

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 610**

51 Int. Cl.:

A61K 35/50 (2015.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2008 PCT/US2008/087237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009 WO09085860**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2008 E 08867441 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2237789**

54 Título: **Tratamiento de la degeneración de discos intervertebrales utilizando células derivadas de tejido cordón umbilical humano**

30 Prioridad:
27.12.2007 US 16849 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2017

73 Titular/es:
**DEPUY SYNTHES PRODUCTS, INC. (100.0%)
325 Paramount Drive
Raynham, MA 02767-0350, US**

72 Inventor/es:
**BROWN, LAURA J.;
GOSIEWSKA, ANNA;
KIHM, ANTHONY J. y
KRAMER, BRIAN C.**

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 621 610 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).

Tratamiento de la degeneración de discos intervertebrales utilizando células derivadas de tejido cordón umbilical humano

5 Descripción

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 **[0001]** La invención se refiere en general al campo de la terapéutica basada en células. En algunos aspectos, la invención se refiere al uso de células derivadas de tejido del cordón umbilical para tratar una enfermedad o condición relacionada con la degeneración del disco intervertebral.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 **[0002]** Varias publicaciones, incluyendo patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos se citan a lo largo de la memoria descriptiva.

20 **[0003]** El dolor de espalda es una de las discapacidades más comunes, y causa malestar físico y emocional importante en los individuos afectados. El deterioro de la estructura del disco intervertebral (DIV) es una de las principales causas de dolor lumbar. La DIV se forma a partir de un anillo fibroso externo fibroso que rodea un núcleo pulposo gelatinoso más blando. Las fibras del anillo fibroso se adhieren a las placas terminales de los cuerpos vertebrales de la médula espinal y atrapan el núcleo pulposo, creando un entorno isobárico. Bajo una carga axial, el núcleo pulposo comprime y transfiere radialmente esa carga al anillo fibroso. La naturaleza laminada del anillo fibroso proporciona una alta resistencia a la tracción y por lo tanto permite que se expanda radialmente en respuesta a esta carga transferida.

30 **[0004]** En una DIV sana, las células dentro de la forma del núcleo pulposo sólo alrededor del uno por ciento del tejido del disco en volumen. Estas células producen una matriz extracelular (MEC) que contiene un alto porcentaje de proteoglicanos. Los proteoglicanos contienen grupos funcionales sulfatados que retienen el agua, proporcionando de este modo el núcleo pulposo con sus cualidades de amortiguación. Las células del núcleo pulposo también pueden secretar pequeñas cantidades de citocinas y metaloproteinasas de matriz (MPMs), que ayudan a regular el metabolismo de las células del núcleo pulposo.

35 **[0005]** En algunos casos de la enfermedad de DIV, la degeneración gradual de la DIV es causada por las inestabilidades mecánicas en otras porciones de la columna vertebral. En estos casos, las cargas y presiones aumentadas sobre el núcleo pulposo hacen que las células dentro del disco (o macrófagos invasores) emitan cantidades mayores de lo normal de las citoquinas mencionadas anteriormente. En otros casos de enfermedad DIV, factores genéticos o apoptosis pueden causar una disminución en el número de células de disco y/o una liberación de cantidades tóxicas de citocinas y MPMs. En algunos casos, la acción de bombeo del disco puede funcionar mal (debido, por ejemplo, a una disminución de la concentración de proteoglicano dentro del núcleo pulposo), retrasando así el flujo de nutrientes en el disco, así como el flujo de productos de desecho a partir del disco. Esta capacidad reducida para proporcionar nutrientes a las células y eliminar los residuos puede resultar en la disminución de la viabilidad celular y el metabolismo, lo que resulta en una mayor degradación de la MEC junto con la acumulación de altos niveles de toxinas que pueden causar irritación nerviosa y dolor.

45 **[0006]** A medida que la degeneración de DIV progresa, los niveles tóxicos de citoquinas y MPMs presentes en el núcleo pulposo empiezan a degradar el MEC. En particular, las MPM (mediadas por citoquinas) comienzan a escindir las porciones de retención de agua de los proteoglicanos, reduciendo así sus capacidades de retención de agua. Esta degradación conduce a un núcleo pulposo menos flexible, que cambia el patrón de carga dentro del disco, y a su vez puede conducir a la delaminación del anillo fibroso. Estos cambios causan más inestabilidad mecánica, lo que puede hacer que las células emitan aún más citoquinas y conducir a una mayor regulación de las MPM. A medida que esta cascada destructiva continúa y la degeneración de DIV progresa, el disco comienza a protruir ("un disco herniado"), y después se rompe, causando que el núcleo pulposo entre en contacto con la médula espinal y produzca dolor.

55 **[0007]** Actualmente, las terapias principales para degeneración de DIV son intervenciones quirúrgicas en las que degeneraron discos se escinden o se fusionan con los discos vecinos. Las terapias quirúrgicas tienen como objetivo aliviar el dolor y otros síntomas de la degeneración de DIV, pero no hacen nada para reparar o regenerar las DIV enfermos. Un enfoque para el tratamiento de las células y tejidos DIV degeneradas es el uso de terapias basadas en células, en las que se administran células vivas para reparar, reemplazar y/o remodelar tejidos enfermos. Varios estudios recientes han investigado el uso de terapias basadas en células para las condiciones de DIV degenerativas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. Los números 6,352,557 ("Ferree") y 6,340,369 ("Ferree II") enseñan a cosechar células DIV vivas de un paciente, cultivando las células y trasplantándolas a una DIV afectada. Del mismo modo, Alini, Eur. Spine J., 2002: 11 (Supp.2): S215-220, describe el aislamiento y cultivo de células del núcleo pulposo, incrustar las células en una biomatriz e inyectar las células incrustadas en pacientes para restaurar la funcionalidad a las DIV afectadas. Estos enfoques, aunque prometedores, han mostrado una eficacia limitada en la reparación de

las DIVs degeneradas y sufren de complicaciones causadas por la incompatibilidad inmunológica entre los donantes de células y los receptores.

[0008] Un enfoque terapéutico alternativo basado en células es el uso de células madre, que tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en células que comprenden los tejidos enfermos. El trasplante de células madre puede utilizarse como una herramienta clínica para reconstituir un tejido diana, restaurando de este modo la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de la tecnología de células madre es muy amplia, incluyendo la ingeniería de tejidos, administración de terapia génica, y la terapéutica de células, es decir, administración de agentes bioterapéuticos a un lugar de destino a través de células vivas suministradas exógenamente o componentes celulares que producen o contienen aquellos agentes (para una revisión, véase Tresco, PA et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000; 42: 2-37). La identificación de células madre ha estimulado la investigación dirigida a la generación selectiva de tipos específicos de células para la medicina regenerativa. Un obstáculo para la realización del potencial terapéutico de la tecnología de células madre ha sido la dificultad de obtener un número suficiente de células madre. El tejido embrionario o fetal es una fuente de células madre. Se han aislado células madre y progenitoras embrionarias de varias especies de mamíferos, incluyendo seres humanos, y se han mostrado varios tipos de células de este tipo capaces de auto-renovación y expansión, así como diferenciación en un número de diferentes linajes celulares. Sin embargo, la derivación de células madre de fuentes embrionarias y fetales ha planteado muchos problemas éticos y morales que han impedido el desarrollo de la terapia con células madre embrionarias.

[0009] Existe por tanto una necesidad en la técnica para agentes terapéuticos basados en células madre que eviten los problemas que rodean las células madre embrionarias y fetales. Los tejidos posparto, como el cordón umbilical y la placenta, han generado interés como una fuente alternativa de células madre multipotentes o pluripotentes. Por ejemplo, se han descrito métodos para la recuperación de células madre por perfusión de la placenta o recolección de sangre o tejido de cordón umbilical. Una limitación de la obtención de células madre de estos métodos ha sido un volumen inadecuado de sangre de cordón umbilical o cantidad de células obtenidas, así como heterogeneidad o carencia de caracterización de las poblaciones de células obtenidas a partir de esas fuentes.

[0010] Por consiguiente, un suministro fiable, bien caracterizado y abundante de las poblaciones sustancialmente homogéneas de células madre que tienen la capacidad de diferenciarse en células que son fenotípicamente similares a células endógenas DIV serían ventajosas en una variedad de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas para la reparación, regeneración y/o reemplazo de células DIV, y para la reconstrucción y/o remodelación de tejidos DIV.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0011] La invención proporciona células obtenidas a partir de tejido humano del cordón umbilical, en el que el tejido del cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, donde las células: se pueden obtener por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano que está libre de sangre con una metaloproteasa, una proteasa neutra y una proteasa mucolítica; son capaces de auto-renovarse y expandirse en la cultura; Tienen el potencial para diferenciarse; y tienen las siguientes características:

- a) expresar CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C como se detecta mediante citometría de flujo;
- b) no expresar CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD141, CD178, HLA-G, CD117 y HLA-DR, DP, DQ como se detecta mediante citometría de flujo;
- c) no expresar telomerasa; y
- d) expresar, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimatosas o células de la médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8, reticulón 1, ligando quimiocina (motivo CXC) 1 o ligando 3 de quimiocina (motivo CXC)

Para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con la degeneración del disco intervertebral mediante la administración de las células en el núcleo pulposo o en el anillo fibroso del disco intervertebral.

[0012] En un aspecto, los métodos se describen en el presente documento para el tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con degeneración de DIV. Los métodos comprenden la administración de células derivadas de tejido del cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o condición. Preferiblemente, el tejido del cordón umbilical del que se obtienen las células está sustancialmente exento de sangre. Las células derivadas de tejidos del cordón umbilical son preferiblemente capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse, por ejemplo, con un fenotipo de célula DIV; requieren L-valina para el crecimiento; puede crecer en al menos aproximadamente un 5% de oxígeno; no producen CD117 o HLA-DR ni telomerasa; expresar la actina del músculo liso alfa; y expresar, con relación a un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o célula de médula ósea de cresta ilíaca, aumento de los niveles de interleucina 8 o reticulón 1.

[0013] En otro aspecto, se describen composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con la degeneración de DIV, comprendiendo las composiciones un vehículo

farmacéuticamente aceptable y células derivadas de tejido del cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección, en el que el tejido del cordón umbilical del que se obtienen las células está sustancialmente libre de sangre y en el que las células son capaces de la autorrenovación y la expansión en el cultivo y tienen el potencial para diferenciar, por ejemplo, a un fenotipo de célula DIV; requieren L-valina para el crecimiento; puede crecer en al menos aproximadamente un 5% de oxígeno; no producen CD117 o HLA-DR ni telomerasa; expresan la actina del músculo liso alfa; y expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de la médula ósea de cresta iliaca, niveles incrementados de interleucina 8 o reticulón 1.

[0014] De acuerdo con otro aspecto, kits se describen para el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad o condición relacionada con la degeneración de DIV, los kits comprenden instrucciones para usar el kit en un método para tratar una enfermedad o condición relacionada con la degeneración de DIV, vehículo farmacéuticamente aceptable y células derivadas de tejidos del cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección, en el que el tejido del cordón umbilical del que se obtienen las células está sustancialmente exento de sangre y en el que las células capaces de autorenovarse y expandirse en Y tienen el potencial de diferenciar, por ejemplo, a un fenotipo de célula DIV; requerir L-valina para el crecimiento; pueden crecer en al menos aproximadamente un 5% de oxígeno; no producen CD117 o HLA-DR ni telomerasa; expresan la actina del músculo liso alfa; y expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimatosas o células de la médula ósea de cresta iliaca, niveles incrementados de interleucina 8 o reticulón 1. En algunas realizaciones, los kits descritos en la presente memoria descriptiva comprenden además al menos un reactivo y/o instrucciones para cultivar las células. En algunas realizaciones, los kits descritos en este documento comprenden instrucciones para la inducción de células a diferenciarse al menos parcialmente *in vitro*, por ejemplo, en células que muestran un fenotipo de núcleo pulposo celular y/o un fenotipo de células de anillo fibroso.

[0015] En diversas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical utilizadas en los métodos, composiciones, y/o kits descritos en este documento, expresan reticulón, ligando del receptor de quimioquinas 3, y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos 2. En algunas formas de realización, células de cordón umbilical derivadas de tejido descritas en este documento expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical descritas en este documento tienen la capacidad de diferenciarse en células de anillo fibroso y/o núcleos pulposos.

[0016] En diversas realizaciones, la enfermedad o condición relacionada con la degeneración de DIV puede ser causada o inducida por la edad, trauma, auto-inmunidad, reacción inflamatoria, un defecto genético, la deposición de complejos inmunes, y/o combinaciones de los mismos. Una DIV dirigido para el tratamiento puede estar intacto o en cualquier etapa de daño o degeneración. Por ejemplo, una DIV dirigido para el tratamiento puede ser herniado, roto, delaminado, y/o de otro modo dañado o degenerado.

[0017] En algunos métodos realizaciones dadas a conocer en el presente documento comprenden la administración de las células derivadas de tejido umbilical no diferenciadas o derivadas de células. Las células derivadas de tejido umbilical humano producen factores tróficos beneficiosos que incluyen, pero no se limitan a citocinas, factores de crecimiento, inhibidores de proteasa, proteínas de matriz extracelular que promueven la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de células progenitoras o precursoras endógenas de DIV. Los factores tróficos descritos aquí podrían ser secretados directamente por las células derivadas del tejido umbilical humano trasplantadas en el medio huésped. Los factores tróficos u otros derivados celulares pueden recogerse de células derivadas de tejidos umbilicales humanos ex vivo y posteriormente introducirse en el paciente.

[0018] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical descritas en este documento son inducidas *in vitro* para diferenciarse en células de un linaje de condrocitos, y/o en células que muestran el fenotipo de una célula de anillo fibroso, una célula de núcleo pulposo, y/u otra célula de tipo DIV antes, después, o simultáneamente con la administración de las células. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento comprenden además la etapa de inducción de células derivadas de tejido de cordón umbilical para diferenciarse al menos parcialmente *in vitro*.

[0019] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se pueden modificar genéticamente para expresar un producto de gen, tal como, pero no limitado a, un producto génico que promueve la reparación y/o regeneración de los tejidos de DIV. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se modifican genéticamente para expresar un factor trófico u otro producto génico. En algunas realizaciones, el producto génico ejerce un efecto trófico o modula de otro modo las células derivadas de tejido del cordón umbilical, tipos de células adicionales administradas con las células derivadas de tejido del cordón umbilical, células endógenas DIV y/u otras células endógenas. En algunas realizaciones, el producto génico es un componente de la matriz extracelular o un agente que modula la matriz extracelular. En algunas realizaciones, el producto génico estimula la expresión de una o más proteínas de matriz extracelular.

