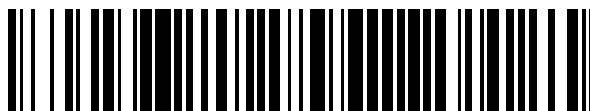


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 847**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 5/071</b>	(2010.01)
<b>C12N 5/073</b>	(2010.01)
<b>C12N 5/074</b>	(2010.01)
<b>A61K 35/12</b>	(2015.01)
<b>A61K 35/51</b>	(2015.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2005 PCT/US2005/046851**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2006 WO06071794**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2005 E 05855417 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 1831356**

54 Título: **Células posparto derivadas de tejido de cordón umbilical, y métodos de elaboración y uso de las mismas**

30 Prioridad:

**23.12.2004 US 639088 P**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARRIS, IAN, ROSS;  
MESSINA, DARIN, J.;  
KIHM, ANTHONY;  
SEYDA, AGNEISZKA y  
COLTER, DAVID**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones:**

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

**ES 2 621 847 T3**

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

**Células posparto derivadas de tejido de cordón umbilical, y métodos de elaboración y uso de las mismas****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

**[0001]** Esta invención se refiere a la terapia celular de mamífero, preferiblemente humana, y más particularmente a métodos de derivar células de cordón umbilical posparto, y métodos de su uso y el crecimiento en diversos medios, incluidos los medios que contienen suero o están libres de suero.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0002]** Al haberse avanzado la comprensión moderna de la enfermedad, la utilidad potencial de la terapia celular para mejorar el pronóstico de los afectados ha resultado en un mayor interés en nuevas fuentes de células humanas útiles para fines terapéuticos. Una de tales fuentes de células humanas son los tejidos posparto, y en particular, el ombligo o el cordón umbilical.

15

**[0003]** Recientemente, la atención se ha centrado en el almacenamiento de sangre de cordón umbilical (o simplemente "la sangre del cordón") como una fuente potencial de, por ejemplo, células hematopoyéticas para su uso por un individuo para quien la sangre del cordón se ha depositado en el nacimiento. Tales células serían útiles para aquellos individuos, por ejemplo, que requieren radiación terapéutica que puede eliminar porciones funcionales de su sistema inmune. En lugar de requerir un donante de médula ósea cuidadosamente ajustado para evitar el rechazo, la propia sangre del cordón umbilical del individuo se puede usar para reconstituir las células inmunes perdidas y restaurar la función inmune.

20

**[0004]** Aún más recientemente, ha habido interés en la obtención de células madre de sangre del cordón, debido a las amplias aplicaciones terapéuticas potenciales de tales células. Las células madre se entienden en términos generales como células que 1) tienen la capacidad de auto-renovarse durante largos períodos a través de la división celular a partir de una única célula; y 2) tienen la capacidad de diferenciarse en tipos de células específicas dadas las condiciones adecuadas. En consecuencia, las células madre son potencialmente útiles en el tratamiento de una población de individuos, y no meramente la persona de cuya sangre del cordón se obtuvieron inicialmente las células.

25

**[0005]** En particular, la sangre del cordón ha sido considerada como una fuente de células madre progenitoras hematopoyéticas. Se ha considerado útil para la reconstitución hematopoyética, por ejemplo en la médula ósea y los trasplantes relacionados, sangre de cordón depositado (o criopreservada) o células madre aisladas de la misma. (Boyse et al., Patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 5.004.681 y 5.192.553).

30

**[0006]** Además de la sangre del cordón, otras fuentes de células terapéuticas desde el cordón umbilical humano han sido exploradas, incluyendo las células aisladas a partir de la Gelatina de Wharton, vena umbilical o tejido de la arteria, y la propia matriz umbilical. Tales células han sido en gran parte no caracterizadas, o sólo se caracterizan mínimamente con respecto a sus propiedades fisiológicas, bioquímicas, inmunológicas y genéticas.

35

**[0007]** Por ejemplo, Purchio et al. (Patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 5.919.702) han aislado células progenitoras condrogénicas (o precondrocitos) de Gelatina de Wharton. Informaron del aislamiento de células de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical humano eliminando la sangre y los vasos sanguíneos e incubando el tejido en condiciones que permiten la proliferación de los precursores. Como tal, el método no distinguía las células deseadas de los diferentes tipos de células presentes en Gelatina de Wharton, sino que se basaba en la migración del tejido o la selección de las condiciones de crecimiento que favorecían a los precondrocitos. Los precondrocitos se expandieron mitóticamente después de que se establecieron. Las células en los pasajes 2 a 4 se informaron como útiles para producir cartílago, si se activan por la adición de factores de crecimiento exógenos, tales como BMP-13 o TGF-beta. Se propusieron las aplicaciones de las células para inyección directa o implantación, o uso con un hidrogel o una matriz de tejido. Sin embargo, se consideró importante que las células no excedieran aproximadamente el 25% de confluencia. Las células no se caracterizaron con respecto a sus propiedades bioquímicas o inmunológicas, ni con respecto a su expresión génica.

40

45

**[0008]** Weiss *et al.* (Publicación de solicitud de patente de EE.UU. US2003/0161818) propone procedimientos para aislar células pluripotentes o comprometidas en linaje a partir de fuentes de Gelatina de Wharton o de fuentes de sangre de cordón umbilical que no sean de sangre de mamífero. Se informó que las células aisladas se diferenciaban en líneas hematopoyéticas, mesenquimatosas o neuroectodérmicas. Las líneas celulares no se caracterizaron con respecto a sus propiedades de identificación. Se proporcionó una caracterización limitada con respecto a las células después de la diferenciación hacia las líneas neurales. Se hizo referencia a células bovinas y porcinas derivadas de Gelatina de Wharton que eran CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>.

50

**[0009]** Weiss *et al.* también informaron de la investigación del trasplante de las células de la matriz del cordón umbilical porcino en el cerebro de rata. (Exp. Neur. 182: 288 - 299, 2003). No se utilizó tratamiento enzimático en el procedimiento de aislamiento. Obtuvieron dos poblaciones distintas: células esféricas y mesenquimatosas planas. Las células se modificaron genéticamente para expresar GFP. Las células no parecen estimular el rechazo inmune cuando se implantan especies cruzadas.

55

60

**[0010]** Mitchell et al. (Stem Cells 21: 50-60, 2003) informaron de la obtención de las células de la matriz de Gelatina de Wharton de cordones umbilicales porcinos. Se informó que las células indiferenciadas eran positivas para la telomerasa y una subpoblación también se informó positiva para la expresión de c-kit, es decir, la telomerasa<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>. También se informó de que las células producían actina de músculo liso alfa, indicativa de su naturaleza

65

similar a los miofibroblastos. Las células supuestamente podrían diferenciarse a lo largo de las líneas neuronales en presencia de factores de crecimiento. Sin embargo, ambas células diferenciadas e indiferenciadas se encontraron para expresar NSE, un marcador para células madre neurales. Se reconoció la necesidad de líneas clonales y caracterización en términos de capacidad proliferativa, análisis cariotipo y expresión de antígenos HLA.

5 [0011] Romanov et al. (Stem Cells 21 (1): 105 - 110, 2003) informó de un procedimiento para aislar Células madre mesenquimatosas (MSC) de la vena del cordón umbilical humano. Su procedimiento implicaba el tratamiento del tejido extirpado de la vena con colagenasa y requería que la digestión enzimática fuera corta (15 minutos) para obtener la población celular de interés (una capa subendotelial de la vena). En particular, el procedimiento evitó la inclusión de células de músculo liso (SMC) y fibroblastos dejando las capas más profundas del tejido intactas, eliminando supuestamente sólo las capas externas. Se informó que la población de células "casi homogénea" resultante contenía aproximadamente 0,5 - 1% de células endoteliales que también intentaban evitar. Se informó que las células eran predominantemente CD34<sup>+</sup> y producían actina de músculo liso-alfa.

10 [0012] El documento WO2004/072273 supuestamente divulga células progenitoras de la Gelatina de Wharton de cordón umbilical humano.

15 [0013] El documento WO2005/003334 describe células de posparto derivadas de tejido de cordón umbilical y métodos de fabricación y utilización del mismo.

[0014] Ishii et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications 332 (1): 297-303, 2005) supuestamente revela marcadores moleculares que distinguen las Células madre mesenquimatosas de médula ósea de los fibroblastos.

20 [0015] Lodie et al. (Tissue Engineering 8 (5): 739-751, 2002) supuestamente revela un análisis sistemático de poblaciones supuestamente distintas de células madre multipotentes derivadas de médula ósea.

[0016] Rafii et al. (Nature Medicine 9 (6), 2003) supuestamente describe el trasplante terapéutico de células madre y progenitoras para la vascularización y regeneración de órganos.

25 [0017] Van Hoffelen et al. (Investigative Ophthalmology & Visual Science 44 (1): 426-434, 2003) supuestamente describe la incorporación de células progenitoras de cerebro murino en la retina de mamífero en desarrollo.

[0018] Caplan et al. (Trends in Molecular Medicine 7 (6): 259-264, 2001) supuestamente revela Células madre mesenquimatosas.

[0019] Efrat (Trends in Molecular Medicine 8 (7): 334-339, 2002) supuestamente describe terapia de reemplazo celular para diabetes de tipo 1.

30 [0020] Tremain et al. (Stem Cells 19: 408 - 418, 2001) supuestamente revela un análisis de microsaque de 2,353 genes expresados en una única colonia derivada de células de Células madre mesenquimatosas humanas no diferenciadas.

[0021] Draper et al. (Journal of Anatomy 200: 249-258, 2002) supuestamente describe antígenos de superficie de células madre embrionarias humanas.

35 [0022] Debido a la diversidad de poblaciones de células que se encuentran en la matriz de cordón umbilical, existe una necesidad en la técnica de métodos de aislamiento de células no sanguíneas definidas y las poblaciones derivadas de cordón umbilical de mamífero; así como la necesidad de líneas celulares derivadas del cordón umbilical de mamífero que se caractericen por su bioquímica (por ejemplo, secreción de factores de crecimiento), inmunología (marcadores de superficie celular y potencial para estimular respuestas inmunes) y expresión de diversos genes. Esta necesidad es particularmente convincente para las células derivadas del cordón umbilical humano.

40 [0023] Con respecto a los medios para cultivar células, la mayoría contienen al menos algo de suero bovino o de ternera fetal. Generalmente, las formulaciones de medios comercialmente disponibles utilizan suplementos de suero de aproximadamente 10-20% (v/v). El componente sérico es a menudo integral para la supervivencia y expansión de las poblaciones celulares. Se encuentran una miríada de proteínas en suero bovino, incluyendo por ejemplo PDGF y FGF, factores de crecimiento conocidos que pueden tener una influencia significativa en el crecimiento y diferenciación celular en poblaciones celulares, incluyendo poblaciones de células madre y progenitoras.

45 [0024] A pesar de las ventajas de incluir suero bovino (o suero de otras especies), existen, sin embargo, una serie de inconvenientes de complementar el medio con suero animal en lugar de utilizar un medio químicamente definido o libre de suero al cultivar células terapéuticas o producir las biológicas. La homeostasis de células y tejidos se produce en condiciones ambientales que carecen de suero sanguíneo. Por lo tanto, la exposición a largo plazo de células a suero y productos relacionados con la sangre simula un paradigma de lesión de tejido. Además, la variación de lote a lote en la composición del suero, incluyendo las proteínas estimuladoras y cualquier sustancia inhibidora, requiere de pruebas previas largas y costosas para asegurar que cada lote cumpla con los estándares de desarrollo o producción de productos terapéuticos. Por último, la creciente preocupación por la transmisión de enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) por el uso de productos relacionados con animales puede retardar o impedir la aprobación por la FDA de terapias basadas en células desarrolladas con suero extraño.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 [0025] *Figura 1:* Potencial de crecimiento a largo plazo de las células del cordón umbilical aisladas en diferentes condiciones. Las condiciones que permitieron más de 5 duplicaciones de población fueron analizadas más a fondo para el potencial de crecimiento a largo plazo. Las células se cultivaron usando las formulaciones de medio indicadas y las condiciones de cultivo hasta que las células alcanzaron la senescencia. La senescencia se determinó cuando las células no alcanzaron una duplicación de más de una población durante el intervalo de tiempo del estudio.

## RESUMEN DE LA INVENCION

**[0026]** La invención proporciona un método para la preparación de células terapéuticas o cultivos que comprende:

- 5 a) el aislamiento de células de tejido de cordón umbilical humano libre de sangre en presencia de (i) actividad de proteasa neutra o (ii) dos o más actividades enzimáticas seleccionadas entre las actividades de metaloproteasa, proteasa neutra y enzima mucolítica, en donde dichas células son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, y donde las células:
- 10 producen cada una de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-A, B, C, según se detecta por citometría de flujo, y  
no producen cada una de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, según se detecta mediante citometría de flujo;
- 15 b) la expansión inicial de las células a un número útil en un medio que contiene suero que soporta la expansión celular, pero en el que las células producen una cantidad del marcador de superficie celular HLA-ABC;
- c) la transferencia de las células a un medio en el que las células producen una cantidad disminuida del marcador de superficie celular HLA-ABC, en el que el medio en el que las células producen una cantidad disminuida del marcador de superficie celular HLA-ABC es un medio exento de suero; y
- 20 d) el paso de las células en el medio en el que las células producen una cantidad disminuida del HLA-ABC
- e) la preparación de este modo de una célula o cultivo terapéutico.

**[0027]** La descripción proporciona células derivadas de cordón umbilical aisladas (UDC) que se derivan del tejido del cordón umbilical de mamífero sustancialmente libre de sangre. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo. Las células derivadas del cordón umbilical tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. En realizaciones preferidas, las células se derivan de un cordón umbilical humano.

**[0028]** Las células se han caracterizado con respecto a varias de sus propiedades celulares, genéticas, inmunológicas, y bioquímicas. Por ejemplo, las células se han caracterizado por sus propiedades de crecimiento en cultivo, por sus marcadores de superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad para producir ciertos factores tróficos bioquímicos y por sus propiedades inmunológicas.

**[0029]** La célula de posparto derivado es una célula derivada del cordón umbilical. En realizaciones específicas, la célula tiene todas las características de identificación de cualquiera de los tipos de células UMB 022803 (P7) (ATCC N° de Acceso PTA-6067); o UMB 022803 (P17) (ATCC N° de Acceso PTA-6068).

**[0030]** En otro de sus varios aspectos, se describen cultivos de células que comprenden las células derivadas del cordón umbilical de aislados de la divulgación. Los cultivos de células del cordón umbilical están libres de células maternas en ciertas realizaciones preferidas.

**[0031]** Se proporcionan métodos de cultivo y la expansión de células derivadas del cordón umbilical y cultivos de células y poblaciones que los comprenden.

**[0032]** En otro aspecto de la descripción se describen células derivadas del cordón umbilical aisladas que tienen perfiles de expresión específica marcadores de superficie celular, en los que se producen proteínas marcadoras en particular de la superficie celular. En particular, las células producen una o más de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, CD141, PDGFr-alfa o HLA-A, B, C. Además, las células no producen una o más de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR, DP, DQ, según se detecta mediante citometría de flujo.

**[0033]** Las células de la divulgación también se han caracterizado de acuerdo con su expresión de una amplia variedad de genes. Por consiguiente, otro aspecto de la descripción proporciona células derivadas del cordón umbilical aisladas, las cuales, con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatoso o una célula de médula ósea de cresta iliaca, tienen una expresión reducida de genes para uno o más de: homeobox de corta estatura 2; choque térmico 27 kDa proteína 2; quimioquina (motivo CXC) ligando 12 (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm *Homo sapiens*; ADNC DKFZp586M2022 (clon DKFZp586M2022); mesenquima homeobox 2 (homeobox específico para la detención del crecimiento); homeobox *sine oculis* homólogo 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado desordenado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a la neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); *src* homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la C-endopeptidasa de pro-colágeno; homólogo de frizzled 7 (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquión); iroquis homeobox proteína 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína de vesícula sináptica 2; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, 36 kDa; *Homo sapiens* ADNC FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citoquinas; potasio intermedio/canal de conducto cálcico de pequeña conducta, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homeobox *sine oculis* homólogo 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína 1 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta de crecimiento precoz 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa aldo-ceto 1, miembro C3 (deshidrogenasa de hidroxiesteroide 3-alfa, tipo II); biglicano co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, similar a beta-1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de inserto de longitud completa ARNm de *Homo sapiens* de ADNC del EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor peptídico natriurético C/guanilato

ciclasa C (receptor del péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; *Homo sapiens* ARNM; ADNC DKFZp564B222 (clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus E1B 19kDa que interactúa con la proteína de tipo 3; proteína de unión a AE 1; y el polipéptido 1 de la subunidad VIIa de oxidasa de citocromo c (músculo). Además, estas células derivadas del cordón umbilical humano aislado expresa un gen para cada una de interleuquina 8; reticulón 1; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimulante del crecimiento del melanoma, alfa); quimioquina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3; y el factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3, en el que la expresión se incrementa con relación a la de una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa, una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca o una célula derivada de la placenta. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. También se describen cultivos celulares terapéuticos que comprenden las células aisladas derivadas del cordón humano.

[0034] En otro de sus varios aspectos, la divulgación proporciona células aisladas derivadas del cordón umbilical humano capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y que tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, en el que las células no estimulan linfocitos alogénicos en una reacción mixta de linfocitos y expresa PD-L2, pero no HLA-G, CD 178, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 o B7-H2. En algunas realizaciones preferidas, las células no estimulan PBMCs alogénicas. Más preferiblemente, no estimulan linfocitos alogénicos, células T alogénicas o células T ingenuas, ni generan otras respuestas inmunológicas adversas en receptores emparejados o no igualados. Las células también pueden producir vimentina y alfa-actina de músculo liso en ciertas realizaciones.

[0035] En otro aspecto, la descripción proporciona células aisladas derivadas del cordón umbilical humano que secretan uno o más de los factores angiogénicos de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO o TIMP1. En ciertas realizaciones, las células secretan varias o todas las moléculas antes mencionadas. En otras realizaciones, las células no segregan uno o más de los factores angiogénicos SDF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 2, ANG2, PDGFbb o VEGF, según se detecta mediante ELISA. En realizaciones particulares, secretan pocas o ninguna de esas moléculas.

[0036] En otro aspecto de la descripción, se describen cultivos celulares terapéuticos, cultivos de células que comprenden las células aisladas como se ha descrito anteriormente para uso en el tratamiento de pacientes en necesidad de factores tróficos de estimulación de angiogénesis. Tales cultivos celulares terapéuticos se describen también para su uso en el tratamiento de un paciente que necesita factores estimulantes tróficos de crecimiento neural.

[0037] Se proporcionan métodos de derivar células de tejido umbilical humano no sanguíneo. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. El método comprende (a) obtener tejido umbilical humano; (b) eliminar sustancialmente toda la sangre para producir un tejido umbilical sustancialmente exento de sangre, (c) disociar el tejido mediante tratamiento mecánico o enzimático, o ambos, (d) resuspender el tejido en un medio de cultivo, y (e) proporcionar condiciones de crecimiento que permiten el crecimiento de una célula derivada del cordón umbilical humano capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y que tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. Los métodos preferidos implican un tratamiento enzimático con, por ejemplo, colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa e hialuronidasa, y se describen métodos de este tipo.

[0038] También se describen en el presente documento las células aisladas derivadas del cordón umbilical humano derivadas del método anterior. Las células mantienen un cariotipo normal consistente a pesar del paso repetido en ciertas realizaciones. También se describen cultivos de células derivadas del cordón humano derivadas del método anterior, en el que los cultivos están libres de células maternas. Se describen además células y cultivos de tales células en las que las células aisladas por cualquiera de una variedad de métodos en cualquiera de una variedad de medios, incluso cuando se cultivan en un amplio intervalo de condiciones, son capaces de mantener un perfil sustancialmente consistente de marcadores de superficie expresados o perfil sustancialmente consistente de expresión de genes que caracterizan las células, por ejemplo, "perfiles de gen de firma", incluyendo por ejemplo, patrones de expresión específicos de ciertas células madre y/o de ciertas células de posparto.

[0039] También se describen en el presente documento los co-cultivos que comprenden las células o cultivos de la divulgación con otras células de mamífero. Preferentemente, estos co-cultivos comprenden otra línea celular humana cuyo crecimiento o potencial terapéutico, por ejemplo, se mejora por la presencia de las células derivadas del cordón umbilical. Tales co-cultivos son útiles para la aplicación terapéutica *in vitro* o *in vivo*.

[0040] También se describe en la presente invención composiciones terapéuticas que comprenden una célula derivada del cordón umbilical y otro agente terapéutico, factor, o el agente bioactivo. Tales factores incluyen, pero no se limitan a IGF, LIF, PDGF, EGF, FGF, así como agentes antitrombogénicos, antiapoptóticos, antiinflamatorios, inmunosupresores o inmunomoduladores y antioxidantes. Dichas composiciones terapéuticas pueden comprender además uno o más tipos de células adicionales además de las UDC y el componente bioactivo.

[0041] Además de lo anterior, las composiciones derivadas de las células se describen en el presente documento. Se describen aquí lisados celulares, fracciones de células solubles y fracciones de células enriquecidas en membrana. Las matrices extracelulares derivadas de las células, por ejemplo, que comprenden membranas basales también son útiles y se describen en la presente memoria.

[0042] Las composiciones de la divulgación también incluyen medios de cultivo acondicionados como se describe en el presente documento. Tales medios se han utilizado en primer lugar para cultivar las células o cultivos de la descripción, que durante el crecimiento secretan uno o más productos útiles en el medio. El medio acondicionado a partir de estas nuevas células es útil para muchos propósitos, incluyendo por ejemplo, el apoyo al crecimiento de otras células de mamífero que necesitan factores de crecimiento o factores tróficos secretados en los medios por las

células y cultivos de la descripción y promoviendo, por ejemplo, angiogénesis.

[0043] Se describen procedimientos de inducción de las células para diferenciarse a lo largo de una vía hacia progenitores de varias células, o incluso en células terminalmente diferenciadas. Tales células tienen utilidad para el tratamiento terapéutico de ciertas afecciones, trastornos y estados patológicos. Tales células también tienen utilidad para protocolos de diagnóstico, tales como para su uso en ensayos para identificar agentes terapéuticos.

[0044] La descripción también proporciona métodos de utilización de las células derivadas del cordón umbilical diferenciadas o las células progenitoras para usos terapéuticos, incluyendo pero no limitado a la aplicación angiogénica, aplicaciones neuronales, aplicaciones de tejido blando, aplicaciones oculares y aplicaciones en las que las células son útiles en el tratamiento del corazón, riñón, hueso, cartílago, páncreas, hígado y otros tejidos solos o en combinación con otros agentes terapéuticos.

[0045] Los kits también se describen en este documento. Se describen kits útiles para el crecimiento, aislamiento y uso de las células derivadas del cordón umbilical.

[0046] En otro de varios aspectos, la divulgación proporciona células aisladas derivadas de posparto que comprenden un "perfil de gen de firma" que distingue a los PPDCs de otras células de origen diferente y de otras células totipotentes y pluripotentes conocidas. Los perfiles de genes de firma preferidos comprenden aquellos en los que ARNm de genes para reticulón, receptor de LDL oxidado e IL-8 están presentes independientemente de si las células se hacen crecer en medio que contiene suero o medio libre de suero. También se describen tales células que comprenden adicionalmente la capacidad de alterar la expresión de sus marcadores de superficie celular cuando se cultivan en un medio que contiene suero con relación al medio libre de suero. De particular interés son actualmente las células en las que los marcadores para receptor PDGF alfa y HLA-ABC pueden alterarse.

[0047] También se proporcionan procedimientos para la preparación de células terapéuticas o cultivos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende: el aislamiento de células; expandiendo inicialmente las células a un número útil en un medio que contiene suero que soporta la expansión celular, pero en el que las células producen una cantidad del marcador de superficie celular HLA-ABC; transfiriendo las células a un medio en el que las células producen una cantidad disminuida del marcador de superficie celular HLA-ABC; y pasando las células en el medio en el que las células producen una cantidad disminuida de HLA-ABC, preparando así una célula o cultivo terapéutico. El medio en el que las células producen una cantidad disminuida del marcador de superficie celular HLA-ABC es un medio exento de suero. Los métodos son particularmente útiles para la producción de células terapéuticas o cultivos para implantación o injerto.

[0048] También se describen de acuerdo con la presente descripción medios libres de suero para la expansión de las células derivadas de posparto en las que los medios de comunicación tienen uno o más factores de crecimiento añadidos. Factores de crecimiento actualmente preferidos que se han de añadir son bFGF, EGF o PDGF.

[0049] También se proporcionan métodos para el aislamiento y cultivo de células del posparto, en particular células derivadas del cordón umbilical, en medios que contienen suero y los que están libres de suero, con o sin beta-mercaptoetanol, con o sin diversos factores de crecimiento, en las superficies recubiertas con gelatina, o CELLBIND, u otros tratamientos que permitan el acoplamiento. Los métodos de cultivo de las células también incluyen condiciones variadas de oxígeno, y otros parámetros de crecimiento.

[0050] En otro aspecto, la descripción proporciona cultivos terapéuticos que comprenden células derivadas del posparto expandidas en medio libre de suero. Los cultivos preferidos que tienen un perfil de gen de firma en el que el ARNm de los genes para reticulón, receptor LDL oxidado e IL-8 están presentes independientemente de si las células se desarrollan en medio que contiene suero o medio libre de suero.

[0051] También se describen bancos de cultivo celular y depositarios y similares que comprenden células derivadas de posparto y cultivos de la divulgación.

[0052] Se describirán estos y otros aspectos de la invención con mayor detalle a continuación.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### Definiciones

[0053] Varios términos utilizados a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se definen como se expone a continuación.

[0054] *Las células madre* son células no diferenciadas definidas por la capacidad de una sola célula tanto para la auto-renovación como para producir células de progeñie, incluyendo progenitores auto-renovables, progenitores no renovadores y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales tras el trasplante, y de contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos los tejidos después de la inyección en blastocistos.

[0055] Las células madre se clasifican de acuerdo con su potencial de desarrollo como: (1) *totipotentes*; (2) *pluripotentes*; (3) *multipotentes*; (4) *oligopotentes*; y (5) *unipotentes*. Células *totipotentes* son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Células *pluripotentes* son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias. Células *multipotentes* incluyen aquellas capaces de dar lugar a un subconjunto de los linajes de células, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular (por ejemplo, células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una progeñie que incluyen HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes con restricción de células sanguíneas y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre). Las células que son *oligopotentes* pueden dar lugar a un subconjunto

más restringido de linajes de células que las células madre multipotentes; y las células que son *unipotentes* son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre de espermatogénesis).

**[0056]** Las células madre también se clasifican sobre la base de la fuente de la que se pueden obtener. Una *célula madre adulta* es generalmente una célula multipotente indiferenciada que se encuentra en el tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre del adulto puede renovarse. Bajo circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir los tipos de células especializadas del tejido del que se originó, y posiblemente otros tipos de tejidos. Una *célula madre embrionaria* es una célula pluripotente de la masa celular interna de un embrión en fase de blastocisto. Una célula madre *fetal* es una que se origina a partir de tejidos o membranas fetales. Una *célula madre de posparto* es una célula multipotente o pluripotente que se origina sustancialmente a partir del tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, a saber, la placenta y el cordón umbilical. Se ha descubierto que estas células poseen elementos característicos de las células madre pluripotentes, incluyendo la proliferación rápida y el potencial de diferenciación en muchos linajes celulares. Las células madre de posparto pueden derivarse de la sangre (por ejemplo, las que se obtienen de la sangre del cordón umbilical) o no derivadas de la sangre (por ejemplo, obtenidas de los tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y la placenta).

**[0057]** *El tejido embrionario* se define típicamente como el tejido procedente del embrión (el cual en los seres humanos se refiere al período desde la fertilización hasta alrededor de seis semanas de desarrollo). *El tejido fetal* se refiere al tejido procedente del feto, que en los seres humanos se refiere al período de aproximadamente seis semanas de desarrollo a parto. *El tejido extraembrionario* es el tejido asociado con, pero sin originarse en el embrión o el feto. Los tejidos extraembrionarios incluyen membranas extraembrionarias (corion, amnios, saco vitelino y alantoides), cordón umbilical y la placenta (que en sí se forma a partir de corión y la decidua basalis materna).

