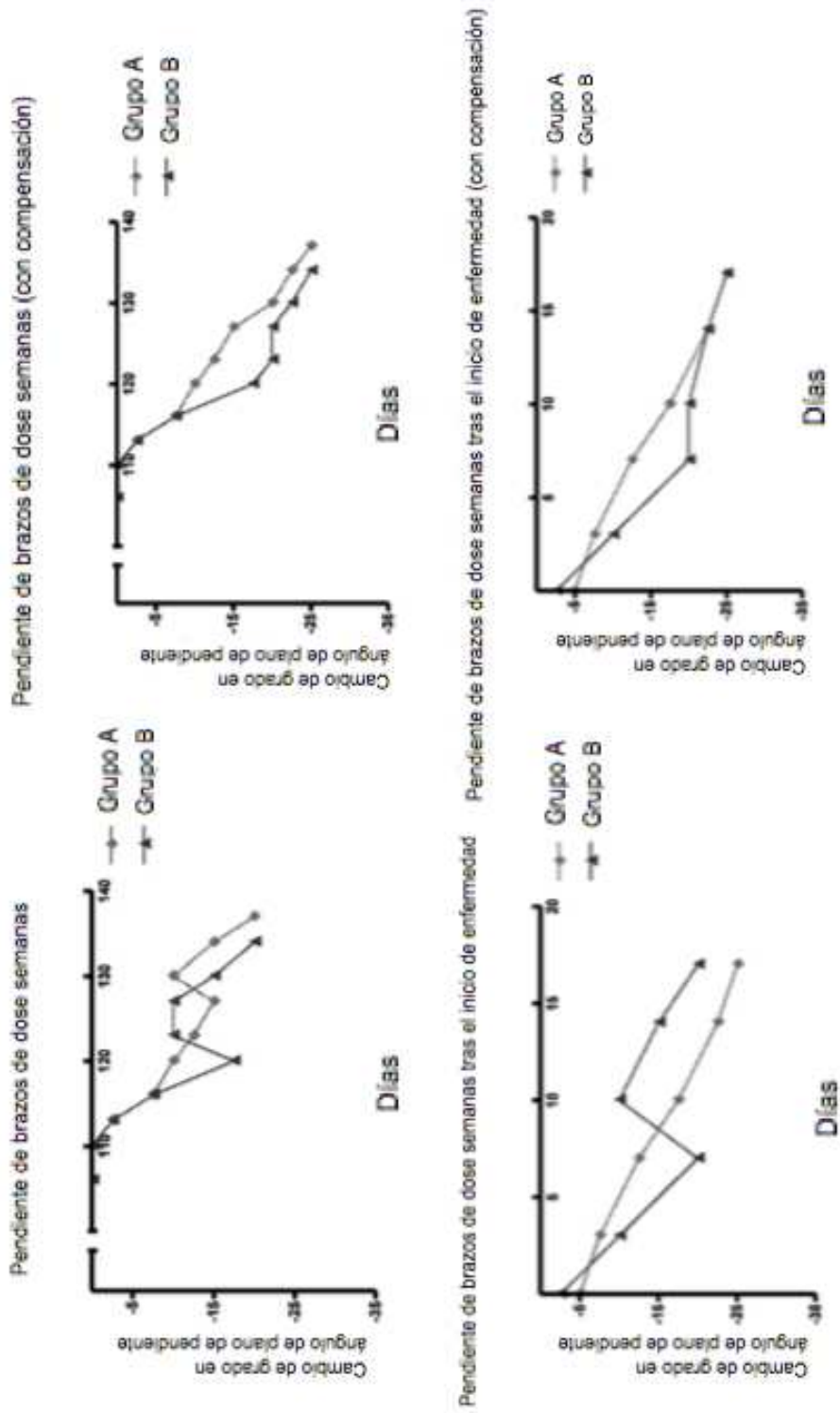


Fig. 16

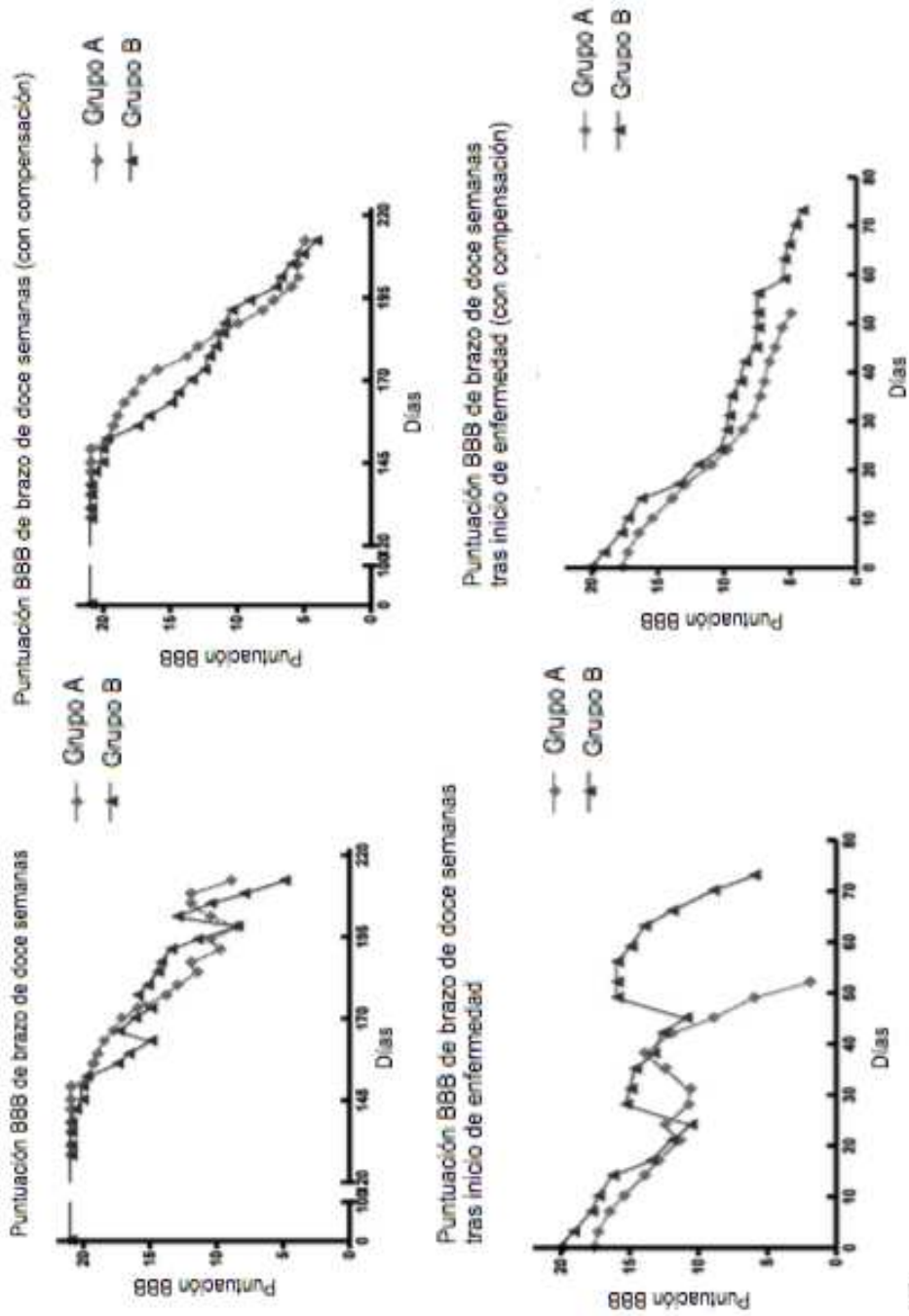