[0020] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran con al menos otro tipo de células, tales como, pero no limitado a una célula de anillo fibroso, una célula de núcleo pulposo, un fibroblasto, un condrocito, una célula madre mesenquimal, Una célula derivada del tejido adiposo u otro tipo de células madre pluripotentes o multipotentes. El al menos otro tipo celular puede administrarse simultáneamente con,

antes o después de las células derivadas del tejido del cordón umbilical.

[0021] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran con al menos un agente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran con un factor trófico, tal como, pero sin limitarse a, TGF-beta, GDF-5, TIMP-1 y PDGF-BB. En varias realizaciones, el al menos un agente ejerce un efecto trófico sobre o modula de otro modo las células derivadas de tejido del cordón umbilical, uno o más tipos celulares adicionales administrados con las células derivadas de tejido del cordón umbilical, células DIV endógenas y/u otras células endógenas. En algunas realizaciones, al menos un agente estimula la expresión de una o más proteínas de matriz extracelular. Otros agentes que incluyen pero no se limitan a agentes antiinflamatorios, agentes de supervivencia celular, agentes reductores del dolor y agentes inmunomoduladores. El agente se puede administrar simultáneamente con, antes o después de la administración de las células derivadas del tejido del cordón umbilical.

[0022] En varios aspectos, las células se pueden administrar, dirigirse a administrarse o formularse para administrarse por inyección en una DIV, incluyendo, por ejemplo, el núcleo pulposo y/o el anillo fibroso de una DIV degenerada. En algunas realizaciones, las células son administradas, dirigidas a administrarse o formularse para administrarse de manera que las células se encapsulen dentro de un dispositivo implantable o mediante la implantación de un dispositivo o matriz que comprende las células.

[0023] Lo anterior y otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0024] Varios términos relacionados con los métodos y otros aspectos de la presente invención se utilizan en toda la memoria y las reivindicaciones. Dichos términos tendrán su significado ordinario en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben ser interpretados de una manera consistente con la definición aquí proporcionada.

[0025] Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

[0026] El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible como una cantidad, una duración temporal, y similares, se utiliza para abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, aún más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos descritos.

[0027] "Derivado" se utiliza para indicar que las células se han obtenido a partir de su fuente biológica y cultivado, expandido en cultivo, inmortalizado, o manipulado de otra manera *in vitro*.

[0028] "Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" de su estado natural. Si una molécula o composición ocurre en la naturaleza, se ha "aislado" si ha sido cambiado o removido de su entorno original, o ambos.

[0029] El término "expresar", "expresa", o "expresión" de una molécula de ácido nucleico o gen se refiere a la biosíntesis de un producto génico, por ejemplo, la biosíntesis de un polipéptido.

[0030] "Los factores tróficos" son sustancias que promueven la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación, proliferación y/o la maduración de una célula, o estimulan una mayor actividad biológica de una célula. Los derivados de células se refieren a cualquier material que se puede obtener a partir de células e incluyen medios acondicionados de células, lisado celular, proteínas de matriz extracelular, factores tróficos, fracciones celulares, membranas celulares.

[0031] "Degeneración" se refiere a cualquier daño físico, lesión, degeneración o trauma a una DIV.

[0032] "Patología" se refiere a cualquier indicación estructural o funcional de una desviación del estado normal de una célula, tejido, órgano o sistema, medido por cualquier medio adecuado en la técnica.

[0033] Una "enfermedad" es cualquier desviación o deterioro en la salud, condición, o el funcionamiento de una célula, tejido, órgano, sistema u organismo en su conjunto, según se mide mediante cualquier medio adecuado en la técnica.

[0034] "Tratar," "tratando" o 'tratamiento' se refieren a cualquier éxito o indicio de éxito en la atenuación o mejora de la enfermedad, daño o condición, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión, disminución de los síntomas o haciendo que la enfermedad, el daño o la condición sean más tolerables para el paciente, disminuyendo la velocidad de degeneración o declive, haciendo que el punto final de la degeneración sea

menos debilitante o mejorando el bienestar físico o mental del sujeto. El tratamiento o mejora de los síntomas pueden basarse en parámetros objetivos o subjetivos, incluidos los resultados de un examen físico, un examen neurológico y/o evaluaciones psiquiátricas.

5 **[0035]** "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una cantidad de un compuesto, material o composición, tal como se describe en el presente documento eficaz para lograr un resultado biológico particular tal como, pero no limitado a, resultados biológicos descritos, descritos o ejemplificados en la presente memoria. Tales resultados pueden incluir, pero no se limitan al tratamiento de la enfermedad DIV o daño en un sujeto, según se determina por cualquier medio adecuado en la técnica.

10 **[0036]** "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y al químico farmacéutico fabricante desde un punto de vista físico/químico respecto a composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y no es tóxico para el huésped al que se administra.

15 **[0037]** Se ha descubierto que las enfermedades y condiciones relacionadas con la degeneración del disco intervertebral (DIV) se pueden tratar mediante la administración de células derivadas de tejido de cordón umbilical tal como se describe en el presente documento. Ventajosamente, los métodos, composiciones y kits descritos en el presente documento promueven la reparación y regeneración de las DIVs degeneradas y, de este modo, alivian uno o más síntomas asociados con la degeneración de DIV. Por consiguiente, en un aspecto, se describen métodos para tratar una enfermedad o afección relacionada con la degeneración de DIV, que comprende administrar células derivadas de tejido del cordón umbilical a una DIV en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o condición.

20 **[0038]** En diversas realizaciones, la enfermedad o condición relacionada con la degeneración de DIV puede ser causada o inducida por la edad, trauma, auto-inmunidad, reacción inflamatoria, un defecto genético, la deposición de complejos inmunes (por ejemplo, formación de tejido de cicatriz), y/o combinaciones de los mismos. Una DIV dirigido para el tratamiento puede estar intacto o en cualquier etapa de daño o degeneración. Por ejemplo, una DIV dirigida para el tratamiento puede estar herniada (por ejemplo, donde una porción del anillo fibroso tiene una protuberancia u otra protuberancia), rota (por ejemplo, donde al menos una porción del anillo fibroso se rompe, dando como resultado una disminución en la presión y/o el volumen del núcleo pulposos), delaminada (por ejemplo, donde se han separado dos o más capas del anillo fibroso) y/o dañada o degenerada de otro modo (por ejemplo, donde el anillo fibroso tiene fisuras, grietas, o similar, y/o en el que la matriz extracelular se degrada o se altera).

25 **[0039]** En diversas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran a una DIV degenerada, por ejemplo por inyección, trasplante, implante, inyectar o proporcionar como un complejo de células de la matriz, o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar terapia celular. En algunas realizaciones, las células se administran directamente al anillo fibroso y/o al núcleo pulposos de la DIV. En algunas realizaciones, las células se administran indirectamente a una DIV. Por ejemplo, las células pueden estar en un vehículo acuoso, encapsuladas en un dispositivo o sembradas en una matriz, que después se implantan en o cerca de una DIV degenerada. Los vehículos acuosos incluyen, pero no se limitan a soluciones de tampón fisiológicas tales como solución salina tamponada, solución salina tamponada con fosfato, solución de sales balanceadas de Hank, solución salina tamponada con Tris y solución salina tamponada con Hepes. En diversas realizaciones, se puede implantar un dispositivo, matriz u otro depósito celular de modo que esté unido a una pared exterior del anillo fibroso, o localizado fuera de, pero adyacente a una pared de la fibrosis anular, o adyacente a una placa terminal de un cuerpo vertebral que rodea la DIV.

30 **[0040]** En algunas realizaciones, las células se administran en la forma de un dispositivo tal como un complejo de células de la matriz. Los materiales del dispositivo incluyen, pero no se limitan a, materiales biorreabsorbibles tales como colágenos, 35/65 Poli(epsilon-caprolactona)(PCL)/Poli(ácido glicólico) (PGA), construcciones bioabsorbibles PANACRYL™, poliglactina 910 de VICRYL™, y péptidos autoensamblables y materiales no reabsorbibles tales como fluoropolímeros (por ejemplo, fluoropolímeros TEFLON®), plásticos y metales. Las matrices incluyen andamios biocompatibles, celosías, estructuras de autoensamblaje y similares, bioabsorbibles o no, líquidos, gel o sólidos. Tales matrices son conocidas en la técnica de tratamiento de células terapéuticas, reparación quirúrgica, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas. Preferiblemente, las matrices son pretratadas con las células terapéuticas. Más preferiblemente, las matrices se rellenan con células en estrecha asociación con la matriz o sus espacios. Las células pueden adherirse a la matriz o pueden quedar atrapadas o contenidas dentro de los espacios matriciales. Los complejos de matriz-célula son los más preferidos en los que las células crecen en estrecha asociación con la matriz y cuando se usan terapéuticamente, el crecimiento, la reparación y/o la regeneración de las propias células DIV del paciente se estimula y soporta, y la angiogénesis apropiada se estimula o se soporta. Las composiciones de células de matriz pueden introducirse en el cuerpo de un paciente de cualquier manera conocida en la técnica, incluyendo pero no limitándose a implantación, inyección, unión quirúrgica, trasplante con otro tejido, y similares. En algunas realizaciones, las matrices forman *in vivo*, o incluso más preferiblemente *in situ*, por ejemplo geles polimerizables *in situ* se pueden usar de acuerdo con la invención. Ejemplos de tales geles se conocen en la técnica.

[0041] Las células descritas en este documento también pueden ser sembradas en matrices tridimensionales, tales como andamios y implantados *in vivo*, donde las células sembradas pueden proliferar sobre o en el marco, o ayudar a establecer tejido de reemplazo *in vivo* con o sin la cooperación de otras células. El crecimiento de células derivadas de tejido de cordón umbilical en el marco tridimensional resulta preferentemente en la formación de un tejido tridimensional, o fundación del mismo, que puede utilizarse *in vivo*, por ejemplo para reparar y/o regenerar el tejido dañado o enfermo.

[0042] Las células pueden ser sembradas en un marco tridimensional o matriz, tal como un andamio, una espuma, un andamio electroestáticamente hilado, un andamio no tejido, micropartículas porosas o no porosas, o hidrogel y se administran en consecuencia. El bastidor puede configurarse en diversas formas, tales como sustancialmente plana, sustancialmente cilíndrica o tubular, o puede ser de forma completamente libre, según se requiera o se desee para la estructura correctiva considerada. Dos o más armazones sustancialmente planos pueden colocarse encima de otro y fijarse juntos como sea necesario para generar una estructura multicapa.

[0043] En tales marcos tridimensionales, las células se pueden coadministrar con otros tipos de células, u otros progenitores de tipo de tejidos blandos, incluyendo las células madre. Cuando se cultiva en un sistema de tres dimensiones, las células proliferantes pueden madurarse y segregarse apropiadamente para formar componentes de tejidos adultos análogos a las contrapartes encontradas naturalmente *in vivo*.

[0044] Las matrices descritas y ejemplificadas en el presente documento pueden diseñarse de tal manera que la estructura de la matriz soporta las células derivadas de tejido de cordón umbilical sin degradación posterior, apoya a las células desde el momento de la siembra hasta el trasplante de tejido es remodelado por el tejido del huésped, o permite que las células sembradas se adhieran a, proliferen, y se conviertan en una estructura de tejido que tiene suficiente integridad mecánica para apoyarse *in vitro*, momento en el cual la matriz se degrada.

[0045] Las matrices, andamios, tales como espumas no tejidos, estructuras electrostáticamente hiladas, micropartículas y sistemas de auto-montaje contemplados para uso en esta invención pueden implantarse en combinación con uno cualquiera o más células, factores de crecimiento, medicamentos u otros componentes, como agentes bioactivos que promueven la cicatrización, la regeneración, la reparación o el crecimiento de tejido, o estimulan la vascularización o inervación de los mismos o mejoran de otro modo el resultado terapéutico o la práctica de la invención, además de las células de la invención.

[0046] En algunas realizaciones, las células descritas en este documento se pueden cultivar libremente en cultivo, eliminado a partir del cultivo y se inocularon en un marco tridimensional. La inoculación de la estructura de tres dimensiones con una concentración de células, por ejemplo, aproximadamente 10^6 a 5×10^7 células por mililitro, se traduce preferiblemente en el establecimiento del soporte de tres dimensiones en periodos relativamente cortos de tiempo. Además, en alguna aplicación, puede ser preferible utilizar un número mayor o menor de células dependiendo del resultado deseado.

[0047] En algunos aspectos, es útil volver a crear en el cultivo el microambiente celular encontrado *in vivo*, de tal manera que el grado en que las células se cultivan antes de la implantación *in vivo* o se utilizan *in vitro* puede variar. Las células se pueden inocular sobre la estructura antes o después de formar la forma deseada para la implantación, por ejemplo, cuerdas, tubos, filamentos y similares. Después de la inoculación de las células sobre el armazón, el armazón se incuba preferiblemente en un medio de crecimiento apropiado. Durante el período de incubación, las células inoculadas crecerán y envolverán el armazón y pueden por ejemplo puentear, o puentear parcialmente cualquier espacio intersticial en el mismo. Es preferible, pero no necesario cultivar las células a un grado apropiado, que refleja la densidad celular *in vivo* de tejido que está siendo reparado o regenerado. En otras realizaciones, la presencia de las células, incluso en números bajos en el armazón, estimula el crecimiento de células sanas endógenas para facilitar la cicatrización, por ejemplo, del tejido dañado o lesionado.

[0048] Los ejemplos de matrices, por ejemplo andamios que pueden ser utilizados para los aspectos de la invención incluyen esteras, espumas porosas o semiporosas, péptidos de automontaje y similares. Las esteras no tejidas pueden formarse, por ejemplo, utilizando fibras constituidas por polímeros naturales o sintéticos. En una realización preferida, se usan copolímeros absorbibles de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), vendidos bajo el nombre comercial VICRYL™ (Ethicon, Inc., Somerville, NJ) para formar una esterilla. Las espumas, compuestas, por ejemplo, de copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/ácido poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como liofilización, como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.355.699, también pueden servir como andamios.