**[0058]** *La diferenciación* es el proceso por el cual una célula ("no comprometida") o menos especializada de células no especializadas adquiere las características de una célula especializada, como por ejemplo una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula *diferenciada* es una que ha adoptado una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término *cometido*, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha procedido en la vía de diferenciación a un punto en el que, en circunstancias normales, continuará para diferenciarse en un tipo celular específico o un subconjunto de tipos de células, y no puede, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo celular diferente o volver a un tipo celular menos diferenciado. *De-diferenciación* se refiere al proceso por el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se usa en el presente documento, el *linaje* de una célula define la heredabilidad de la célula, es decir, las células de las que procede y las células a las que puede dar lugar. El linaje de una célula sitúa a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

**[0059]** En un sentido amplio, una *célula progenitora* es una célula que tiene la capacidad de crear una progenie que es más diferenciada que ella, y sin embargo, conserva la capacidad para reponer el depósito de los progenitores. Según esta definición, las células madre también son células progenitoras, que son los precursores más inmediatos a las células terminalmente diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente descripción, como se describe en mayor detalle a continuación, esta amplia definición de *células progenitoras* se puede utilizar. En un sentido más estricto, una célula progenitora se define a menudo como una célula que es intermedia en la vía de diferenciación, es decir, que surge de una célula madre y es intermedia en la producción de un tipo de célula madura o subconjunto de tipos de células. Este tipo de células progenitoras en general, no es capaz de auto-renovación. Por consiguiente, si se refiere a este tipo de célula en el presente documento, se refiere a ella como una *célula progenitora no renovable* o como un *progenitor intermedio* o *célula precursora*.

**[0060]** Tal como se utiliza aquí, la expresión *se diferencia en un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico* se refiere a una célula que se encuentra comprometida en un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico específico, respectivamente. Ejemplos de células que se diferencian en un linaje mesodérmico o dan lugar a células mesodérmicas específicas incluyen, pero no se limitan a, células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, hemangiogénicas, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas, o estromales. Ejemplos de células que se diferencian en linaje ectodérmico incluyen, pero no se limitan a las células epidérmicas, células neurogénicas, y células neurogliogénicas. Ejemplos de células que se diferencian en linaje endodérmico incluyen, pero no se limitan a, células pleurigénicas, células hepatogénicas, células que dan lugar a la mucosa del intestino, y células que dan lugar a células pancreogénicas y esplanhogénicas.

**[0061]** Las células de la presente descripción se denominan generalmente *células derivadas del cordón umbilical* (o *UDC*). También pueden a veces denominarse más generalmente en el presente documento *células derivadas del posparto* o *células de posparto* (*PPDCs*). Además, las células pueden ser descritas como células madre no embrionarias o células progenitoras no embrionarias, utilizándose este último término en el sentido amplio. El término *derivado* se usa para indicar que las células se han obtenido a partir de su fuente biológica y cultivada o de otro modo manipulada *in vitro* (por ejemplo, se cultivan en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de las células madre umbilicales y las características únicas de las células derivadas del cordón umbilical de la presente descripción se describen en detalle a continuación.

**[0062]** Varios términos se utilizan para describir las células en cultivo. *El cultivo celular* se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo condiciones controladas ("en el cultivo" o "cultivado"). Un *cultivo de células primarias* es un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo antes del primer subcultivo. Las células se *expandieron* en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en

condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, lo que resulta en una mayor población de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación de las células a veces se mide por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número. Esto se conoce como *tiempo de duplicación*.

[0063] Una *línea celular* es una población de células formadas por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se conoce como un *pase*. Cuando se subcultivan las células, se dice que se han *pasajeado*. Una población específica de células, o una línea celular, se refiere a veces o se caracteriza por el número de veces que se ha pasajeado. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha pasajeado diez veces se puede denominar cultivo *P10*. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo tras el aislamiento de células a partir del tejido, se designa *P0*. Tras el primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (*P1* o *pase 1*). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (*P2* o el *pase 2*), y así sucesivamente. Se entenderá por expertos en la técnica que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el período de pasos; por lo tanto el número de duplicaciones de la población de un cultivo es mayor que el número de pasos. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el período entre el pasaje depende de muchos factores, incluyendo pero no limitado a la densidad de siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento, y tiempo entre el pasaje.

[0064] Un *medio acondicionado* es un medio en el que una célula específica o población de células se ha cultivado, y después se retira. Cuando las células se cultivan en un medio, que pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, pero no están limitados a hormonas, citoquinas, la matriz extracelular (MEC), proteínas, vesículas, anticuerpos, y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio condicionado.

[0065] Generalmente, un *factor trófico* se define como una sustancia que promueve o al menos soporta, la supervivencia, el crecimiento, la proliferación y/o la maduración de una célula, o estimula el aumento de la actividad de una célula.

[0066] Cuando se hace referencia a las células de vertebrados en cultivo, el término *senescencia* (también *senescencia replicativa* o *senescencia celular*) se refiere a una propiedad atribuible a los cultivos celulares finitos; a saber, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de la población (a veces conocido como *límite de Hayflick*). Aunque la senescencia celular fue descrita por primera vez el uso de células similares a fibroblastos, la mayoría de tipos de células humanas normales que se pueden cultivar con éxito en el cultivo se someten a la senescencia celular. La vida útil *in vitro* de diferentes tipos de células varía, pero la vida útil máxima es típicamente menos de 100 duplicaciones de la población (este es el número de duplicaciones para todas las células en el cultivo para convertirse en senescente y por lo tanto hacer que el cultivo sea incapaz de dividirse). Senescencia no depende de tiempo cronológico, sino que se mide por el número de divisiones celulares o duplicaciones de la población de las que el cultivo ha sido objeto. Así, las células que se hicieron quiescentes mediante la eliminación de los factores de crecimiento esenciales son capaces de reanudar el crecimiento y la división cuando se re-introducen los factores de crecimiento, y después realizan el mismo número de duplicaciones como células equivalentes cultivadas continuamente. Del mismo modo, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de varios números de duplicaciones de la población y después se descongelan y se cultivan, se someten a sustancialmente el mismo número de duplicaciones como células mantenidas sin congelar en cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; en realidad son resistentes a la muerte celular programada (apoptosis), y se han mantenido en su estado de no división durante hasta tres años. Estas células están muy vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. El estado de no división de células senescentes todavía no se ha demostrado reversible por cualquier agente biológico, químico, o viral.

[0067] Tal como se utiliza aquí, el término *medio de crecimiento* se refiere en general a un medio suficiente para el cultivo de células derivadas del cordón umbilical. En particular, un medio actualmente preferido para el cultivo de las células de la presente descripción comprende Medio Esencial Modificado de Dulbecco (también abreviado a *DMEM* en este documento). Particularmente preferido es *DMEM-baja glucosa* (también *DMEM-LG* en el presente documento) (Invitrogen, Carlsbad, CA). *DMEM-baja glucosa* se complementa preferiblemente con 15% (v/v) de suero bovino fetal (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan UT), antibióticos/antimicóticos (preferiblemente de penicilina (100 unidades/mililitro), estreptomycin (100 miligramos/mililitro), y anfotericina B (0,25 microgramos/mililitro), (Invitrogen, Carlsbad, CA)), y 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). En algunos casos se utilizan diferentes medios de crecimiento, o se describen diferentes supplementations, y estos normalmente se indican en el texto como auxiliares a, o deleciones del medio de crecimiento.

[0068] En otras realizaciones, el medio de crecimiento no es suplementado con suero, y más preferiblemente el medio no está suplementado con cualquier material de proteína de origen animal. Esto se prefiere en la actualidad, por ejemplo, para el cultivo de células para usos clínicos o preclínicos. Tales medios que carecen de suero, e incluso más preferiblemente que carecen de cualquier suplementación de la proteína animal, pueden utilizarse tanto para el aislamiento como el crecimiento de las células de acuerdo con la presente invención.

[0069] También en relación con la presente invención, el término *condiciones de crecimiento estándar*, tal como se utiliza aquí se refiere al cultivo de células a 37°C, en una *atmósfera estándar* que comprende 5% de CO<sub>2</sub>. La humedad relativa se mantuvo a aproximadamente 100%. Si bien las condiciones anteriores son útiles para el cultivo, es de entenderse que tales condiciones son capaces de variarse por el experto en la técnica quien apreciará las opciones disponibles en la técnica para el cultivo de células, por ejemplo, variando la temperatura, CO<sub>2</sub>, rotación o agitación, humedad relativa, oxígeno, medio de crecimiento, y similares.

[0070] Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento:

ANG2 (o *Ang2*) para angiopoyetina 2;



APC para las células presentadoras de antígeno;  
 BDNF para el factor neurotrófico derivado del cerebro;  
 bFGF para el factor de crecimiento de fibroblastos básicos;  
 bid (o BID) para "bis in die" (dos veces por día);  
 5 BME para mercaptoetanol beta (o 2-mercaptoetanol);  
 BSP para sialoproteína ósea;  
 CK18 para citoqueratina 18;  
 CXC *ligando* 3 para el ligando del receptor de quimioquinas 3;  
 DAPI para 4'-6-diamidino-2-fenilindol-2-HCl  
 10 DMEM para medio esencial mínimo de Dulbecco; también se utiliza aquí como sinónimo de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco. El experto en la técnica apreciará que la composición es la misma por cualquiera de los nombres.  
 DMEM: Ig (o DMEM: Lg, DMEM: LG) para DMEM con bajo nivel de glucosa;  
 EDTA para ácido etilendiaminetetraacético;  
 15 EGF para el factor de crecimiento epidérmico;  
 ERG para electroretmalgram;  
 FACS para clasificación celular activada fluorescente;  
 FBS para suero bovino fetal;  
 FCS, suero de ternero fetal;  
 20 GCP-2 para proteína quimiotáctica de granulocitos 2;  
 GFAP para la proteína ácida fibrilar glial;  
 HB-EGF para el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina;  
 HCAEC para las células endoteliales de arteria coronaria humana;  
 HGF para el factor de crecimiento de hepatocitos;  
 25 hMSC para las células madre mesenquimáticas humanas;  
 HNF-1 *alfa* para el factor de transcripción específica de hepatocitos;  
 HUVEC para las células endoteliales de la vena umbilical humana;  
 I309 para una quimioquina y el ligando para el receptor de CCR8 y es responsable de la quimioatracción de células TH2 de tipo T. I309 se une a las células endoteliales, estimula la quimiotaxis y la invasión de estas células, y mejora la diferenciación HUVEC en estructuras similares a capilares en un ensayo *in vitro* de Matrigel. Además, I309 es un inductor de la angiogénesis *in vivo*, tanto en la córnea de conejo como el ensayo de membrana corioalantoica de pollo (CAM).  
 30 IL-6 para la interleucina-6;  
 IL-8 para la interleucina-8;  
 35 K19 para la queratina 19;  
 K8 para la queratina 8;  
 KGF para el factor de crecimiento de queratinocitos;  
 MCP-1 para proteína quimiotáctica de monocitos 1;  
 MDC para quimiocina derivada de macrófagos;  
 40 MIP1 $\alpha$  para proteína inflamatoria de macrófagos 1  $\alpha$ ;  
 MIP1 $\beta$  para proteína inflamatoria de macrófagos 1  $\beta$ ;  
 MSC para las células madre mesenquimáticas;  
 NHDF para los fibroblastos dérmicos humanos normales;  
 NPE para los medios de expansión progenitores neurales;  
 45 PBMC de células mononucleares de sangre periférica;  
 PBS para solución salina tamponada con fosfato;  
 PDGF $\beta$  para el factor de crecimiento derivado de plaquetas;  
 PDGF $\alpha$  para derivado de plaquetas alfa del receptor del factor de crecimiento;  
 PD-L2 para el ligando de muerte programada 2;  
 50 PE para ficoeritrina  
 PO para "per os" (por la boca);  
 PPDC para la célula derivada del posparto;  
 Rantes (o RANTES) para regulado en activación, células T normales expresadas y secretadas;  
 rhGDF-5 para el crecimiento humano recombinante y factor de diferenciación 5;  
 55 SC para vía subcutánea;  
 SDF-1 $\alpha$  para el factor derivado del estroma 1  $\alpha$ ;  
 SHH para el erizo sónico;  
 SOP para el procedimiento operativo estándar;  
 TARC para el timo y la quimiocina regulada por activación;  
 60 TCP para el plástico de cultivo de tejidos;  
 TGFB $\beta$ 2 para factor de crecimiento transformante beta 2;  
 TGFB $\beta$ 3 para la transformación del factor de crecimiento beta-3;  
 TIMP1 para el tejido inhibidor de la metaloproteinasas de matriz 1;  
 TPO para trombopoyetina;  
 65 TuJ1 para BIII tubulina;  
 UDC para la célula derivada del cordón umbilical;

VEGF para el factor de crecimiento endotelial vascular;  
 vWF para el factor de von Willebrand;  
 alphaFP para alfa-fetoproteína;

## 5 Descripción

- [0071] En un primer aspecto, la divulgación proporciona células aisladas derivadas del cordón umbilical que comprenden células derivadas de tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo. Las células derivadas del cordón umbilical tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. En realizaciones preferidas, las células pueden diferenciarse en cualquier célula de origen ectodérmico, mesodérmico o endodérmico. La descripción proporciona, en una de sus células de varios aspectos que se aíslan de los tejidos umbilicales humanos. Las células, como se describe en el presente documento, preferiblemente no se derivan de la sangre del cordón umbilical. Tampoco son células endoteliales derivadas de, por ejemplo, los vasos sanguíneos. Más bien, las células se derivan de los tejidos de cordón umbilical restantes.
- [0072] Las células se han caracterizado en relación a varias de sus propiedades celulares, genéticas, inmunológicas, y bioquímicas. Por ejemplo, las células han sido bien caracterizadas por sus marcadores de superficie celular, por su expresión génica, por su capacidad de producir ciertos factores tróficos bioquímicos, y por sus propiedades inmunológicas.
- [0073] En otro de sus varios aspectos, se describen cultivos de células que comprenden las células aisladas derivadas del cordón umbilical de la divulgación. Los cultivos están libres de células maternas en realizaciones preferidas del presente documento. También se prefieren las células que tienen un cariotipo normal, y aquellas que mantienen su cariotipo mientras que se pasan. Más altamente preferidas son aquellas células que tengan y mantengan un cariotipo normal durante el pasaje hasta al menos después de la senescencia.
- [0074] Se proporcionan métodos de cultivo y expansión de células derivadas del cordón umbilical y cultivos de células que los comprenden. Actualmente se prefieren células que no requieren factores de crecimiento añadidos, sino más bien, son capaces de expansión en muchos medios de cultivo disponibles, especialmente aquellos suplementados con, por ejemplo, suero bovino fetal. Los medios preferidos para el cultivo y la expansión de las células incluyen Medio de Crecimiento, que se define en el presente documento como medio que comprende Medio Esencial Modificado de Dulbecco (también abreviado a *DMEM en el presente documento*). Se prefiere DMEM-baja glucosa (también *DMEM-LG en el presente documento*) (Invitrogen, Carlsbad, CA). DMEM-baja glucosa se complementa lo más preferiblemente con 15% (v/v) de suero bovino fetal (por ejemplo, suero fetal bovino definido, Hyclone, Logan UT), antibióticos/antimicóticos (preferiblemente de penicilina en 100 Unidades/mililitro, estreptomycin a 100 microgramos/mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro; (Invitrogen, Carlsbad, CA)), y 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO).
- [0075] El experto en la técnica apreciará que el medio de crecimiento puede complementarse diversamente y alterarse de cualquiera de las maneras conocidas en la técnica, y puede optimizarse por razones particulares. También se prefiere, ya sea para el aislamiento de células a partir de tejido posparto o para el crecimiento y el cultivo de las células, aquellos medios que carecen de cualquier suero añadido, y aquellos medios que son libres de suero y proteínas animales libres. Tales medios son particularmente preferidos para usos en el aislamiento o el cultivo de células para el uso preclínico o clínico. También son útiles los medios que carecen de beta-mercaptoetanol como aditivo. Además, las células son capaces de crecer en muchos otros medios de cultivo, incluyendo medios definidos químicamente en ausencia de suero añadido. Varios de estos medios se ejemplifican a continuación. Además de cultivo de rutina y mantenimiento de las células, muchos otros medios de comunicación son conocidos en la técnica para afectar la diferenciación de tales células potentes en tipos específicos de células o progenitores de células específicas. El experto en la técnica apreciará que estos medios son útiles para muchos propósitos, y se incluyen dentro del alcance de la descripción, pero no son necesariamente los preferidos para el cultivo de rutina y de expansión.
- [0076] Además de la flexibilidad de las células con respecto al cultivo de medio, las células pueden crecer bajo una variedad de condiciones ambientales. En particular, las células pueden crecer bajo una amplia gama de condiciones atmosféricas. Actualmente se prefieren atmósferas que van desde aproximadamente un 5% de O<sub>2</sub> a aproximadamente 20% o más O<sub>2</sub>. Las células crecen y se expanden bien en medio de crecimiento en estas condiciones, típicamente en presencia de aproximadamente 5% de CO<sub>2</sub> y el equilibrio de la atmósfera como nitrógeno. El experto en la técnica apreciará que las células pueden tolerar intervalos más amplios de condiciones en diferentes medios de comunicación, y que la optimización para fines específicos puede ser apropiada.
- [0077] Aunque las células no han demostrado los requisitos para factores de crecimiento específicos, las células han demostrado un requisito para L-valina sobre D-valina. Por lo tanto medios de cultivo preferidos deben tener L-isómero de este aminoácido presente. Además de la flexibilidad demostrada de las células con respecto a sus requisitos de crecimiento, se prefieren las células aisladas que pueden unirse y expandirse ya sea en un recipiente de cultivo de tejidos revestido o no revestido. Recipientes de cultivo de tejidos incluyen placas, frascos, tubos y similares, hechos de cualquiera de los materiales conocidos en la técnica - por ejemplo, plástico, poliestireno, vidrio. Tales recipientes, donde se recubren, están recubiertos con cualquiera de una variedad de compuestos como se conocen en la técnica. Vasos recubiertos actualmente preferidos comprenden un recubrimiento con gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, polilisina, vitronectina, o fibronectina, por ejemplo.
- [0078] Las células aisladas de la divulgación también se expanden preferiblemente en presencia de aproximadamente 2% a aproximadamente 15% de suero, preferiblemente de suero bovino fetal, y más

preferiblemente Suero Bovino Fetal definido.

[0079]. Las células también se expanden en presencia o ausencia de beta-mercaptoetanol, y en presencia o ausencia de factores de crecimiento añadidos incluyendo uno o más de EGF, bFGF, PDGF, VEGF, IGF-I, y LIF. El experto en la técnica apreciará que estos requisitos de crecimiento flexibles permiten muchas opciones cuando se cultiva o se trabaja con estas células. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en DMEM avanzada (Gibco) que contiene uno cualquiera de los factores de crecimiento mencionados anteriormente, en particular bFGF. Como se describió anteriormente, mientras que en la actualidad se prefiere el medio de crecimiento, no hay requerimiento absoluto para el suero; el crecimiento se ha logrado en medio libre de suero.

[0080] Las células también pueden cultivarse como cultivos dependientes de adjunto sobre una variedad de superficies. Actualmente se prefieren superficies tratadas con gelatina, más preferiblemente CELLBIND donde se requieren cultivos completamente libres de proteína animal. Otros revestimientos son compatibles con crecimiento de cultivos de fijación dependiente tales como los descritos en el presente documento.

[0081] En una realización preferida, las células tienen excelente potencial de duplicación y de expansión y son adecuadas para su uso en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas debido a que sus números se pueden ampliar fácilmente. Las células aisladas preferentemente pueden duplicarse suficientemente para generar rendimientos de más de aproximadamente  $10^{14}$  células en menos de aproximadamente 80 días en cultivo cuando se sembraron a aproximadamente  $10^3$  células/cm<sup>2</sup> en un medio adecuado. Más preferidas son las células que pueden doblarse suficientemente para generar más de aproximadamente  $10^{15}$  células en menos de aproximadamente 80 días en cultivo cuando se sembraron a aproximadamente 5000 células/cm<sup>2</sup>. Aún más preferida es la célula aislada que puede doblarse suficientemente para generar más de aproximadamente  $10^{17}$  células en menos de aproximadamente 65 días en cultivo cuando se sembraron a aproximadamente 5000 células/cm<sup>2</sup>.

[0082] Las células aisladas de la divulgación pueden someterse a extensas duplicaciones. Preferiblemente, las células se someten a al menos 30 duplicaciones antes de llegar a la senescencia. Más preferiblemente, al menos 40 duplicaciones en cultivo son alcanzables. Aún más preferibles son aquellas células que pueden alcanzar más de 40 duplicaciones antes de convertirse en senescentes. Las células de la invención son preferiblemente capaces de someterse a la división en un período de tiempo más largo, que son, por ejemplo, células humanas mesenquimatosas, o fibroblastos humanos, cultivados en las mismas condiciones.

[0083] En una realización, las células del cordón umbilical están aisladas en presencia de dos o más actividades de la enzima seleccionada de metaloproteasa, proteasa neutra y actividades enzimáticas mucolíticas. Una amplia gama de enzimas digestivas para su uso en el aislamiento de células a partir de tejido es conocida en la técnica, incluyendo las enzimas que van desde las que se consideran débilmente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina). Actualmente se prefieren actividades mucolíticas enzimáticas, metaloproteasas, proteasas neutras, proteasas de serina (tales como tripsina, quimotripsina, o elastasa), y desoxirribonucleasas. Más preferidas son actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Actualmente preferidas son células que se aíslan en presencia de dos o más actividades de la colagenasa, hialuronidasa y dispasa. Más preferidas son aquellas células aisladas en presencia de una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de la proteasa, dispasa y termolisina. Aún más preferidas son células aisladas con actividades enzimáticas de colagenasa y dispasa. También se prefieren tales células aisladas en presencia de una actividad de hialuronidasa, además de actividad de colagenasa y dispasa.

[0084] En otro aspecto de la descripción, se describen células aisladas derivadas del cordón umbilical que tienen perfiles de expresión de marcador específico de superficie celular. Las células preferidas se caracterizan, ya sea en su producción o falta de producción por uno o más marcadores de superficie celular seleccionados de CD10, CD13, CD31, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, CD141, PDGFR-alfa, HLA-A, B, C y HL-DR, DP, DQ. Más preferidas son células que se caracterizan con respecto a su producción, o la falta de la misma, de varios (por ejemplo, dos, cuatro, cinco, u ocho), o incluso diez de, o todos los anteriores, para proporcionar un perfil de la célula. En realizaciones preferidas, las células producen una o más de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, o HLA-A, B, C. Más preferidas son las células que expresan varios o todos los marcadores anteriores. Aún más preferidas son las células que expresan cada una de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, y HLA-A, B, C.

[0085] Las células preferidas también pueden caracterizarse con respecto a los marcadores que no producen, y dicha información también es útil en la formación de una caracterización o perfil inmunológico de la célula. Preferiblemente, las células no producen una o más de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, como se detecta por citometría de flujo. Más preferidas son las células que no producen varias o más de las anteriores. Aún más preferidas son las células para las que la producción de cualquiera de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ puede detectarse por citometría de flujo en las condiciones descritas en la presente memoria.

[0086] En otras realizaciones preferidas, las células pueden ser mostradas para producir varias o más de las CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, y HLA-A, B, C y concomitantemente no producen una o varias, o más de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ como se detecta por citometría de flujo. Más altamente preferidas son las células que producen cada una de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, y HLA-A, B, C y concomitantemente no producen cualquiera de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA DR, DP, DQ como se detectó por citometría de flujo.

[0087] Tales células son altamente caracterizadas con respecto a su producción de estas proteínas de la superficie celular. En realizaciones preferidas, la caracterización de las células con respecto a dicha producción permanece sustancialmente constante y no cambia sustancialmente con variaciones en el procedimiento de aislamiento, paso, condiciones de cultivo, o incluso el recubrimiento o falta de él en un recipiente de cultivo de tejidos.

**[0088]** Las células de la divulgación también se han caracterizado de acuerdo con su expresión de una amplia variedad de genes. Por consiguiente, otro aspecto de la divulgación proporciona células aisladas derivadas de cordón umbilical humano, que se caracteriza, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosas, o una célula de médula ósea de cresta iliaca, en su expresión de genes para: homeobox de baja estatura 2; proteína de choque térmico 27 kDa 2; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina (estenosis aórtica supraaórtica, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox mesénquimo 2 (homeobox de crecimiento detenido específico); sine oculis homeobox homólogo 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado desaliñado de morfogenesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionados con runt 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno de C-endopeptidasa; 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; *Homo sapiens* ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor de citoquina de tipo receptor 1; canal de calcio activado intermedio de potasio/pequeña conductancia, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ-(TAZ); sine oculis de homeobox homólogo 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa de aldo-ceto 1, miembro de C3 (3-alfa deshidrogenasa de hidroxisteroide, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, de tipo beta 1 (dominios de repetición de tipo EGF); *Homo sapiens* ARNm de inserto de longitud completa de ADNc del clon EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); proteína asociada a vesículas de membrana 5 (miobrevina); EGF que contiene proteína de la matriz extracelular de tipo fibulina 1; BCL2/adenovirus E1B 19kDa proteína de interacción de tipo 3; proteína de unión AE 1; subunidad VIIa de oxidasa de citocromo c polipeptídica 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36kDa; así como la interleucina 8; reticulon 1; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora de crecimiento de melanoma, alfa); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3; y el factor de necrosis tumoral, alfa inducido por la proteína 3.

**[0089]** En una realización, las células preferidas tienen la caracterización de marcador de superficie celular descrito anteriormente y se caracteriza además en su expresión génica relativa. Por ejemplo, algunas células preferidas tienen la caracterización de superficie de célula descrita anteriormente y expresan un gen para una o más de interleucina 8; reticulon 1; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora de crecimiento de melanoma, alfa); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3; o factor de necrosis tumoral, proteína inducida alfa 3. Más preferidas son las células que expresan un gen para varias, (por ejemplo, al menos dos, cuatro, cinco o más) de cada una de las anteriores. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. También se describen cultivos de células terapéuticas que comprenden las células aisladas derivadas del cordón umbilical humano.

**[0090]** También se describen los UDC que comprenden la caracterización de marcador de superficie celular y que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosas, o una célula de médula ósea de cresta iliaca, han reducido la expresión de uno o más genes seleccionados de: homeobox de corta estatura 2; proteína de choque térmico 27 kDa 2; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina (estenosis aórtica supraaórtica, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox mesénquimo 2 (homeobox de detención de crecimiento específico); sine oculis homeobox homólogo 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador desaliñado asociado a morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; gen de translocación de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionada con runt 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno de C-endopeptidasa; 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; *Homo sapiens* ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor similar a receptor de citoquina 1; canal de calcio activado intermedio de potasio/pequeña conductancia, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ-(TAZ); sine oculis homeobox homólogo 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa de aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa de hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; 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 (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); proteína asociada a vesículas de membrana 5 (miobrevina); EGF que contiene proteína de la matriz extracelular de tipo fibulina 1; BCL2/adenovirus E1B 19 kDa proteína de interacción similar a 3; proteína de unión AE 1; subunidad VIIa polipeptídica de oxidasa de citocromo c 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión similar a factor de crecimiento de tipo insulina 2, 36 kDa. Se prefieren las células que han reducido la expresión de un gen para varias (por ejemplo, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más, o incluso la totalidad) de las anteriores.

**[0091]** Aún más altamente preferidas son las células que tienen la caracterización de marcador de superficie celular como se describe aquí anteriormente y que también expresan un gen para cada uno de interleucina 8; reticulon 1; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora de crecimiento de melanoma, alfa); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (granulocitos); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3; o factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3, y que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosas, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, han reducido la expresión de uno o más genes seleccionados de: homeobox de estatura corta 2; proteína de choque térmico 27 kDa 2; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina (estenosis aórtica supra-avalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox mesénquimo 2 (homeobox de detención específica de crecimiento); sine oculis homeobox homólogo 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador desaliñado asociado a morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; translocación de gen de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno de C-endopeptidasa; 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; *Homo sapiens* ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor de tipo receptor de citoquina 1; canal activado por calcio de potasio intermedio/pequeña conductancia, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ-(TAZ); sine oculis de homeobox homólogo 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa de aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; 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 (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); proteína asociada a vesículas de membrana 5 (miobrevina); EGF que contienen proteína de la matriz extracelular de tipo fibulina 1; BCL2/adenovirus E1B 19 kDa proteína de interacción de tipo 3; Proteína de unión AE 1; subunidad VIIa polipeptídica de oxidasa de citocromo c 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina 2, 36 kDa.