Fig. 17

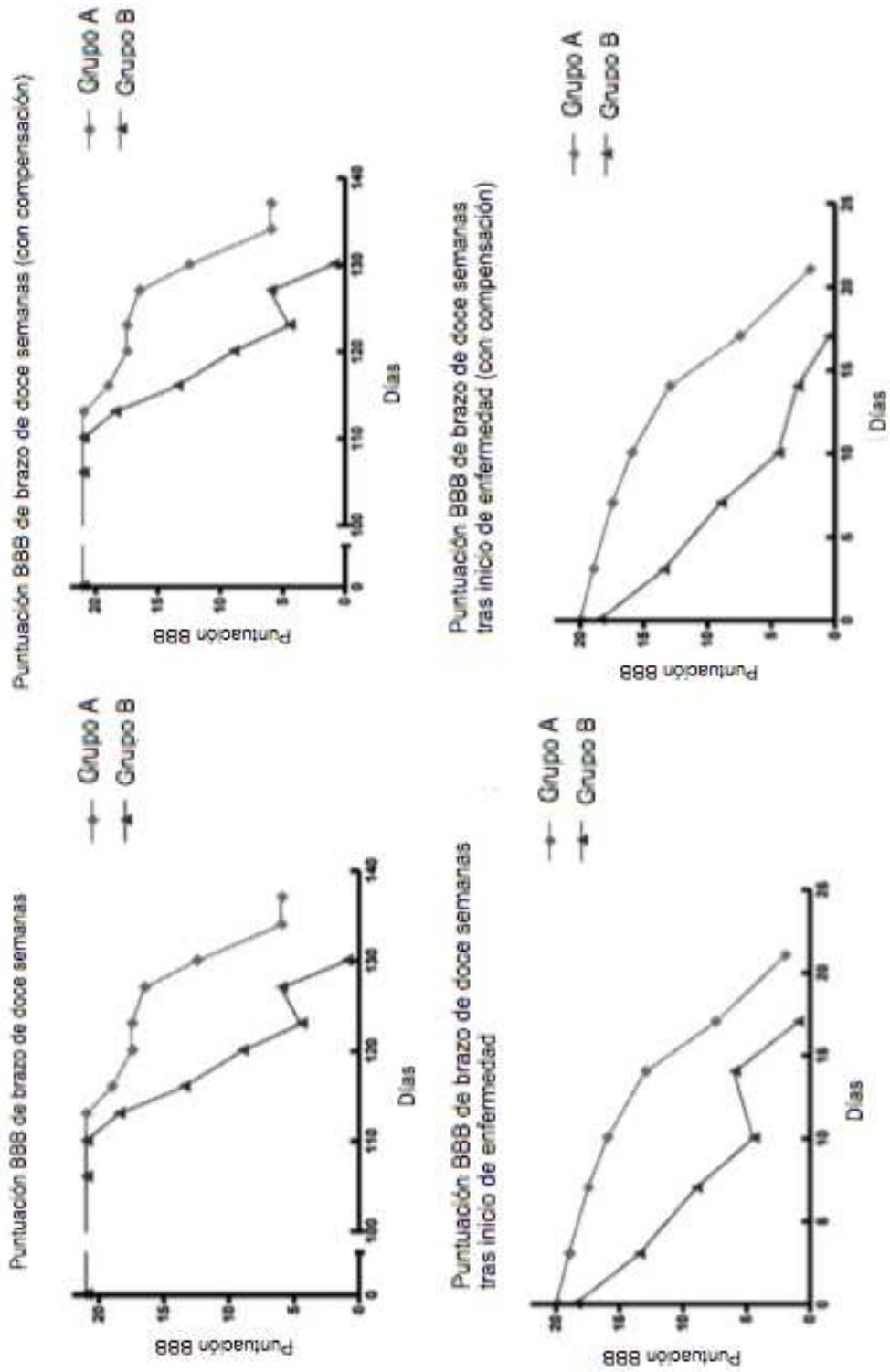
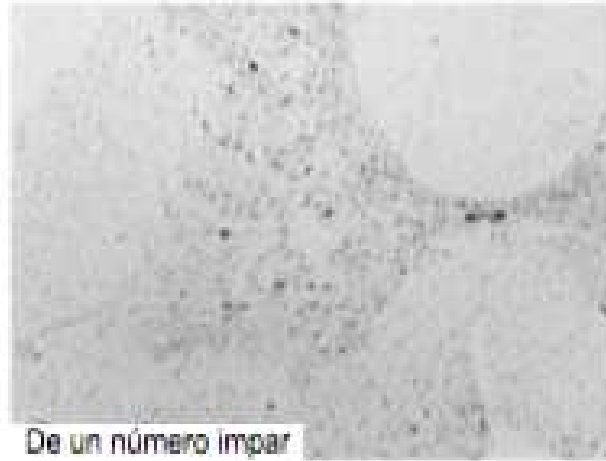


Fig. 18

A.



B.



C.

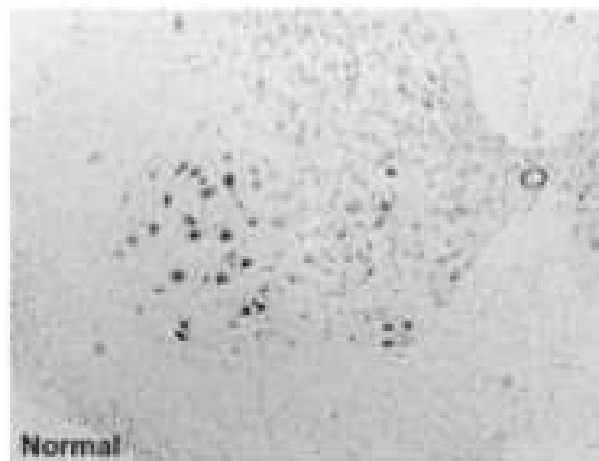


Fig. 19