[0049] Los geles también forman matrices adecuadas, como se usa en el presente documento. Los ejemplos incluyen geles inyectables, geles polimerizables *in situ*, e hidrogeles, por ejemplo compuestos de péptidos de autoensamblaje. Estos materiales se utilizan frecuentemente como crecimiento del tejido. Por ejemplo, un gel inyectable puede estar compuesto de agua, solución salina o tampón fisiológico y un material gelificante. Materiales gelificantes incluyen, pero no se limitan a proteínas, tales como, colágeno, elastina, trombina, fibronectina, gelatina, fibrina, tropoelastina, polipéptidos, laminina, proteoglicanos, cola de fibrina, coágulo de fibrina, coágulo de plasma rico en plaquetas (PRP), coágulo de plasma pobre en plaquetas (PPP), los hidrogeles de péptidos de

autoensamblaje, y atelocolágeno; polisacáridos tales como, pectina, celulosa, celulosa oxidada, quitina, quitosano, agarosa, ácido hialurónico; polinucleótidos tales como ácidos ribonucleicos, ácidos deoxiribonucleicos, y otros tales como, alginato, alginato reticulado, poli(N-isopropilacrilamida), poli(oxialquileno), copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno), poli(alcohol de vinilo), poliacrilato, copolímeros de monoestearoilglicerol cosuccinato/polietilenglicol (MGSA/PEG) y combinaciones de los mismos.

[0050] Redes degradables formadoras *in situ* también son adecuadas para uso en la invención (véase, *p.ej.*, Anseth, KS et al., J. Controlled Release, 2002; 78: 199-209; Wang, D. et al., Biomaterials, 2003; 24: 3.969-3.980; de patente de EE.UU. 2002/0022676 a He et al.). Estos materiales se formulan como fluidos adecuados para inyección, y después pueden inducirse por una variedad de medios (*p.ej.*, cambio en la temperatura, pH, exposición a la luz) para formar redes de hidrogel degradables *in situ* o *in vivo*.

[0051] En algunas realizaciones, el marco puede ser un fieltro, que puede estar compuesto de un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, PGA, PLA, copolímeros de PCL o mezclas, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro utilizando técnicas de procesamiento textil estándar que consta de engaste, corte, cardado y punción. Las células de la invención pueden ser sembradas en los andamios de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Además, el marco tridimensional puede moldearse en una forma útil, tal como una estructura específica en o alrededor de la DIV a reparar, reemplazar, o aumentar.

[0052] El marco puede ser tratado antes de la inoculación de las células de la invención con el fin de mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, 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.

[0053] Además, las superficies externas de la estructura de tres dimensiones se pueden modificar 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 (*p.ej.*, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, pero no limitado a, gelatina, alginatos, agar, agarosa, y gomas vegetales, entre otros.

[0054] El andamio puede estar compuesto de o tratarse con materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a los materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal, tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentados, como PURSPAN® (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden ser tratados adicionalmente para hacer el andamio no trombogénico. Tales tratamientos incluyen agentes anti-trombóticos tales como la heparina, y los tratamientos que alteran la carga superficial del material tal como recubrimiento por plasma.

[0055] Diferentes proporciones de los diferentes tipos de colágeno, por ejemplo, depositados sobre el marco pueden afectar el crecimiento del tejido específico o de otras células que pueden inocularse más tarde en el marco o que pueden crecer sobre la estructura *in vivo*. Alternativamente, el marco puede inocularse con una mezcla de células que sintetizan los tipos de colágeno adecuados deseados. Dependiendo del tejido a cultivar, el tipo de colágeno apropiado para inocularse en el marco o producirse por las células sembradas sobre el mismo puede seleccionarse. Por ejemplo, las cantidades relativas de las fibras colágenas y elásticas presentes en el marco pueden ser moduladas mediante el control de la proporción de células productoras de colágeno a las células de elastina productoras en el inóculo inicial.

[0056] El marco tridimensional sembrado o inoculado de la invención puede ser para el trasplante o la implantación de cualquiera de las células cultivadas obtenidas a partir de la matriz o la propia matriz cultivadas *in vivo*. Los andamios tridimensionales pueden, de acuerdo con la invención, ser utilizados para reemplazar o aumentar el tejido existente, para introducir tejido nuevo o alterado, para modificar prótesis artificiales, o para unir tejidos o estructuras biológicas.

[0057] En algunas realizaciones, las células se pueden administrar (por ejemplo, inyectarse) en una DIV a través de una aguja, tal como una pequeña aguja de calibre. En algunas formas de realización, la aguja tiene un diámetro de alrededor de 22 calibre o menos, a fin de mitigar la posibilidad de herniar la DIV. Al inyectar volúmenes en el núcleo pulposo, es deseable que el volumen de fármaco suministrado sea no más de aproximadamente 3 ml, preferiblemente no más de aproximadamente 1 ml, más preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5 ml. Cuando se inyecta en estas cantidades más pequeñas, se cree que el volumen añadido no causará un aumento de presión apreciable en el núcleo pulposo. Si el volumen de la inyección directa de la formulación es lo suficientemente alto como para provocar que una preocupación respecto a la sobrepresurización del núcleo pulposo, a continuación, se prefiere que al menos una parte del núcleo pulposo se retire antes de la inyección directa. En algunas realizaciones, el volumen de núcleo pulposo eliminado es sustancialmente similar al volumen de la formulación a inyectar. Por ejemplo, el volumen de núcleo pulposo eliminado puede ser dentro de

aproximadamente 80-120% del volumen de la formulación a inyectar. En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se concentran antes de administrarse.

5 **[0058]** Las células útiles en los métodos, composiciones y kits descritos en este documento se pueden derivar de cordón umbilical de mamíferos recogido en la terminación o poco después de la terminación de cualquiera de un embarazo de término completo o embarazo prematuro, por ejemplo, después de la expulsión tras del nacimiento o la extirpación quirúrgica después de una cesárea. Sangre y residuos se eliminan del tejido del cordón umbilical antes del aislamiento de las células, por ejemplo, por lavado con cualquier medio o tampón adecuado.

10 **[0059]** Las células pueden ser aisladas de tejido del cordón umbilical por la fuerza mecánica o por digestión enzimática. Las enzimas preferidas son las metaloproteasas, proteasas neutras y proteasas mucolíticas. Por ejemplo, varias combinaciones de colagenasa, dispasa, y hialuronidasa se pueden utilizar para disociar las células del tejido del cordón umbilical. El experto en la técnica apreciará que muchas de tales tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para el aislamiento de células de diversas fuentes de tejido. Por ejemplo, las series de LIBERASE® Blendzyme (Roche) de combinaciones de enzimas son adecuadas para uso en los presentes procedimientos. Otras fuentes de enzimas son conocidas, y el experto en la técnica también puede obtener tales enzimas directamente desde sus fuentes naturales. El experto en la técnica también es capaz de evaluar enzimas nuevas, o adicionales o combinaciones de enzimas 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.

20 **[0060]** Las células aisladas se pueden utilizar para iniciar cultivos celulares. Las células aisladas se transfirieron a recipientes de cultivo de tejidos estériles o bien no recubiertos o recubiertos de matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (nativo desnaturalizado, atelo, o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular. Células derivadas de tejido de cordón umbilical se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sostener el crecimiento de las células tales como, pero no limitados a, DMEM (glucosa alta o baja), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), medio de Hayflick, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, y CELL-GRO-FREE. El medio de cultivo se puede complementar con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero bovino fetal, preferiblemente alrededor de 2-15% (v/v); suero equino; suero humano; suero de ternera fetal; beta-mercaptoetanol, 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 la insulina 1 (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF) y eritropoyetina; aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos/antimicóticos 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.

35 **[0061]** Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. En una realización, las células se cultivaron a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO₂ en el aire. En algunas realizaciones, las células se cultivaron a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento O₂ en el aire, preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento O₂ en el aire. Las células preferiblemente se cultivan a aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C y más preferiblemente se cultivan a 37°C. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Células derivadas de tejido de cordón umbilical se cultivan preferiblemente bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, vitamina C, catalasa, vitamina E, N-acetilcisteína), lo cual significa ningún o mínimo daño del radical libre para las células cultivadas.

45 **[0062]** Las células derivadas de tejido de cordón umbilical se pueden pasar o eliminar a un recipiente de cultivo separado que contiene medio fresco del mismo o de 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 paso 0 y la senescencia. Las células preferiblemente se pasan entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, se pasan más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferiblemente se pasan 10 o 11 veces. La clonación y/o subclonación se pueden realizar para confirmar que una población clonal de las células ha sido aislada.

55 **[0063]** Los diferentes tipos de células presentes en el tejido del cordón umbilical se pueden fraccionar en subpoblaciones. Esto se puede lograr mediante la utilización de técnicas estándar para la separación de células incluyendo, pero no limitado a, tratamiento enzimático; 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 las células deseadas (selección positiva), 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; procedimientos de congelación-descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación contracorriente); unidad de separación por gravedad; distribución en contracorriente; electroforesis; clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS); y similares.

[0064] Los ejemplos de células aisladas de tejido del cordón umbilical se depositaron en la American Type Culture Collection el 10 de junio de 2004, y se les asignaron números de acceso ATCC de la siguientes manera: (1) a designación de la cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el N° de Acceso PTA 6067; y (2) a designación de la cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el N° de Acceso PTA-6068.

[0065] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical se pueden caracterizar, por ejemplo, por las características de crecimiento (p.ej., capacidad de duplicación de población, tiempo de duplicación, pasajes a la senescencia), análisis de cariotipo (p.ej., cariotipo normal; linaje materno o neonatal), citometría de flujo (p.ej. análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (p.ej. para la detección de epítomos), perfiles de expresión génica (p.ej. ensayos de chips de genes; reacción de polimerasa en cadena (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, y PCR convencional)), matrices de proteínas, la secreción de proteínas (p.ej., por ensayo de coagulación de plasma o el análisis de medio acondicionado PDC, por ejemplo, por ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)), reacción mixta de linfocitos (p.ej., como medida de la estimulación de PBMCs), y/u otros métodos conocidos en la técnica.

[0066] En varios aspectos, las células derivadas de tejido de cordón umbilical tienen una o más de las siguientes características de crecimiento: requieren L-valina para el crecimiento en cultivo; son capaces de crecimiento en atmósferas que contengan oxígeno de aproximadamente 5% a por lo menos aproximadamente 20%; tienen el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de llegar a la senectud; y/o adjuntan y expanden en un recipiente de cultivo de tejido revestido o no revestido, en el que el recipiente de cultivo de tejido revestido comprende un revestimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

[0067] En algunas realizaciones, las células tienen un cariotipo normal, que se mantiene mientras que se pasan las células. El cariotipo es particularmente útil para identificar y distinguir células neonatales de células maternas derivadas de placenta. Los métodos para la determinación del cariotipo están disponibles y conocidos por los expertos en la técnica.

[0068] En algunas realizaciones, las células pueden ser caracterizadas por la producción de ciertas proteínas, incluyendo la producción de al menos uno de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso-alfa; y la producción de al menos uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, marcadores de superficie celular de C, tal como se detecta mediante, por ejemplo, citometría de flujo. En otras realizaciones, las células pueden ser caracterizadas 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, HLA-DP, y/o de la superficie celular ERS de marcado y HLA-DQ, como se detecta por cualquier medio adecuado, tales como la citometría de flujo. En algunas realizaciones, se prefieren las células que producen al menos dos de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso-alfa. En algunas realizaciones, se prefieren las células que producen los tres del factor de proteínas del tejido, vimentina y actina de músculo liso-alfa.

[0069] En algunas realizaciones, las células tienen, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, el aumento de expresión de un gen que codifica al menos una de la interleucina 8; reticulon 1; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína 2 de granulocitos quimiotácticos); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3; factor de necrosis tumoral, proteína alfa inducida 3.

[0070] En aún otras realizaciones, las células tienen, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, la reducción de expresión de un gen que codifica al menos uno de: homeobox de corta estatura 2; proteína 2 de choque térmico 27 kDa; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor derivado de células de estroma 1); elastina (estenosis aórtica supralvalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox 2 de mesénquima (homeobox específico a detención de crecimiento); homólogo 1 de homeobox sine oculis (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado desaliñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionada con runt-3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de C-endopeptidasa de procolágeno; homólogo de frizzled 7 (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox Iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína de vesícula sináptica 2; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión de factor de crecimiento similar a la insulina, 36 kDa; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 de citoquina similar a receptor; canal de calcio activado por calcio de potasio intermedio/pequeña conductancia, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de homeobox sine oculis (*Drosophila*); proteína KIAA1034; proteína asociada a vesículas de membrana 5 (miobrevina); proteína 1 de la matriz extracelular que contiene EGF similar a fibulina; 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; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, similar a beta 1 (con dominios de repetición similar a EGF); ARNm de *Homo sapiens* de longitud completa de ADNc inserto del clon Euroimage 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (péptido atrionatriurético receptor C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc de DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus

E1B 19 kDa proteína de interacción 3-similares; proteína 1 de unión a AE; y polipéptido 1 de subunidad VIIa de oxidasa de citocromo c (músculo).

5 **[0071]** En algunas realizaciones, las células pueden ser caracterizadas por la secreción de al menos una de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP- 2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1b, I309, MDC, RANTES, y TIMP1. En algunas realizaciones, las células pueden ser caracterizadas por la falta de secreción de al menos una de TGF-beta2, ANG2, PDGFBB, y VEGF, como se detecta por ELISA.

10 **[0072]** En algunas realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más del crecimiento, la producción de marcador de proteína/superficie, la expresión de gen o características de secreción de sustancias. En algunas realizaciones, se prefieren células que comprenden tres, cuatro, o cinco o más de las características. En algunas realizaciones, se prefieren células que comprenden seis, siete, u ocho o más de las características. En algunas realizaciones, se prefieren células que comprenden la totalidad de las características anteriores.

15 **[0073]** Entre las células que se prefieren para su uso con los diversos aspectos de la invención están células que tienen las características descritas anteriormente, y más particularmente aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con pases, y además en el que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, alfa PDGFR, y HLA-a, B, C, en el que las células producen las proteínas inmunológicamente detectables que corresponden a los marcadores enumerados. Además de lo anterior, las células no producen proteínas correspondientes a cualquiera de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, tal como se detecta por cualquier medio adecuado en la técnica, tales como la citometría de flujo. Las células no expresan CD117 o HLA-DR o telomerasa.