**[0092]** En otro de sus aspectos, la divulgación proporciona células aisladas derivadas del cordón umbilical humano, que, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosas, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, han reducido la expresión de genes para cada una de: homeobox de estatura corta 2; proteína de choque térmico 27 kDa 2; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina (estenosis aórtica supra-avalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox mesénquimo 2 (homeobox de detención específica de crecimiento); sine oculis homeobox homólogo 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador desaliñado asociado a morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; translocación de gen de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno de C-endopeptidasa; 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; *Homo sapiens* ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor de tipo receptor de citoquina 1; canales de calcio activados de intermedio de potasio/pequeña conductancia, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ-(TAZ); sine oculis de homeobox homólogo 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa de aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; 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 (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); proteína asociada a vesículas de membrana 5 (miobrevina); EGF que contiene proteína de la matriz extracelular similar a fibulina 1; BCL2/adenovirus E1B 19 kDa proteína de interacción de tipo 3; proteína de unión AE 1; subunidad VIIa polipeptídica de oxidasa de citocromo c 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa; y que expresan un gen para cada uno de interleucina 8; reticulon 1; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora de crecimiento de melanoma, alfa); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3; y el factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3, en la que la expresión aumenta en relación con la de una célula humana, que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosas, una célula de médula ósea de cresta ilíaca, o célula derivada de placenta. Tales células no necesitan caracterizarse con respecto a sus marcadores de superficie celular, pero tales células preferiblemente son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y también tienen la capacidad de diferenciarse en cultivo. Las más preferidos son las células que se aíslan como células adherentes como se describe a continuación, sin embargo, tales células pueden también cultivarse después del aislamiento en una forma esférica en determinadas condiciones, por lo que no son obligatoriamente adherentes.

**[0093]** Ciertas realizaciones preferidas incluyen células como se describe anteriormente que también producen la vimentina o la actina de músculo liso-alfa. Más preferidas son las células que producen tanto vimentina como actina

de músculo liso-alfa. La producción de estas proteínas parece distinguir las células de la presente descripción a partir de células hematopoyéticas aisladas de sangre de cordón umbilical, por ejemplo.

**[0094]** En realizaciones preferidas, los perfiles de expresión génica anteriores son sustancialmente estables y no varían con los pasos o condiciones normales de cultivo. Por supuesto, se entiende que un perfil de este tipo puede variar cuando se cultivan las células en condiciones que estimulan o inducen la diferenciación en otros fenotipos, por ejemplo, o la expresión de un conjunto diferente de genes.

**[0095]** La descripción también proporciona cultivos de células terapéuticas que comprenden la célula que tiene la producción de la superficie celular o perfiles de expresión de genes, o ambos, como se describe anteriormente. Bancos de células que comprenden los cultivos terapéuticos están igualmente incluidos con el alcance de la descripción. Por ejemplo, un banco de células puede incluir células cultivadas de la divulgación en varios pasajes, así como las células de la descripción que han sido inducidas a diferenciarse a diferentes fenotipos. Otras células pueden almacenarse con éxito por separado o en co-cultivo con las células de la descripción. Un banco de células completo puede incluir las células almacenadas de una amplia variedad de individuos. En realizaciones preferidas, células almacenadas se almacenan en forma criopreservada a  $-180^{\circ}\text{C}$  por ejemplo. Las células se almacenan preferiblemente a  $-90^{\circ}\text{C}$  en algunas realizaciones. Las células de la divulgación se crioconservan fácilmente bajo una variedad de condiciones tales como las conocidas en la técnica.

**[0096]** En realizaciones preferidas, las células carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular sustancialmente linfocitos alogénicos en una reacción mixta de linfocitos. En realizaciones más preferidas, las células carecen de las moléculas de la superficie necesarias para estimular considerablemente  $\text{CD4}^{+}$  células T en evaluaciones *in vitro*, o *in vivo* en receptores de alogénico, singénico, o autólogas. Aún más preferidas son aquellas células que no causan consecuencias inmunológicas adversas sustanciales para aplicaciones *in vivo*. En algunas realizaciones de la divulgación, los cultivos de células terapéuticas carecen de cantidades detectables de al menos dos, o varios, o la totalidad de las proteínas estimulantes de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2, tal como se determina por citometría de flujo. Las que carecen de todo lo anterior son las más preferidas. También se prefieren los cultivos de células terapéuticas que carecen además de cantidades detectables de una o ambas de las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD 178, como se determina por citometría de flujo. También se prefieren los cultivos de células terapéuticas que expresan cantidades detectables de la proteína inmunomoduladora PD-L2, como se determina por citometría de flujo. En una realización, el cultivo celular terapéutico no estimula sustancialmente una respuesta mediada por linfocitos *in vitro*, en comparación con los controles alogénicas en una reacción mixta de linfocitos.

**[0097]** En otro de sus varios aspectos, la divulgación proporciona células aisladas derivadas del cordón umbilical humano capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y que tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, en el que las células no estimulan sustancialmente linfocitos alogénicos en una reacción mixta de linfocitos. Más preferidas son las células que no estimulan sustancialmente  $\text{CD4}^{+}$  células T, y que producen PD-L2, pero no una o más de HLA-G, CD178, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, o B7-H2. Las células también pueden producir la vimentina o la actina de músculo liso-alfa en ciertas realizaciones. Más preferidas son las células que producen tanto vimentina como actina de músculo liso-alfa. Aún más preferidas son aquellas células que no producen cualquiera de HLA-G, CD178, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2.

**[0098]** Las células de la descripción que secretan moléculas útiles, por ejemplo, factores de crecimiento, se prefieren actualmente. Tales células tienen utilidad no sólo para sus propiedades celulares sino por sus moléculas secretadas, por ejemplo, en medio condicionado, o lisados libres de células. En otro aspecto, la divulgación proporciona células aisladas derivadas de cordón umbilical humano que secretan uno o más de los factores angiogénicos MCP-1, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, TPO, o TIMP1. En ciertas realizaciones, las células secretan todos los factores anteriores. Las células no secretan uno o más de los factores angiogénicos SDF-1 alfa, TGF-beta2, Ang2, PDGFbb o VEGF, como se detecta por ELISA. En ciertas realizaciones que no secretan ninguna de SDF-1 alfa, TGF-beta2, ANG2, PDGFbb o VEGF, como se detecta por ELISA.

**[0099]** En otro aspecto, las células de la descripción se definen de acuerdo con una combinación de muchas de las características descritas en este documento. Por ejemplo, la divulgación proporciona células aisladas derivadas del cordón umbilical que comprenden células que requieren L-valina derivadas de tejido posparto de mamífero sustancialmente libre de sangre. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos; por ejemplo, los cardiomiocitos, o sus progenitores. Las células pueden ser aisladas a partir de tejido de cordón umbilical de cualquier mamífero de interés por las técnicas proporcionadas en este documento. Actualmente se prefieren las células humanas. Las células se pueden hacer crecer en una amplia gama de condiciones, incluyendo una amplia variedad de medios de cultivo, y condiciones ambientales. Las células se pueden cultivar al menos de aproximadamente  $35^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $39^{\circ}\text{C}$ , y, posiblemente, una gama más amplia dependiendo de otras condiciones. Las células se pueden cultivar en medios definidos químicamente, o en medio con suero de mamífero añadido, por ejemplo suero bovino fetal. Las células también toleran la criopreservación en varias etapas. Las células se pueden mantener congeladas o almacenadas a temperaturas preferiblemente en o por debajo de  $-80^{\circ}\text{C}$  durante largos períodos. Otras temperaturas preferidas varían desde aproximadamente  $-90^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-180^{\circ}\text{C}$  o por debajo. Congeladores eléctricos especializados se pueden utilizar, o las células se pueden almacenar en las fases líquidas o de vapor de nitrógeno. dió en 5 mililitros de medio dalmacenar antes del aislamiento de las células. Preferiblemente se siguen buenos procedimientos de almacenamiento, tales como los conocidos en la técnica.

**[0100]** Las células son capaces de crecimiento en atmósferas que contengan oxígeno de aproximadamente 5% a al menos aproximadamente 20% y comprenden al menos una de las siguientes características: las células tienen el potencial para al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; las células preferiblemente son adherentes,

por lo tanto se prefiere la unión y la expansión en un recipiente de cultivo de tejido revestido o no revestido, en el que un recipiente de cultivo de tejido revestido comprende un revestimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, polilisina, vitronectina, o fibronectina;

5 **[0101]** Las células producen preferiblemente al menos uno de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso-alfa; más preferidas son células que producen cada uno de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso-alfa; producción de al menos una de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C también se prefiere. Las células también se caracterizan en su falta de producción de al menos una de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR, DP, DQ, tal como se detecta por citometría de flujo; células más preferibles carecen de producción de todos estos marcadores de superficie. También preferidas son las células que expresan al menos uno de interleucina 8; reticulon 1; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora de crecimiento de melanoma, alfa); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3; y el factor de necrosis tumoral, la proteína inducida por alfa 3. Células preferidas también tienen expresión, la cual en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosas, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se reduce para al menos uno de: homeobox de corta estatura 2; proteína de choque térmico 27 kDa 2; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina (estenosis aórtica supraválvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox mesénquimo 2 (homeobox de detención específica de crecimiento); sine oculis homeobox homólogo 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador desaliñado asociado a morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; translocación de gen de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno de endopeptidasa C; 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; *Homo sapiens* ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor de tipo receptor de citoquina 1; canal de calcio activado de potasio intermedio/pequeña conductancia, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); sine oculis de homeobox homólogo 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa de aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; fibronectina 1; proencefalina; integrina, similar a beta 1 (con EGF como dominios de repetición); 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 (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); proteína asociada a vesículas de membrana 5 (miobrevina); EGF que contienen proteína de la matriz extracelular similar a fibulina 1; BCL2/adenovirus E1B 19 kDa proteína de interacción 3; proteína de unión AE 1; subunidad VIIa polipeptídica de oxidasa de citocromo c 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa; el experto en la técnica apreciará que la expresión de una amplia variedad de genes se caracteriza convenientemente en un conjunto de genes, por ejemplo en un Affymetrix GENECHIP®.

40 **[0102]** Las células segregan una variedad de factores bioquímicamente activos, tales como factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas y similares. Las células preferidas secretan al menos una de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1alpha, RANTES, y TIMP1; células preferidas pueden, alternativamente, caracterizarse por su falta de secreción de al menos una de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1beta, I309, MDC, y VEGF, como se detecta por ELISA. Estas y otras características están disponibles para identificar y caracterizar las células, y distinguir las células de la descripción de otras conocidas en la técnica.

45 **[0103]** En realizaciones preferidas de la divulgación, la célula comprende dos o más de las características anteriores. Más preferidas son aquellas que comprenden células, tres, cuatro, o cinco o más de las características. Aún más preferidas son aquellas células de posparto aisladas que comprenden seis, siete, u ocho o más de las características. Aún más preferidas actualmente son aquellas células que comprenden las nueve características reivindicadas.

50 **[0104]** También actualmente preferidas son células que producen al menos dos de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso-alfa. Más preferidas son aquellas células que producen el factor de proteínas del tejido, vimentina y actina de músculo liso-alfa.

55 **[0105]** El experto en la técnica apreciará que los marcadores de células están sujetos a variación bajo muy diferentes condiciones de crecimiento, y generalmente se describen aquí caracterizaciones en Medio de Crecimiento, o variaciones de las mismas. Células derivadas de posparto que producen de al menos una, dos, tres, o cuatro de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C son células preferidas de la divulgación. Más preferidas son aquellas células productoras de cinco, seis, o siete de estos marcadores de la superficie celular. Aún más preferidas son las células del posparto que pueden producir ocho de las proteínas marcadoras de la superficie celular anterior.

60 **[0106]** De manera similar, las células del posparto que carecen de producción de al menos una, dos, tres, o cuatro de las proteínas CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA DR, DP, DQ, detectadas por citometría de flujo son células actualmente preferidas de la divulgación. También se prefieren las células que carecen de producción de al menos cinco, seis, siete u ocho o más de estos marcadores. Más preferidas son células que carecen de producción de al menos nueve o diez de los marcadores de superficie celular. Más altamente preferidas son las células que carecen de producción de once de las proteínas de identificación

65

anteriores.

**[0107]** Las células actualmente preferidas producen cada una de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa, y HLA-A, B, C, y no producen ninguna de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA DR, DP, DQ, detectadas por citometría de flujo.

**[0108]** Actualmente, se prefiere que las células derivadas del posparto expresan al menos uno, dos o tres de interleucina 8; reticulon 1; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora de crecimiento de melanoma, alfa); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3; y el factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3. Más preferidas son aquellas células que expresan cuatro o cinco, y aún más preferidas son células capaces de expresar todos los seis de los genes anteriores.

**[0109]** Para algunas realizaciones, se prefieren células que, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, han reducido la expresión de al menos uno de los genes correspondientes a: homeobox de baja estatura 2; proteína de choque térmico 27 kDa 2; quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor derivado de células del estroma 1); elastina (estenosis aórtica supravalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022); homeobox mesénquimo 2 (homeobox de detención específica de crecimiento); sine oculis homeobox homólogo 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador desaliñado asociado a morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; translocación de gen de células B 1, anti-proliferativa; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; proteína hipotética FLJ23191; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno de C-endopeptidasa; 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; *Homo sapiens* ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor de tipo receptor de citoquina 1; canales de calcio activados de potasio intermedio /pequeña conductancia, subfamilia N, miembro 4; integrina, alfa 7; proteína DKFZP586L151; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ-(TAZ); sine oculis homeobox homólogo 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia de reductasa de aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa hidroxisteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; 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 (receptor de péptido atrionatriurético C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); proteína asociada a vesículas de membrana 5 (miobrevina); EGF que contienen proteína de la matriz extracelular similar a fibulina 1; BCL2/adenovirus E1B 19 kDa proteína de interacción 3; proteína de unión AE 1; subunidad VIIa polipeptídica de oxidasa de citocromo c 1 (músculo); neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina 2, 36 kDa. Más preferidas son células que tienen, con respecto a los fibroblastos humanos, Células madre mesenquimatosas, o células de médula ósea de la cresta ilíaca, la reducción de expresión de al menos 5, 10, 15 o 20 genes que corresponden a los enumerados anteriormente. Actualmente más preferidas son células con expresión reducida de al menos 25, 30, o 35 de los genes correspondientes a las secuencias enumeradas. También son más preferidas aquellas células derivadas del posparto que tienen la expresión que se reduce, en relación a la de un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimatosa, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, de genes que corresponden a 35 o más, 40 o más, o incluso todas las secuencias de la lista.

**[0110]** La secreción de ciertos factores de crecimiento y otras proteínas celulares pueden hacer que las células de la divulgación sean particularmente útiles. Células derivadas del posparto preferidas secretan al menos una, dos, tres o cuatro de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES, y TIMP1. Las células que secretan más de cinco, seis, siete u ocho de las proteínas enumeradas son también útiles y preferidas. Las células que pueden secretar al menos nueve, diez, once o más de los factores son más preferidos, como lo son las células que pueden secretar doce o más, o incluso la totalidad de trece de las proteínas en la lista anterior.

**[0111]** Mientras que la secreción de estos factores es útil, las células pueden también caracterizarse por su falta de secreción de factores en el medio. Las células derivadas del cordón umbilical que carecen de la secreción de al menos una, dos, tres o cuatro de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1beta, I309, MDC, y VEGF, como se detecta por ELISA, se prefieren actualmente para su uso. Las células que se caracterizan en su falta de secreción de cinco o seis de las proteínas anteriores son más preferidas. También se prefieren las células que carecen de secreción de los siete de los factores enumerados anteriormente.

**[0112]** En otro aspecto de la descripción, se describen cultivos celulares terapéuticos, comprendiendo los cultivos de células las células aisladas como se ha descrito anteriormente para uso en el tratamiento de pacientes en necesidad de factores tróficos estimuladores de angiogénesis. También se describen tales cultivos de células terapéuticas para su uso en el tratamiento de un paciente en necesidad de factores tróficos estimuladores de crecimiento neural.

**[0113]** Se proporcionan métodos de derivar las UDC de tejido umbilical humano. Las células son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, y tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos. El método comprende (a) la obtención de tejido umbilical humano; (b) la eliminación sustancial de toda la sangre para producir un tejido sustancialmente libre de sangre umbilical, (c) la disociación del tejido mediante un tratamiento mecánico o enzimático, o ambos, (d) la resuspensión del tejido en un medio de cultivo, y (e) la proporción de condiciones de crecimiento que permiten el crecimiento de una célula derivada de cordón umbilical humano capaz de auto-renovación y expansión en cultivo y que tiene el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos.

**[0114]** El tejido se puede obtener de cualquier embarazo completado, a término o menos que a término, ya sea por



vía vaginal, o a través de otras rutas, por ejemplo cesárea quirúrgica. La obtención del ejido de los bancos de tejidos también se considera dentro del alcance de la presente invención.

**[0115]** El tejido se vuelve sustancialmente libre de sangre por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la sangre se puede retirar físicamente por lavado, enjuague, y dilución y similares, antes o después de la eliminación de sangre mayor, por ejemplo, por aspiración o drenaje. Otros medios de obtención de un tejido sustancialmente libre de células de la sangre podrían incluir tratamiento enzimático o químico.

**[0116]** La disociación de los tejidos umbilicales se puede lograr por cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo por disrupción mecánica, por ejemplo, el tejido puede cortarse asépticamente con tijeras o un escalpelo, o tal tejido puede picarse de otro modo, mezclarse, o homogeneizarse en cualquier forma que sea compatible con la recuperación de células intactas o viables a partir de tejido humano.

**[0117]** En una realización actualmente preferida, el procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. Muchas enzimas son conocidas en la técnica por ser útiles para el aislamiento de células individuales a partir de matrices de tejidos complejos para facilitar el crecimiento en cultivo. Como se discutió anteriormente, una amplia gama de enzimas digestivas para su uso en el aislamiento de células a partir de tejido está disponible para el experto en la técnica. Van desde débilmente digestivos (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) fuertemente digestivos (por ejemplo, papaína y tripsina), tales enzimas están disponibles comercialmente. Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles incluyen actividades enzimáticas mucolíticas,

metaloproteasas, proteasas neutras, proteasas de serina (tales como tripsina, quimotripsina, o elastasa), y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren dos o más actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, colagenasas son conocidas por ser útiles para aislar diversas células de los tejidos. Deoxirribonucleasas pueden digerir el ADN de una sola hebra y pueden minimizar aglutinación de células durante el aislamiento. Proteasas neutras pueden utilizarse solas o en combinación. Proteasas de serina se utilizan preferiblemente en una secuencia tras el uso de otras enzimas, ya que pueden degradar las otras enzimas que se utilizan. La temperatura y tiempo de contacto con las proteasas de serina deben monitorearse. Las proteasas de serina pueden inhibirse con microglobulina alfa 2 en suero y por lo tanto el medio utilizado para la digestión es preferiblemente libre de suero. EDTA y ADNasa se utilizan comúnmente y pueden mejorar los rendimientos o eficiencias. Los métodos preferidos implican el tratamiento enzimático con por ejemplo colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa y hialuronidasa, y tales métodos se proporcionan en los que en ciertas realizaciones preferidas, una mezcla de colagenasa y la dispasa de proteasa neutra se utilizan en la etapa de disociación. Más preferidos son aquellos métodos que emplean la digestión en presencia de al menos una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de la proteasa, dispasa y termolisina. Aún más preferidos son los métodos que emplean la digestión tanto con dispasa como actividades enzimáticas de colagenasa. También se prefieren los métodos que incluyen digestión con una actividad de hialuronidasa además de actividades colagenasa y dispasa. El experto en la técnica apreciará que muchos de tales tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para el aislamiento de células de diversas fuentes de tejido. Por ejemplo, la serie LIBERASE Blendzyme (Roche) de combinaciones de enzimas son muy útiles y se pueden usar 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 está bien preparado para evaluar enzimas nuevas, o combinaciones de enzimas adicionales para su utilidad en el aislamiento de las células de la divulgación. Tratamientos enzimáticos preferidos son 0,5, 1, 1,5, o 2 horas de duración o más. En otras realizaciones preferidas, se incuba el tejido a 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disociación. La dilución de la digestión también puede mejorar los rendimientos de células ya que las células pueden ser atrapadas dentro de un digesto viscoso.

**[0118]** Al preferirse actualmente el uso de las actividades enzimáticas, no es necesario para un método de aislamiento como se describe aquí. Los métodos basados en la separación mecánica solo pueden tener éxito en el aislamiento de las células instantáneas desde el ombligo como se discutió anteriormente.

**[0119]** Las células pueden resuspenderse después de que el tejido se disocia en cualquier medio de cultivo como se ha discutido anteriormente en este documento. Las células pueden resuspenderse después de una etapa de centrifugación para separar las células a partir de tejido u otros residuos. La resuspensión puede implicar métodos mecánicos de resuspensión, o simplemente la adición de medio de cultivo a las células.

**[0120]** La proporción de las condiciones de crecimiento permite una amplia gama de opciones en cuanto a medio de cultivo, los suplementos, las condiciones atmosféricas, y la humedad relativa para las células. Una temperatura preferida es 37°C, sin embargo, la temperatura puede variar de aproximadamente 35°C a 39°C en función de las otras condiciones de cultivo y uso deseado de las células o cultivo.

**[0121]** Actualmente se prefieren los métodos que proporcionan las células que no requieren factores de crecimiento exógenos, excepto como se dispone en el suero suplementario provisto con el medio de crecimiento. También se proporcionan en este documento métodos de derivar células del cordón umbilical capaces de expansión en ausencia de determinados factores de crecimiento. Los métodos son similares al método anterior, sin embargo, requieren que los factores de crecimiento particulares (para los que las células no tienen ningún requisito) estén ausente en el medio de cultivo en el que las células en última instancia se resuspendieron y se cultivaron. En este sentido, el método es selectivo para aquellas células capaces de división en ausencia de los factores de crecimiento particulares. Las células preferidas en algunas realizaciones son capaces de crecimiento y expansión en medio de crecimiento químicamente definido sin suero añadido. En tales casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que se pueden añadir al medio para apoyar y sostener las células. Factores actualmente preferidos que se añaden para el crecimiento en medios libres de suero incluyen una o más de FGF, EGF, IGF, y PDGF. En

realizaciones más preferidas, dos, tres o cuatro de los factores se añaden a medios libres o químicamente definidos de suero. En otras realizaciones, se añade Lif a medio libre de suero para apoyar o mejorar el crecimiento de las células.

**[0122]** También se proporcionan procedimientos en los que las células se pueden expandir en presencia de aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de oxígeno en su atmósfera. Los métodos para obtener células que requieren L-valina requieren que las células se cultivaran en presencia de L-valina. Después de obtenerse una célula, su necesidad de L-valina puede examinarse y confirmarse por el crecimiento en D-valina que contiene el medio que carece de L-isómero.

**[0123]** Se proporcionan métodos en los que las células pueden someterse a al menos 25, 30, 35, o 40 duplicaciones antes de alcanzar un estado senescente. Se proporcionan métodos para derivar células capaces de duplicarse para llegar a  $10^{14}$  células o más. Preferidos son los métodos que derivan células que pueden doblarse suficientemente para producir al menos aproximadamente  $10^{14}$ ,  $10^{15}$ ,  $10^{16}$ , o  $10^{17}$  o más células cuando se sembraron a desde aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^6$  células/cm<sup>2</sup> en cultivo. Preferiblemente, estos números de células se producen dentro de 80, 70, o 60 días o menos.

**[0124]** También se describen en el presente documento células aisladas derivadas de cordón umbilical humano derivadas del método anterior. Las células mantienen un cariotipo normal consistente a pesar de pasos repetidos en ciertas realizaciones. También se describen los cultivos de células derivadas del cordón umbilical humano derivadas por el método anterior, en el que los cultivos están libres de células maternas. Se describen los cultivos terapéuticos que se obtienen por los métodos de la invención.

**[0125]** Hay muchos usos para las células de la presente descripción. Por ejemplo, debido a los factores tróficos secretados por las células, que pueden ser útiles para el crecimiento, mantenimiento, soporte o similar, de otras células útiles, ya sea directamente o indirectamente. Por ejemplo, las células pueden ser usadas para hacer los medios condicionados, o pueden cocultivarse con otras células de interés, incluyendo co-cultivo directo o indirecto *ex vivo* de células destinadas a ser utilizadas terapéuticamente en un receptor autólogo. Para el co-cultivo directo, las células pueden mezclarse entre sí, mientras que para el co-cultivo indirecto, las células pueden cultivarse en compartimentos separados por membranas semipermeables que excluyen la migración celular. Por ejemplo, membranas de politetrafluoroetileno recubiertas de policarbonato, poliéster (PET), y colágeno (PTFE) de alrededor de menos de 3 micras de tamaño de poro nominal excluyen la migración celular y son útiles para tales fines. Tales membranas para sistemas de cultivo son capaces de intercambiar, por ejemplo, factores de crecimiento solubles entre las células derivadas del cordón umbilical y otro tipo de célula. Ejemplos son conocidos en la técnica y algunos están disponibles comercialmente (por ejemplo, membranas de cultivo Transwell (Corning Inc, Corning NY)).

**[0126]** También se describen en la presente invención son composiciones terapéuticas que comprenden una célula derivada del cordón umbilical y otro agente terapéutico o factor. Tales factores incluyen, pero no se limitan a, IGF, LIF, PDGF, EGF, FGF, así como agentes antitrombogénicos y antiapoptóticos. Tales composiciones terapéuticas pueden comprender además uno o más tipos de células.

**[0127]** Además de las anteriores, las composiciones derivadas de las células mismas se describen en este documento. Los lisados celulares, fracciones celulares solubles y fracciones de células de membrana enriquecida se describen en este documento. Los lisados celulares incluyen lisados en los que sustancialmente todo, y más preferiblemente todas las células han sido lisadas, por ejemplo mediante cizallamiento mecánico, el tratamiento enzimático, detergente u otro tratamiento químico, y similares, o combinaciones de los mismos. Los lisados resultantes incluyen todos los componentes de la célula y tienen muchas utilidades, por ejemplo en el apoyo o el mantenimiento del crecimiento de las células de la descripción o de otras células de interés. Además, los lisados celulares pueden servir como material de partida para la purificación o el enriquecimiento de los productos de células deseables. En realizaciones preferidas, los lisados celulares se separan adicionalmente en al menos una fracción celular soluble y una fracción de membrana celular enriquecida. Cada uno puede ser útil para fines específicos. Por ejemplo, cuando se contemplan usos *in vivo*, por ejemplo la administración por inyección, fracciones celulares solubles pueden ser particularmente útiles en la minimización de la estimulación de PBMC alogénicos. Más en particular, fracciones celulares solubles carecen preferiblemente de antígenos requeridos para estimular reacciones inmunológicas adversas, por ejemplo estimulación de linfocitos alogénicos, células T de CD4<sup>+</sup> alogénicas, o incluso células T CD4<sup>+</sup> ingenuas. Matrices extracelulares derivadas de las células, por ejemplo que comprenden membranas basales también son útiles y se describen en este documento. Tal material extracelular es útil para ensayos *in vitro*, por ejemplo, ensayos de angiogénesis. Éstos también pueden ser útiles *in vivo* como parte de un régimen terapéutico. Por ejemplo, los compuestos de la matriz extracelular son conocidos para su uso en el aumento y reparación tales como aplicaciones relacionadas con la cicatrización de heridas agudas y crónicas, o en la cirugía estética y reconstructiva. El material de matriz extracelular a menudo es útil donde las propiedades similares al colágeno son deseables. Material de la matriz extracelular es particularmente útil en la solicitud de elasticidad o viscosidad que requiere porque la matriz extracelular parece ser capaz de proporcionar estos atributos. Otra aplicación de la matriz extracelular es en combinación con un dispositivo terapéutico implantable. Las técnicas para la ruptura celular van de suaves a severas, el experto en la técnica está bien equipado para seleccionar la técnica de interrupción de la célula basada en el uso final del lisado celular así obtenido.

**[0128]** Las composiciones de la divulgación también incluyen medios de cultivo acondicionado como se describe en el presente documento. Tales medios primero se han utilizado para cultivar las células o cultivos de la divulgación, que durante el crecimiento secretan uno o más productos útiles en el medio. El medio condicionado de estas células novedosas son útiles para muchos propósitos, incluyendo, por ejemplo, el apoyo del crecimiento de otras células de mamífero en necesidad de factores de crecimiento o factores tróficos secretados en los medios de comunicación por las células y cultivos de la divulgación, y promover, por ejemplo, angiogénesis. Los medios condicionados son útiles

para los factores de crecimiento secretados que contienen, y preferiblemente los medios acondicionados de la presente descripción contienen uno o más factores de crecimiento útiles para apoyar el crecimiento de otra célula de mamífero en necesidad de tales factores de crecimiento. El uso de medios acondicionados es bien entendido por los expertos en la técnica. Sistemas de cultivo continuo para la generación de medio de cultivo condicionado se contemplan en el presente documento, y las células de la descripción son útiles para gran escala o la producción continua de productos celulares secretados tales como factores de crecimiento.

**[0129]** Preferiblemente, los medios acondicionados de la divulgación comprenden uno o más de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, o TIMP1. Más preferidos son los medios acondicionados que comprenden varios, (por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro) de los anteriores. Aún más preferidos son los que contienen muchos (por ejemplo, al menos cinco, seis, siete, ocho o más) de los factores de crecimiento mencionados. También se prefieren los medios acondicionados que comprenden moléculas secretadas adicionales de interés.