25 **[0074]** En algunos aspectos preferidos, los métodos comprenden células obtenidas o aisladas a partir de tejido de cordón umbilical humano a una DIV degenerada, donde las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo de administración, requieren L-valina para el crecimiento, puede crecer en por lo menos aproximadamente 5% de oxígeno, no producen CD117 o HLA-DR o telomerasa, expresa actina de músculo liso alfa, y expresa, con relación a un fibroblasto humano, células madre mesenquimales, o célula ósea de hueso de cresta ilíaca, aumento de los niveles de interleucina 8 o reticulon 1. Las células aisladas de tejido de cordón umbilical humano se pueden expandir en cultivo antes de la administración. En algunas realizaciones, las células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo DIV, tales como, pero no limitado a, un fenotipo de células de anillo fibroso o un fenotipo de células del núcleo pulposo. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden integrarse en DIV del paciente, o, alternativamente, pueden proporcionar soporte para el crecimiento o la estimulación para células madre DIV naturalmente presentes. La supervivencia de las células administradas no es determinante del éxito o resultados de su uso donde hay una mejora en la enfermedad o condición relacionada con degeneración de DIV y/o la salud general del paciente. En algunas realizaciones, las células preferiblemente al menos parcialmente integran, se multiplican, o sobreviven en el paciente. En algunas realizaciones, el paciente experimenta los beneficios de la terapia, por ejemplo de la capacidad de las células para apoyar el crecimiento de otras células, incluyendo las células madre o células progenitoras presentes en la DIV y/o los tejidos circundantes, desde el tejido en crecimiento o vascularización del tejido, y/o de la presencia de factores beneficiosos celulares, quimiocinas, citocinas y similares, pero las células no se integran ni se multiplican en el paciente. En algunos aspectos, el paciente se beneficia del tratamiento terapéutico con las células, pero las células no sobreviven por un período prolongado en el paciente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células disminuyen gradualmente en número, la viabilidad o la actividad bioquímica. En algunas realizaciones, una disminución de este tipo puede ser precedida por un periodo de actividad, por ejemplo el crecimiento, división o actividad bioquímica. En algunas realizaciones, células senescentes, no viables o incluso muertas son capaces de tener un efecto terapéutico beneficioso.

50 **[0075]** 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 espontáneamente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se prefieren las células que no se diferencian de forma espontánea. Por ejemplo, algunas 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 perfiles de expresión génica usando, por ejemplo, ácido nucleico o ensayos de polipéptidos. Tales células permanecen sustancialmente constantes, por ejemplo en sus características de marcador de superficie, sobre los pases, a través de múltiples duplicaciones de la población.

60 **[0076]** En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento inducen a las células derivadas de tejido de cordón umbilical para diferenciar a lo largo de una vía celular DIV, hacia fenotipos de células DIV, o progenitores o parientes más primitivos de los anteriores. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden integrarse en DIV del paciente, o, alternativamente, pueden proporcionar soporte para el crecimiento o la estimulación para diferenciar para células madre de DIV naturalmente presentes. La supervivencia de las células administradas no es determinante del éxito o resultados de su uso donde hay una mejora en la enfermedad o condición relacionada con degeneración de DIV y/o la salud general del paciente. En algunas realizaciones, las células preferiblemente al menos parcialmente se integran, se multiplican, o sobreviven en el paciente. En algunas realizaciones, el paciente experimenta los beneficios de la terapia, por ejemplo de la capacidad de las células para apoyar el crecimiento de

otras células, incluyendo las células madre o células progenitoras presentes en la DIV y/o los tejidos circundantes, desde el tejido en crecimiento o vascularización del tejido, y/o de la presencia de factores beneficiosos celulares, quimiocinas, citocinas y similares, pero las células no se integran o se multiplican en el paciente. En algunos aspectos, el paciente se beneficia del tratamiento terapéutico con las células, pero las células no sobreviven por un período prolongado en el paciente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células disminuyen gradualmente en número, la viabilidad o la actividad bioquímica. En algunas realizaciones, una disminución de este tipo puede precederse por un periodo de actividad, por ejemplo el crecimiento, división o actividad bioquímica. En algunas realizaciones, células senescentes, no viables o incluso muertas son capaces de tener un efecto terapéutico beneficioso.

[0077] En algunos aspectos, los métodos inventivos pueden comprender, además, la evaluación del paciente para mejoras en la estructura y/o función de DIV, y/o mejoras en la salud en general. Tales evaluaciones pueden proceder de acuerdo a cualesquiera medios adecuados en la técnica, incluyendo los descritos y ejemplificados en el presente documento.

[0078] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran conjuntamente con uno o más de otros tipos celulares, incluyendo pero no limitado a, otras células multipotentes o pluripotentes, o condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento del hueso, o células de médula ósea. Las células de diferentes tipos se pueden mezclar con las células derivadas de tejido de cordón umbilical inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden co-cultivarse durante un período de tiempo antes de la administración. En algunas realizaciones, una población de células derivadas de tejido de cordón umbilical apoya la supervivencia, proliferación, el crecimiento, el mantenimiento, la maduración, la diferenciación, y/o aumento de la actividad de uno o más de otros tipos de células administradas conjuntamente con las células derivadas de tejido de cordón umbilical, y/o viceversa.

[0079] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical proporcionan soporte trófico a otros tipos de células con las que se administran, y/o viceversa. En algunas realizaciones, es deseable que las células derivadas de tejido de cordón umbilical y las células co-cultivadas estén en contacto. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la siembra de las células como una población heterogénea de células en medio de cultivo o sobre un sustrato de cultivo adecuado. Alternativamente, las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden primero cultivarse hasta la confluencia y se emplea como un sustrato para las células co-cultivadas. En otras realizaciones, las células co-cultivadas pueden cultivarse en contacto con un medio acondicionado, matriz extracelular y/o lisado celular de las células derivadas de tejido de cordón umbilical.

[0080] En diversas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se puede administrar en combinación con un agente biológicamente activo, tal como un agente que modula la proliferación, diferenciación, y/o otras actividades celulares. El agente puede administrarse antes, después, o simultáneamente que las células derivadas de tejido de cordón umbilical. El agente particular elegido puede ser a discreción del profesional médico que dirige el tratamiento del paciente, y puede variar de acuerdo con necesidades particulares o estado del paciente. El agente elegido puede ser utilizado para diversos fines, tales como, pero no limitado a la facilitación de la administración de las células, mejorar la reparación y/o regeneración de la DIV, mejorar la salud general del paciente, la reducción del dolor, la reducción o la prevención del rechazo de las células trasplantadas, y similares.

[0081] Los ejemplos de agentes que pueden administrarse con las células derivadas de tejido de cordón umbilical incluyen, pero no se limitan a, vitaminas y otros suplementos nutricionales; agentes antitrombogénicos; agentes anti-apoptóticos; agentes antiinflamatorios; inmunosupresores (p.ej., ciclosporina, rapamicina); antioxidantes; hormonas; glicoproteínas; fibronectina; péptidos y proteínas; hidratos de carbono (simples y/o complejos); proteoglicanos; oligonucleótidos (ADN sentido y/o antisentido y/o ARN); proteínas morfogenéticas óseas (BMPs); factores de diferenciación; anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos a agentes infecciosos, tumores, fármacos u hormonas); y reactivos de terapia génica. En algunas realizaciones, el agente es una sustancia, tal como un analgésico, anti-inflamatorio, narcótico, relajante muscular, o combinación de los mismos que alivia uno o más síntomas de una enfermedad o condición relacionada con degeneración de DIV.

[0082] En algunas realizaciones, el agente adicional es un factor trófico u otro agente que ejerce un efecto trófico contra las células derivadas de tejido de cordón umbilical, frente a células adicionales administradas con las células derivadas de tejido de cordón umbilical, contra las células de DIV endógenas (p.ej., las células de anillo fibroso, células de núcleo pulposo), y/o contra otras células endógenas (p.ej., tejido conectivo de células progenitoras). En algunas realizaciones, el factor trófico es uno que es secretado por las células derivadas de tejido de cordón umbilical, en cuyo caso se puede derivar a partir de preparaciones de dichas células derivadas de tejido de cordón umbilical o de otra fuente. Ejemplos de tales factores o agentes incluyen, pero no se limitan a, miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF-1 y FGF-2) y FGF-4; miembros del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), incluyendo PDGF-A-B, PDGF-BB y PDGF-AA; EGFs, miembros del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), incluyendo IGF-I y -II; la superfamilia de TGF-beta, incluyendo TGF-beta1, 2 y 3 (incluyendo MP-52), factor inductor de osteoide (OIF), angiogenina(s), endotelinas, factor de crecimiento de hepatocitos y factor de crecimiento de queratinocitos; miembros de la proteína morfogenética ósea (BMP), la familia, tales como BMP-1, BMP-3, BMP-2, OP-1, BMP-2A,

BMP-2B, BMP-4, BMP-7 y BMP-14; HBGF-1 y HBGF-2; factores de diferenciación de crecimiento (GDF); miembros de la familia hedgehog de proteínas, incluyendo erizo de indio, sónico y del desierto; ADMP-1; GDF-5; TIMP-1 y los miembros de la familia del factor estimulante de colonias (CSF), incluyendo CSF-1, G-CSF y GM-CSF; y análogos e isoformas de los mismos.

5
 [0083] En algunas realizaciones, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste de TGF-beta, TGF-beta1, FGF, bFGF, e IGF-1. Se cree que estos factores de crecimiento promueven la regeneración del núcleo pulposo, estimulan la proliferación y/o diferenciación de los condrocitos, y promueven la secreción de matriz extracelular. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento es TGF-beta. Más preferiblemente, TGF-beta se administra en una cantidad de entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 5.000 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 50 ng/ml y aproximadamente 500 ng/ml, p.ej., entre aproximadamente 100 ng/ml y aproximadamente 300 ng/ml.

15
 [0084] En algunas realizaciones, concentrado de plaquetas se proporciona como un agente terapéutico adicional. En algunas formas de realización, el concentrado de plaquetas es autólogo. En algunas realizaciones, el concentrado de plaquetas es plasma rico en plaquetas (PRP). PRP es ventajoso, ya que contiene factores de crecimiento que pueden reestimular el crecimiento de la MEC, y porque su matriz de fibrina proporciona un andamio adecuado para el nuevo crecimiento del tejido. En algunas realizaciones, el agente adicional es un lisado celular, una fracción celular soluble, una fracción celular de membrana enriquecida, medios de cultivo celular (p.ej., medio acondicionado), o matriz extracelular derivada de células derivadas de tejido de cordón umbilical u otras células.

20
 [0085] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se administran en combinación con un inhibidor de reductasa de HMG-CoA, incluyendo, pero no limitado a simvastatina, pravastatina, lovastatina, fluvastatina, cerivastatina, y atorvastatina.

25
 [0086] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical están diseñadas genéticamente para expresar uno o más agentes, tales como pero no limitado a, uno o más de los agentes terapéuticos adicionales que se describen en este documento. Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética utilizando cualquiera de una variedad de vectores, incluyendo, pero no limitado a, la integración de vectores virales, p.ej. vector de retrovirus o vectores virales adeno-asociados; vectores de replicación no integrantes, p.ej. vectores de virus papiloma, vectores de SV40, vectores adenovirales; o vectores víricos de replicación defectuosa. Otros métodos de introducción de ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o mediante inyección directa de ADN.

35
 [0087] Células huésped se transforman o se transfectan con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos apropiados de control de expresión tales como secuencias de promotor o potenciador, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable de preferencia.

40
 [0088] Después de la introducción del ADN extraño, las células manipuladas pueden dejarse crecer en medio enriquecido y después se cambian a medio selectivo. El marcador seleccionable en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y cultivarse para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en células líneas. Este método se puede utilizar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan el producto génico.

45
 [0089] Cualquier promotor puede ser utilizado para conducir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, promotores virales incluyen, pero no se limitan al promotor/potenciador CMV, SV 40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o elastina promotora del gen. Preferiblemente, los elementos de control utilizados para controlar la expresión del gen de interés deben permitir la expresión regulada del gen de modo que el producto se sintetice sólo cuando sea necesario *in vivo*. Si se desea la expresión transitoria, 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, aquellos asociados con las proteínas de la metalotioneína y de choque térmico.

55
 [0090] Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para expresión "knock out" o "knock down" de factores que promueven la inflamación o rechazo en el sitio de implante. Técnicas moduladoras negativas para la reducción de los niveles de expresión del gen diana o los 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 puede reducirse o eliminarse utilizando una serie de técnicas que incluyen, por ejemplo, inhibición de la expresión mediante la inactivación del gen completo (comúnmente denominado "knockout") utilizando la técnica de recombinación homóloga. Por lo general, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' a esa región) es interrumpido por un marcador seleccionable positivo, p.ej., neo, impidiendo la producción de ARNm normal a partir del gen diana y que resulta en la inactivación del gen. Un gen también puede ser inactivado mediante la creación de una delección en parte de un gen, o mediante la supresión del gen entero. Mediante el uso de una construcción con dos regiones de homología al gen diana que están muy separadas en el genoma, las secuencias que intervienen las dos regiones se pueden eliminar

(Mombaerts et al., Proc Nat Acad Sci EE.UU., 1991; 88: 3087).

[0091] ARN antisentido, de interferencia pequeña, ADNzimas y moléculas de ribozima que inhiben la expresión del gen diana también pueden usarse de acuerdo con la invención para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, 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, moléculas de triple hélice pueden ser utilizadas en la reducción del nivel de actividad del gen diana.

[0092] Estas y otras técnicas se describen en detalle por LG Davis et al. (eds), Basic Methods in Molecular Biology, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn., (1994).

[0093] IL-1 es un potente estimulador de la resorción del cartílago y de la producción de mediadores inflamatorios por los condrocitos (Campbell et al., J. Immun, 1991; 147 (4): 1238-1246). Usando cualquiera de las técnicas anteriores, la expresión de IL-1 puede ser eliminada o derribada en las células de la invención para reducir el riesgo de la resorción del cartílago implantado o la producción de mediadores inflamatorios por las células de la invención. Del mismo modo, la expresión de moléculas MHC de clase II puede ser eliminada o derribada con el fin de reducir el riesgo de rechazo del tejido implantado.

[0094] Una vez que las células de la invención han sido diseñadas genéticamente, se pueden implantar directamente en el paciente para permitir el tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con degeneración de DIV, por ejemplo mediante la producción de un producto que tiene un efecto terapéutico contra uno o más síntomas de la enfermedad o afección, tal como un producto de gen anti-inflamatorio. Alternativamente, las células modificadas por ingeniería genética se pueden usar para producir nuevo tejido *in vitro*, que se implanta a continuación en el sujeto, como se describe en el presente documento.

[0095] En algunos aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden células derivadas de tejido del cordón umbilical, como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento pueden inducir a las células derivadas de tejido de cordón umbilical a diferenciar a lo largo de una vía o linaje celular DIV, por ejemplo para mostrar un fenotipo celular de núcleo pulposo y/o un fenotipo de células de anillo fibroso. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento modulan los procesos celulares de células endógenas DIV y/o células de los tejidos circundantes, incluyendo pero no limitado a, la división celular, la diferenciación y la expresión génica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento promueven la reparación y la regeneración de una DIV degenerada.