**[0130]** Otra realización de la presente divulgación proporciona un cultivo de células de mamífero que comprende el medio acondicionado y una célula de mamífero en necesidad de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, o TIMP1. El cultivo en medios acondicionados proporciona métodos indirectos de apoyo, por ejemplo, el crecimiento o mantenimiento de otras células. Por ejemplo, tales métodos indirectos proporcionan formas de expansión de las poblaciones de células de mamífero, que debido a sus requisitos de factor de crecimiento, son difíciles de expandir en cultivo en ausencia de medio acondicionado.

**[0131]** Otro aspecto de la divulgación proporciona co-cultivos que comprenden las células derivadas del cordón umbilical y otra célula de mamífero de cualquier fenotipo. Estos co-cultivos pueden comprender células de cualquier fenotipo y pueden, por ejemplo, proporcionar una manera de ampliar las poblaciones de células de mamífero, que debido a sus exigencias de factor de crecimiento son difíciles de expandir. Esta es una manera de utilizar las propiedades de las células derivadas del cordón umbilical directamente para apoyar el crecimiento de otras células. Tales co-cultivos son también de uso *in vivo* para varias aplicaciones, particularmente cuando el uso de tales células no genera una respuesta inmunológica no deseada. La presencia de las células derivadas del cordón umbilical puede alentar el establecimiento y crecimiento de células, por ejemplo en los andamios implantados, o en los sitios de reparación quirúrgica. En realizaciones preferidas, los co-cultivos comprenden una línea celular humana, además de la célula derivada del cordón umbilical. Aún más preferido sería el uso de las células en un miembro de la familia o una persona estrechamente relacionada con el donante. Aún más preferidos serían los co-cultivos para uso en el individuo del que se derivaron las células.

**[0132]** En otros aspectos de la divulgación, se describen usos de los cultivos. Por ejemplo, los cultivos de células derivadas del cordón umbilical son útiles en la promoción de la angiogénesis. También son útiles en el tratamiento de la enfermedad de tejido blando o lesión. En realizaciones preferidas, los cultivos de células terapéuticas se cultivan en un andamio o matriz. El crecimiento en el andamio o matriz o sustrato similar puede ser *in vivo*, *in vitro*, o una combinación de éstos. Para aplicación *in vivo*, el sustrato se puede aplicar quirúrgicamente, por ejemplo como una reparación de daños en los tejidos blandos. El sustrato se puede sembrar con UDC, o previamente con medio UDC acondicionado, o lisados de células o extractos celulares solubles, u otra fracción de células, incluyendo una matriz extracelular, antes del uso quirúrgico. Para aplicaciones *in vitro*, las células pueden ayudar a otras células para establecer sobre o dentro del sustrato o de sus intersticios. Por ejemplo, la piel u otro tejido blando o las capas dérmicas o subdérmicas que se puede cultivar *in vitro* en tales sustratos para su uso posterior. Para usos de combinación, una población de células se puede establecer *in vitro* en el sustrato o estructura y entonces se une quirúrgicamente, se injerta, o se implanta para el crecimiento adicional. El preestablecimiento de una población de células, en particular una que secreta factores angiogénicos puede conducir a la curación mucho más rápida. Actualmente se prefieren para tales andamios matrices no permeables, poliméricas bioabsorbibles y similares.

**[0133]** Una variedad de soportes o matrices se conocen en la técnica de la ingeniería de tejidos y la curación de heridas por ejemplo, y son útiles con las células y los métodos de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a esteras, espumas, o péptidos de automontaje. Esteras preferidas comprenden fibras no tejidas. Esterillas no tejidas pueden, por ejemplo, formarse usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se venden bajo el nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Las espumas preferidas para uso en esta invención incluyen espumas porosas, tales como las que comprenden, por ejemplo, poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), como se discute en la patente de EE.UU. N° 6.355.699. Péptidos de automontaje y los hidrogeles formados de los mismos se conocen en la técnica, e incluyen hidrogel de RAD 16, ejemplificado en el presente documento. Tales materiales se utilizan con frecuencia como soporte para el crecimiento de células o tejido.

**[0134]** También se describen en este documento usos adicionales para los cultivos de células terapéuticas de la divulgación que incluyen, pero no se limitan al uso en el tratamiento de la enfermedad ósea o lesión, el tratamiento de la enfermedad pancreática o lesión, el tratamiento de la enfermedad renal o lesión, el tratamiento de la enfermedad neural o lesión, enfermedad cardíaca o lesión, y el tratamiento de la enfermedad hepática o lesión.

**[0135]** En otro de sus aspectos, la divulgación proporciona estructuras de orden superior, tales como estructuras de tejido implantable que comprenden las células de la divulgación, la matriz de tejido humano implantable que comprende las células, los tejidos humanos que comprenden las células y órganos humanos que comprenden estas células.

**[0136]** La descripción también proporciona, en otro de sus varios aspectos, células terapéuticas inyectables que comprenden células aisladas derivadas de cordón umbilical humanos capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y que tienen el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, en el que las células no estimulan considerablemente linfocitos alogénicos en una reacción limfocítica mixta, y producen PD-L2, pero no HLA-G, CD

178, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, o B7-H2. Esta composición celular terapéutica inyectable es útil como un tratamiento terapéutico en cualquier aplicación en la que células no diferenciadas pueden reclutarse a un sitio a través de la circulación. En realizaciones preferidas, la célula inyectable se trata para inactivar el factor tisular. Tal tratamiento incluye cualquier tratamiento capaz de inactivar el factor tisular sin destruir la integridad de la célula. Más preferidos son tratamientos que no tienen ningún efecto sobre la viabilidad, el tiempo o expansión de duplicación. La célula inyectable se trata con un anticuerpo anti-factor de tejido en una realización actualmente preferida.

**[0137]** En conjunción con células terapéuticas, otras moléculas biológicamente activas, tales como agentes antitrombogénicos, agentes anti-apoptóticos, y agentes anti-inflamatorios pueden ser útiles y se pueden administrar en secuencia con, o coadministrarse con las células, de forma individual o en combinaciones o dos o más de tales compuestos o agentes. Por ejemplo, agentes anti-apoptóticos pueden ser útiles para minimizar la muerte celular programada. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a EPO, derivados y análogos de EPO, y sus sales, TPO, IGF-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y los inhibidores de caspasas. Los agentes antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a inhibidores de la quinasa p38 MAP, estatinas, IL-6 y los inhibidores de IL-1, pemirolast, tranilast, remicade, sirolimus, compuestos anti-inflamatorios no esteroideos, por ejemplo, tepoxalina, tolmetina, y suprofen.

**[0138]** Otros factores bioactivos o agentes terapéuticos que pueden coadministrarse con las células terapéuticas de la divulgación incluyen, por ejemplo, factores antitrombogénicos, agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, y antioxidantes. Los ejemplos de agentes inmunosupresores e inmunomoduladores incluyen inhibidores de la calcineurina, por ejemplo ciclosporina, tacrolimus, inhibidores de mTOR como sirolimus o everolimus; antiproliferativos tales como azatioprina y mofetilo de micofenolato; corticosteroides, por ejemplo, prednisona o hidrocortisona; anticuerpos, tales como monoclonales anti-IL-2R  $\alpha$  anticuerpos del receptor, Basiliximab, Daclizumab; anticuerpos anti-células T policlonales tales como globulina anti-timocitos (ATG), globulina antilinfocítica (ALG), y el anticuerpo OKT3 celular monoclonal anti-T. Compuestos antitrombogénicos que se pueden proporcionar terapéuticamente en combinación con las células de la divulgación incluyen, por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, y PPACK (clorometilcetona de arginina de prolina de dextrofenilalanina); compuestos de antitrombina, antagonistas del receptor plaquetario, anticuerpos de antitrombina, anticuerpos del receptor antiplaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina, e inhibidores de plaquetas. Los antioxidantes son bien conocidos en la técnica, por supuesto, y cualquier antioxidante farmacéuticamente aceptable se puede administrar en conjunción con las células de la divulgación incluyendo probucol; vitaminas A, C, y E, coenzima Q-10, glutatión, L cisteína, N-acetilcisteína, o derivado antioxidante, análogos o sales de los anteriores.

**[0139]** En otro aspecto de la descripción, se describen kits para el crecimiento y mantenimiento, el aislamiento y el uso de las células derivadas del cordón umbilical. Las células, lisados celulares, fracciones celulares solubles, fracciones de membrana y matrices convenientemente se pueden emplear como partes de kits, por ejemplo, para un kit para el cultivo o la implantación. La descripción proporciona un kit que incluye los UDC y componentes adicionales, incluyendo instrucciones para el crecimiento o mantenimiento, aislamiento, o el uso de las células o fracciones de células, junto con, por ejemplo, el material de matriz (*por ejemplo*, un andamio), agentes hidratantes (*por ejemplo*, soluciones salinas fisiológicamente compatibles, medios de cultivo celular preparado), sustratos de cultivo celular (*por ejemplo*, placas de cultivo, placas, viales, etc.), los medios de cultivo de células (ya sea en forma líquida o deshidratada), compuestos antibióticos, hormonas, y similares. Los kits para la lata de crecimiento, por ejemplo, incluyen todos los componentes del medio de crecimiento tal como se utiliza en este documento, incluyendo suero, por ejemplo suero bovino fetal. Mientras que el kit puede incluir cualquiera de tales componentes, preferiblemente que incluye todos los ingredientes necesarios para el uso deseado. Si se desea, el kit también puede incluir células (típicamente criopreservadas), que pueden ser sembradas en la red como se describe aquí. Kits para el aislamiento contendrán todo lo necesario para practicar los métodos del aislamiento como se proporciona aquí, excepto por el tejido de cordón umbilical que debe obtenerse directamente o congelado de un banco de tejidos en el momento de aislamiento. Se proporcionan el equipo quirúrgico para disociar el tejido, enzimas preferidas, o opciones de enzimas en forma estable, como lo son los tampones y medio, coladores celulares y similares, según sea necesario o preferido para el método como se describe anteriormente. Las instrucciones detalladas con pasos y listas de proveedores de materiales opcionales o alternativos opcionales también se proporcionan convenientemente. Las células de control pueden ser incluidos para comparación de las células aisladas a, por ejemplo los cultivos UDC depositados en la ATCC. Kits para la utilización de las células derivadas del cordón umbilical contienen preferentemente poblaciones de las células, o las composiciones terapéuticas que comprenden las células, componentes y productos, o fracciones o medios condicionados derivados de las células como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, que incluye al menos UDC y un vehículo farmacéuticamente aceptable (líquido, semi-sólido o sólido). Las poblaciones en algunas realizaciones son líneas celulares homogéneas o incluso clonales de UDC. En otras realizaciones, los kits incluyen otras líneas celulares para su uso en co-cultivo. Kits de aplicación terapéutica incluyen preferiblemente agentes bioactivos adicionales según se desee, por ejemplo, agentes antitrombogénicos, agentes anti-inflamatorios, agentes antiapoptóticos, y compuestos inmunosupresores o inmunomoduladores. Los kits también pueden incluir opcionalmente un medio de administración de las células, por ejemplo por inyección. Los kits pueden incluir además instrucciones para el uso de las células. Kits preparados para hospital de campo, como para uso militar, pueden incluir suministros de procedimiento completo incluyendo de andamiaje de tejido, suturas quirúrgicas, y similares, donde las células se van a utilizar en conjunción con la reparación de lesiones agudas. Kits para ensayos y métodos *in vitro* tal como se describen en el presente documento pueden contener uno o más de (1) UDC o fracciones, componentes o productos de UDC, (2) reactivos para la práctica del método *in vitro*, (3) otras

células o poblaciones de células, como apropiadas, por ejemplo para co-cultivos e (4) instrucciones para la realización del método *in vitro*.

[0140] También se describen en el presente documento células aisladas derivadas del posparto que comprenden un "perfil de gen firma." Se prefieren células en las que los genes de firma son reticulon, receptor de LDL oxidada, e IL-8. En realizaciones preferidas, las células comprenden un perfil que incluye ARNm de genes para reticulon, receptor de LDL oxidada, e IL-8. Más preferiblemente, el perfil comprende genes que están presentes independientemente de si las células se cultivan en medio que contiene suero o medio libre de suero, y que distinguen adicionalmente la célula derivada de posparto de otra célula que son totipotentes o pluripotentes. En ciertas realizaciones, las células aisladas derivadas del posparto comprenden, además, la capacidad de alterar su expresión de marcadores de superficie celular cuando se cultivan en medio que contiene suero con respecto al de un medio libre de suero. En otras formas de realización de las células aisladas derivadas del posparto, se alteran los marcadores de receptor PDGF alfa y HLA-ABC. Esta plasticidad de las células con respecto a sus marcadores de superficie celular permite que las células se pueden diseñar en ciertos aspectos para proporcionar ventaja completa de las propiedades deseadas de las células y para minimizar cualesquiera propiedades no deseadas o nocivas relativas a marcadores de superficie celular. Esto es particularmente útil en la ingeniería o la preparación de células para la implantación o para el uso en el injerto donde las reacciones inmunológicas adversas y rechazo suscitan preocupación.

[0141] En otro de sus varios aspectos, la invención proporciona un método para la preparación de células terapéuticas o cultivos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende: el aislamiento de células; inicialmente la expansión de las células a un número útil en un medio que contiene suero que apoya la expansión de células pero en la que las células producen una cantidad del marcador de superficie celular HLA-ABC; la transferencia de las células a un medio en el que las células producen una disminución en la cantidad del marcador de superficie celular HLA-ABC; y el paso de las células en el medio en el que las células producen una cantidad disminuida de HLA-ABC, preparando de este modo una célula o cultivo terapéutico. El medio en el que las células producen una disminución en la cantidad del marcador de superficie celular HLA-ABC es un medio libre de suero. Esto es útil para la fabricación y la aplicación comercial de las células y cultivos terapéuticos particularmente cuando se requieren por las agencias reguladoras y similares. Tales métodos son beneficiosos y deseables para la producción de células terapéuticas o cultivos para la implantación y el injerto.

[0142] La descripción proporciona en otro aspecto, un medio libre de suero para la expansión de las células derivadas del posparto. Los medios preferidos han añadido uno o más factores de crecimiento exógenos. Actualmente preferidos son los medios en el que los uno o más factores de crecimiento añadidos son bFGF, EGF, o PDGF. Aún más preferidos son los medios en el que los uno o más factores de crecimiento añadido incluyen bFGF por sí mismo o en combinación con otros factores de crecimiento beneficiosos para el crecimiento de las células o para la optimización de la expresión de ciertos marcadores de superficie celular.

[0143] En realizaciones preferidas, los medios libres de suero de la divulgación proporcionan apoyo a la expansión durante al menos 5 pasajes de las células con ninguna reducción en la viabilidad de células y no senescencia. Más preferidos son los medios que soportan 10, 15, 20 o más pasajes de las células, con las poblaciones todavía capaces de más pasos. Aún más preferidos son los medios que soportan 25, 28, 30, 33 y 35 o más pasos. Los más preferidos son los medios capaces de soportar las células durante aproximadamente 40 o más pasos.

[0144] También descritos en conjunción con la presente descripción son cultivos terapéuticos que comprenden células derivadas de posparto expandidas en medio libre de suero. Tales células tienen propiedades útiles y se adaptan más fácilmente para su aplicación comercial y la aprobación regulatoria que tiene, por ejemplo, poco riesgo de la transmisión de enfermedades relacionadas con suero animal extranjero o proteínas. En ciertas realizaciones preferidas, los cultivos terapéuticos comprenden células que tienen un perfil de gen de firma en el que el ARNm de genes para reticulon, receptor de LDL oxidada, y IL-8 están presentes independientemente de si las células se cultivan en medio que contiene suero o medio libre de suero. Tales cultivos pueden comprender un único tipo de célula o pueden consistir en múltiples tipos de células incluyendo PPDCs y otros tipos celulares como las células adicionales presentes en el co-cultivo o cultivo mixto.

[0145] También se describen en el presente documento los bancos de cultivo de células que comprenden las células derivadas de posparto y cultivos de la divulgación.

[0146] Los siguientes ejemplos describen varios aspectos de realizaciones de la invención y la divulgación en mayor detalle. Estos ejemplos están destinados a ilustrar aspectos adicionales de la invención aquí descrita. Estos ejemplos no se deben interpretar para limitar el aspecto ejemplificado de este modo.

### Ejemplo 1

#### Aislamiento de células de tejidos del cordón umbilical del posparto

[0147] Los tejidos del cordón umbilical del posparto se obtuvieron después del nacimiento de cualquiera de un período completo o el embarazo antes de término. Se recogieron las células de cinco donantes separados de tejido de cordón umbilical. Diferentes métodos de aislamiento de células se ensayaron para determinar su capacidad para producir células con: 1) el potencial de diferenciarse en células con diferentes fenotipos, una característica común a las células madre, o 2) el potencial de proporcionar factores tróficos críticos útiles para otras células y tejidos.

#### Métodos y materiales

[0148] Aislamiento de células umbilicales. Los cordones umbilicales se obtuvieron de National Disease Research

Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Se obtuvieron los tejidos después de partos normales. Los protocolos de aislamiento de células se realizaron 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 penicilina en 100 unidades/ml y estreptomycin a 100 miligramos/mililitro, y anfotericina B en ,25 microgramos/mililitro (Invitrogen Carlsbad, CA). Los tejidos entonces se disociaron mecánicamente en 150 cm<sup>2</sup> placas de cultivo de tejido en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-baja glucosa o DMEM-alto glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido se troceó en una pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos de 50 ml cónicos (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo).

**[0149]** Después, el tejido se digirió en medio de DMEM-baja glucosa o medio de DMEM-alta glucosa, conteniendo cada uno 100 unidades/mililitro, estreptomycin a 100 miligramos/mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro y las enzimas de digestión. En algunos experimentos se usó una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C: D") (colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 unidades/mililitro; y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro, en Medio de DMEM-baja glucosa). En otros experimentos una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C: H: D") se utilizó (C: D: H = 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, medio y digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Enviro, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

**[0150]** 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; definido de suero fetal bovino; N° de Lote AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 100 unidades por mililitro, estreptomycin a 100 microgramos por mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos por mililitro; (cada uno de Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un BD FALCON Cell Strainer de 70 micrones de nylon (BD Biosciences, San Jose, CA). Un enjuague adicional de 5 mililitros que comprende Medio de Crecimiento se pasó a través del tamiz. La suspensión celular se pasó por un filtro de células de nylon de 40 micrómetros (BD Biosciences, San Jose, CA) y se extrajo con un enjuague de un medio de crecimiento de 5 mililitros adicionales.

**[0151]** El filtrado se volvió a suspender en medio de crecimiento (volumen total 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.

**[0152]** Después de 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.

**[0153]** Las células aisladas de los tejidos del cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T-75 recubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento. Después de dos días, medio gastado y las células no adheridas se aspiraron de los matraces. Las células adherentes se lavaron con PBS tres veces para eliminar los residuos y las células derivadas de la sangre. Las células entonces se rellenan con medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días desde el paso 0) para el paso 1. En pasos posteriores (de paso 1 a 2, etc), las células alcanzaron sub-confluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pasos posteriores, las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron en un incubador humidificado con 5 por ciento de dióxido de carbono a 37°C.

**[0154] El aislamiento de células usando LIBERASE Blendzymes.** Las células fueron aisladas de los tejidos de posparto en medio de DMEM-baja glucosa con LIBERASE (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) y hialuronidasa (5 unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y aislamiento de las células era como se describe para otras digestiones de proteasa anteriores, sin embargo, se utilizó la mezcla de LIBERASE/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C: D o C: H: D. La digestión del tejido con LIBERASE resultó en el aislamiento de poblaciones de células de los tejidos de posparto que se expandieron fácilmente.

**[0155] El aislamiento de células usando otras combinaciones de enzimas.** Procedimientos se compararon para el aislamiento de células del cordón umbilical utilizando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas para la digestión en comparación incluyen: i) colagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla colagenasa: dispasa (C: D); v) colagenasa: mezcla de hialuronidasa (C: H); vi) mezcla dispasa: hialuronidasa (D: H); y vii) mezcla de colagenasa: dispasa: hialuronidasa (C: D: H). Se observaron las diferencias en el aislamiento de células que utilizan estas diferentes condiciones de digestión de la enzima (Tabla 1-1).

**[0156] El aislamiento de células de la sangre residual en el cordón.** Se hicieron otros intentos de aislar grupos de células de cordón umbilical por diferentes enfoques. En un caso el cordón umbilical se cortó y se lavó con medio de crecimiento para desalojar a los coágulos de sangre y material gelatinoso. Se recogió la mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de crecimiento y se centrifugó a 150 x g. El sedimento se resuspendió y se sembró en matraces recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. A partir de estos experimentos, se aisló una población de células que se expandió rápidamente.

**[0157] El aislamiento de las células de sangre de cordón.** Las células también se han aislado de muestras de sangre de cordón alcanzadas desde NDRI. El protocolo de aislamiento utilizado era el de solicitud de patente internacional US0229971 por Ho et al. Las muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de la sangre del cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) se mezclaron con tampón de lisis (155 milimolar de cloruro de amonio esterilizado por filtración, 10 milimolar de potasio bicarbonato, 0,1 milimolar de EDTA tamponada a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron en una proporción de sangre 1:20 espinal a tampón de lisis. La suspensión celular resultante se agitó con vórtex durante 5 segundos y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 xg). El sedimento celular se resuspendió en medio

esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contiene 10 por ciento de suero fetal bovino (Hyclone, Logan UT), 4 milimolar de glutamina (Mediatech Herndon, VA), penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro (Gibco, Carlsbad, CA). Se centrifugaron las células resuspendidas (10 minutos a 200 xg), se aspiró el sobrenadante, y el sedimento celular se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en cualquiera de matraces T75 (Corning, NY), frascos recubiertos con laminina T75, o matraces recubiertos de fibronectina T175 (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

**[0158] El aislamiento de las células utilizando diferentes combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento.** Para determinar si las poblaciones de células podrían aislarse en diferentes condiciones y expandirse bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, se digirieron las células en medio de crecimiento con o sin el 0,001 por ciento (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), utilizando la combinación de enzimas de C: D: H, de acuerdo con los procedimientos previstos anteriormente. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro. Bajo todas las condiciones ensayadas, las células se adjuntaron y se expandieron bien entre el paso 0 y 1 (Tabla 1-2). Las células en condiciones 5-8 y 13-16 se demostraron proliferar bien hasta 4 pasos después de la siembra en cuyo momento se crioconservaron.

**Resultados**

**[0159] El aislamiento celular usando diferentes combinaciones de enzimas.** La combinación de C: D: H, proporcionó el mejor rendimiento de células después del aislamiento, y las células generadas que se expandieron para muchas más generaciones en cultivo que las otras condiciones (Tabla 1-1). Una población de células expandibles no se alcanzó usando solo colagenasa o hialuronidasa. No se hizo ningún intento para determinar si este resultado es específico a la colagenasa que se examinó.

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

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

Clave: + = bueno, ++ = muy bueno, +++ = excelente, x = sin éxito

**[0160] El aislamiento de las células utilizando diferentes combinaciones de enzimas y condiciones de crecimiento.** Células unidas y expandidas bien entre el paso 0 y 1 en todas las condiciones ensayadas para la digestión enzimática y el crecimiento (Tabla 1-2). Las células en condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pasos después de la siembra, momento en el que se crioconservaron. Todas las células se crioconservaron para su posterior análisis.

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

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

**[0161] El aislamiento de células de la sangre residual en el cordón.** Células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron por citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas por digestión enzimática.

**[0162] El aislamiento de las células de sangre de cordón.** Las preparaciones contenían células rojas de la sangre y plaquetas. No hay células nucleadas que se unieron y se dividieron durante las primeras 3 semanas. El medio se cambió 3 semanas después de la siembra y no se observaron células que se unieran ni crecieran.

**[0163] Resumen.** Las poblaciones de células pueden ser aisladas a partir de tejido umbilical de manera eficiente utilizando la colagenasa de combinación de enzimas (una metaloproteasa), dispasa (proteasa neutra) y hialuronidasa (enzima mucolítica que rompe el ácido hialurónico). Liberasa, que es una mezcla de colagenasa y una proteasa neutra, también puede utilizarse. Blendzyme 3, que es la colagenasa (4 Wunsch unidades/gramo) y la termolisina (1714 de caseína unidades/gramo), también se utiliza junto con hialuronidasa para aislar células. Estas células expandidas fácilmente sobre muchos pasos cuando se cultivan en medio de expansión de crecimiento en el plástico recubierto de gelatina.

**[0164]** Las células también se aislaron de sangre residual en el cordón, pero no la sangre del cordón. La presencia de células en los coágulos de sangre lavados del tejido, que se adhieren y crecen bajo las condiciones usadas, puede deberse a la liberación de las células durante el proceso de disección.

### Referencia

#### **[0165]**

1. Ho, Tony, W., et al., WO2003025149 A2 " CELL POPULATIONS WHICH CO-EXPRESS CD49C AND CD90" Neuronyx, INC. Solicitud N° PCT/US02/029971, presentada 20020920, A2 Publicada 20030327, A3 Publicada 20031218

### **EJEMPLO 2**

#### Características de crecimiento de células derivadas del cordón umbilical

**[0166]** El potencial de expansión celular de las células derivadas del cordón umbilical se comparó con otras poblaciones de células madre aisladas. El proceso de expansión de las células a la senescencia se denomina límite de Hayflick (Hayflick L. The longevity of cultured human cells. J. Am. Geriatr. Soc. 22(1):1-12, 1974; Hayflick L. The strategy of senescence. Gerontologist 14(1):37-45), 1974).

#### Materiales y métodos

**[0167] matraces de recubrimiento de gelatina.** Matraces de plástico de cultivo de tejidos se recubrieron mediante la adición de 20 mililitros 2% (p/v) de gelatina (Tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a un matraz T75 (Corning Inc., Corning, NY) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de gelatina, 10 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) se añadieron y después se aspiraron.

**[0168] Comparación del potencial de expansión de las células derivadas del cordón umbilical con otras poblaciones de células.** Para comparación de potencial de expansión del crecimiento se utilizaron las siguientes poblaciones de células; i) Las Células madre mesenquimatosas (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de tejido adiposo (Patente de EE.UU. N° 6.555.374 B1; solicitud de patente de EE.UU. US20040058412); iii) los fibroblastos de piel dérmica normal (CC-2509 N° de Lote 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); y iv) células derivadas del cordón umbilical. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. Para pasos posteriores, los cultivos celulares se trataron del siguiente modo. Después de tripsinización, las células viables se contaron después de tinción con azul tripán. La suspensión celular (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). El número de células viables se estimó utilizando un hemocitómetro.

**[0169]** Tras el recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces recubiertos de gelatina T 75 en 25 mililitros de medio de crecimiento fresco. Las células se cultivaron en una atmósfera estándar (5 por ciento de dióxido de carbono (v/v)) a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia que se pasaron; este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron la senectud.

**[0170]** En cada paso, se tripsinizaron y se contaron las células. El rendimiento de células viables, duplicaciones de la población [ $\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$ ], y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de población) se calcularon. A los efectos de determinación de la expansión óptima de células, el rendimiento total de células por paso se determinó multiplicando el rendimiento total para el paso anterior por el factor de expansión para cada paso (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales).

**[0171] Potencial de expansión de los bancos de células a baja densidad.** El potencial de expansión de las células en bancos en el paso 10 también se examinó. Se usó un conjunto diferente de condiciones. Se ensayaron células derivadas del cordón umbilical, y células derivadas de la placenta; fibroblastos normales de la piel dérmica (cc-2509 N° de Lote 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD). Estas poblaciones celulares se habían depositado en el paso 10 anteriormente, después de cultivarse a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en cada paso a ese punto. Se determinó el efecto



de la densidad celular en las poblaciones de células tras descongelación de células en el paso 10. Las células se descongelaron en condiciones estándar, se contaron usando tinción con azul tripán. Las células descongeladas fueron entonces sembradas a 1.000 células/cm<sup>2</sup> en Medio de Crecimiento. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El crecimiento medio se cambió dos veces por semana. Las células se pasaron cuando alcanzaron aproximadamente el 85% de confluencia. Las células se pasaron posteriormente hasta la senescencia, es decir, hasta que no pudieron expandirse. Las células se trataron con tripsina y se contaron en cada paso. El rendimiento celular, duplicación de la población ( $\ln(\text{células finales/células iniciales})/\ln 2$ ) y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo)/duplicación de la población). Se determinó el rendimiento total de células por paso mediante la multiplicación del rendimiento total para el paso anterior por el factor de expansión para cada paso (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales).

**[0172] La expansión de células derivadas del cordón umbilical a baja densidad de la siembra de células iniciales.** El potencial de expansión de los cultivos de células aisladas derivadas del cordón umbilical en condiciones de baja siembra de células se puso a prueba en otro experimento. Se aislaron células derivadas del cordón umbilical como se describe en un ejemplo anterior. Las células se sembraron a 1.000 células/cm<sup>2</sup> y se pasaron como se describió anteriormente hasta la senescencia. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El crecimiento medio se cambió dos veces por semana. Las células se pasaron cuando alcanzaron aproximadamente el 85% de confluencia. En cada paso, las células se tripsinizaron y se contaron por tinción con azul tripán. El rendimiento celular, duplicación de la población ( $\ln(\text{célula final/célula inicial})/\ln 2$ ) y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de población) se calcularon para cada paso. El rendimiento total de células por paso se determinó mediante la multiplicación del rendimiento total para el paso anterior por el factor de expansión para cada paso (es decir, factor de expansión = célula final/célula inicial). Las células se cultivaron en matraces recubiertos de gelatina y no gelatina.

**[0173] La expansión de células en condiciones de cultivo de bajo oxígeno.** Se ha demostrado que las condiciones de cultivo celular de bajo O<sub>2</sub> pueden mejorar la expansión de células en determinadas circunstancias (Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J.; McKay, Ron; Studer, Lorenz. El cultivo de bajo oxígeno de células progenitoras del sistema nervioso central. US20040005704). Con el fin de determinar si la expansión celular de las células derivadas del cordón umbilical podría mejorarse mediante la alteración de las condiciones de cultivo de células, cultivos de células derivadas del cordón umbilical se cultivaron en condiciones de bajo oxígeno. Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento en matraces recubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente en condiciones atmosféricas estándar a través del paso 5, en el cual señalan que fueron trasladados a condiciones de cultivo de bajo oxígeno (5% O<sub>2</sub>).

**[0174] Otras condiciones de crecimiento.** En otros experimentos se ampliaron las células en placas no recubiertas, recubiertas de colágeno, fibronectina, recubiertas con estaño, recubiertas con laminina y recubiertas con Matrigel. Los cultivos se han demostrado para expandir bien en estos diferentes matrices.

**Resultados**

**[0175] Comparación del potencial de expansión de las células derivadas del cordón umbilical con otras poblaciones de células.** Células derivadas del cordón umbilical se expandieron durante más de 40 pasos que generan rendimientos de células de > 1E17 células en 60 días. Por el contrario, las MSC y los fibroblastos llegaron a la senectud después de <25 días y <60 días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas de tejido adiposo como omental se expandieron durante casi 60 días que generaron los rendimientos celulares totales de 4.5E12 y 4.24E13 respectivamente. Por lo tanto, cuando se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas del cordón umbilical se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células cultivadas bajo las mismas condiciones (Tabla 2-1).

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

Tipo de célula	Senectud	Población total duplicaciones	Rendimiento (células totales)
MSC	24 d	8	4,72 E7
Células derivadas de tejido adiposo	57 d	24	4,5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2,82 E13
Umbilical	65 d	42	6,15 E17

**[0176] La expansión del potencial de bancos de células a baja densidad.** Células derivadas del cordón umbilical y fibroblastos se expandieron para más de 10 pasos que generan rendimientos de células de > 1E11 células en 60 días (Tabla 2-2). En estas condiciones tanto de los fibroblastos como las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical de senescencia después de 80 días, completando >50 y > 40 de duplicaciones de población respectivamente.

**Tabla 2-2:** Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células utilizando expansión de crecimiento de baja densidad de paso 10 a través de la senescencia

Tipo de célula (Nº de Paso)	Senectud	Duplicaciones de población total	Rendimiento (células totales)
Fibroblastos (P10)	80 días	43,68	2,59 E11
Umbilical (P10)	80 días	53,6	1,25 E14

**[0177] La expansión de las células en condiciones de cultivo de bajo oxígeno.** Las células se expandieron bien bajo las condiciones de bajo oxígeno, sin embargo, el cultivo en condiciones de bajo oxígeno no parecen tener un efecto significativo en la expansión de células para las células derivadas del posparto. Estos resultados son preliminares, en el sentido de que cualesquiera conclusiones finales respecto al efecto de reducción de oxígeno deberían extraerse de los experimentos sobre células en crecimiento en bajo oxígeno del aislamiento inicial. Condiciones atmosféricas estándar ya han demostrado su eficacia para el crecimiento de un número suficiente de células, y el cultivo de bajo oxígeno no es necesario para el crecimiento de las células derivadas del posparto.

**[0178] Resumen.** Las condiciones actuales de expansión de células aisladas crecientes derivadas del cordón umbilical a densidades de aproximadamente 5000 células/cm<sup>2</sup> en Medio de Crecimiento en matraces recubiertos de gelatina o no revestidos, bajo oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar grandes números de células en el paso 11. Además, los datos sugieren que las células pueden expandirse fácilmente utilizando condiciones de cultivo de densidad inferior (por ejemplo 1.000 células/cm<sup>2</sup>). La expansión de células derivadas del cordón umbilical en condiciones de bajo oxígeno también facilita la expansión de las células, aunque todavía no se ha observado mejora incremental en el potencial de la expansión de células cuando se utilizan estas condiciones para el crecimiento. Actualmente, el cultivo de células derivadas del cordón umbilical en condiciones atmosféricas estándar se prefiere para la generación de grandes grupos de células. Sin embargo, cuando se alteran las condiciones de cultivo, la expansión de células derivadas del cordón umbilical puede igualmente alterarse. Esta estrategia se puede utilizar para mejorar la capacidad proliferativa y diferenciación de estas poblaciones de células.

**[0179]** En las condiciones utilizadas, mientras que el potencial de expansión de MSC y células derivadas de tejido adiposo es limitado, las células derivadas del cordón umbilical se expanden fácilmente en grandes cantidades.

### Referencias

#### **[0180]**

- 1) Hayflick L. The longevity of cultured human cells. J Am Geriatr Soc. 22:1-12, 1974.
- 2) Hayflick L. The strategy of senescence. Gerontologist 14(1):37-45, 1974.
- 3) United States Patent Application No. 20040058412
- 4) United States Patent Application No. 20040048372
- 6) Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J.; McKay, Ron; and Studer, Lorenz. Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. United States Patent Application No. 20040005704.

### **EJEMPLO 3**

#### **Crecimiento de células derivadas del cordón umbilical en medio que contiene D-valina**

**[0181]** Se ha informado de que el medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma normal de L-valina se puede utilizar para inhibir selectivamente el crecimiento de células similares a fibroblastos en cultivo (Hongpaisan, 2000;. Sordillo et al., 1988). Se realizaron experimentos para determinar si las células derivadas del cordón umbilical podrían crecer en medio que contiene D-valina.

#### **Métodos y materiales**

**[0182]** Las células derivadas del cordón umbilical (P5) y los fibroblastos (P9) se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas se retiró el medio y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se reemplazó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (Gibco de orden especial), 15% (v/v) se dializó suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) beta-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 50 unidades/mililitro y estreptomycin a 50 miligramos/mililitro (Gibco)).

#### **Resultados**

**[0183]** Ni las células derivadas del cordón umbilical ni las células de fibroblastos sembradas en el medio que contiene D-valina proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medio de crecimiento que contenía suero dializado. Células de fibroblasto se cambiaron morfológicamente, aumentándose en tamaño y cambiando de forma. Todas las células murieron y finalmente se separaron de la superficie del frasco después de cuatro semanas. Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas del cordón umbilical requieren L-valina para el crecimiento celular

y para mantener la viabilidad a largo plazo.

**Referencias**

5 [0184]

Hongpaisan J. (2000) Inhibition of proliferation of contaminating fibroblasts by D-valine in cultures of smooth muscle cells from human myometrium. Cell Biol Int. 24:1-7.  
 Sordillo LM, Oliver SP, Akers RM. (1988) Culture of bovine mammary epithelial cells in D-valine modified medium: selective removal of contaminating fibroblasts. Cell Biol Int Rep.12:355-64.

**Ejemplo 4**

**Análisis de cariotipo de PPDCs derivados del cordón umbilical**

15 [0185] Las líneas celulares utilizadas en la terapia de células son preferiblemente homogéneas y libres de cualquier tipo de célula contaminante. Las células humanas utilizadas en la terapia de células deben tener un número normal (46) de cromosomas con estructura normal. Para identificar líneas celulares derivadas del cordón umbilical que son homogéneas y libres de células de origen tisular no umbilical, se analizaron cariotipos de muestras de células.

**Materiales y métodos**

20 [0186] PPDCs de tejido de posparto de un neonato masculino se cultivaron en medio de crecimiento. Tejido de posparto de un neonato macho (X, Y) se selecciona para permitir la distinción entre las células derivadas de neonatales y células derivadas de la madre (X, X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en Medio de Crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron a 80% de confluencia. Un matraz T25 que contiene células se llenó hasta el cuello con Medios de Crecimiento. Las muestras se administraron a un laboratorio de citogenética clínica por mensajería (tiempo de transporte estimado de laboratorio a laboratorio es de una hora). El análisis cromosómico se llevó a cabo por el Centro de Genética Molecular Humana y la Escuela de Medicina de Nueva Jersey, Newark, Nueva Jersey. Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De las veinte células contadas en metafase, cinco se analizaron para un número de cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra de células se caracterizó como homogénea si se observaron dos cariotipos. Una muestra de células se caracterizó como heterogénea si se observaron más de dos cariotipos. Células de metafase adicionales se contaron y se analizaron cuando se identificó un número de cariotipo heterogéneo (cuatro).

**Resultados**

35 [0187] Todas las muestras de células enviadas para el análisis cromosómico fueron interpretadas por tener una apariencia normal. Cada una de las muestras de células se caracterizó como homogénea. (Tabla 4-1).

**Tabla 4-1.** Resultados del cariotipo de PPDCs.

Tejido	Paso	Células de metafasa contadas	Células de metafasa analizadas	Número de cariotipos	Cariotipos de ISCN
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Umbilical	3	20	5	2	46, XX

50 [0188] **Resumen.** Análisis cromosómico identificó PPDCs derivadas de cordón umbilical cuyos cariotipos parecen normales tal como se interpreta por un laboratorio de citogenética clínica. El análisis de cariotipo también identificó líneas celulares libres de células maternas, como se determina por cariotipo homogéneo.

**EJEMPLO 5**

**Evaluación de citometría de flujo de marcadores de superficie de células derivadas del cordón humano**

60 [0189] Caracterización de proteínas de superficie celular o "marcadores" por citometría de flujo se puede utilizar para determinar la identidad de una línea celular. La consistencia de la expresión se puede determinar a partir de múltiples donantes, y en las células expuestas a diferentes condiciones de procesamiento y cultivo. Las líneas celulares de posparto aisladas del cordón umbilical se caracterizaron por citometría de flujo, proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

**Materiales y métodos**

**[0190] Recipientes de medios y cultivo.** Las células fueron cultivadas en Medio de Crecimiento, en matraces de cultivo tisular de T75, T150, 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.

**[0191] Tinción del anticuerpo.** Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, MO) y separadas con tripsina/EDTA (Gibco). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, el anticuerpo para el marcador de superficie celular de interés (véase más adelante) se añadió a 100 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.

**[0192] El análisis de citometría de flujo.** La citometría de flujo análisis se realizó con un instrumento citómetro (Becton Dickinson, San Jose, CA).

**[0193] Anticuerpos a marcadores de superficie celular.** Se utilizaron los siguientes anticuerpos frente a marcadores de superficie celular.

**Tabla 5-1:** Los anticuerpos utilizados en la caracterización de marcadores de superficie celular de UDC.

Anticuerpo	Fabricante	Nº de catalogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen	555394
CD31	BD Pharmingen	555446
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45RA	BD Pharmingen	555489
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
PDGFr-alfa	BD Pharmingen	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen	555553
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG-PE	Sigma	P-4685

**[0194] Comparación de paso a paso.** Se analizaron las células derivadas del cordón umbilical en los pasos 8, 15, y 20.

**[0195] Comparación donante a donante.** Para comparar las diferencias entre los donantes, tejidos de cordón umbilical de diferentes donantes se compararon entre sí.

**[0196] Comparación de recubrimiento de superficie.** Células derivadas del cordón umbilical cultivadas en matraces recubiertos de gelatina se comparó con cordón umbilical cultivado en frascos no recubiertos.

**Resultados**

**[0197] Caracterización de células derivadas de cordón umbilical.** Células derivadas del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo mostraron una expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicado por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control de IgG (datos no mostrados). Estas células fueron negativas para la expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicada por los valores de fluorescencia comparables al control de IgG (datos no mostrados). Se representaron variaciones en los valores de fluorescencia de curvas positivas. La media (es decir, CD13) y rango (es decir, CD90) de las curvas positivas mostraron alguna variación, pero las curvas parecen normales, lo que confirma una población homogénea. Ambas curvas exhibieron individualmente valores mayores que el control de IgG.

**[0198] Comparación paso a paso.** Las células umbilicales en el paso 8, 15, y 20 se analizaron por citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicadas por el aumento de fluorescencia con respecto al control de 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. Las variaciones en los valores de detección de fluorescencia de curvas positivas estaban dentro de los intervalos esperados. Mientras que las medias (es decir, CD13) de las curvas positivas variaron, todas las curvas de valores mayores que el control de IgG se exhibieron individualmente.

**[0199] Comparación donante a donante.** Células aisladas derivadas del cordón umbilical de donantes independientes analizados por citometría de flujo mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, que se refleja en el aumento de los valores de la fluorescencia relativa al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ con

valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG. Se representaron las variaciones en los valores de detección de fluorescencia de curvas positivas. Mientras que la media (es decir, CD10) de las curvas positivas variaba, ambas curvas exhibieron individualmente valores mayores que el control de IgG.

**[0200] El efecto del recubrimiento de la superficie con gelatina.** Células del cordón umbilical ampliadas de gelatina y matraces sin revestir analizadas por citometría de flujo fueron positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control de IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

**[0201] Resumen.** Análisis de células de posparto derivadas del cordón umbilical por citometría de flujo ha establecido un perfil útil para identificar estas líneas celulares. Células de posparto derivadas del cordón umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr alfa, HLA-A, B, C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad fue consistente entre las variaciones de variables que incluyen el donante, paso, revestimiento de la superficie de recipiente de cultivo, y las enzimas de digestión utilizadas en el aislamiento y la preparación de las células. Alguna variación en las medias y rangos de curva de histograma de valor de fluorescencia se observaron, 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 6

### Análisis de las células por matriz de oligonucleótidos

**[0202]** Matrices de oligonucleótidos se utilizaron para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas del cordón umbilical y de la placenta con fibroblastos, células madre mesenquimatosas humanas, y otra línea celular derivada de la médula ósea humana. Este análisis proporciona una caracterización de las células derivadas del posparto y se identificaron los marcadores moleculares únicos para estas células.

### Materiales y métodos

#### Aislamiento y cultivo de células

**[0203]** Las células derivadas de tejido de posparto. Cordones umbilicales y placentas humanas se obtuvieron a partir de National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) a partir de un parto normal a término con el consentimiento del paciente. Se recibieron los tejidos y las células fueron aisladas como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

**[0204]** Fibroblastos. Fibroblastos dérmicos humanos fueron adquiridos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; N° de lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen)). Las células se cultivaron sobre el plástico estándar tratado por tejido.

**[0205]** Las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC). hMSCs se compraron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; 2F1655 N°s de lote, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en MSCGM Media (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico estándar cultivado por tejido a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

**[0206]** Células de médula ósea de cresta ilíaca humana (ICBM). La 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.* (WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM de KHCO<sub>3</sub>, 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 de azul tripán (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico cultivados de tejido a 5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en cualquiera de O<sub>2</sub> o a 5% e O<sub>2</sub> estándar atmosférico. Las células se cultivaron durante 5 días sin un cambio de medio. Medios y células no adherentes se retiraron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

**[0207] El aislamiento de ARNm y GENECHIP Analysis.** Cultivos activamente crecientes de células se retiraron de los frascos con un raspador de células en salina tamponada en fosfato frío (PBS). 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. ADNc se transcribió en ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con los ensayos de Affymetrix GENECHIP HG-U133A de oligonucleótidos (Affymetrix, Santa Clara, CA). La recolección de datos y las hibridaciones se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La colección de hibridación y los datos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los análisis de datos se realizaron usando software de ordenador "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1,21 (Tusher, VG et al., 2001, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 98: 5116 hasta

5121). Las licencias para el análisis de software están disponibles a través de la Oficina de Licencias de Tecnología de la Universidad de Stanford, y más información está disponible en la Red Informática Mundial en el sitio web del Profesor Tibshirani en el Departamento de Estadística, Universidad de Stanford ([www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/](http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/)).

5 **Resultados**

[0208] Catorce poblaciones diferentes de células se analizaron en este estudio. Las células junto con información de paso, sustrato de cultivo, y medios de cultivo se enumeran en la Tabla 6-1.

10 **Tabla 6-1.** Las células analizadas por el estudio de micromatriz. Las líneas de células se enumeran por sus códigos de identificación junto con el paso en el momento del análisis, sustrato de crecimiento celular, y medios de crecimiento.

Población de células	Paso	Sustrato	Medios
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, $\text{MEM}$
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, $\text{MEM}$
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, $\text{MEM}$
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, $\text{MEM}$
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, $\text{MEM}$
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, $\text{MEM}$
ICBM (070203) (5% O <sub>2</sub> )	3	Plástico	DMEM, 15% FBS, $\text{MEM}$ MEM 10% FBS
ICBM (062703) (std O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062,703) (5% O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM 10% FBS
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS

[0209] Los datos se evaluaron por el análisis de componentes principales con software SAM como se describe anteriormente. El análisis reveló 290 genes que se expresan en diferentes cantidades relativas en las células ensayadas. Este análisis proporciona comparaciones relativas entre las poblaciones.

35 [0210] La tabla 6-2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de los pares 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.

40 **Tabla 6-2.** Las distancias euclidianas para los pares de células. La distancia euclidiana se calculó para los tipos de células utilizando los 290 genes que son expresados diferencialmente entre los tipos de células. Similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclídea.

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

[0211] Tablas 6-3, 6-4, y 6-5 muestran la expresión de genes aumentada en las células derivadas de la placenta (Tabla 6-3), el aumento en las células derivadas del cordón umbilical (Tabla 6-4), y la reducción en el cordón umbilical y células derivadas de la placenta (Tabla 6-5).

**Tabla 6-3.** Los genes que se incrementan específicamente en la expresión en las células derivadas de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes aumentados en células derivadas de placenta</b>		
<b>Identificación de conjunto de sondas</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Nº de acceso NCBI</b>
209732_at	C-tipo (dominio dependiente de calcio de reconocimiento de carbohidratos) lectina, miembro de superfamilia 2 (inducida por activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor de Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	Familia de deshidrogenasa de aldehído 1, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	receptor de lipoproteína oxidada de baja densidad (lectina) 1	AF035776
214993_at	Homo sapiens, clon IMAGEN:4179671, ARNm, cds parcial	AF070642
202178_at	quinasa de proteína C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	regulado hacia abajo en cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113)	AI246730

**Tabla 6-4.** Los genes que se incrementan específicamente en la expresión en el cordón umbilical - células derivadas en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes aumentados en células derivadas del cordón umbilical</b>		
<b>Identificación de conjunto de sondas</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Nº de acceso NCBI</b>
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 inducida por alfa 3	NM_006290

**Tabla 6-5.** Los genes que se vieron reducidos en la expresión en las células del cordón umbilical y la placenta, en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes disminuidos en células derivada del cordón umbilical y placenta</b>		
<b>Identificación de conjunto de sondas</b>	<b>Nombre de gen</b>	<b>Nº de acceso NCBI</b>
210135_s_at	homeobox de baja estatura 2	AF022654.1
205824_at	proteína de choque térmico 27 kDa 2	NM_001541.1
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	elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (a partir del clon DKFZp586M2022)	N91149

(continúa)

Genes disminuidos en células derivada del cordón umbilical y placenta		
Identificación de conjunto de sondas	Nombre de gen	Nº de acceso NCBI
206201_s_at	homeobox mesénquimo 2 (homeobox de detención de crecimiento específica)	NM_005924.1
205817_at	Sine oculis homeobox homólogo 1 ( <i>Drosophila</i> )	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador de morfogénesis desaliñado asociado a 2	BF513244
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	Tetranectina (proteína de unión a plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	gen de translocación de células B 1, 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	potenciador de Procolágeno C-endopeptidasa	NM_002593.2
203706_s_at	Homólogo 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
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 de vesícula sináptica 2	NM_014849.1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	factor de citoquina similar al receptor 1	NM_004750.1
204401_at	canal activado por calcio de potasio intermedio/pequeña conductancia, 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	Sine oculis homeobox homólogo 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

55

60

65



(continúa)

Genes disminuidos en células derivada del cordón umbilical y placenta		
Identificación de conjunto de sondas	Nombre de gen	Nº de acceso NCBI
209160_at	familia de reductasa de aldo-ceto 1, miembro de C3 (deshidrogenasa hidroxisteroide 3-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 del 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 ciclasa C (receptor de péptido atrionatriurético C)	AI628360
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 vesículas 5 (miobrevina)	NM_006634.1
201843_s_at	EGF que contienen proteína de la matriz extracelular similar a fibulina 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	subunidad VIIa polipeptídica 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

45 [0212] Tablas 6-6, 6-7, y 6-8 muestran la expresión de genes aumento en fibroblastos humanos (Tabla 6-6), células ICBM (Tabla 6-7), y MSCs (Tabla 6-8).

50 **Tabla 6-6.** Los genes que se incrementaron en expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes incrementados en fibroblastos	
	fosfatasa de doble especificidad 2
	proteína KIAA0527
	<i>Homo sapiens</i> ADNc: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	anquirina 3, nodo de Ranvier (anquirina G)
	inhibina, beta A (activina A, polipéptido de activina AB alfa)
	ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	proteína KIAA1053
	proteína asociada a microtúbulos 1A

65

(continúa)

<b>Genes incrementados en fibroblastos</b>	
5	proteína de dedos de zinc 41
	proteína HSPC019
	<i>Homo sapiens</i> ADNc: FLJ23564 fis, clon LNG10773
	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
10	proteína LIM (similar a enigma de unión C de quinasa de proteína de rata C)
	inhibidor de potenciador de gen de polipéptido kappa ligera en células B, proteína asociado a quinasa compleja
	proteína hipotética FLJ22004
	Secuencia humana de ARNm (Clon CTG-A4)
15	ESTs, moderadamente similar al factor de citoquina similar a receptor 2; precursor de receptor de citoquinas CRL2 [ <i>Homo sapiens</i> ]
	factor de crecimiento transformante, beta 2
	proteína hipotética MGC29643
20	antígeno identificado por anticuerpo monoclonal MRC OX-2
	proteína de retinopatía putativa ligada al cromosoma X

**Tabla 6-7.** Genes que se incrementaron en expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes aumenta en las células ICBM</b>	
25	• proteína de repetición de anquirina cardiaca
	• región ORF de MHC de clase I
	• integrina, alfa 10
30	• proteína hipotética FLJ22362
	• UDP-N-acetilo-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
	• proteína inducida por interferón 44
	• SRY (región determinante del sexo Y)-box 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)
	• proteína asociada a queratina 1-1
35	• similar a hipocalcina 1
	• dentado 1 (síndrome de Alagille)
	• proteoglicano 1, gránulo secretor

**Tabla 6-8.** Los genes que se incrementaron en expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

<b>Genes incrementados en las células MSC</b>	
40	• interleucina 26
	• maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
	• subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2
45	• v-fos FBJ osteosarcoma murino homólogo de oncogén viral
	• proteína hipotética DC42
	• subfamilia de receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2
	• homólogo de oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ B
	• proteína de ruta de señalización inducible por WNT1 1
50	• línea celular MCF.2 derivada de secuencia transformante
	• canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
	• homeoproteína de cartilago de clase emparejada 1
	• <i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ 12232 fis, clon MAMMA1001206
	• <i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
55	• jun B proto-oncogén
	• CLL/linfoma de células B 6 (proteína de dedo de zinc 51)
	• proteína de dedo de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

**[0213] Resumen.** El presente estudio se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células derivadas del pospartos del cordón umbilical y de placenta. Este análisis incluyó células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y tres placentas diferentes. El estudio también incluyó dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de Células madre mesenquimatosas, y tres líneas de células de médula ósea de la cresta iliaca. El ARNm que se expresó por estas células se analizó en una matriz de oligonucleótido GENECHIP que contenía sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

**[0214]** El análisis reveló que las transcripciones de 290 genes estaban presentes en diferentes cantidades en estos

cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen diez genes que se incrementan específicamente en las células derivadas de la placenta y siete genes aumentaron específicamente en las células derivadas del cordón umbilical. Se han encontrado que cincuenta y cuatro genes tenían niveles de expresión específicamente más bajos en placenta y en cordón umbilical.

5 **[0215]** La expresión de genes seleccionados ha sido confirmada por PCR, como se muestra en el Ejemplo 7. Generalmente las células derivadas del posparto, y las células derivadas del cordón umbilical, en particular, tienen distintos perfiles de expresión génica, por ejemplo, en comparación con otras células humanas, tales como las células derivadas de médula ósea y de los fibroblastos examinados aquí.

## 10 **EJEMPLO 7**

### **Marcadores de células en células derivadas del cordón umbilical**

15 **[0216]** Perfiles de expresión génica de células derivadas del cordón umbilical humano se compararon con los de las células derivadas de otras fuentes usando un Affymetrix GENECHIP. Se identificaron seis genes "de firma": receptor de LDL oxidado 1, interleucina-8 (IL-8), renina, reticulon, ligando del 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 cordón umbilical.

20 **[0217]** Se llevaron a cabo los procedimientos descritos en este ejemplo para verificar los datos de micromatrices y comparar los datos para el gen y la expresión de proteínas, así como para establecer una serie de ensayos fiables para la detección de identificadores únicos para las células derivadas del cordón umbilical.

### **Métodos y Materiales**

25 **[0218] Células.** Células derivadas del cordón umbilical (cuatro aislados), y Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF; neonatal y adulto) se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las Células madre mesenquimatosas (MSC) se cultivaron en kit de bala de Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

30 **[0219]** Para experimentos IL-8, las células se descongelaron a partir de nitrógeno líquido y se sembraron en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup>, cultivadas durante 48 horas en medio de crecimiento y después se hicieron crecer adicionalmente durante 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero [DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro) (Gibco) y 0,1% (p/v) albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. A continuación, se extrajo el 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 hasta el análisis ELISA.

35 **[0220] Cultivo de células para el ensayo ELISA.** Las células derivadas de cordón umbilical humano, 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 15 ml de centrifuga. 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 75 cm<sup>2</sup> matraz 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. Medio de privación de suero se recogió al final de la incubación, se centrifugaron a 14.000 x g durante 5 minutos (y se almacenaron a -20°C).

45 **[0221]** Para estimar el número de células en cada frasco, 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) se añadieron cada matraz. Después de células desprendidas del matraz, la actividad tripsina se neutralizó con 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y 1 mililitro de Medio de Crecimiento se añadió a cada tubo para resuspender las células. El número de células se determinó con un hemocitómetro.

50 **[0222] Ensayo de ELISA.** 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 realizaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

55 **[0223] Aislamiento de ARN total.** Se extrajo ARN de células derivadas de cordón umbilical confluentes y fibroblastos, o por expresión IL-8, a partir de células tratadas como se describe anteriormente. Las células se lisaron con RLT de tampón de 350 microlitros que contiene mercaptoetanol beta (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). Se extrajo el ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) y se sometieron a tratamiento con ADNasa (2,7 unidades/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluye con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenaron a -80°C. ARN también fue extraído a partir de cordón umbilical humano. El tejido (30 miligramos) se suspendió en 700 microlitros de tampón RLT que contiene beta-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 almacenó a -80°C.

60 **[0224] Transcripción inversa.** ARN se transcribió a la inversa utilizando 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.

65 **[0225]** Los genes identificados por Micromatriz de ADNc como regulado 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.

**[0226] PCR en tiempo real.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión de genes que se venden bajo el nombre comercial de ASSAYS-ON-DEMAND (Applied Biosystems) productos de expresión de genes. Receptor de LDL oxidado (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); Ligando C-X-C 3 (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH se mezclaron con ADNc y PCR universal TaqMan master mix de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con ABI Prism 7000 SDS software (Applied Biosystems). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. PCR datos se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario nº 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

**[0227] PCR convencional.** PCR convencional se realizó utilizando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de PCR en tiempo real. PCR se realizó usando 2 microlitros de solución de ADNc (1 X Taq polimerasa (nombre comercial AMPLITAQ GOLD) mezcla universal de tampón de reacción PCR (Applied Biosystems) 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 la renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos para 38 ciclos); para el receptor de LDL oxidada y GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos para 33 ciclos) Los cebadores usados para la amplificación se enumerados en la Tabla 7-1. concentración de cebador en la reacción de PCR final era de 1 micromolar a excepción de GAPDH que era de 0,5 micromolar. cebadores GAPDH fueron los mismos que para la PCR en tiempo real, excepto que la sonda TaqMan por el fabricante no se añadió a la PCR final de reacción. Las muestras se separaron en 2% (p/v) en gel de agarosa y se tñieron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Se tomaron imágenes en lámina 667 (Universal Twinpack, VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara Polaroid de longitud focal fija (VWR International, South Plainfield, NJ).