[0096] También se incluyen de conformidad con la presente descripción kits para la práctica de los métodos de la invención. En un aspecto, se proporcionan kits para el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad o daño de al menos una DIV. Los kits comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o condición, tales como aquellas células que se describen y se ejemplifican en la presente memoria, e instrucciones para usar el kit en un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad o condición relacionada con degeneración de DIV. Los kits pueden comprender además al menos un reactivo e instrucciones para el cultivo de las células. Los kits pueden comprender además una población de al menos otro tipo de célula, y/o al menos un agente.

[0097] En algunos aspectos, los kits comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, un lisado, matriz extracelular, o medio acondicionado preparado a partir de células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano, que las células tienen las características que se describen y se ejemplifican en este documento. Los kits son útiles para facilitar la reparación y/o regeneración de una DIV que está dañada o enferma.

[0098] Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con mayor detalle. Se destinan a ilustrar, no limitar, la invención.

EJEMPLO 1

Aislamiento de células derivadas de tejido del cordón umbilical

[0099] Los cordones umbilicales se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Se obtuvieron tejidos después de partos normales. 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 tampón de fosfato salino (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicóticos y antibióticos (100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B). Los tejidos entonces se disoció mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-baja glucosa o DMEM-alta glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido se troceó en una pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a 50 ml de tubos cónicos (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo). El tejido se digiere o bien en medio de DMEM-baja glucosa o bien un medio de DMEM-alta glucosa, conteniendo cada uno antimicóticos y antibióticos como se describe anteriormente. En algunos experimentos, se usó una mezcla de enzimas de

5 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: Baja glucosa). Los tubos cónicos que contienen las enzimas de tejido, de medio y de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

10 [0100] Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM: Baja glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) de suero bovino fetal (FBS; suero bovino definido; Lote#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), 1 mililitro por 100 mililitros de antibiótico/antimicótico como se describe anteriormente. La suspensión celular se filtró a través de un tamiz de células de nylon de 70 micrómetros (BD Biosciences). 5 mililitros adicionales que comprenden medio de crecimiento se pasó a través del tamiz. La suspensión celular se pasó después a través de un tamiz de células de nylon de 40 micrómetros (BD Biosciences) y se extrajo con un enjuague de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

15 [0101] El filtrado se volvió a suspender en medio de crecimiento (volumen total de 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

20 [0102] 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 tripán. Las células se cultivan a continuación bajo condiciones estándar.

25 [0103] Las células aisladas a partir de cordones umbilicales se sembraron a 5.000 células/cm² en frascos de T-75 cm² recubiertos con gelatina (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), 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 después se rellenaron con medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días desde el paso 0) para el paso 1. En pasajes posteriores (del pasaje 1 a 2 y así sucesivamente), las 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 oxígeno del aire, a 37°C.

35 EJEMPLO 2

Evaluación de marcadores de superficie celular derivados de posparto humano por citometría de flujo

40 [0104] Tejido del cordón umbilical se caracterizó usando citometría de flujo para proporcionar un perfil para la identificación de células obtenidas del mismo.

45 [0105] Las células fueron cultivadas en Medio de Crecimiento (Gibco Carlsbad, CA) con penicilina/estreptomina. Las células fueron cultivadas en matraces de cultivo tisular T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta la confluencia. Las superficies de crecimiento de los frascos se recubrieron con gelatina mediante incubación de 2% (p/v) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

50 [0106] Las células adherentes en matraces se lavaron en PBS y se desprendieron con tripsina/EDTA. Las células fueron cosechadas, centrifugadas, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1 x 10⁷ 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 centenar 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. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento citómetro (Becton Dickinson, San Jose, CA).

55 [0107] Se utilizaron los siguientes anticuerpos frente a marcadores de superficie celular.

Anticuerpos	Fabricante	Número de catálogo
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
CD 141	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

[0108] Las células se analizaron en los pasajes 8, 15, y 20, y las células derivadas de tejido de cordón umbilical de diferentes donantes se compararon entre sí. Además, las células cultivadas en matraces recubiertos de gelatina se compararon con células cultivadas en frascos no recubiertos.

[0109] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, alfa PDGFR y HLA-A, B, C, indicado 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, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicado por valores de fluorescencia comparables con el control de IgG. Las variaciones en los valores de fluorescencia de las curvas de positivos se representaron. La media (p.ej., CD13) y rango (p.ej., CD90) de las curvas positivas mostraron alguna variación, pero las curvas parecieron normales, confirmando una población homogénea. Ambas curvas individualmente exhibieron valores mayores que el control de IgG.

[0110] Las células en el pasaje 8, 15, y 20 expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, indicadas por el aumento de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicadas por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0111] Los aislados de donantes separados cada uno mostró expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, alfa PDGFR y HLA-A, B, C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control 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.

[0112] Las células expandidas en gelatina y matraces sin recubrir fueron positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, con aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control 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.

[0113] Por lo tanto, las células derivadas de tejido de cordón umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, HLA-A, B, C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD 117, CD141 y HLA DR, DP, DQ. Esta identidad era consistente entre las variaciones de variables que incluyen el donante, paso, y revestimiento de la superficie recipiente de cultivo. Alguna variación en la curva de valor de medias y rangos de histograma de valor de fluorescencia individuales 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 3

Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos de células

[0114] Se recogió el tejido del cordón umbilical humano y se inmersó en 4% (p/v) de paraformaldehído durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1: 500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150, generado contra conejo; Sigma; o 1: 300, generado contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (Clase CD34 humana III; 1: 100; Dako, Carpintería, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores: GROalfa - PE anti-humano (1: 100; Becton

Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor 1 LDL oxidada anti-humana (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGO-A anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech). Muestras fijadas se cortaron con un escalpelo y se colocaron dentro del compuesto de incorporación de OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contiene etanol. Los bloques congelados fueron entonces seccionados (10 μ m de espesor) utilizando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para tinción.

[0115] La inmunohistoquímica se realizó similarmente a los estudios previos (Messina et al., *Exper Neurol*, 2003; 184: 816-29). En resumen, las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una proteína de la solución de bloqueo que contenía PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a antígenos intracelulares. En casos en los que se encuentra el epítipo de interés en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), Triton se omitió en todos los pasos del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítipo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se planteó en contra de cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), 3% (v/v) de suero de burro se utilizó en lugar de suero de cabra durante todo el procedimiento. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, se aplicaron a las secciones durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas, y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contiene el bloque, junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o de cabra anti-IgG de conejo - Alexa 488 (1: 250; Molecular Probes) o de burro anti-IgG de cabra - FITC (1: 150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicó 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0116] La fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva fue representada por la señal de fluorescencia por encima de la tinción control. Imágenes representativas fueron capturadas utilizando una cámara de video a color digital y software de ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez.

[0117] La vimentina, desmina, SMA, CK18, de vWF, y marcadores de CD34 se expresaron en un subconjunto de las células que se encuentran dentro de cordón umbilical. En particular, vWF y la expresión CD34 estaban restringidos a los vasos sanguíneos contenidos en el cable. Células CD34+ estaban en la capa más interna (lado de lumen). La expresión de vimentina se encontró en toda la matriz y los vasos sanguíneos de la cuerda. SMA se limitaba 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 dentro de los vasos, limitándose la desmina a las capas media y exterior. La expresión de GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1, y NOGO-A no se observaron dentro del tejido del cordón umbilical.

EJEMPLO 4

Análisis de oligonucleótido

[0118] Matrices de Affymetrix GeneChip® se utilizaron para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas de tejido de cordón umbilical con fibroblastos, células madre mesenquimatosas humanas, y otra línea de células derivadas de médula ósea humana. Este análisis proporciona una caracterización de las células derivadas del parto e identificó los marcadores moleculares únicos para estas células.

[0119] Los cordones umbilicales humanos se obtuvieron a partir del 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 anteriormente. Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento (usando DMEM-LG) en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

[0120] 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/estreptomycin (Invitrogen). Las células fueron cultivadas en plástico estándar tratado de tejido.

[0121] Las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) se compraron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en MSCGM Media (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico cultivadas de tejidos estándar a 37°C con 5% de CO₂.

[0122] Médula ósea de cresta ilíaca humana se recibió de NDRI con el consentimiento del paciente. La médula se procesó de acuerdo con el método descrito por Ho, et al. (WO 2003/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (155 mM NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃, y EDTA 0,1 mM, pH 7,2) en una proporción de médula ósea de 1 parte a 20 partes tampón de lisis. La suspensión de células se sometió a vórtice, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. El sobrenadante se descartó 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 cultivado a 5×10^4 células/cm². Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en O₂ atmosférica estándar o a O₂ de 5%. Las células se cultivaron durante 5 días sin un cambio de medio. Los medios y las células no adherentes se retiraron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

[0123] Cultivos en crecimiento activo de las 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. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. ARNm celular se extrajo y se transcribió en ADNc, que después se transcribió en ARNc y se marcó con biotina. La ARNc marcada con biotina se hibridó con matriz de oligonucleótido HG-U133A GeneChip (Affymetrix, Santa Clara CA). La hibridización y colección de datos se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los análisis se realizaron usando el software de ordenador "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1,21 (Universidad de Stanford; Tusher et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU., 2002; 98: 5116-21).

[0124] Se analizaron catorce poblaciones diferentes de células. Las células junto con información de pasaje, sustrato de cultivo, y medios de cultivo se enumeran en la Tabla 1.

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

Población celular	Pasaje	Sustrato	Medio
Cordón umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, 2-ME
Cordón umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, 2-ME
Cordón umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, 2-ME
ICBM (070203) (5% O2)	3	Plástico	MEM, FBS al 10%
ICBM (062703) (std. O2)	5	Plástico	MEM, FBS al 10%
ICBM (062703) (5% O2)	5	Plástico	MEM, FBS al 10%
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lot 2F 1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%

[0125] Los datos fueron evaluados por un análisis de componentes principales, analizando los 290 genes que son expresados diferencialmente en las células. Este análisis permite una comparación relativa de las similitudes entre las poblaciones. La Tabla 2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de las parejas de células. Las distancias euclidianas se basan 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 (p.ej., cuanto mayor sea la distancia, cuanto menos similitud existe).

Tabla 2. Las distancias euclidianas para los pares de células.

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

[0126] Las tablas 3 y 4 a continuación muestran la expresión de genes aumentados en las células derivadas de tejido de cordón umbilical (Tabla 3), y la reducción en las células derivadas de tejido de cordón umbilical (Tabla 4). La columna titulada "Identificación de conjunto de sondas" se refiere al código de identificación de 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 se puede encontrar dentro de la base de datos de NCBI (GenBank) en el número de acceso especificado (columna "número de acceso de NCBI").

5 **Tabla 3. Genes que muestran haber aumentado específicamente la expresión en las células derivadas de tejido de cordón umbilical, en comparación con otras líneas celulares ensayadas.**

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

25 **Tabla 4. Los genes que muestran tener una expresión disminuida en células derivadas de tejido de cordón umbilical, en comparación con otras líneas celulares ensayadas.**

Genes disminuidos en tejido de cordón umbilical y células derivadas del Placenta		
Identificación de conjunto de sondas	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
210135_s_at	Homeobox 2 de baja estatura	AF022654,1
205824_at	Proteína 2 de choque térmico 27 kDa	NM_001,541,1
209687_at	Quimiocinas (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1)	U19495,1
203666_at	Quimiocinas (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1)	NM_000609,1
212670_at	Ekastina (estenosis aórtica supraavalvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	Homeobox 2 mesénquima (homeobox específico a crecimiento detenido)	NM_005924,1
205817_at	Homólogo 1 de homeobox sine oculis (<i>Drosophila</i>)	NM_005982,1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162,1
212793_at	activador asociado desaliñado de la morfogénesis 2	BF513244
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143,1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	tetranectina (proteína de unión de plasminógeno)	NM_003278,1
205743_at	src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149,1
200921_s_at	gen de translocación 1 de células B, anti-proliferativa	NM_001731,1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956,1
204198_s_at	factor de transcripción relacionado con runt-3	AA541630
219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574,1
204773_at	receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512,1
202465_at	procolágeno C-endopeptidasa potenciador	NM_002593,2
203706_s_at	homólogo de frizzled 7 (<i>Drosophila</i>)	NM_003507,1
212736_at	gen hipotético BC008967	BE299456
214587_at	colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	tenascina C (hexabrachion)	NM_002160,1

Genes disminuidos en tejido de cordón umbilical y células derivadas del Placenta		
Identificación de conjunto de sondas	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
210239_at	proteína homeobox Iroquois 5	U90304,1
203903_s_at	hefaestina	NM_014799,1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214,1
203069_at	glicoproteína sináptica vesícula 2	NM_014849,1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	citoquina similar al receptor de 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 a PDZ-(TAZ)	AA081084
206511_s_at	homólogo homeobox sine oculis 2 (<i>Drosophila</i>)	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	familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro C3 (3-deshidrogenasa de hidroxisteroide alfa, tipo II)	AB018580,1
213905_x_at	biglicano	AA845258
201261_x_at	biglicano	BC002416,1
202132_at	co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ-(TAZ)	AA081084
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395,1
213791_at	proencefalina	NM_006211,1
205422_s_at	integrina, similar a beta 1 (con dominios de repetición similar a EGF)	NM_004791,1
214927_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> de longitud completa inserto de ADNc de clon EUROIMAGE 1968422	AL359052,1
206070_s_at	EphA3	AF213459,1
212805_at	proteína KIAA0367	AB002365,1
219789_at	receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclase C (receptor del péptido atrionatriurético C)	A1628360
219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563,1
213429_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesícula 5 (miobrevina)	NM_006634,1
201843_s_at	proteína de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 1	NM_004105,2
221478_at	proteína de interacción BCL2/adenovirus E1B 19 kDa 3	AL132665,1
201792_at	proteína de unión a AE 1	NM_001129,2
204570_at	polipéptido de Vila de subunidad de oxidasa de citocromo c 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

[0127] Las Tablas 5, 6 y 7 muestran la expresión de genes aumentados en fibroblastos humanos (Tabla 5), células ICBM (Tabla 6), y MSCs (Tabla 7).

Tabla 5. Los genes que mostraron tener una mayor expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en fibroblastos	
5	fosfatasa de doble especificidad 2
	proteína KIAA0527
	<i>Homo sapiens</i> ADNc: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
10	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	anquirina 3, nodo de Ranvier (anquirina G)
	inhibina, beta A (activina A, activina A-B polipéptido alfa)
	ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	proteína KIAA1053
15	proteína asociada a microtúbulos 1A
	proteína con dedos de zinc 41
	proteína HSPC019
	<i>Homo sapiens</i> ADNc: FLJ23564 fis, clon LNG10773
20	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	proteína LIM (similar a enigma a unión C de quinasa de proteína de rata)
	inhibidor de potenciador del gen de polipéptido ligero kappa en las células B, proteína asociada a complejo de quinasa
	proteína hipotética FLJ22004
25	Secuencia de ARNm humano (Clon CTG-A4)
	ESTs, moderadamente similar al factor de citoquina similar a receptor 2; precursor CRL2 del receptor de citoquinas [<i>Homo sapiens</i>]
	factor de crecimiento transformante, beta 2
30	proteína hipotética MGC29643
	antígeno identificado por anticuerpo monoclonal MRC OX-2
	proteína de retinopatía putativa ligada al cromosoma X

Tabla 6. Los genes que mostraron tener una mayor expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en las células ICBM	
40	<ul style="list-style-type: none"> • proteína con repeticiones de anquirina cardíaca • región MHC de clase I ORF • integrina, alfa 10 • proteína hipotética FLJ22362 • UDP-N-acetilo-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
45	<ul style="list-style-type: none"> • proteína inducida por interferón 44 • SRY (región determinante del sexo Y)-caja 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica) • proteína asociada a queratina 1-1 • hipocalcina 1 • dentado 1 (síndrome de Alagille) • proteoglicano 1, gránulo secretor

Tabla 7. Los genes que mostraron tener una mayor expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumenta en las células MSC	
55	<ul style="list-style-type: none"> • interleucina 26 • maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa) • subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2 • v-fos FBJ osteosarcoma murino homólogo de oncogén viral • proteína hipotética DC42
60	<ul style="list-style-type: none"> • subfamilia de receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2 • FBJ osteosarcoma murino proteína de la ruta viral oncogén homólogo B • proteína de vía WNT1 de señalización inducible 1 • secuencia transformante derivada de línea celular MCF.2 • canal de potasio, subfamilia K, miembro 15 • homeoproteína de cartílago de clase emparejada 1
65	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ 12232 fis, clon MAMMA1001206

- Homo sapiens ADNc FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
- jun B proto-oncogén
- CLL de células B/linfoma 6 (proteína de dedo de zinc 51)
- proteína con dedos de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

5
10
15
[0128] El análisis anterior incluye células derivadas de tres cables de diferentes cordones umbilicales y 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 22.000 genes. Los resultados mostraron que 290 genes se expresan diferencialmente en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen siete genes aumentados específicamente en las células derivadas de tejido de cordón umbilical. Se ha encontrado que cincuenta y cuatro genes tienen niveles de expresión específicamente menores en las células derivadas de tejido de cordón umbilical, en comparación con los otros tipos de células. La expresión de genes seleccionados ha sido confirmada por PCR. Estos resultados demuestran que las células derivadas de tejido de cordón umbilical tienen un perfil de expresión de genes distintos, por ejemplo, en comparación con células y fibroblastos derivados de médula ósea.

EJEMPLO 5

Marcadores celulares en las células derivadas de tejido del cordón umbilical

20
25
[0129] Como se demostró anteriormente, se identificaron seis genes de "firma" para las células derivadas de tejido de cordón umbilical: receptor de LDL oxidado 1, interleucina-8, renina, reticulon, ligando de receptor de quimioquinas 3 (C-X-C ligando 3), y proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes de "firma" se expresaron en niveles relativamente altos en células derivadas del posparto.

30
[0130] Los procedimientos descritos en este ejemplo se llevaron a cabo para verificar los datos de micromatrices y encontrar concordancia/discordancia entre el gen y la expresión de proteínas, así como para establecer una serie de ensayo fiable para la detección de identificadores únicos a células derivadas de tejido del cordón umbilical.

35
[0131] Células derivadas de tejido de cordón umbilical (cuatro aislados), y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatales y adultos) se cultivaron en Medio de Crecimiento con penicilina/estreptomycin en un matraz T75 recubiertos de gelatina. Las células madre mesenquimáticas (MSC) se cultivaron en bala de medio de crecimiento de célula madre mesenquimales (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

40
[0132] 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 se hicieron crecer durante 8 horas en 10 mililitros de privación de suero medio [DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina/estreptomycin (Gibco, Carlsbad, CA) y 0,1% (p/v) albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. Después de este tratamiento, se extrae ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares. Los sobrenadantes se congelaron a -80°C para el análisis ELISA.

45
50
[0133] Las células de posparto derivadas 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 paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se contaron. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² que contenía 15 ml de medio de crecimiento a 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El medio de privación de suero se recogió al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos (y se almacenó a -20°C).

55
[0134] Para estimar el número de células en cada frasco, 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 mililitros de medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y 1 mililitro de medio de crecimiento se añadió a cada tubo para resuspender las células. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

60
[0135] La cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero se analizó utilizando ensayos ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se ensayaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

65
[0136] Se extrajo ARN de células derivadas de tejido de cordón umbilical y fibroblastos confluentes 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 ADNasa (2,7 U/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluye con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C.

[0137] ARN también fue extraído de tejido del cordón umbilical humano. Tejido (30 miligramos) se suspendió en 700 microlitros de RLT tampón que contiene 2-mercaptoetanol. Las muestras fueron mecánicamente homogeneizadas y la extracción de RNA se procedió según la especificación del fabricante. El ARN se extrajo con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. ARN se transcribió por inversión usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

[0138] Los genes identificados por micromatriz de ADNc regulados de forma única en las células del posparto (genes de firma - incluyendo receptor de LDL oxidada, interleucina-8, renina y reticulon), se investigaron adicionalmente usando PCR en tiempo real y convencional.

[0139] Se realizó la PCR en muestras de ADNc utilizando productos de expresión de genes de Assays-on-Demand™: receptor de LDL oxidada (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); Ligando C-X-C 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) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con software ABI Prism 7000 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. Datos de PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario n° 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

[0140] PCR convencional se realizó utilizando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Massachusetts, EE.UU.) para confirmar los resultados de PCR en tiempo real. PCR se realizó usando 2 microlitros de solución de ADNc, 1 3 AmpliTaq Gold mezcla de PCR tampón de reacción universal (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, C-X-C 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 (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores usados para la amplificación se enumeran en la Tabla 8. Primer concentración en la reacción de PCR final fue de 1 micromolar a excepción de GAPDH, que fue de 0,5 micromolar. Cebadores GAPDH fueron los mismos que en tiempo real PCR, excepto que la sonda TaqMan por el fabricante no se agregó a la reacción de PCR final. Las muestras se corrieron en 2% (p/v) en gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes fueron capturadas utilizando una lámina de 667 Twinpack universal (VWR International, South Plainfield, NJ) utilizando una longitud focal de la cámara Polaroid (VWR International, South Plainfield, Nueva Jersey).

Tabla 8: Cebadores utilizados

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

[0141] Las células se fijaron con paraformaldehído frío al 4% (p/v) de (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos en temperatura ambiente. Un aislado en el paso 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y dos aislamientos en el paso 11 (P11), y se utilizaron fibroblastos (P11). La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1: 500, Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150; Sigma - levantado contra conejo; o 1: 300; Chemicon, Temecula, CA - levantado contra ratón), actina de músculo liso de alfa (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (CD34 humana Clase III; 1: 100; Dako, Carpinteria, CA). Además, los siguientes marcadores fueron probados en células posparto de paso 11: GRO alfa - PE anti-humano (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humano (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor LDL oxidado anti-humano 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGA-A anti-humano (1: 100; Santa Cruz, Biotech).

[0142] Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, suero de cabra del 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Cuando el epítomo de interés se encuentra en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), Triton X-100 se omitió en todos los pasos del

procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítipo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se levantó en contra de cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), 3% (v/v) suero de burro se utilizó en lugar de suero de cabra. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 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 anti-IgG de 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 DAPI micromolar (Molecular Probes) se aplicó durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0143] Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando un filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido de 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 capturadas utilizando una cámara de video a color digital y software de ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez. Montajes en capas se prepararon a continuación, utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

[0144] Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron, y resuspendieron 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Cien microlitros alícuotas se entregaron a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). El anticuerpo se añadió a alícuotas de acuerdo con especificaciones del fabricante y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que requieren un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de 3% de FBS. El anticuerpo secundario se añadió de acuerdo con 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), ratón IgG1 kappa, (P-4685 y M-5284; Sigma), burro contra IgG de cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech). La citometría de flujo se realizó con citómetro (Becton Dickinson San Jose, CA).

[0145] Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el método CT y expresados en una escala logarítmica. Los niveles de reticulon y expresión del receptor de LDL oxidada fueron más altos en las células derivadas de tejido de cordón umbilical, en comparación con otras células. No hay diferencia significativa en los niveles de expresión de CXC ligando 3 y GCP-2 se encontraron entre las células y los controles derivados de posparto. Los resultados de PCR en tiempo real fueron confirmados por PCR convencional. La secuenciación de productos de PCR validaron aún más estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de CXC ligando 3 entre las células derivadas de posparto y controles que utilizan PCR CXC ligando 3 cebadores convencionales mencionados anteriormente.

[0146] La producción de la citoquina, IL-8 en posparto fue elevada tanto en células derivadas del posparto cultivadas den medio de crecimiento y privadas de suero. Todos los datos de PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y mediante la secuenciación de productos de PCR.

[0147] 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 9). No se detectó IL-8 en un medio derivado de fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 9. Cantidad de proteína IL-8 medida por ELISA

Tipo de célula	IL-8
hFibro	ND
Umb aislado 1	2.058,42 + 144,67
Umb aislado 2	2368,86 ± 22,73
Valores picogramos/millones de células, n = 2, sem; ND = No detectado	

[0148] Las células derivadas del tejido de cordón umbilical humano en el pase 0 se probaron para la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (paso 0), las células se fijaron con 4% paraformaldehído y se exponen a anticuerpos para seis proteínas: Factor de von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de músculo liso-alfa, y vimentina. Células derivadas de tejido de

cordón umbilical fueron positivas para actina de músculo liso-alfa y vimentina, con el patrón de tinción consistente a través del paso 11.

[0149] 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 LDL oxidada 1, renina, reticulon, y IL-8. La expresión de estos genes se regula diferencialmente en el nivel de ARNm en PPDCs, estando IL-8 también regulada diferencialmente a nivel de proteínas. Las células derivadas del tejido de cordón umbilical humano en el paso 0 se examinaron para la expresión de actina de músculo liso-alfa y vimentina, y fueron positivas para ambas. El patrón de tinción fue preservada a través del paso 11.

EJEMPLO 6

Evaluación inmunológica *In Vitro* de las células derivadas de posparto

[0150] Se evaluaron células derivadas del posparto (PPDCs) *in vitro* por sus características inmunológicas en un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica que, en su caso, estas células provocarían sobre el trasplante *in vivo*. PPDCs 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 células T ingenuas CD4⁺ (Abbas y Lichtman, *Cellular and Molecular Immunology*, 5^a Ed. (Saunders, Philadelphia, 2003; 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., *Journal of Immunological Methods*, 1999; 224: 185-196), y PD-L2 (Abbas y Lichtman, 2003, *supra*; Brown, et al., *The Journal of Immunology*, 2003; 170: 1257-1266). Se cree que la expresión de estas proteínas por las células que residen en tejidos de la placenta median el estado inmuno-privilegiado de los tejidos de la placenta *en el útero*. Para predecir el grado en que líneas de células derivadas de placenta y de tejido de cordón umbilical provocan una respuesta inmune *in vivo*, las líneas de células se ensayaron en una reacción mixta de linfocitos de una dirección (MLR).

[0151] Las células se cultivaron hasta la confluencia en Medio de Crecimiento que contenía penicilina/estreptomicina en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertas con gelatina al 2% (Sigma, St. Louis, MO).

[0152] Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Se recogieron las células, se centrifugaron y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1x10⁷ por mililitro. Anticuerpo (Tabla 10) se añadió a un centenar de microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante y 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 quinientos microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 10.

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

[0153] Viales criopreservadas de células derivadas de tejido de cordón umbilical de paso 10 etiquetadas como línea celular A fueron enviados sobre hielo seco a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción de linfocitos mixtos usando CTBR SOP N° CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios femeninos y masculinos. Líneas celulares estimuladoras (donantes) alérgicas PBMC, autólogas PBMC, y posparto se trataron con mitomicina C. Células estimuladoras de autólogo y mitomicina C-tratadas se añadieron a PBMCs de respondedor (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, y [³H]-timidina se midió utilizando un contador de centelleo.

5 **[0154]** El índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) se calculó como la proliferación media de receptor más donante alogénico de mitomicina C-tratado dividido por la proliferación de línea de base del receptor. El índice de estimulación de los PPDCs se calculó como la proliferación media de la línea celular de posparto C-tratada con receptor más mitomicina dividido por la proliferación de línea de base del receptor.

10 **[0155]** Se cribaron seis donantes de sangre voluntarios humanos 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 de control positivo alogénico. Los cinco donantes de sangre restantes fueron seleccionados como receptores. El donante alogénico de control positivo y las líneas celulares de placenta fueron C-tratados por mitomicina 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). El índice medio de estimulación varió de 6,5 (placa 1) a 9 (placa 2) y controles positivos de donante alogénico variaron de 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 12).