**Tabla 7-1: Cebadores utilizados**

Nombre del cebador	Cebadores
<b>Receptor LDL oxidado</b>	S: 5'- GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO: 1) A: 5'-AGAATGGAAAAGTGGGAATAGG -3' (SEQ ID NO: 2)
<b>Renina</b>	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC -3' (SEQ ID NO: 3) A: 5 'GAATTCTCGGAATCTCTGTTG -3' (SEQ ID NO: 4)
<b>Reticulon</b>	S: 5'- TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO: 5) A: 5'- AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO: 6)
<b>Interleucina-8</b>	S: 5'- TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO: 7) A: 5 'CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC- 3' (SEQ ID NO: 8)
<b>Quimiocina (C-X-C) ligando 3</b>	S: 5'- CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO: 9) A: 5 'TCCTGTCTAGTTGGTGTCTCC -3' (SEQ ID NO: 10)

**[0228] Inmunofluorescencia.** Las células se fijaron con 4% (p/v) de paraformaldehído frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron células derivadas del cordón umbilical en el paso 0 (P0) (un aislado, directamente después del aislamiento) y el paso 11 (P11) (dos aislados de células derivadas del cordón umbilical), y fibroblastos (P11). La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1: 500, Sigma, St. Louis, MO), desmina ((Sigma) 1: 150; producido contra conejo; o (Chemicon, Temecula, CA) 1: 300, generado contra ratón), músculo liso alfa actina (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (humano CD34 Clase III; 1: 100; DakoCytomation, Carpinteria, CA). Además, los siguientes marcadores fueron examinados en células del posparto del paso 11: GROalfa anti-humana - PE (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor de LDL oxidada anti-humana 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGO-A anti-humana (1: 100; Santa Cruz, Biotech).

**[0229]** Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Cuando el epítomo de interés se encuentra en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), Triton X-100 se omitió en todos los pasos del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítomo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se planteó en contra de cabra se utilizó (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), 3% (v/v) de suero de burro en lugar de suero de cabra. 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 IgG-Texas Red de anti-ratón de cabra (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG-Alexa 488 anti-conejo de cabra (1: 250; Molecular Probes) o IgG-FITC anti-cabra de burro (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.

**[0230]** Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando un filtro de fluorescencia correspondiente

en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó señal de fluorescencia sobre la tinción de control donde todo el procedimiento descrito anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario (sin 1º control). Imágenes representativas fueron capturadas utilizando una cámara de vídeo digital en color y software 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).

**[0231] Análisis FACS.** Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y separadas con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mililitro. Cien microlitros alícuotas fueron entregados a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con Perm/Tampón de lavado (BD Pharmingen, San Diego, CA). El anticuerpo se añadió a alícuotas como por 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. Se añadió el anticuerpo secundario, según las especificaciones del fabricante y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 ml de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: receptor de LDL oxidada 1 (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROalfa (555 042; BD Pharmingen, Bedford, MA), el ratón IgG1 kappa, (P-4685 y M-5284; Sigma), IgG de burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech). Citometría de flujo se realizó con FACSCalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

### Resultados

**[0232]** Los resultados de PCR en tiempo real para genes "de firma" seleccionados realizados en ADNc a partir de células derivadas de cordón umbilical humano umbilical, fibroblastos adultos y neonatales, y Células madre mesenquimatosas (MSCs) indican que expresión tanto de reticulon como del receptor de LDL oxidada fueron mayores en células derivadas del cordón umbilical en comparación con otras células. Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el método  $\Delta\Delta CT$  (delta delta CT) y se expresaron en una escala logarítmica. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de CXC ligando 3 y GCP-2 entre las células del posparto y controles. Los resultados de PCR en tiempo real fueron confirmados por P convencional CR. La secuenciación de los productos de PCR validó aún más estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de CXC ligando 3 entre las células del posparto y controles utilizando los cebadores PCR CXC convencional ligando 3 enumerados en la Tabla 7-1.

**[0233]** La expresión de la citoquina, IL-8 en células del posparto fue elevada tanto en las células derivadas del posparto cultivadas en medio de crecimiento y privadas de suero. Todos los datos de PCR en tiempo real fueron validados con PCR convencional y mediante la secuenciación de productos de PCR.

**[0234]** Después del crecimiento en medio libre de suero, se examinaron los medios condicionados para detectar la presencia de IL-8. Se detectaron las mayores cantidades de IL-8 en medios en los que las células del cordón umbilical habían sido cultivadas (Tabla 7-2). No se detectó IL-8 en un medio en el que se habían cultivado los fibroblastos dérmicos humanos.

**Tabla 7-2: Expresión de proteína IL-8 medida por ELISA**

Tipo de célula	Secreción IL-8
hFibro	ND
Aislado UMBC 1	2.058,42+144,67
Aislado UMBC 2	2368.86+22,73
Los resultados del ensayo ELISA para la interleuquina-8 (IL-8) se realizaron en medio gastado en el que se habían cultivado células derivadas del cordón umbilical y fibroblastos de piel humana. Los valores presentados aquí son pg/millón de células, n = 2, sem.	
<b>ND: No detectado</b>	

**[0235]** Las células derivadas del cordón umbilical humano en el paso 0 se examinaron para la expresión de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (paso 0), las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: Factor de von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de músculo liso-alfa, y vimentina. Células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para actina de músculo liso-alfa y vimentina, con el patrón de tinción consistente a través del paso 11.

**[0236]** La expresión de GROalfa, GCP-2, receptor de LDL oxidada 1 y reticulon en células derivadas del cordón umbilical en el paso 11 se investigó por inmunocitoquímica.

**[0237] Resumen.** La concordancia entre los niveles de expresión de genes medidos por micromatriz y PCR (tanto en tiempo real como convencional) se ha establecido para cuatro genes: receptor de LDL oxidada 1, renina, reticulon, e IL-8. La expresión de estos genes se regula a nivel de ARNm en las células del posparto. IL-8 también

fue regulada a nivel de proteínas. Las diferencias en la expresión de GCP-2 y CXC ligando 3 no se confirmaron en el ARNm.

[0238] Las células derivadas del cordón umbilical humano en el pase 0 se examinaron para la expresión de actina de músculo liso-alfa y vimentina, y fueron positivas para ambas. El patrón de tinción fue preservado a través del paso 11, lo que sugiere que la expresión de vimentina y actina de músculo liso-alfa se conserva en las células con pasos, al menos en el medio de crecimiento usado.

## EJEMPLO 8

### **Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos de células derivadas del cordón umbilical**

[0239] Los fenotipos de células que se encuentran dentro del tejido de cordón umbilical humano se analizaron por inmunohistoquímica.

#### **Materiales y Métodos**

[0240] **Preparación de tejidos.** Tejido del cordón umbilical humano se cosechó y la inmersión se fijó en 4% (p/v) paraformaldehído durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (véase la Tabla 8-1): vimentina (1: 500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150, generado contra conejo; Sigma; o 1: 300, generado contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa-actina de músculo liso (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma) y CD34 (CD34 humano de Clase III; 1: 100; Dako, Carpintería, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores: GROalfa-PE anti-humana (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), Receptor de LDL oxidada 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech) anti-humana, y NOGO-A anti-humana (1: 100; Santa Cruz Biotech). Muestras fijadas se recortaron con un bisturí y se colocaron dentro del compuesto de incrustación de OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contiene etanol. Los bloques congelados fueron entonces seccionados (10 micras de espesor) utilizando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para tinción.

[0241] **Inmunohistoquímica.** La inmunohistoquímica se realizó similarmente a los estudios anteriores (*por ejemplo*, Messina, et al. (2003) *Exper Neurol* 184: 816-829). Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a antígenos intracelulares. En casos en los que se encuentra el epítomo 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 epítomo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se planteó en contra de cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó 3% (v/v) de suero de burro en lugar de suero de cabra durante todo el procedimiento. Los anticuerpos primarios, se diluyeron en solución de bloqueo, se aplicaron a las secciones durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario, 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 IgG-Texas Red de anti-ratón de cabra (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG-Alexa 488 anti-conejo de cabra (1: 250; Molecular Probes) o IgG-FITC anti-cabra de burro (1: 150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicó 10 DAPI micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0242] Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epifluorescencia invertido de Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva fue representada por la señal de fluorescencia sobre la tinción de control. Imágenes representativas se tomaron utilizando una cámara de vídeo digital en color y software 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).

**Tabla 8-1: Resumen de los anticuerpos primarios utilizados**

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

**Resultados**

**[0243] Caracterización de cordón umbilical.** Vimentina, desmina, marcadores SMA, CK18, de vWF, y 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. CD34 + células estaban en la capa más interna (lado lumen). La expresión de vimentina se encontró en toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón. SMA se limita a la matriz y las paredes exteriores de la arteria y la vena, pero no contenía a los propios vasos. CK18 y desmina fueron observados solamente dentro de los vasos, estando la desmina limitada a las capas media y exterior.

**[0244] Resumen.** Vimentina, desmina, actina de músculo liso-alfa, citoqueratina 18, von Willebrand Factor, y CD34 se producen en las células dentro del cordón umbilical humano.

**EJEMPLO 9****Secreción de factores tróficos por células derivadas del cordón umbilical**

**[0245]** Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de PPDCs derivadas del cordón umbilical. Se seleccionaron factores que tienen actividad angiogénica (*es decir*, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen et al. (1997) Ciba Found. Symp. 212: 215-26), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Salcedo et al. (2000) Blood 96; 34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li et al. (2003). J. Immunol 170: 3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes et al. (2004). Ann Thorac Surg 77: 812-8), inhibidor tisular de la metaloproteinasa de matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFBB), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor derivado del estroma 1 alfa (SDF-1 alfa)), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng et al. (2003). Dev Biol 258; 319-33), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2)), o la actividad de quimiocinas (proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1a lpha), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1beta), quimioatrayentes de monocitos-1 (MCP-1), Rantes (regulados en la activación, célula T normal expresada y secretada), I309, timo y quimiocina regulada por activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

**Métodos y Materiales**

**[0246] Cultivo celular.** PPDCs derivadas de 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 fueron criopreservadas en el paso 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, Medio de Crecimiento se añadió a las células, seguido por transferencia a un mililitro 15 tubo de centrifuga y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 4 mililitros de medio de crecimiento, y se contaron las células. Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 que contienen cada uno 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 de suero bovino (Sigma), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomocina (50 microgramos/mililitro, Gibco)) durante 8 horas. 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.

**[0247]** Para estimar el número de células en cada matraz, se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron usando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). 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 retiró el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de Medio de Crecimiento. El número de células se estimó con un hemocitómetro.

**[0248] Ensayo ELISA.** Las células fueron cultivadas a 37°C en dióxido de carbono 5% y oxígeno atmosférico. La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1 alfa, GCP-2, IL-8, y TGF-beta2 producida por cada muestra de células se determinó por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son picogramos por mililitro por millón de células (n = 2, SEM).

**[0249] Ensayo ELISA SearchLight multiplexado.** Las quimiocinas (MIP1alpha, MIP1beta, MCP-1, RANTES, I309, TARC, eotaxina, MDC, IL8), BDNF, y de los factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGFbb, TPO, se midieron HB-EGF usando SearchLight Proteome Arrays (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteoma son ELISAs de sandwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a dieciséis 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 dieciséis diferentes anticuerpos de captura en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento ELISA sándwich, toda la placa se forma para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. La señal generada en cada punto es proporcional a la cantidad de proteína diana en el estándar o muestra original.

**Resultados**

**[0250] Ensayo de ELISA.** MCP-1 e IL-6 se secretaron por PPDCs derivadas de cordón umbilical y fibroblastos

dérmicos (Tabla 9-1). SDF-1alfa y GCP-2 fueron secretados por los fibroblastos. GCP-2 e IL-8 fueron secretados por PPDCs derivadas de cordón umbilical. TGF-beta2 no se detectó a partir de cualquiera de los tipos de células por ELISA.

5

**Tabla 9-1.** Resultados de ELISA: Detección de factores tróficos

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
<b>Fibroblastos</b>	17±1	61±3	29±2	1961	21±1	ND	ND
<b>Umbilical (022803)</b>	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
<b>Umbilical (071003)</b>	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND

Clave: ND: No detectado, =/- SEM

10

15 **[0251] Ensayo ELISA SearchLight multiplexado.** TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1beta, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC, y la IL-8 se secretan de PPDCs derivadas de cordón umbilical (Tablas 9-2 y 9-3). No se detectaron Ang2, VEGF, o PDGFbb.

**Tabla 9-2.** Resultados de ensayo ELISA de SearchLight multiplexado

20

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
<b>hFB</b>	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
<b>U1</b>	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
<b>U3</b>	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

Clave: HFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivadas del cordón umbilical (022803)), U3 (PPDC derivadas del cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

25

**Tabla 9-3.** Los resultados del ensayo de ELISA SearchLight multiplexado

30

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
<b>hFB</b>	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
<b>U1</b>	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
<b>U3</b>	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

Clave: HFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivadas del cordón umbilical (022803)), U3 (PPDC derivadas del cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

35

40 **[0252] Resumen.** Células derivadas del cordón umbilical secretan una serie de factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, bFGF, MCP-1 y IL-8, desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF y IL-6, tienen un papel importante en la regeneración o la protección neural.

**EJEMPLO 10**

**Inmunología *En Vitro***

45

50 **[0253]** Las líneas celulares de posparto fueron evaluadas *in vitro* por sus características inmunológicas en un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica que, en su caso, estas células provocarían sobre trasplante *in vivo*. Líneas celulares de posparto se analizaron por citometría de flujo para la expresión 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<sup>+</sup> (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, quinta ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171). Las líneas celulares también se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, quinta Ed. (2003) Saunders, Philadelphia, p. 171), CD178 (Coumans, et. al, (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196), y PD-L2 (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, quinta Ed (2003.) Saunders, Philadelphia, p 171; Brown, et al. (2003) The Journal of Immunology 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 tejidos de la placenta *en el útero*. Para predecir el grado en que líneas celulares derivadas de posparto provocan una respuesta inmune *in vivo*, las líneas de células se ensayaron en una reacción mixta de linfocitos de una vía (MLR).

60

**Materiales y métodos**

65 **[0254] Cultivo celular.** Las células se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertas con gelatina al 2% (Sigma, St. Louis, MO) hasta la confluencia.

**[0255] Tinción de anticuerpos.** Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Las células se recogieron, se centrifugaron,



y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Anticuerpo (Tabla 10-1) 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 volvieron a suspender en quinientos microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

**Tabla 10-1. Anticuerpos**

Anticuerpo	Fabricante	Numero de catalogo
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen	557227
CD86	BD Pharmingen	555665
B7-H2	BD Pharmingen	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, Reino Unido)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen	557846
Ratón IgG2alpha	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
Ratón IgG1kappa	Sigma	P-4685

**[0256] Reacción mixta de linfocitos.** Viales criopreservados de paso 10 PPDCs derivadas del cordón umbilical etiquetadas como línea celular "A" se enviaron sobre hielo seco a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción mixta de linfocitos usando CTBR SOP N° CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios masculino y femeninos. Seis donantes de sangre voluntarios humanos fueron examinados para identificar un único donante alogénico que exhibió 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 control positivo alogénico. Los cinco donantes de sangre restantes fueron seleccionados como receptores. PBMC alogénica estimuladora (donante), PBMC autóloga, y las líneas celulares de posparto se trataron con mitomicina C. Células estimuladoras autóloga y con mitomicina tratadas con C se añadieron a PBMCs respondedoras (receptores) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, [<sup>3</sup>H] timidina se añadió a cada muestra y se cultivaron durante 18 horas. Después de la cosecha de las células, se extrajo el ADN radiomarcado, y [<sup>3</sup>H]-timidina se midió utilizando un contador de centelleo. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando placas de cultivo de dos células con tres receptores por placa

**[0257]** El índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) se calculó como la proliferación media del receptor más donante alogénico tratado con mitomicina C dividido por la proliferación de línea de base del receptor. El índice de estimulación de las células del posparto se calculó como la proliferación media del receptor más línea celular de posparto tratado con mitomicina C dividido por la proliferación de línea de base del receptor.

**Resultados**

**[0258] Reacción de linfocitos mixtos-células derivadas del cordón umbilical.** Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 10-2 y -3. El índice medio de estimulación varió de 6,5 (placa de 1) a 9 (placa de 2) y los controles positivos de donante alogénico variaron de 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 10-3).

**Tabla 10-2.** Datos de reacción de linfocitos mixtos- Línea celular A (omblijo)

DPM para Ensayo de Proliferación Placa ID: Placa1								
Nº analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	SD	CV	
		1	2	3				
IM04-2478	Línea de base de proliferación de receptor	1074	406	391	623.7	390.07	62.5	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	672	510	1402	861.3	475.19	55.2	
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7	
	MLE con línea celular (Célula tratada con mitomicina C de tipo A)	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3	
SI (donor) SI (cell line)					708			
IM04-2479	Línea de base de proliferación de receptor	530	508	527	521.7	11.93	2.3	
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	701	567	1111	793.0	283.43	35.7	
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1	
	MLE con línea celular (Célula tratada con mitomicina C de tipo A)	5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3	
SI (donante) SI (línea celular)					477			

(continúa)

DPM para Ensayo de proliferación. Placa ID: Placa1									
Nº analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM04-2480	Línea de base de proliferación de receptor Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C) MLE con línea celular (Célula tratada con mitomicina C de tipo A)	1192	854	1330	1125.3	244.90	21.8		
		2963	993	2197	2051.0	993.08	48.4		
		25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7		
		2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1		
SI (donante) SI (línea celular)					233				
IM04-2481	Línea de base de proliferación de receptor Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C) MLE con línea celular (Célula tratada con mitomicina C de tipo A)	695	451	555	567.0	122.44	21.6		
		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)					318				
Placa ID: Placa 2									
Nº analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM04-2482	Línea de base de proliferación de receptor Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C) MLE 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)					709				

(continúa)

Placa ID: Placa 2									
Nº analítico	Culture System	Replicados			Media	SD	CV		
		1	2	3					
IM04-2477 (donante alogénico)	Línea de base de proliferación de receptor 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 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 10-3.** Índice de estimulación medio de células del 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

**[0259] Marcadores de células que presentan antígenos producidos por células derivadas del cordón umbilical.** Los histogramas del análisis de flujo de citometría muestran que las células del cordón umbilical fueron negativas para la producción de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, debido a que los valores de fluorescencia fueron comparables con el control de IgG. Esto indica que las líneas celulares umbilicales carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente células T CD4<sup>+</sup>.

**[0260] Los marcadores inmunomoduladores en células derivadas del cordón umbilical.** Las células del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo fueron positivas para la expresión de PD-L2, como se refleja en el aumento de la fluorescencia con respecto al control de IgG. Las células fueron negativas para la expresión de CD 178 y HLA-G, como se indica por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

**[0261] Resumen.** En las reacciones de linfocitos mixtos realizados con líneas celulares del cordón umbilical, el índice medio de estimulación varió de 6,5 a 9, mientras que el de los controles positivos alogénicas varió de 42,75 a 70. Líneas celulares del cordón umbilical no expresaban cantidades detectables de las proteínas estimulantes de HLA-DR, HLA -DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se midió por citometría de flujo. Líneas celulares del cordón umbilical también no expresan las proteínas inmuno-moduladoras de HLA-G y CD178, pero la expresión de PD-L2 se detectó 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 los linfocitos alogénicos. La ausencia en las células derivadas del cordón umbilical de moléculas de superficie celular presentadoras de antígeno requeridas para la estimulación directa de Células T ingenuas CD4<sup>+</sup>, así como la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, podría explicar el índice de baja estimulación exhibida por estas células en una MLR en comparación con controles alogénicos.

**EJEMPLO 11**

**Ensayo de coagulación de plasma**

**[0262]** Las células útiles para la terapia pueden inyectarse sistémicamente para ciertas aplicaciones en las que las células son capaces de dirigir el sitio de acción. Es importante que las células inyectadas no causen trombosis, ya que puede ser fatal. El factor tisular, una glicoproteína procoagulante unida a la membrana, es el iniciador de la cascada de coagulación extrínseca, que es la vía de coagulación predominante *in vivo*. El factor tisular también juega un papel importante en la formación de vasos embrionaria, por ejemplo, en la formación de la pared vascular primitiva (Brodsky et al. (2002) Exp Nephrol 10: 299-306). Para determinar el potencial de PPDCs para iniciar la coagulación, se evaluaron PPDCs derivadas del cordón umbilical para la expresión del factor tisular y por su

capacidad para iniciar la coagulación de plasma.

### **Métodos y Materiales**

5 **[0263] Factor tisular humano.** Factor tisular humano (Simplastin, Organon Teknika Corporation, Durham, NC), se reconstituyó con 20 mililitros de agua destilada. La solución madre se diluyó en serie (1: 2) en ocho tubos. Plasma humano normal (George King Biomedical, Overland Park, KS) se descongeló a 37°C en un baño de agua y después se almacenó en hielo antes de su uso. 100 microlitros de salina tamponada con fosfato (PBS), 10 microlitros SIMPLASTIN diluida, 30 microlitros de cloruro de calcio 0,1 molar y 100 microlitros de plasma humano normal se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Un pocillo de control negativo no recibió ninguna SIMPLASTIN. La placa se coloca inmediatamente en un lector de microplacas a temperatura controlada y la absorbancia medida a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

10 **[0264] Células derivadas de J-82 y del cordón umbilical.** J-82 (ATCC, MD) se cultivó en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Gibco, Carlsbad, CA) que contiene 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; Hyclone, Logan UT), 1 milimolar de piruvato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO), 2 milimolar de L-glutamina (Mediatech Herndon, VA), 1 x aminoácidos no esenciales (Mediatech Herndon, VA). A aproximadamente el 70% de confluencia, las células se transfirieron a 100.000, 50.000 y 25.000 células/pocillo a los pocillos de placa de 96 pocillos. Células derivadas del cordón umbilical se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Células derivadas del cordón umbilical en el paso 18 se transfirieron a los pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo. El medio de cultivo se retiró de cada pocillo después de centrifugación a 150 x g durante 5 minutos. Las células se suspendieron en PBS sin calcio y magnesio. Las células incubadas con células de anticuerpo anti-factor de tejido se incubaron con 20 microgramos/mililitro CNTO 859 (Centocor, Malvern, PA) durante 30 minutos. Se añadió cloruro de calcio (30 microlitros) a cada pocillo. La placa se colocó inmediatamente en un lector de microplacas a temperatura controlada y se midió la absorbancia a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

20 **[0265] Tinción de anticuerpo.** Las células se lavaron en PBS y se separaron del matraz con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. El anticuerpo se añadió a 100 microlitros de suspensión de células de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS, después se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 100 microlitros de 3% de FBS y anticuerpo secundario añadido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 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 anticuerpo secundario no unido. Las células lavadas se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo.

30 **[0266] El análisis de citometría de flujo.** Análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

### **Resultados**

40 **[0267]** El análisis de citometría de flujo reveló que las células de posparto derivadas del cordón umbilical son menos activas en la promoción de la coagulación de plasma de las células J82. Aunque un ensayo de coagulación de plasma demostró que el factor de tejido presente en las células derivadas del cordón umbilical era activo, la coagulación tomó más tiempo que con las células J-82, como se evidencia por el tiempo más largo para la absorbancia media-máxima (T1/2 a max; Tabla 11 -1). El T1/2 a max es inversamente proporcional al número de células J-82. Células derivadas del cordón umbilical disminuyeron la tasa de coagulación como se indica por la T1/2 a max. La coagulación se observó tanto con células pasajeadas tempranas (P5) como tardías (P18). La preincubación de las células del cordón umbilical con CNTO 859, un anticuerpo para el factor tisular, inhibe la reacción de coagulación, estableciendo que el factor tisular era responsable de la coagulación.

50 **Tabla 11-1.** El efecto del factor de tejido humano (Simplastin®) y células derivadas del cordón umbilical (UMB) en la coagulación de plasma. El tiempo hasta absorbancia máxima media (T 1/2 a max) en la meseta en segundos se utilizó como unidad de medida.

Estándar (dilución Simplastin®)	T 1/2 al máximo (segundos)
1: 2	61
1: 4	107
1: 8	147
1: 16	174
1: 32	266
1:64	317
1: 128	378

(continúa)

	Estándar (dilución Simplastin®)	T 1/2 al máximo (segundos)
5	0 (control negativo)	1188
	<b>células J-82</b>	
	100.000	122
10	50000	172
	25000	275
	<b>UMB P5</b>	
15	50000	833
	<b>P18 UMB</b>	
	50000	443

20 **[0268] Resumen.** PPDCs derivadas del cordón umbilical producen cierto factor tisular, pero la adición de un anticuerpo contra el factor tisular puede inhibir la actividad de coagulación del factor de tejido. El factor tisular se encuentra normalmente en las células en una conformación que es inactiva, pero que es activada por estrés mecánico o químico, *por ejemplo*, LPS) (Sakariassen et al. (2001) Thromb Res 104: 149-74; Engstad et al. (2002) Int Immunopharmacol 2: 1585-1597). Por lo tanto, la minimización de la tensión durante el proceso de preparación de PPDCs puede evitar la activación del factor tisular. Además de la actividad trombogénica, el factor tisular se ha asociado con la actividad angiogénica. Por esta razón, la actividad del factor de tejido puede ser beneficiosa cuando PPDCs derivadas del cordón umbilical se trasplantan en el tejido, pero deberían inhibirse cuando las PPDCs se inyecten por vía intravenosa.

### 30 EJEMPLO 12

#### Trasplante de células derivadas del cordón umbilical

35 **[0269]** Las células derivadas del cordón umbilical de posparto son útiles para terapias regenerativas. Se evaluó tejido producido por ratones SCID después del trasplante de un material biodegradable con y sin células derivadas del cordón umbilical. Los materiales evaluados fueron andamios no tejidos VNW, 35/65 PCL/PGA de espuma, y un hidrogel de péptido de auto-montaje.

#### 40 Métodos y Materiales

**[0270] Cultivo celular.** Células derivadas del cordón umbilical se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces recubiertos de gelatina.

45 **[0271] Preparación de matriz.** Un andamio de material no tejido se preparó usando una técnica de perforación con aguja tradicional como se ha descrito abajo. Las fibras, que constan de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), se obtuvieron de Ethicon, Inc. (Somerville, NJ). Las fibras eran filamentos de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro. Las fibras fueron cortadas y rizadas en longitudes sustancialmente uniformes de 2 pulgadas para formar fibras cortadas de 2 pulgadas. Una matriz no tejida de aguja perforada seca se preparó utilizando las fibras cortadas PGA/PLA, en adelante "VNW". Las fibras cortadas se abrieron en maquinaria no tejida estándar. La estera resultante estaba en la forma de fibras discontinuas palmeadas. Las fibras cortadas palmeadas se perforaron con aguja para formar el andamio no tejido perforado con aguja seco. El andamio no tejido se enjuagó en agua, seguido por otra incubación en etanol para eliminar cualquier residuo químico o coadyuvantes de elaboración utilizados durante el proceso de fabricación.

50 **[0272]** Las espumas, compuestas de 35/65 de copolímero poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (35/65 PCL/PGA), se formaron por el proceso de liofilización, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.355.699.

55 **[0273]** Un hidrogel de péptido de auto montaje (péptidos de automontaje RAD16 (3D Matrix, Cambridge, MA)) se obtuvieron como solución estéril 1% en agua (p/v).

60 **[0274] Preparación de la muestra.** Un millón de células viables se sembraron en 15 microlitros de medio de crecimiento en diámetro de 5 milímetros, andamios VNW de espesor de 2,25 milímetros (64,33 miligramos/cc); o discos de espuma de 5 milímetros de diámetro 35/65 PCL/PGA. Las células se dejaron unir durante dos horas antes de añadir más medio de crecimiento para cubrir los andamios. Las células se cultivaron en andamios durante la noche. Andamios de control sin células también se incubaron en medio.

65 **[0275]** La solución de péptido de auto-montaje se mezcló 1: 1 con  $1 \times 10^6$  células en 10% (p/v) de sacarosa (Sigma, St Louis, MO), 10 milimolar HEPES (pH aproximadamente 7), en Medio modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) inmediatamente antes de su uso. La concentración final de células en el hidrogel de péptido de auto-montaje era de  $1 \times 10^6$  células/100 microlitros.

MATERIAL DE ENSAYO (N = 4/condición)

**[0276]**

- 5 1. Andamio VNW + 1 x 10<sup>6</sup> células derivadas del cordón umbilical
2. Espuma 35/65 PCL/PGA + 1 x 10<sup>6</sup> células derivadas del cordón umbilical
3. Péptido de automontaje + 1 x 10<sup>6</sup> células derivadas del cordón umbilical
4. Espuma 35/65 PCL/PGA
- 10 5. Endamio VNW

**[0277] Preparación de los animales.** Los animales utilizados en este estudio fueron manejados y mantenidos de acuerdo con los requisitos actuales de la Ley de Bienestar Animal. El cumplimiento de las Leyes Públicas anteriores se logra mediante la adhesión a las normas de bienestar animal (9 CFR) y conforme a las normas vigentes promulgadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, 7ª edición.