Tabla 11. Reacción mixta de linfocitos Línea Celular Data- A (cordón umbilical)

20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

DPM para ensayo de proliferación Placa ID: Placa 1							
Nº analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	SD	CV
		1	2	3			
	Línea de base de proliferación de receptor de	1074	406	391	623.7	390.07	62.5

ES 2 621 610 T3

DPM para ensayo de proliferación Placa ID: Placa 1								
Nº analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	DE	CV	
		1	2	3				
IM04-2478	control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	672	510	1402	861.3	475.19	55.2	
	donante alogénico MLR IM04-2477 (tratada con mitomicina C)	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7	
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C de tipo A)	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3	
SI (donante) SI (línea celular)					70 8			
IM04-2479	Línea de base de proliferación de receptor de control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	530	508	527	521.7	11.93	2.3	
	donante alogénico MLR IM04-2477 (tratada con mitomicina C)	701	567	1111	793.0	283.43	35.7	
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C de tipo A)	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1	
		5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3	
SI (donante) SI (línea celular)					47 7			
IM04-2480	Línea de base de proliferación de receptor de control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1192	854	1330	1125.3	244.90	21.8	
	donante alogénico MLR IM04-2477 (tratada con mitomicina C)	2963	993	2197	2051.0	993.08	48.4	
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C de tipo A)	25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7	
		2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1	
SI (donante) SI (línea celular)					23 3			
	Línea de base de proliferación de receptor de	695	451	555	567.0	122.44	21.6	

DPM para ensayo de proliferación Placa ID: Placa 1									
Nº analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	DE	CV		
		1	2	3					
IM04-2481	control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) donante alogénico MLR IM04-2477 (tratada con mitomicina C) MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C de tipo A)	738	1252	464	818.0	400.04	48.9		
		13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8		
		4495	3671	4674	4280.0	534.95	12.5		
SI (donante) SI (línea celular)					31 8				
Placa ID: Placa 2									
Nº analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	DE	CV		
		1	2	3					
IM04-2482	Línea de base de proliferación de receptor de control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) donante alogénico MLR IM04-2477 (tratada con mitomicina C) MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C de tipo A)	432	533	274	413.0	130.54	31.6		
		1459	633	598	896.7	487.31	54.3		
		24286	30823	31346	28818.3	3933.82	13.7		
		2762	1502	6723	3662.3	2724.46	74.4		
SI (donante) SI (línea celular)					70 9				
IM04-2477 (donante alogénico)	Línea de base de proliferación de receptor de control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	312	419	349	360.0	54.34	15.1		
		567	604	374	515.0	123.50	24.0		
Línea celular de tipo A	Línea de base de proliferación de receptor de control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	5101	3735	2973	3936.3	1078.19	27.4		
		1924	4570	2153	2882.3	1466.04	50.9		

Tabla 12. Índice promedio de estimulación de células derivadas de tejido de cordón umbilical y un donante alogénico en una reacción mixta de linfocitos con cinco receptores alogénicos individuales.

Índice promedio de estimulación		
	Recipiente	Ombigo
Placa 1 (receptores 1-4)	42,75	6,5
Placa 2 (receptor 5)	70	9

[0156] Los histogramas de las células derivadas de tejido de cordón umbilical analizados por el flujo de citometría que muestra la expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se ha señalado por valor de fluorescencia coherente con la IgG de control, lo que indica que líneas celulares umbilicales carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente células T CD4⁺. Los histogramas de las células derivadas de tejido de cordón umbilical analizados por flujo muestran citometría de expresión positiva de PD-L2, como se ha indicado por el incremento del valor de la fluorescencia con respecto al control IgG, y la expresión negativa de CD 178 y HLA-G, según lo observado por valor de fluorescencia consistente con el control de IgG.

[0157] En las reacciones de linfocitos mixtos realizados con líneas celulares derivadas de tejido de cordón umbilical, el índice medio de estimulación varió de 6,5 a 9, y la de los controles positivos alogénicas varió de 42,75 a 70. Líneas celulares derivadas de tejido de cordón umbilical fueron negativas 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 de células derivadas de tejido del cordón umbilical fueron negativas para la expresión de proteínas de inmunomodulación de HLA-G y CD178 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 ingenuas de CD4⁺. La ausencia de moléculas de superficie celular presentadoras de antígeno sobre las células derivadas de tejido de cordón umbilical y placenta necesarias para la estimulación directa de células T ingenuas CD4⁺ y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el bajo índice de estimulación exhibida por estas células en un MLR en comparación con los controles alogénicos.

EJEMPLO 7

Secreción de factores tróficos por células derivadas de tejido del cordón umbilical

[0158] Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados a partir de células derivadas de tejido de 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., Ciba Found Symp., 1997; 212: 215-26), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Salcedo et al., Blood, (2000; 96: 34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li et al., J. Immunol, 2003; 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., Ann Thorac Surg, 2004; 77: 812-8), metaloproteína de matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), trombotopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor de 1alfa derivado del estroma (SDF-1 alfa); (2) los conocidos por tener actividad neurotrófica/neuroprotectora, tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng et al., Dev Biol, 2003; 258: 319-33), interleucina-6 (IL-6), en proteína de granulocitos quimiotáctica 2 (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2); y (3) los conocidos por tener actividad de quimioquinas, tales como proteína 1alfa de macrófago inflamatorio (MIP1a), proteína 1beta de macrófago inflamatorio (MIP1b), quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), RANTES (reguladas en la activación, células T normales expresadas y secretadas), I309, timo y quimiocina regulada por activación (TARC), eotaxina, quimioquina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

[0159] Las células de cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano se cultivaron en Medio de Crecimiento con penicilina/estreptomina en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células fueron crioconservadas en el paso 11 y se almacenan en nitrógeno líquido. Después de la descongelación de las células, el medio de crecimiento se añadió a las células, seguido de la transferencia a un tubo de centrifuga de 15 ml y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó. El sedimento celular se resuspendió en 4 mililitros de medio de crecimiento, y se contaron las células. Las células se sembraron a matraz de 375.000 células/75 cm² 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% (p/v) de albúmina/suero bovino (Sigma), penicilina/estreptomina (Gibco)) durante 8 horas. El medio libre de suero acondicionado se recogió al final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a 20°C. Para estimar el número de células en cada matraz, 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 adición de 8 mililitros de Medio de Crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de Medio de Crecimiento. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

[0160] Las células se cultivaron a 37°C en dióxido de carbono y oxígeno atmosférico al 5%. Células derivadas de placenta (lote 101503) también se cultivó en 5% de oxígeno o beta-mercaptoetanol (BME). La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, 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.

[0161] Las quimiocinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, RANTES, I309, TARC, eotaxina, MDC, IL8), BDNF, y los factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-BB, TPO, HB-EGF se midieron utilizando SEARCHLIGHT® Proteome Arrays (Pierce Biotechnology Inc.). Matrices de proteoma son ELISAs de sandwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Las matrices se producen mediante la detección de un patrón 2 x 2, 3 x 3, o 4 x 4 de cuatro a 16 anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento de sándwich ELISA, toda la placa se forma para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. La cantidad de señal generada en cada punto es proporcional a la cantidad de proteína diana en el estándar original o muestra.

[0162] MCP-1 e IL-6 fueron secretadas por las células derivadas de tejido del cordón umbilical y fibroblastos dérmicos (Tabla 13). SDF-1a fue secretada por los fibroblastos. GCP-2 e IL-8 se secretaron por las células derivadas de tejido de cordón umbilical en cultivo en presencia de BME o 5% de O₂. GCP-2 también se secretó por los fibroblastos humanos. TGF-beta2 no era detectable por el ensayo ELISA.

Tabla 13. Resultados de ensayo ELISA

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
Fibroblastos	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Cordón umbilical (022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
Cordón umbilical (071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND

Los valores presentados son picogra/millón de células/mililitro ms (n = 2, sem); ND = no detectado.

[0163] TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC, y la IL-8 se secretaron a partir de células derivadas de tejido de cordón umbilical (Tablas 14 y 15). No se detectó Ang2, VEGF, o PDGF-BB.

Tabla 14. Resultados de ensayo SearchLight® multiplexado ELISA

	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
U1	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
U3	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

HFB = fibroblastos humanos, células U1 = cordón umbilical derivado de tejido (022803), U3 = células derivadas de tejido de cordón umbilical (071003), ND = No detectado.

Tabla 15. Resultados de ensayo SearchLight® Multiplexed ELISA

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

hFB = fibroblastos humanos, células U1 = células derivadas de tejido del cordón umbilical (022803), U3 = células derivadas de tejido de cordón umbilical (071003), ND = No detectado.

[0164] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical secretan una serie de factores tróficos altamente beneficiosos. Algunos de estos factores tróficos, tales como TIMP1, un inhibidor catabólico, desempeña un papel crítico en la prevención de la degradación de la matriz extracelular por metaloproteasas de matriz. HGF, bFGF, MCP-1 y IL-8, desempeñan papeles importantes en las funciones de supervivencia celular y la diferenciación celular. Otros factores tróficos, tales como BDNF y IL-6, tienen un papel importante en la regeneración neural.

EJEMPLO 8

Inhibición de la expresión inducida por IFN-gamma de HLA-DR, DP, DQ en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano ampliado por los inhibidores de reductasa de HMG-CoA

[0165] Las células derivadas de tejido del cordón umbilical humanos expandidas en cultivo (022.803 P4) se sembraron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos y se cultivaron en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)-baja glucosa, suero bovino fetal al 15% (FBS), penicilina/estreptomicina (P/S), beta-mercaptoetanol (BME) a aproximadamente 70% de confluencia. Las células se trataron entonces con medios que contienen 10 µm de respectivo inhibidor de la reductasa de la HMG-CoA (ácido simvastático (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza) formulado como reactivos madre de 10 mM en DMSO) o vehículo DMSO - 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) y se incubó durante la noche. El medio se retiró por aspiración y se reemplazó con medio que contenía 500 U/ml rhIFN-gamma (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) y 10 µm de inhibidor respectivo de la reductasa de la HMG-CoA y se incubó durante 3 días. En el tercer día, las células se recogieron con tripsina.

[0166] Las células recogidas se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 100 µl de 3% FBS en PBS con 20 µl de HLA-DR, DP, DQ marcado con FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) o anticuerpo IgG marcado con FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) y se incubó durante una hora. Las células se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en 500 µl de PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BS Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Tabla 16. Expresión HLA-DR, DP, DQ de HUTC medido por valores de intensidad de fluorescencia de FITC pre- tratados con inhibidor de la reductasa de la HMG-CoA y además tratados con IFN-gamma de citoquinas inflamatorias.

Tratamiento de inhibidor de reductasa HMG-CoA	Control IgG		IFN-gamma-tratada		Tratamiento sin citoquina	
	Media	Dev. Est.	Media	Dev. Est.	Media	Dev. Est.
Sin tratar	4,88	5,12	274,23	219,04	5,56	8,97
Control de vehículo DMSO 0,1%	4,09	5,67	294,08	257,08	5,54	5,46
Simvastatina	4,4	2,38	5,57	3,98	5,66	3,25

[0167] Tal como se muestra en la Tabla 16, células derivadas de tejido de cordón umbilical humanas de control de vehículo de DMSO 0,1% no tratadas y incubadas con IFN-gamma de citoquina inflamatoria mostró un aumento de HLA-DR, DP, expresión DQ como se ve por el aumento de la fluorescencia detectada por citometría de flujo. Células derivadas de tejido de cordón umbilical humano pre-tratadas con un inhibidor de la reductasa de la HMG-CoA y posteriormente incubadas con IFN-gamma mostraron expresión de HLA-DR, DP, DQ similares a los controles no tratados y de vehículos.

[0168] Estos datos indican que la reductasa de HMG-CoA inhibe la expresión de HLA-DR, DP, DQ mediada por citoquinas inflamatorias en las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

Ejemplo 9

Eficacia de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (HUTC) en un modelo de conejo de degeneración de disco intervertebral

[0169] Un estudio se realizó para determinar si las células derivadas de tejido umbilical humano (HUTC) son eficaces en un modelo de conejo de degeneración de disco intervertebral (DIV). Las células se inyectan en el sitio de dimensiones de lesiones y de disco evaluadas por imágenes de rayos X. El análisis de los tejidos se realizó en la necropsia.

[0170] Para evaluar los efectos de las células humanas de cordón umbilical derivadas de tejido (hUTC) en degeneración de disco intervertebral (DIV), hUTC se inyectaron en una DIV perforada. Radiografías bisemanales se obtuvieron y se analizaron para el cambio de altura del disco en comparación con el control tratado con vehículo lesionado. El tratamiento con hUTC resultó en altura de disco aumentada, así como aumento de la tasa de recuperación en comparación con los controles del vehículo.

[0171] Creación de modelo de degeneración de disco: se seleccionaron conejos NZW hembras a los 6 meses de edad sin ningún tipo de sesgo sistémico. Los animales fueron etiquetados y se pesaron antes de la inscripción e inmediatamente antes de la necropsia. Los conejos recibieron glicopirolato (0,01 a 0,02 mg/kg SQ) antes de la sedación para reducir las secreciones orotraqueales y disminuir bradicardia asociada con la anestesia. La buprenorfina (buprenorfina HCl 0,03 mg/kg) se administró preoperatorivamente como un analgésico preventivo. Los conejos se anestesiaron mediante la administración de clorhidrato de ketamina (25 mg/kg) y maleato de acepromazina (1 mg/kg, 10 mg/ml) para facilitar la intubación endotraqueal. Una radiografía pre-operatoria se tomó

como un control de línea de base. Una dosis de xilacina a 5 mg/kg se administra por vía subcutánea o por vía intramuscular después de completarse las radiografías preoperatorias. Los animales se mantuvieron por inhalación de isoflurano (inducida en 2-3%, y se mantuvieron a 0,5-2%).

5 **[0172]** Los conejos (3,5 kg de peso) se colocaron en decubito prono lateral. Tras la preparación y cubierta, las DIVs de zona lumbar fueron expuestas a través de un enfoque retroperitoneal posterolateral mediante disección roma del músculo psoas. Se expusieron las superficies anteriores de tres DIVs lumbares consecutivas (L2/3, L3/4 y L4/5). Mediante la utilización de una aguja 18G con un dispositivo de tapón que permite que la aguja entre a una profundidad de 5 mm, el anillo fibroso se pinchó en el aspecto ventral en el núcleo pulposo en los niveles L2/3 y
10 L4/5. Una grapa vascular y una sutura se colocaron en el músculo psoas en el nivel L3/4 como marcadores. La herida quirúrgica creada fue reparada en capas. La piel se cerró con grapas.

[0173] Después de la operación, una radiografía post-operatoria fue tomada para confirmar el nivel de la punción. Se le dio 1,5 mg de meloxicam por vía oral (un día antes de la cirugía y 2-3 días después de la operación). Un analgésico (buprenorfina HCl 0,01 - 0,03 mg/kg) se administró hasta dos veces al día durante 2-3 días, según sea necesario, en consulta con el personal veterinario. Después de la recuperación de la anestesia, los conejos fueron devueltos a sus jaulas y movilizados ad lib. Chaquetas de conejo se utilizaron en conejos para evitar que llegaran y perturbaran/volvieran a abrir la incisión quirúrgica y eliminaran las grapas.
15

[0174] Evaluación de los tratamientos: Cuatro semanas después de la cirugía inicial (punción anular), un procedimiento quirúrgico similar se hizo desde el lado opuesto para evitar la hemorragia de la cicatriz formada a partir de la primera operación. Una vez que los discos en degeneración quirúrgica fueron confirmados por rayos X e inspección visual, PBS, 1.000.000 o 100.000 células se inyectaron intradiscalmente en el área de núcleo pulposo con una microjeringa con una aguja 28G, tanto a niveles L2/3 como L4/5 para cada conejo. L3/4 se dejó como control sin heridas, sin tratar. Después de la reparación de la herida quirúrgica, los conejos fueron devueltos a sus jaulas y estrechamente vigilados. Como se describió previamente, un analgésico y un antibiótico se administró durante tres días. Cada conejo recibió 1,5 mg de meloxicam por vía oral (un día antes de la cirugía y 2-3 días después de la operación). El comportamiento, el apetito y el cambio en el peso corporal fueron monitorizados y el personal veterinario y los investigadores controlados por estrés post-quirúrgico.
20
25
30

[0175] Todos los materiales de inyección se prepararon en condiciones estériles. hUTC de calidad para investigación (Lote Q030306), evaluada con respecto a la esterilidad, micoplasma, cariotipo, y los patógenos se utilizaron para este estudio. Células criogénicamente almacenadas se descongelaron rápidamente y se diluyeron en PBS. Las células se centrifugaron y el sobrenadante se eliminó. Las células se resuspendieron en PBS y se contaron para lograr una concentración final de células de cualquiera de 100.000 o 10.000 células por microlitro. Azul de tripano se utilizó para evaluar la viabilidad. Diez microlitros de células se cargaron en micro-jeringas pre-esterilizadas y se inyectaron en la DIV como se describe anteriormente.
35

[0176] En 2-, 4-, 6-, 8-, 10-, 12-, 14- y 16- semanas post-punción y sacrificio a las 16 semanas post-punción, se realizaron radiografías para medir la altura de DIV después de la administración de clorhidrato de ketamina (25 mg/kg) y maleato de acepromazina (1 mg/kg).
40

[0177] A las 16 semanas después de la punción anular inicial [correspondiente a las semanas 12, después de la inyección (células)], ocho conejos en cada grupo se anestesiaron con hidrocloreto de ketamina (25 mg/kg) y maleato de acepromazina (1 mg/kg) y la eutanasia con una dosis en exceso de pentobarbital (90 mg/kg, solución de eutanasia B: Henry Schein Inc., Melville, NY).
45

[0178] Láminas de rayos X obtenidas antes de la punción, en cada punto de tiempo después de la punción, y en la eutanasia se digitalizaron y se midió la altura del cuerpo y la altura del disco vertebral. La altura de DIV se expresó como DHI de acuerdo con métodos publicados (Chujo et al., Spine, 2006; 31: 2909-17; Masuda et al., Spine, 2006; 31: 742-54). Un investigador ortopédico, ciego al grupo de tratamiento, interpretó de forma independiente todas las imágenes de rayos X. Rayos X digitalizados, medidas, incluyendo la altura del cuerpo vertebral y la altura de DIV, se analizaron mediante el programa personalizado para el software MATLAB (Natick, MA). Los datos fueron transportados al software Excel y la altura DIV se expresó como el índice de la altura del disco (DHI = altura DIV/altura del cuerpo DIV adyacente) basado en el método de Lu et al., Spine, 22: 1828-1834 (1997), con una ligera modificación. La altura media de DIV (DHI) se calculó promediando las mediciones obtenidas a partir de las porciones anterior, media y posterior de la DIV y dividiéndola por la media de las alturas de los cuerpos vertebrales adyacentes. El % DHI se expresó como (DHI postoperatoria/DHI preoperatoria) x 100. Además, el % de DHI se normalizó utilizando el nivel de L3/4 como el nivel de control. El % de DHI normalizada = (nivel experimental % DHI / L3/4 %DHI) x 100. La tasa de recuperación también se calculó de la siguiente manera: (% DHI (punto de tiempo) - % DHI (4W [punción])) / (100 - % DHI (4W [punción])).
50
55
60

[0179] La importancia de las diferencias entre medias de los datos sobre las mediciones de rayos X fue analizada por medidas repetidas de dos vías ANOVA, o ANOVA de una vía y PLSD de Fisher como una prueba post hoc. Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando Statview (Versión 5,0, SPSS, Chicago, IL) paquete de programas con un nivel de significancia de $p < 0,05$.
65

[0180] El índice de altura del disco se evaluó cada dos semanas como se describió anteriormente. Los discos con menos de un déficit de 10% fueron excluidos del estudio. Los datos (mostrados en la Tabla 17) indican que la altura del disco se aumentó con una dosis hUTC de 100.000 células y disminuyó con una dosis de 1.000.000 de células en comparación con el control entre 2-12 semanas post-trasplante (6-16 semanas post-punción) ($p < 0,05$ hUTC (1.000.000) vs. hUTC (100.000) 2, 4, 6, y 14 semanas después del trasplante, $p < 0,01$ 8 semanas después del trasplante).

Tabla 17. Efecto de hUTC en la altura del disco

Altura del disco (%)	0	2	4	6	8	10	12	14	16
	Pre-OP	2W-P	4W-P	2W	4W	6W	8W	10W	12W
Control	100,0	79,4	79,3	78,9	79,5	78,5	77,1	74,8	78,5
Control- SE	0,0	3,2	2,8	2,1	2,6	3,4	4,6	3,6	2,0
1,00E+06	100,0	76,6	76,6	74,8	74,6	72,7	70,8	74,4	72,9
SE	0,0	2,2	1,5	2,1	1,8	2,1	1,4	1,8	2,8
1,00E+05	100,0	84,8	76,6	83,7	83,8	81,3	86,0	82,4	82,2
SE	0,0	1,7	2,6	2,7	3,3	1,9	3,1	4,2	3,8

[0181] Tasa de recuperación se midió como se describió anteriormente. Los discos con menos de un déficit de 10% fueron excluidos del estudio. Los datos (mostrados en la Tabla 18) indican que la tasa de recuperación se aumentó con una dosis hUTC de 100.000 y se disminuyó con una dosis de 1.000.000 en comparación con el control entre 2-12 semanas post-trasplante (6-16 semanas post-punción). ($p < 0,05$ vs. control hUTC (100.000 células) 2 y 14 semanas post-trasplante; $p < 0,01$ 12 semanas post-trasplante).

Tabla 18. Efecto de hUTC en la Tasa de recuperación (%)

Índice de recuperación	0	2	4	6	8	10	12	14	16
	Pre-OP	2W-P	4W-P	2W	4W	6W	8W	10W	12W
Control-	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,3	-0,2
Control- SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
1,00E+06%	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,2	-0,3	-0,1	-0,2
SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
1,00E+05%	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,4	0,3	0,3
SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1

[0182] Por lo tanto, se evaluaron los efectos de hUTC sobre la degeneración de DIV en un modelo de conejo de degeneración de DIV inyectando hUTC en una DIV pinchada en dosis de 1.000.000 y 100.000 células/inyección. Radiografías bisemanales se obtuvieron y se analizaron para el cambio de altura del disco en comparación con el control de perforación sin tratar. Los datos indicaron que el tratamiento con hUTC a una concentración de 100.000 dio como resultado un aumento en la altura del disco, en donde el tratamiento con una concentración de 1.000.000 disminuyó la altura del disco en comparación con el control tratado con PBS (Tabla 17). El análisis adicional de los datos reveló que la tasa de recuperación (la cantidad de recuperación/disminución total de % de DHI normalizado) de los discos tratados con hUTC (100000) era mayor que la de control (Tabla 18).

Ejemplo 10

Expresión de proteínas de matriz extracelular por las células de tejidos humanos derivados de cordón umbilical *in vitro*

[0183] Se realizó un estudio para determinar el grado de expresión de las tres proteínas de la matriz extracelular agregano, colágeno I y colágeno II por hUTC *in vitro*. Las células se ensayaron solos y después de la estimulación con los factores tróficos, TGF-beta, GDF-5 y PDGF-BB.

[0184] Los cultivos de células humanas umbilicales derivadas de tejido (HUTC; lote 120304) se mantuvieron en cultivo bajo condiciones estándar. En resumen, las células se sembraron a 5000 células por cm cuadrado en matraces T con pasaje y resiembra cada 3-4 días. Las células para el experimento de factor trófico se encapsularon en perlas de alginato y se trataron con factores al medio de crecimiento estándar. Los cultivos se complementaron

con ácido ascórbico a 100 µg/ml. Factores probados eran PDGF-BB a 10 ng/ml, TGFbeta-1 a 5 ng/ml y GDF-5 a 200 ng/ml. Se crearon cinco grupos de tratamiento, hUTC solo, hUTC con GDF-5, hUTC con TGF-beta1, hUTC con PDGF-BB y hUTC con TGF-beta1 y GDF-5.

5 **[0185]** Después de 2 semanas en cultivo, las células fueron liberadas de alginato, se lavaron, se sedimentaron y se congelaron. Se aisló el ARN y la transcripción inversa se llevó a cabo para generar ADNc. Las muestras se analizaron por PCR en tiempo real para la expresión de agrecano, colágeno de tipo I y de tipo II.

10 **[0186]** Los resultados del análisis en tiempo real PCR muestran la expresión bajo cinco condiciones de cultivo diferentes. Los resultados se muestran en la Tabla 19 y se expresan como expresión relativa a hUTC sin tratamiento de factor de crecimiento. Los cultivos tratados con PDGF-BB y GDF-5 con TGF-beta1 mostraron una expresión comparable de agrecano, colágeno I y colágeno II. Las células tratadas con TGF-beta1 mostraron cierta inducción de colágeno I y colágeno II y agrecano de aproximadamente 10-20 veces. La inducción más alta se observó con GDF-5 de tratamiento. Las células mostraron aproximadamente un aumento de 50 veces en agrecano y colágeno de tipo I y un aumento de más de 300 veces en la expresión de colágeno de tipo II.

Tabla 19. Expresión de proteínas de matriz extracelular por hUTC *in vitro*.

	Relative mRNA		
	Agrecano	Colágeno I	Colágeno II
hUTC	1	1	1
hUTC + GDF-5	56	45	387
hUTC + GDF-5/TGF beta	1	1	113
hUTC + PDGF	1	<1	<1
hUTC +TGF beta	23	7	13

LISTADO DE SECUENCIAS

30

[0187]

<110> BROWN, LAURA
GOSIEWSKA, ANNA
35 KIHM, ANTHONY J.
KRAMER, BRIAN

<120> DEGENERATION DE DISCO DE TRATAMIENTO INTERVERTEBRAL UTILIZANDO
CÉLULAS DERIVADAS DE TEJIDO DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO

40

<130> 026038.0224PTUS

<140>

<141>

45

<150> 61/016.849

<151> 2007-12-27

<160> 10

50

<170> versión de patentIn 3,5

<210> 1

<211> 22

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
sintético

60

<400> 1

aagagcaaat gg gagaaatcca 22

65

<210> 2

<211> 21

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

10
 <400> 2
 agaatggaaa actggaatag g 21

15
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

25
 <400> 3
 ttcggattcc tctcgatgc 20

30
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

40
 <400> 4
 gaattctcgg aatctctgtt g 21

45
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

55
 <400> 5
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

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

65
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

ES 2 621 610 T3

<400> 7
tctgcagctc tgttgaagg 20

5 <210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
sintético

15 <400> 8
ttctccacaa cc ctcaaaaac 22

20 <210> 9
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
sintético

30 <400> 9
gctctcc cccacgccac 17

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

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
sintético

45 <400> 10
tcctgtcagt tggctcc 19

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Las células obtenidas a partir de tejido humano del cordón umbilical, en el que el tejido del cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, donde las células: se pueden obtener por digestión enzimática de tejido del cordón umbilical humano que está sustancialmente libre de sangre con una metaloproteasa, una proteasa neutra y una proteasa mucolítica; son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo; tienen el potencial de diferenciarse; y tienen las siguientes características:
- 10 a) expresar CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2, y HLA-A, B, C como se detecta por la citometría de flujo;
- b) no expresar CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD141, CD178, HLA-G, CD117 y HLA-DR, DP, DQ como se ha detectado por citometría de flujo;
- 15 c) no expresar la telomerasa; y
- d) expresar, con relación a un fibroblasto humano, células madre mesenquimales, o cresta ilíaca de células de médula ósea, aumento de los niveles de interleucina 8, reticulon 1, quimiocinas (CXC motivo) ligando 1 o quimiocinas (CXC motivo) ligando 3,
- 20 para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con la degeneración del disco intervertebral mediante la administración de las células en el núcleo pulposo o anillo fibroso del disco intervertebral.
- 2.** Las células para el uso de la reivindicación 1, donde el tratamiento comprende la administración a las células
- 25 (a) por inyección;
- (b) encapsuladas dentro de un dispositivo implantable,
- (c) mediante la implantación de una matriz que comprende las células,
- (d) con al menos otro tipo de célula; o
- (e) con al menos un agente.
- 30 **3.** Las células para el uso de la reivindicación 2d, en las que al menos otro tipo de célula
- (a) se administra simultáneamente con, o antes, o después de las células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano, o
- 35 (b) se ha diseñado para expresar al menos un producto génico exógeno.
- 4.** Las células para el uso de la reivindicación 3b, donde el producto del gen exógeno
- (a) es un factor trófico, o
- 40 (b) es TGF-beta o GDF-5 que modula la expresión de una o más proteínas de la matriz extracelular.
- 5.** Las células para el uso de la reivindicación 2e, donde al menos un agente
- (a) se administra simultáneamente con, antes de, o después de la administración de las células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano; o
- 45 (b) es un factor trófico.
- 6.** Las células para el uso de la reivindicación 5b, donde el factor trófico
- (a) se selecciona del grupo que consiste en: TGF-beta, GDF-5, PDGF-BB y TIMP1; o
- 50 (b) es TGF-beta o GDF-5 que ejerce un efecto trófico sobre las células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano.
- 7.** Las células para el uso de la reivindicación 6b donde el efecto trófico comprende el aumento de la expresión de una o más proteínas de la matriz extracelular.
- 55 **8.** Las células para el uso de la reivindicación 1, donde las células se han diseñado para expresar al menos un producto génico exógeno.
- 9.** Las células para el uso de la reivindicación 8, donde el producto del gen exógeno
- 60 (a) es un factor trófico; o
- (b) es TGF-beta o GDF-5 que modula la expresión de una o más proteínas de la matriz extracelular.
- 10.** Las células para el uso de la reivindicación 1, donde las células derivadas de tejido de cordón umbilical tienen la capacidad de diferenciarse
- 65

- (a) en células de un fenotipo de células del núcleo pulposo; o
- (b) en células de un fenotipo de células de anillo fibroso.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65