15 **[0278] Animales:** ratones macho (*Mus musculus*) (Fox Chase SCID; Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana), se utilizaron a las 5 semanas de edad. Toda la manipulación de los ratones SCID se llevó a cabo bajo una campana. Cada animal se pesó individualmente, y se anestesió con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramo Ketaset (hidrocloruro de ketamina) (Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa), 10 miligramos/kilogramo Rompun (xilazina) (Moby Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de la anestesia, se eliminó el pelo de la parte posterior del animal desde el área cervical dorsal a la zona lumbosacra dorsal mediante el uso de una maquinilla eléctrica para animales. A continuación, la zona se restregó con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó, y se pintó con una solución de yodóforo acuosa de 1% de yodo disponible. Pomada oftálmica se aplicó a los ojos para evitar el secado del tejido durante el período de anestésico.

25 **[0279] Técnica de implantación subcutánea.** Cuatro incisiones en la piel, cada uno de aproximadamente 1 centímetro de longitud, se hicieron en el dorso de los ratones. Dos sitios de implantación craneales, uno de cada uno a la izquierda y derecha de la columna vertebral, se encuentran transversalmente sobre la región torácica lateral dorsal, aproximadamente 5 milímetros de caudal hasta el borde inferior palpado de la escápula. Dos implantes adicionales, uno en cada lado de la línea media, se colocaron transversalmente sobre el área del músculo glúteo a nivel sacro-lumbar de caudal, aproximadamente 5 milímetros de caudal a la cresta ilíaca palpada. Los implantes se colocaron al azar en estos sitios. La piel fue separada del tejido conectivo subyacente para formar un pequeño bolsillo y se colocó el implante (o se inyectó en el caso del péptido de auto-montaje) de aproximadamente 1 centímetro de caudal a la incisión. El material de ensayo apropiado se implanta en el espacio subcutáneo. La incisión de la piel se cerró con clips metálicos.

35 **[0280] Alojamiento animal.** Los animales se alojaron individualmente en jaulas de microaislador durante todo el curso del estudio dentro de un intervalo de temperatura de 64°F - 79°F y humedad relativa de 30% a 70%, y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (aproximadamente). La dieta consistía en Irradiated Pico Mouse Chow 5058 (Purina Co.) y agua suministrada *ad libitum*.

40 **[0281]** Los ratones fueron sacrificados por inhalación de dióxido de carbono a intervalos designados. Los implantes subcutáneos con la piel suprayacente se extirparon y se congelaron para histología.

45 **[0282] Histología.** La piel extirpada con implante se fijó con 10% de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI). Las muestras con tejido suprayacente y adyacente se bisecaron centralmente, se procesaron por parafina, y se embebieron en la superficie de corte usando métodos de rutina. Se seccionó tejido embebido (secciones de cinco micras) en un microtomo y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Poli Scientific, Bay Shore, NY) usando métodos de rutina.

**Resultados**

50 **[0283]** No hubo crecimiento hacia el interior mínimo de tejido en espumas de control sin células derivadas del cordón umbilical implantadas subcutáneamente en ratones SCID después de 30 días. En contraste, no hubo relleno de tejido extensivo en espumas implantados con células derivadas del cordón umbilical.

**[0284]** Hubo cierto crecimiento de tejido en los andamios VNW. Andamios no tejidos sembrados con células derivadas del cordón umbilical mostraron un aumento de la deposición de matriz y los vasos sanguíneos maduros.

55 **[0285] Resumen.** Se demostró que las células derivadas del cordón umbilical humano para aumentar drásticamente la formación de buen tejido de calidad en andamios biodegradables. Andamios sintéticos absorbibles no tejidos, discos de espuma (5,0 milímetros de diámetro x 1,0 milímetros de espesor), o hidrogeles de péptidos de automontaje se sembraron con células derivadas de cordón umbilical humano y se implantaron subcutáneamente bilateralmente en la región de espina dorsal de ratones SCID. Las células derivadas del cordón umbilical mejoraron el crecimiento interno del tejido y formación de vasos sanguíneos en los andamios en ratones inmunodeficientes, en comparación con él en los andamios no sembrados con células derivadas del cordón umbilical.

**EJEMPLO 13**

**Trasplante de células derivadas del cordón umbilical bajo la cápsula renal**

65 **[0286]** El trasplante de islotes pancreáticos a la cápsula renal se realiza rutinariamente para evaluar metodologías

de trasplante para el tratamiento de diabetes (Refaie *et al.*, 1998). Además de los islotes pancreáticos, otras células pueden diferenciarse en células secretoras de insulina capaces de homeostasis de la glucosa en sangre. Se evaluó la idoneidad de las células derivadas del cordón umbilical para este propósito.

## 5 Métodos y materiales

**[0287] Cultivo celular.** Células derivadas del cordón umbilical (aislado 1, P10) se retiraron del almacenamiento en nitrógeno líquido y se cultivaron en Medio de Crecimiento en frascos de T225 recubiertos de gelatina (Sigma) (Corning, Corning, NY) hasta la confluencia.

10 **[0288]** El medio de cultivo sobre las células derivadas del cordón umbilical se reemplazó con medio F12 de Ham (Gibco) que contiene 10 milimolar nicotinamida (Sigma), 25 glucosa milimolar (Sigma), 10 nanogramos/mililitro EGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ), 20 nanogramos/mililitro bFGF (PeproTech) y 15 milimolar GLP-1 (Sigma) y las células se cultivaron adicionalmente durante 2 semanas.

15 **[0289]** Las células de dos matraces se lavaron con salina tamponada de fosfato (PBS), y una suspensión de células individuales se obtuvieron mediante el uso de tripsina/EDTA (Gibco). Células CD34+ movilizadas GM-CSF criopreservadas fueron adquiridas de Cambrex, Walkersville, MD (lote 1F0174 donantes 7956). Las células CD34+ se descongelaron y se lavaron en medio DMEM.

20 **[0290]** La suspensión de células se lavó dos veces en DMEM. El número de células y la viabilidad se calculó después de tinción con azul de tripán (Sigma) utilizando un hemocitómetro. Las alícuotas de la suspensión de células que contiene ~ 300.000 células viables se centrifugaron a 150 x g y las células se resuspendieron en aproximadamente 6 microlitros de DMEM y se ingresaron en una punta de pipeta de 20 microlitros conectada a una jeringa de 1 mililitro. La punta de la punta de la pipeta que contiene las células se sujetó usando una pequeña Ligaclip (Ethicon Endosurgery, Cincinnati OH).

25 **[0291] Preparación de animales.** Los ratones (*Mus musculus*)/Fox Chase SCID/macho (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Indiana) fueron de 8 semanas de edad. Toda la manipulación de los ratones SCID se llevó a cabo bajo una campana. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de 60 miligramos/kilogramo Ketaset (ketamina hidrocloreuro, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa) y 10 miligramos/kilogramo Rompun (xilazina, Mobay Corp., Shawnee, Kansas) y solución salina. Después de la inducción de la anestesia, se eliminó el pelo de toda la parte posterior del animal desde el área cervical dorsal a la zona lumbosacra dorsal mediante el uso de una maquinilla eléctrica. El área se restregó con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó, y se pintó con una solución de yodóforo acuosa de 1% de yodo disponible. Pomada oftálmica se aplicó a los ojos para evitar el secado del tejido durante el período de anestésico. El animal anestesiado y quirúrgicamente preparado se colocó en la posición reclinada deseada. Una incisión transversal se hizo en el lado abdominal izquierdo aproximadamente 2 centímetros de caudal a la caja torácica de animal. El riñón fue expuesto y la cápsula perforada con una aguja de calibre 26. Se utilizó una lanza cápsula (punta de la pipeta de vidrio modificada) para crear un espacio debajo de la cápsula renal en el que se introdujeron las células. Las células fueron inyectadas a través de una jeringa con una punta de micropipeta adjunta. El bolsillo se cierra por el paso de una pluma de cauterio oftálmica (Aaron Medical Industries, St. Petersburg, Florida) sobre la abertura (no tocar el riñón). El riñón se colocó de nuevo en la posición anatómica correcta, y la capa muscular se sutura cerrado. La piel se cerró con grapas para heridas.

40 **[0292]** El diseño experimental se compuso de un trasplante de células en cada ratón; cuatro tratamientos con n-valor de 4 por tratamiento; y tres puntos de tiempo (1, 14 y 30 días).

**[0293]** Los ratones fueron sacrificados por inhalación de dióxido de carbono en sus intervalos designados. Los sitios de implantación renales fueron extirpados y congelados para histología.

45 **[0294] La inmunohistoquímica.** El sitio de implantación de riñón congelado se incrusta en el borde en compuesto O.C.T. (Sakura Inc., Torrance, CA). El tejido renal se recortó por criosección para producir una sección de cinco micrómetros de la zona de implantación y el tejido adyacente. Secciones cedidas fueron fijadas en 4% de paraformaldehído recién preparado (EM Sciences Gibbstown, NJ) en solución salina tamponada con fosfato (Gibco) durante 15 minutos. Las secciones se lavaron en PBS y se incubaron en 3% de suero de cabra en solución de bloqueo PBS durante una hora. La solución de bloqueo se retiró por aspiración suave. Las secciones se incubaron en núcleos de anticuerpo anti-humano (Chemicon International, Temecula, CA) diluido 1: 100 en solución de bloqueo durante una hora. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron en anticuerpo IgG anti-ratón de cabra marcada por fluorescencia (Molecular Probes Eugene, OR), diluido 1: 200 en solución de bloqueo durante 30 minutos en ausencia de luz. Las secciones se lavaron en PBS y se incubaron en 10 DAPI micromolar (Molecular Probes) durante cinco minutos. Las secciones se lavaron en PBS y se examinaron por microscopía fluorescente.

55 **[0295] Tinción Tri-Cromo.** Sitios de implantación de riñón congelados se incrustan en el borde en Compuesto O.C.T (Sakura Inc.). El tejido renal fue recortado por criosección para producir una sección de cinco micrómetros de la zona de implantación y el tejido adyacente. Las secciones cedidas fueron fijadas en 10% de formalina tamponada neutra (Richard-Allan Scientific) durante 15 minutos. Las secciones fueron teñidas tri-cromo (Poli Scientific) utilizando métodos de fabricación.

60

*Tratamiento:*

**[0296]**

65 1.  $3 \times 10^3$  células de cordón umbilical



2.  $3 \times 10^3$  células de cordón umbilical +  $3 \times 10^3$  células CD34+  
Añadidos tres animales como control (sin células)

## Resultados

[0297] La viabilidad de las células derivadas del cordón umbilical era ~ 75%; la de las células CD34+ era del 95%. Los intentos iniciales para trasplantar  $1 \times 10^6$  células viables no tuvieron éxito debido a que la cápsula renal no era lo suficientemente grande para acomodar las células. Las células fueron trasplantadas dentro de 3 horas de tratamiento con tripsina. La localización sobre de las células del posparto bajo la cápsula renal se observó microscópicamente. No hubo diferencias aparentes en el número y distribución de células derivadas del cordón umbilical con o sin células CD34+ en cada punto de tiempo. Hubo una aparente disminución en el número de células con el tiempo.

[0298] La tinción de las células bajo la cápsula renal mostró la retención de las células trasplantadas. Se detectaron células humanas utilizando el antígeno nuclear humano. Se detectaron todas las células (humanas y de ratón) usando DAPI.

[0299] Las células derivadas del cordón umbilical se observaron microscópicamente 14 y 30 días post-trasplante. Las células humanas se tiñeron de nuevo por el antígeno nuclear humano. La tinción tricrómica se utilizó para detectar la presencia de colágeno

[0300] **Resumen.** El trasplante de células en la cápsula renal fue exitosa. La reducción observada en el número de células con el tiempo en este experimento puede deberse a un número de factores tales como la viabilidad de las células en el momento del trasplante, la inmunidad innata y la insuficiente disponibilidad de nutrientes debido a problemas de vascularización. Mientras que la supervivencia a largo plazo o incluso el crecimiento de las células *in vivo* pueden ser útiles para ciertos propósitos, no es necesario para que las células se puedan utilizar en muchas aplicaciones, ni tampoco estos resultados reflejan la capacidad de las células para sobrevivir y crecer durante períodos más largos.

## Referencia

[0301] Refaie A., Gabr M. et al., (1998) Experimental islet cell transplantation in rats: Optimization of the transplantation site. *Trans. Proc.* 30:400-403

## EJEMPLO 14

### Diferenciación neural a corto plazo de células derivadas del cordón umbilical

[0302] Se examinó la capacidad de las células de posparto derivadas del cordón umbilical (PPDCs) para diferenciarse en células de linaje neural.

### **Materiales y Métodos**

[0303] **El aislamiento y la expansión de las células.** PPDCs derivadas del cordón umbilical se aislaron y expandieron tal como se describe en el Ejemplo 1 y 2.

### **Protocolo modificado Woodbury-Black.**

#### [0304]

(A) Este ensayo fue adaptado de un ensayo originalmente realizado para examinar el potencial de inducción neural de las células estromales de la médula ósea (1). PPDCs umbilicales (P4) se descongelaron y expandieron en cultivo en medio de crecimiento a 5.000 células/cm<sup>2</sup> hasta que se alcanzó sub-confluencia (75%). Las células fueron entonces tripsinizadas y se sembraron a 6.000 células por pocillo de una placa de vidrio Titretrek II (VWR International, Bristol, CT). Como controles, las Células madre mesenquimatosas (P3; 1F2155; Cambrex, Walkersville, MD), osteoblastos (P5; CC2538; Cambrex), células omentaleses (P6), células derivadas de tejido adiposo (US6555374 B1) (P6) y fibroblastos dérmicos humanos neonatales (P6; CC2509; Cambrex) también se sembraron en las mismas condiciones.

Todas las células se expandieron inicialmente durante 4 días en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene 15% (v/v) de suero bovino fetal (FBS; Hyclone, Logan, UT), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; 20 nanogramos/mililitro; Peprotech, Rocky Hill, NJ), factor de crecimiento epidérmico (EGF; 20 nanogramos/mililitro; Peprotech), penicilina (50 unidades/mililitro), y estreptomycin (50 microgramos/mililitro (Invitrogen). Después de 4 días, las células se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen) y se cultivaron posteriormente en medio DMEM/F12 medio + 20% (v/v) de FBS + penicilina (50 unidades/mililitro) + estreptomycin (50 microgramos/mililitro (Invitrogen) durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se enjuagaron con PBS. Las células se cultivaron a continuación durante 1-6 horas en un medio de inducción que estaba compuesto de DMEM/F12 (sin suero) que contiene 200 milimolar hidroxianisol butilado, 10 micromolar de cloruro de potasio, 5 miligramos/mililitro de insulina, 10 micromolar forskolina, 4 micromolar ácido valproico, y 2 micromolar hidrocortisona (todos los productos químicos de Sigma, St. Louis, MO). Las células

fueron fijadas en frío (-20°C) 100% de metanol y se realizó inmunocitoquímica (véase los siguientes métodos) para evaluar la expresión de la proteína de nestina humana.

(B) PPDCs (ombligo, P11) y fibroblastos dérmicos humanos adultos (1F1853, P11) se descongelaron y expandieron en cultivo Medio de Crecimiento a 5.000 células/cm<sup>2</sup> hasta que se alcanzó sub-confluencia (75%). Las células fueron entonces tripsinizadas y se sembraron a una densidad similar como en (A), pero en (1) placas de 24 pocillos tratadas con cultivo tisular (TCP, marca Falcon, VWR International), (2) pocillos TCP + 2% (p/v) gelatina adsorbida durante 1 hora a temperatura ambiente, o (3) pocillos TCP + 20 microgramos/mililitro laminina de ratón adsorbida (adsorbida durante un mínimo de 2 horas a 37°C; Invitrogen).

[0305] Al igual que en (A) arriba, las células fueron inicialmente expandidas y los medios conmutados en los marcos de tiempo antes mencionados. Un conjunto de cultivos se fijó en 5 días y seis horas de frío (4°C) 4% (p/v) de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. En la segunda serie de cultivos, se retiró el medio y se cambió a medio Neural Progenitor Expansion (NPE) que consiste en medio Neurobasal-A (Invitrogen) que contiene B27 (suplemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar), penicilina (50 unidades/mililitro), y estreptomina (50 microgramos/mililitro (Invitrogen) medio NPE se complementó adicionalmente con ácido retinoico (RA; 1 micromolar; Sigma). Este medio se retiró 4 días más tarde y los cultivos se fijaron con frío (4°C) 4% (p/v) de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para expresión de proteína nestina, GFAP, y TuJ1 (véase la Tabla 14-1).

**Tabla 14-1.** Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

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

[0306] **Protocolo de diferenciación de dos etapas.** PPDCs derivadas del cordón umbilical (P11), fibroblastos dérmicos adultos humanos (P11; 1F1853; Cambrex) se descongelaron y expandieron en cultivo en Medio de Crecimiento a 5.000 células/cm<sup>2</sup> hasta alcanzarse sub-confluencia (75%). Las células fueron entonces tripsinizadas y se sembraron a 2.000 células/cm<sup>2</sup>, pero en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en presencia de medios NPE suplementados con bFGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro; Peprotech) (composición de medios enteros a la que se refiere en adelante como NPE + F + E). Al mismo tiempo, progenitores neurales de rata adulta aislados a partir de hipocampo (P4; 062603) también se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina en medios NPE + F + E. Todos los cultivos se mantuvieron en esas condiciones durante un período de 6 días (células se alimentaron una vez durante ese tiempo) en el que los medios de tiempo se cambiaron a las condiciones de diferenciación listadas en la Tabla 14-2 por un período adicional de 7 días. Los cultivos se fijaron con enfriado con hielo (4°C) 4% de paraformaldehído (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para nestina humana o de rata, expresión de proteína GFAP, y TuJ1 (v/w).

**Tabla 14-2.** Resumen de las condiciones para protocolo de diferenciación de dos etapas

Nº COND.	A	B
	PRE - DIFERENCIACIÓN	DIF 2ª ETAPA
1	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + SHH (200 ng/ml) + F8 (100 ng/ml)
2	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + SHH (200 ng/ml) + F8 (100 ng/ml) + RA (1 micromolar)
3	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + RA (1 micromolar)
4	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)
5	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Medio de crecimiento
6	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 1B + rhGDF-5 (20 ng/ml)

(continúa)

	A		B
COND. #	PRE - DIFERENCIACIÓN		DIF 2ª ETAPA
5	7	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 1B + BMP7 (20 ng/ml)
	8	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 1B + GDNF (20 ng/ml)
	9	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 2B + rhGDF-5 (20 ng/ml)
	10	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 2B + BMP7 (20 ng/ml)
10	11	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 2B + GDNF (20 ng/ml)
	12	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 3B + rhGDF-5 (20 ng/ml)
	13	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 3B + BMP7 (20 ng/ml)
	14	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	Condición 3B + GDNF (20 ng/ml)
	15	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + rhGDF-5 (20 ng/ml)
15	16	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + BMP7 (20 ng/ml)
	17	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + GDNF (20 ng/ml)

**[0307] Protocolo de inducción del factor de crecimiento múltiple.** PPDCs derivadas del cordón umbilical (P11) se descongelaron y expandieron en cultivo en medio de crecimiento a 5.000 células/cm<sup>2</sup> hasta que se alcanzó subconfluencia (75%). Las células fueron entonces tripsinizadas y se sembraron a 2.000 células/cm<sup>2</sup>, en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences) en presencia de NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro). Además, algunos pocillos contenían NPE + F + E + 2% de FBS o 10% de FBS. Después de cuatro días de condiciones de "pre-diferenciación", todos los medios se retiraron y las muestras se cambiaron a NPE medio suplementado con sonic hedgehog (SHH; 200 nanogramos/mililitro; Sigma, St. Louis, MO), FGF8 (100 nanogramos/mililitro; Peprotech), BDNF (40 nanogramos/mililitro; Sigma), GDNF (20 nanogramos/mililitro; Sigma), y el ácido retinoico (1 micromolar; Sigma). Siete días después de cambio de medio, los cultivos se fijaron con 4% de paraformaldehído helado (4°C) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para nestina humana (v/w), GFAP, TuJ1, desmina, y la expresión de actina de músculo alfa-liso.

**[0308] Protocolo de co-cultivo de progenitor neuronal.** Progenitores de hipocampo de rata adulta (062603) se sembraron como neuroesferas o células individuales (10.000 células/pocillo) en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina (BD Biosciences) en NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos /mililitro).

**[0309]** PPDCs derivadas del cordón umbilical (P11) se descongelaron y expandieron en cultivo NPE + F (20 nanogramos/mililitro) + E (20 nanogramos/mililitro) a 5.000 células/cm<sup>2</sup> durante un período de 48 horas. Las células fueron entonces tripsinizadas y se sembraron a 2.500 células/pocillo en cultivos existentes de progenitores neurales. El medio existente se intercambió por medio fresco. Cuatro días más tarde, los cultivos se fijaron con 4% de paraformaldehído (4°C) (p/v) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron para la proteína nuclear humana (hNuc, Chemicon) helada (Tabla 14-1 anteriormente) para identificar PPDCs.

**[0310] La inmunocitoquímica.** La inmunocitoquímica se realizó utilizando los anticuerpos enumerados en la Tabla 14-1. Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y (v/v) 0,3% de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Los anticuerpos primarios, se diluyeron en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas y los cultivos lavados con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenía solución de bloqueo junto con anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y IgG-Alexa 488 de anti-conejo de cabra (1: 250; Molecular Probes). Después, los cultivos se lavaron y 10 DAPI micromolar (Molecular Probes) se aplicó durante 10 minutos para ayudar a visualizar los núcleos celulares.

**[0311]** Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva representó la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control donde todo el procedimiento descrito anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario. Imágenes representativas fueron tomadas utilizando una cámara de vídeo digital en color y software 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).

## **Resultados**

### **Protocolo Woodbury-Black.**

#### **[0312]**

**(A)** Tras la incubación en esta composición de inducción neural, todos los tipos de células transformados en células con morfologías bipolares y procesos extendidos. También se observaron otras morfologías no bipolares más grandes. Además, las poblaciones de células inducidas se tiñeron positivamente para nestina, un marcador de células madre y progenitoras neurales multipotentes.

**(B)** Cuando se repite en placas de plástico de cultivo de tejido (TCP), no se observó expresión de nestina a

menos que la laminina se pre-adsorbió en la superficie de cultivo. A fin de evaluar si las células de expresión de nestina entonces podrían generar neuronas maduras, PPDCs y fibroblastos se expusieron a NPE + RA (1 micromolar), una composición de medio conocido para inducir la diferenciación de células madre y progenitoras neuronales en tales células (2, 3, 4). Las células se tiñeron para TuJ1, un marcador para neuronas inmaduras y maduras, GFAP, un marcador de astrocitos, y nestina, un marcador indicativo de progenitores neurales. Expresión TuJ1 no estaba encendida, ni eran células con morfología neuronal observada bajo cualquiera de las condiciones ensayadas, lo que sugiere que las neuronas no se generaron en el corto plazo. Además, expresión de nestina y GFAP, que se encontraron en PPDCs y fibroblastos en sustratos recubiertos con laminina, no se produjeron en estas condiciones.

**[0313] Resultados de diferenciación de dos etapas.** Aislados de células derivadas de cordón umbilical, así como fibroblastos humanos y progenitores neural de roedor (como tipos de células de control negativos y positivos, respectivamente), se sembraron en placas recubiertas de laminina (de promoción neural) y se expusieron a 13 condiciones de crecimiento diferentes (y dos condiciones de control) conocidas para promover la diferenciación de progenitores neurales en neuronas y astrocitos. Además, se añadieron dos condiciones para examinar la influencia de GDF5, y BMP-7 en la diferenciación PPDC. En general, se tomó un enfoque de diferenciación de dos etapas, donde las células se colocaron primero en condiciones de expansión de progenitoras neurales durante un período de 6 días, seguido de condiciones de diferenciación completas de 7 días. Morfológicamente, las células del cordón umbilical exhibieron cambios fundamentales en la morfología celular en todo el curso de tiempo de este procedimiento. Sin embargo, en ningún caso se observaron células neuronales o en forma de astrocíticos excepto en condiciones de control, de placas de progenitores neuronales. Inmunocitoquímica, negativo para nestina humana, TuJ1, y GFAP confirmaron estas observaciones morfológicas. Los resultados se resumen en la Tabla 14-3 a continuación.

**Tabla 14-3.** Resultados de la tinción de nestina humana, GFAP, y TuJ1 respectivamente en Experimento de diferenciación de dos etapas. Tenga en cuenta que + significa que al menos una parte (> 0%) de las células fueron positiva para la mancha indicada. Nestin humana: células madre neuronales inmaduras y progenitoras; GFAP: astrocitos; TuJ1: neuronas inmaduras y maduras.

CONDICIÓN	fibroblastos	PPDCs umbilicales	Progenitores neuronales
1	-/-	-/-	+/+/+
2	-/-	-/-	+/+/+
3	-/-	-/-	+/+/+
4	-/-	-/-	+/+/+
5	-/-	-/-	+/+/+
6	-/-	-/-	+/+/+
7	-/-	-/-	+/+/+
8	-/-	-/-	+/+/+
9	-/-	-/-	+/+/+
10	-/-	-/-	+/+/+
11	-/-	-/-	+/+/+
12	-/-	-/-	+/+/+
13	-/-	-/-	+/+/+
14	-/-	-/-	+/+/+
15	-/-	-/-	+/+/+
16	-/-	-/-	+/+/+
17	-/-	-/-	+/+/+

**[0314] Múltiples resultados de inducción del factor de crecimiento.** Después de una exposición de una semana a una variedad de agentes de diferenciación neuronales, las células se tiñeron para los marcadores indicativos de progenitores neuronales (nestina humana), neuronas (TuJ1), y astrocitos (GFAP). Las células cultivadas en la primera etapa en medios que no contenían suero tenían diferentes morfologías que aquellas células en medios que contenían suero (2% o 10%), lo que indica potencial de diferenciación neural. Específicamente, siguiendo un procedimiento de exposición de dos etapas de PPDCs umbilicales a EGF y bFGF, seguido por SHH, FGF8, GDNF, BDNF, y el ácido retinoico, las células mostraron procesos similares a la morfología de astrocitos en cultivo extendidos de longitud. Cuando 2% de FBS o 10% de FBS se incluyeron en la primera etapa de diferenciación, el número de células se incrementó y la morfología celular se mantuvo sin cambios a partir de cultivos de control a alta densidad. La diferenciación neural potencial no se evidenció por análisis inmunocitoquímica para nestina humana, TuJ1, o GFAP.

**[0315] Progenitoras neuronales y procedimientos de co-cultivo de PPDC.** Células derivadas del cordón umbilical se sembraron en cultivos de progenitores neuronales de rata sembrados dos días antes en condiciones de expansión neural (NPE + F + E). Mientras que la confirmación visual de ombligo en placa demostró que estas células se sembraron como células individuales, tinción nuclear específica a humanos (hNuc) 4 días post-placa (6 días longitud

total de experimento) mostraron que tendían a englobarse y evitar el contacto con los progenitores neurales. Además, cuando se unieron las células del cordón umbilical, estas células se dispersaron y parecían estar invadidas por neuronas diferenciadas que eran de origen de rata lo que sugiere que las células del cordón umbilical pueden diferenciarse en células musculares. Esta observación se basó en la morfología bajo microscopio de contraste de fase. Otra observación era que los cuerpos celulares típicamente grandes (más grandes que progenitores neurales) poseían morfologías semejantes a progenitores neurales, con procesos finos que se dispersaban en múltiples direcciones. Tinción HNuc (que se encuentra en una mitad del núcleo de la célula) sugirió que en algunos casos estas células humanas pueden haberse fusionado con progenitores de rata y asumió su fenotipo. Pocillos de control que contienen progenitores neurales sólo tenían un menor número de progenitores totales y células diferenciadas aparentes que hicieron pocillos de co-cultivo que contienen ombligo, lo que indica, además, que las células derivadas del cordón umbilical influyeron en la diferenciación y el comportamiento de progenitores neurales o bien por la liberación de citocinas y quimiocinas, o por Efectos mediados por contacto.

**[0316] Resumen.** Se llevaron a cabo múltiples protocolos para determinar el potencial de corto plazo de PPDCs derivadas del cordón umbilical para diferenciarse en células de linaje neural. Estos incluyen formación de imágenes de contraste de fase de la morfología en combinación con inmunocitoquímica para nestina, TuJ1, y GFAP, proteínas asociadas con las células multipotentes neurales madre y progenitoras, neuronas inmaduras y maduras, y astrocitos, respectivamente. Se observó evidencia para sugerir que la diferenciación neural se produjo en ciertos casos en estos protocolos a corto plazo.

**[0317]** Varias observaciones notables se hicieron en co-cultivos de PPDCs con progenitores neurales. Este enfoque, usando PPDCs humanos junto con un tipo de célula xenogénica permitió la determinación absoluta de la procedencia de cada célula en estos cultivos. En primer lugar, se observaron algunas células en estos cultivos, donde se amplió el citoplasma de la célula, con los procesos de neuritas que se extienden lejos del cuerpo celular, sin embargo, sólo la mitad del cuerpo se marcó con proteína hNuc. Esas células pueden ser PPDCs humanas que se han diferenciado en células de linaje neural o pueden ser PPDCs que se han fusionado con progenitores neurales de origen de rata. En segundo lugar, parecía que progenitores neurales extienden neuritas a PPDCs de una manera que indica que los progenitores se diferenciaron en neuronas e inervaron PPDCs. En tercer lugar, los cultivos de progenitores neurales y PPDCs tenían más células de origen de rata y cantidades más grandes de diferenciación que los cultivos de control de progenitores neurales solos, lo que indica además que PPDCs en placa proporcionaron factores solubles y/o mecanismos dependientes del contacto que estimulan la supervivencia de progenitor neuronal, proliferación y/o diferenciación.

### Referencias

#### **[0318]**

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

### **EJEMPLO 15**

#### **Diferenciación neural a largo plazo de las células derivadas del cordón umbilical**

**[0319]** Se evaluó la capacidad de las células derivadas del cordón umbilical de someterse a la diferenciación a largo plazo en células de línea neuronales.

#### **Materiales y Métodos**

**[0320] El aislamiento y la expansión de las células de posparto (PPDCs).** PPDCs derivadas del cordón umbilical fueron expandidas y expandidas como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

**[0321] Descongelación y revestimiento de células derivadas del cordón umbilical.** Alícuotas congeladas de células derivadas del cordón umbilical de P11 y P12, previamente cultivadas en Medio de Crecimiento se descongelaron y se sembraron en placas a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de T-75 revestidas con laminina (BD, Franklin Lakes, NJ) en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27 (suplemento B27, Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar), penicilina (50 unidades/mililitro), y estreptomycin (50 microgramos/mililitros), la combinación de los cuales se denomina aquí como medios Nural Progenitor Expansion (NPE). Medio NPE se complementó adicionalmente con bFGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ), que se refiere en este documento como NPE + bFGF + EGF.

**[0322] Placas de célula de control.** Además, los fibroblastos dérmicos humanos adultos (P11, Cambrex, Walkersville, MD) y las células madre mesenquimatosas (P5, Cambrex) se descongelaron y se sembraron a la misma densidad de la siembra de células en matraces T-75 recubiertas con laminina en NPE + bFGF + EGF. Como control adicional, los fibroblastos y las células del cordón umbilical se cultivaron en Medio de Crecimiento para el período especificado para todas los cultivos.

**[0323] Expansión celular.** Los medios de todos los cultivos se reemplazaron con medio fresco una vez por semana y las células observadas por expansión. En general, cada cultivo se pasó una sola vez durante un período de un

mes debido a un crecimiento limitado en NPE + bFGF + EGF.

**[0324] La inmunocitoquímica.** Después de un período de un mes, todos los matraces se fijaron con 4% paraformaldehído frío (4°C) (p/v) (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra TuJ1 (Billi tubulina; 1: 500; Sigma, St. Louis, MO) y GFAP (proteína ácida fibrilar glial; 1: 2000; DakoCytomation, Carpinteria, CA). Brevemente, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Los anticuerpos primarios, se diluyeron en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Soluciones de anticuerpo primario se retiraron a continuación 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 IgG-Texas Red anti-ratón de cabra (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y IgG-Alexa 488 anti-conejo de cabra (1: 250; Molecular Probes). Después, los cultivos se lavaron y 10 DAPI micromolar (Molecular Probes) se aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

**[0325]** Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó señal de fluorescencia por encima de la tinción de control donde todo el procedimiento descrito anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario. Imágenes representativas fueron tomadas utilizando una cámara de vídeo digital en color y software 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).

### Resultados

**[0326] Medios NPE + bFGF + EGF ralentizan la proliferación de PPDCs y altera su morfología.** Inmediatamente después del revestimiento, un subconjunto de células del cordón umbilical unidas a los frascos de cultivo recubiertos con laminina. Esto puede haberse debido a la muerte celular en función del proceso de congelación/descongelación o debido a las nuevas condiciones de crecimiento. Las células que no adjuntaron morfologías adoptadas diferentes a las observadas en el medio de crecimiento.

**[0327]** Tras la confluencia, los cultivos se pasaron y se observaron durante el crecimiento. Muy poca expansión se llevó a cabo de esas células que sobrevivieron el paso. En este punto, células muy pequeñas sin morfología dispersada y con características de fase-brillante comenzaron a aparecer en cultivos de células del cordón umbilical. Estas áreas del matraz se siguieron con el tiempo. A partir de estas pequeñas células, los procesos de bifurcación surgieron con varicosidades a lo largo de sus longitudes, características muy similares a progenitores neuronales PSA-NCAM+ anteriormente descritos y neuronas inmaduras TuJ1+ derivadas del cerebro y de la médula espinal (1, 2). Con el tiempo, estas células se hicieron más numerosas, y aún así sólo se encontraron en los clones.

**[0328] Los clones de células umbilicales expresan proteínas neuronales, y no gliales.** Los cultivos se fijaron un mes tras la descongelación/revestimiento y se tiñeron para la proteína neuronal TuJ1 y GFAP, un filamento intermedio que se encuentra en astrocitos. Si bien se encontró que todos los cultivos de control cultivados en Medio de Crecimiento y fibroblastos humanos y las MSC cultivadas en medio NPE + bFGF + EGF ser TuJ1-/GFAP, las células del cordón umbilical encendieron la expresión de TuJ1. Se observó expresión en las células con y sin morfologías similares a neuronales. No se observó expresión de GFAP en cualquier cultivo. El porcentaje de células que expresan TuJ1 con morfologías similares a neuronales era de menos de o igual a 1% de la población total (n = 3 aislados umbilicales examinados).

**[0329] Resumen.** Se desarrollaron procedimientos para generar neuronas diferenciadas (basadas en la expresión TuJ1 Y morfología neuronal) a partir de células del cordón umbilical. Mientras que la expresión para TuJ1 no se examinó antes de un mes *in vitro*, es claro que al menos una pequeña población de células derivadas del cordón umbilical puede dar lugar a neuronas o bien a través de diferenciación por defecto o a través de la inducción a largo plazo después de la exposición de un mes para un medio mínimo suplementado con L-glutamina, FGF básico, y EGF.

### Referencia para el Ejemplo 15

**[0330]**

(1) Mayer-Proschel, M. et al. (1997). *Neurona*. 19 (4): 773-85.

(2) Yang, H. et al. (2000). *PNAS*. 97 (24): 13366-71.

### **EJEMPLO 16**

#### **Factores tróficos de células derivadas de cordones umbilicales para diferenciación de progenitores neurales**

**[0331]** Se examinó la influencia de las células de posparto derivadas del cordón umbilical (PPDCs) en células madre neurales adultas y supervivencia celular de progenitores y la diferenciación a través de mecanismos de dependientes de no contacto (tróficos).

**Materiales y Métodos**

**[0332] Aislamiento de células madre adultas neurales y progenitoras.** Ratas adultas Fisher 344 fueron sacrificadas por asfixia de CO<sub>2</sub> seguido por dislocación cervical. Los cerebros completos fueron retirados intactos usando gubias de hueso y el tejido de hipocampo diseccionado basado en incisiones coronales posteriores al motor y regiones somatosensoriales del cerebro (1). El tejido se lavó en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene B27 (suplemento B27; Invitrogen), L-glutamina (4 milimolar; Invitrogen), y penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomina (50 microgramos/mililitro) (Invitrogen), la combinación de los cuales se denomina aquí como medio de progenitores neurales de expansión (NPE). Medio NPE se complementó adicionalmente con bFGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ) y EGF (20 nanogramos/mililitro, Peprotech, Rocky Hill, NJ), que se refiere en este documento como NPE + bFGF + EGF.

**[0333]** Después del lavado, las meninges superpuestas se eliminaron, y el tejido se picó con un bisturí. Se recogió tejido picado y tripsina/EDTA (Invitrogen) añadido como 75% del volumen total. ADNasa (100 microlitros por 8 mililitros de volumen total, Sigma, St. Louis, MO) se añadió también. A continuación, el tejido/medio se pasó secuencialmente a través de una aguja de calibre 18, aguja de calibre 20, y finalmente una aguja de calibre 25 una vez cada una (todas las agujas de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 250 x g. Se eliminó el sobrenadante, se añadió NPE + bFGF + EGF fresco y el sedimento se resuspendió. La suspensión celular resultante se hizo pasar a través de un colador de 40 micras de colador de células (Becton Dickinson), se sembraron en matraces T-75 recubiertas con laminina (Becton Dickinson) o placas de 24 pocillos de bajo racimo (Becton Dickinson), y se cultivaron en medios NPE + bFGF + EGF hasta obtenerse el número de células suficientes para los estudios indicados.

**[0334] Recubrimiento de células de PPDC.** Células derivadas del posparto (P12) previamente cultivadas en medio de crecimiento se sembraron a 5.000 células/inserto transwell (dimensionado para placa de 24 pocillos) y se cultivaron durante un período de una semana en medio de crecimiento en insertos para alcanzar la confluencia.

**[0335] Revestimiento de progenitores neurales adultos.** Progenitores neuronales, que se cultivan como neuroesferas o células como individuales, fueron sembrados en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina a una densidad aproximada de 2.000 células/pocillo en NPE + bFGF + EGF para un período de un día para promover la unión celular. Un día más tarde, se añadieron insertos Transwell que contenían las células del posparto de acuerdo con el siguiente esquema:

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

**[0336] Inmunoquímica.** Después de 7 días en el co-cultivo, todas las condiciones se fijaron con 4% de paraformaldehído frío (p/v) (Sigma) durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. La inmunoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los epítopos enumerados en la Tabla 16-1. Brevemente, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100; Sigma) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Los anticuerpos primarios, se diluyeron en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las soluciones de anticuerpos primarios fueron removidas y los cultivos lavados con PBS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenía solución de bloqueo junto con anticuerpo IgG-Texas Red de anti-ratón de cabra (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y IgG-Alexa 488 de anti-conejo de cabra (1: 250; Molecular Probes). Después, los cultivos se lavaron y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) se aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

**[0337]** Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó señal de fluorescencia sobre la tinción de control donde todo el procedimiento descrito anteriormente fue seguido con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario. Imágenes representativas fueron tomadas utilizando una cámara de vídeo digital en color y software 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).

Tabla 16-1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

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

**[0338] Análisis cuantitativo de diferenciación de progenitores neurales.** La diferenciación de progenitores neurales de hipocampo se examinaron y se cuantificaron. Un mínimo de 1.000 células se contaron por condición, o si es menor, el número total de células observadas en esa condición. El porcentaje de células positivas para una mancha dada se evaluó dividiendo el número de células positivas por el número total de células como se determina por tinción con DAPI (nuclear).

**[0339] Análisis de espectrometría de masas y electroforesis en gel 2D.** Con el fin de identificar los factores únicos, secretados como resultado de co-cultivo, muestras de medios acondicionados tomadas antes de la fijación de cultivo se congelaron a -80°C durante la noche. Las muestras se aplicaron entonces a los dispositivos de ultrafiltración de espín (corte de MW nominal 30 kD). Retenido se sometió a cromatografía de inmunofinidad (albúmina anti-humana; IgY) (la inmunofinidad no eliminó la albúmina de las muestras). El filtrado se analizó por MALDI-TOFF. El material eluido se aplicó a cromatografía de afinidad Cibachron Blue. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y electroforesis en gel de 2D.

### **Resultados**

**[0340] Co-cultivo umbilical estimula diferenciación de progenitores neurales adultos.** Tras el cultivo con células derivadas del cordón umbilical del posparto, células progenitoras neurales co-cultivadas derivadas de hipocampo de ratas adultas exhiben diferenciación significativa a lo largo de los tres linajes principales en el sistema nervioso central. Este efecto se observa claramente después de cinco días en el co-cultivo, con numerosas células que elaboran procesos complejos y pierden sus características brillantes de fase características de la división de células progenitoras. Por el contrario, los progenitores neurales cultivados solo en la ausencia de bFGF y EGF aparecieron poco saludables y la supervivencia fue limitada.

**[0341]** Después de la terminación del procedimiento, los cultivos se tiñeron para los marcadores indicativos de las células madre y progenitoras indiferenciadas (nestina), las neuronas inmaduras y maduras (TuJ1), astrocitos (GFAP) y oligodendrocitos maduros (MBP). La diferenciación a lo largo de los tres linajes se confirmó mientras que las condiciones de control no mostraron diferenciación significativa como se evidencia por la retención de la tinción de nestina positiva entre la mayoría de las células.

**[0342]** El porcentaje de progenitores neurales diferenciados tras co-cultivo con PPDCs derivadas del cordón umbilical se cuantificó (Tabla 16-2). Células derivadas del cordón umbilical mejoraron de forma significativa el número de oligodendrocitos maduros (MBP) (24,0% frente al 0% en ambas condiciones de control). Además, co-cultivo aumentó el número de astrocitos GFAP + y TuJ1 + neuronas en cultivo (47,2% y 8,7% respectivamente). Estos resultados se confirmaron mediante tinción con nestina que indica que el estado de progenitor se perdió después del co-cultivo (13,4% frente a 71,4% en condición de control 3).

**[0343]** Aunque la diferenciación también parecía estar influenciada por los fibroblastos humanos adultos, tales células no eran capaces de promover la diferenciación de oligodendrocitos maduros ni eran capaces de generar una cantidad apreciable de las neuronas. Aunque no se han cuantificado, fibroblastos parecieron mejorar la supervivencia de los progenitores neurales y su progenie similar a los descubrimientos de las células de posparto derivadas del cordón umbilical.

Tabla 16-2. La cuantificación de la diferenciación de progenitor en co-cultivo de control vs transwell con células de posparto derivadas del cordón umbilical (E = EGF, F = bFGF).

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

**[0344] La identificación de compuestos únicos.** El medio acondicionado a partir de las condiciones de prueba umbilicales junto con los controles apropiados (medios NPE  $\pm$  1,7% de suero, los medios de co-cultivo con fibroblastos) se examinaron para diferencias. Potencialmente se identificaron compuestos únicos y extirpados de sus respectivos geles 2D.



**[0345] Resumen.** Los resultados presentados en este ejemplo indican que la diferenciación de células progenitoras neurales adultas tras co-cultivo con células de posparto derivadas del cordón umbilical es particularmente profunda. Específicamente, un porcentaje significativo de oligodendrocitos maduros se generaron en co-cultivos de células del cordón umbilical. En vista de la falta de contacto entre las células del cordón umbilical y los progenitores neurales, este resultado parece ser una función de factores solubles liberados de las células del cordón umbilical (efecto trófico).

**[0346]** Se hicieron varias otras observaciones. En primer lugar, había muy pocas células en la condición de control donde se eliminaron EGF y bFGF. La mayoría de las células murieron y, en promedio, había alrededor de 100 células o menos por pocillo. En segundo lugar, es de esperar que habría muy poca diferenciación en la condición de control donde EGF y bFGF se retuvieron en el medio, ya que este es normalmente un medio de expansión. Mientras que se observó que aproximadamente 70% de las células retenían su estado progenitor (nestina +), alrededor del 30% eran GFAP + (indicativa de astrocitos). Esto puede deberse al hecho de que tal expansión significativa ocurrió durante todo el curso del procedimiento de que el contacto entre progenitores indujo esta diferenciación. Resultados similares han sido reportados en la literatura (2).

#### Referencia para el Ejemplo 16

**[0347]**

- (1) Paxinos, G. y Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.  
 (2) Song, H. et al. (2002). *Naturaleza*. 417 (6884): 29-32.

#### **EJEMPLO 17**

##### **El efecto de los factores tróficos sobre la angiogénesis**

**[0348]** La angiogénesis, o la formación de nueva vasculatura, es necesaria para el crecimiento de tejido nuevo. La inducción de la angiogénesis es un importante objetivo terapéutico en muchas condiciones patológicas. Se examinó la actividad angiogénica de células derivadas del cordón umbilical en ensayos *in vitro*. Un método bien establecido de la evaluación de la actividad angiogénica que implica la siembra de células endoteliales sobre una placa de cultivo recubierta con un extracto de membrana basal (Nicosia y Ottinetti (1990) *In Vitro Cell Dev Biol* 26 (2): 119-28), se utilizó. El tratamiento de las células endoteliales en tales membranas basales o material de la matriz extracelular con factores angiogénicos estimulará las células para formar una red que es similar a los capilares. Estos tipos de ensayos son ensayos *in vitro* comunes para examinar estimuladores e inhibidores de la formación de vasos sanguíneos (Ito et al. (1996) *Int J. Cancer* 67 (1): 148-52). Los protocolos utilizados en este ejemplo utilizaron un sistema de co-cultivo sembrándose las células derivadas del cordón umbilical sobre insertos de pocillo de cultivo. Estos insertos permeables permiten el intercambio pasivo de componentes de medios entre los medios de cultivo de células endoteliales y derivadas del cordón umbilical.

#### **Material y Métodos**

##### **Cultivo de células.**

**[0349] Células derivadas del cordón umbilical.** Se recibieron los cordones umbilicales humanos y se aislaron las células como se describió anteriormente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces de plástico de cultivo de tejido recubierto de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células usadas para los experimentos estaban entre los pasos 4 y 12.

**[0350]** UDC en crecimiento activo se tripsinizaron, se contaron y se sembraron en 6,5 milímetros de insertos de cultivo de tejido de diámetro (COSTAR TRANSWELL, Corning Inc., Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células fueron cultivadas en los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

**[0351] Células humanas mesenquimatosas madre (hMSC).** hMSCs se compraron de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Los cultivos se incubaron con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

**[0352]** MSCs en crecimiento activo se tripsinizaron y se contaron y se sembraron sobre 6,5 milímetros de insertos de cultivo de tejido de diámetro (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células fueron cultivadas en los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

**[0353] Las células humanas endoteliales de vena umbilical (HUVEC).** HUVEC se obtuvieron de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separados, ya sea en EBM o medios de las células endoteliales EGM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico cultivaron tejido estándar con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células utilizadas en el ensayo variaron de pasos 4 a 10.

**[0354] Células humanas coronarias endoteliales de la arteria (HCAEC).** HCAEC fueron adquiridas de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Estas células también se mantuvieron en cultivos separados, ya sea en el EBM o formulaciones de medios EGM. Las células se cultivaron sobre plástico estándar cultivado por tejido con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células usadas para los experimentos variaron de pasos 4 a 8.

**[0355] Ensayos de la angiogénesis en la matriz extracelular.** Las placas de cultivo se recubrieron con material de la matriz extracelular de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente, el material de la matriz extracelular (Matrigel, BD Descubrimiento Labware, Bedford, MA) se descongeló a 4°C y aproximadamente 250

microlitros se distribuyeron en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos enriada (Corning). La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos para permitir que el material se solidificara. Cultivos de células endoteliales en crecimiento activo se trataron con tripsina y se contaron. Las células se lavaron dos veces en medio de crecimiento suplementado con sólo el 2% de FBS por centrifugación, resuspensión, y aspiración del sobrenadante. Las células se sembraron en los pocillos recubiertos 20.000 células por pocillo en medio de crecimiento de aproximadamente 0,5 mililitro suplementado con sólo el 2% (v/v) de FBS. Las células se incubaron a continuación durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células se asentaran.

**[0356]** Cultivos de células endoteliales fueron luego tratados con cualquiera de 10 nanomolar bFGF humano (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o 10 nanomolar VEGF humano (Peprotech, Rocky Hill, NJ) para servir como controles positivos para la respuesta de células endoteliales. Se añadieron inserciones Transwell sembradas con células del posparto a los pocillos apropiados con medio de crecimiento suplementado con sólo el 2% de FBS en la cámara de inserción. Los cultivos se incubaron en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante aproximadamente 24 horas. La placa de pocillos se retiró de la incubadora, y las imágenes de los cultivos de células endoteliales se recogieron con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

**Resultados**

**[0357]** En un sistema de co-cultivo con células derivadas del cordón umbilical, HUVEC forman redes celulares estructuradas. Células HUVEC forman redes celulares limitadas en experimentos de co-cultivo con hMSC y con 10 nanomolar bFGF. Células HUVEC sin ningún tratamiento mostraron muy poca o ninguna formación de la red. Estos resultados sugieren que las células derivadas del cordón umbilical liberan factores angiogénicos que estimulan la HUVEC. Del mismo modo, HCAECs formaron redes celulares sólo en co-cultivo con células derivadas del cordón umbilical.

**[0358]** La Tabla 17-1 muestra cantidades de factores angiogénicos conocidos liberados por UDC en Medio de Crecimiento en condiciones de oxígeno atmosférico. UDC fueron sembradas en insertos como se describe anteriormente. Las células se cultivaron a 37°C en el oxígeno atmosférico durante 48 horas en los insertos y después cambian a un 2% de medio FBS y volvieron a 37°C durante 24 horas. Se retiró el medio, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C, y se analizó por el ensayo ELISA SearchLight múltiplex (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son las medias de mediciones por duplicado. Los resultados muestran que las UDC no liberan niveles detectables de factor de crecimiento bb derivado de plaquetas (PDGFBB), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las cantidades de angiopoyetina 2 (Ang2) detectadas fueron menos que las del control de medio de cultivo sin células. Las células derivadas del cordón umbilical liberan cantidades medibles de inhibidor tisular de metalinoproteasa-1 (TIMP-1), trombopoyetina (TPO), y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Las cantidades de factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) eran muy bajas y sólo ligeramente por encima de las del medio de control.

**Tabla 17-1.** Factores angiogénicos potenciales liberados de UDC. Células derivadas del cordón umbilical se cultivaron en 24 horas en medios con FBS al 2% en oxígeno atmosférico. Se retiró el medio y se ensayó por el ensayo ELISA SearchLight multiplex (Pierce). Los resultados son los medios de un análisis por duplicado. Los valores son concentraciones en los medios informados en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/mL)	ANG2	PDGFBB (pg/mL)	TPO (pg/mL)	KGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	FGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	HBEGF (pg/mL)
UDC (P4)	81831.7	<9,8	<2,0	365,9	14,1	200,2	5,8	<4,0	<1,2
Medio solo	<9,8	25,1	<2,0	<6,4	<2,0	<3,2	<5,4	<4,0	<1,2

**[0359]** La Tabla 17-2 muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las UDC a 5% O<sub>2</sub>. UDC se sembraron en insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en medio de crecimiento a 5% de oxígeno durante 48 horas en los insertos y después se cambiaron a un medio de FBS al 2% y volvieron a 5% de incubación O<sub>2</sub> durante 24 horas. Se retiró el medio, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C, y se analizó por el ensayo ELISA SearchLight múltiplex (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son las medias de mediciones por duplicado. Los resultados que se muestran para UDC son comparables a los bajo condiciones de oxígeno atmosférico. Mientras que hay esencialmente ningún cambio en la producción de ANG2, PDGFbb, FGF, VEGF, y HB-EGF por UDC, hubo un ligero aumento aparente en la producción de TIMP1, KGF, y HGF, y una ligera disminución aparente en la producción de TPO. Estas diferencias aparentes en los datos en bruto no se ensayaron para determinar la significación estadística.

**Tabla 17-2.** Factores angiogénicos potenciales liberados de UDC. Las células se cultivaron en 24 horas en medios con FBS al 2% en 5% de oxígeno. Se retiró el medio y se ensayó por el multiplex SearchLight ensayo ELISA (Pierce). Los resultados son los medios de un análisis por duplicado. Los valores son concentraciones en los medios reportados en picogramos por mililitro de medio de cultivo.

	TIMP1 (pg/mL)	ANG2	PDGFBB (pg/mL)	TPO (pg/mL)	KGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	FGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	HBEGF (pg/mL)
5 UDC (P4)	50244,7	<9,8	<2,0	403,3	10,7	156,8	5,7	<4,0	<1,2
Medio solo	<9,8	25,1	<2,0	<6,4	<2,0	<3,2	<5,4	<4,0	<1,2

10 **[0360] Resumen.** Los resultados del estudio muestran que las células derivadas del cordón umbilical pueden estimular tanto la vena umbilical humana como las células endoteliales de la arteria coronaria para formar redes en un ensayo de angiogénesis *in vitro*. Este efecto es similar al observado con factores angiogénicos conocidos en tales sistemas de ensayo. Estos resultados sugieren que los UDC son útiles para estimular la angiogénesis *in vivo*.

### 15 EJEMPLO 18

#### **Diferenciación de células derivadas del cordón umbilical en hepatocitos**

20 **[0361]** Una variedad de condiciones fueron examinadas para determinar una combinación adecuada de medios básicos y factores de crecimiento para la diferenciación de células derivadas del cordón umbilical en hepatocitos. HNF-1 alfa, un factor de transcripción específico de hepatocitos, proteínas de filamentos intermedios citoplasmáticos, tales como la queratina 19 (K19), queratina 8 (K8), y citoqueratina 18 (C18), que son marcadores de células epiteliales y dos proteínas secretadas específicas del hígado, albúmina y 2B6 del citocromo P450, se seleccionaron como marcadores para la diferenciación de hepatocitos (Schwartz et al. (2002) J. Clin Invest 109 (10): 1291-1302; Okumoto et al. (2003) Biochem Biophys Res. Commun 304 (4): 691-695; Chargroui et al. (2003) Blood 101 (8): 2973-2982).

#### **Métodos y materiales**

30 **[0362]** Células derivadas del cordón umbilical obtuvieron de acuerdo con el método del Ejemplo 1, así como fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales o adultos (NHDF), se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), la oncostatina M, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de células madre (SCF), y factor de crecimiento fibroblástico 4 (FGF 4) eran de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). Factor de crecimiento BB derivado de plaquetas (PDGFBB) era de R&D Systems (Minneapolis, MN).

35 **[0363]** Se ensayaron las siguientes condiciones:

#### **Método 1**

40 **[0364]** *Células derivadas del cordón umbilical (P5), fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales y adultos (NHDF).* Las células se sembraron en placas a 22,5 X 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> en 1% de Matrigel (Becton-Dickinson y Co., Franklin Lakes, NJ) en medio libre de suero (60% (v/v) DMEM bajo nivel de glucosa) (DMEM-LG; Gibco, Carlsbad, CA), 40% (v/v) MCDB-201 (Sigma, St. Louis, MO), complementado con 1 X insulina/transferrina/selenio, ácido linoleico 4,7 microgramos/mililitro, 1 miligramo/mililitro albúmina de suero bovino, 10 nanomolar dexametasona, 100 micromolar de fosfato de ácido ascórbico (todos de Sigma), 50 unidades/mililitro penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco), 2% (v/v) de FCS (Hyclone Laboratories, Logan, UT), y 10 nanogramos/mililitros cada EGF y PDGFbb. Después de 8-12 horas, el medio se retiró, las células se lavaron dos veces con PBS (Gibco) y se cultivaron en el medio anteriormente descrito sin EGF y PDGFbb pero suplementado con 20 nanogramos/mililitro HGF y/o 10 nanogramos/mililitro FGF-4 (Schwartz et al. (2002) J. Clin Invest 109 (10): 1291-1302).

#### **Método 2**

50 **[0365]** *Células derivadas del cordón umbilical (P5), NHDF neonatal y adulta.* Las células se sembraron a baja densidad (22.500 células/cm<sup>2</sup>) en placas de 24 pocillos recubiertos con gelatina y se cultivaron como se describe anteriormente.

#### **Método 3**

60 **[0366]** *Células derivadas del cordón umbilical (P17), células derivadas del cordón umbilical (P15), células derivadas del cordón umbilical (P10), NHDF adulta.* Las células se sembraron a una mayor densidad (50.000 células/cm<sup>2</sup>) en placas de TCP de 24 pocillos y se cultivaron en DMEM (Gibco), suplemento B27 (Gibco), penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomina (50 microgramos/mililitro), 20 nanogramos/mililitro HGF y/o 10 nanogramos/mililitro FGF-4. Las células se hicieron crecer en estas condiciones durante 4 semanas.

#### **Método 4**

[0367] *Células derivadas de cordón umbilical (P4), células derivadas de cordón umbilical (P9), NHDF neonatal y adulta.* Las células se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T25 en medio Chang C (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) a cada fibronectina (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o gelatina (Sigma) y se cultivaron durante dos pasos hasta confluencia. Las células fueron sembradas a 1.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de TCP de 24 pocillos y se hicieron crecer como se describió anteriormente hasta alcanzar aproximadamente 40-60% de confluencia.

#### Método 5

[0368] *Células derivadas del cordón umbilical (P5) y NHDF adulta.* Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en gelatina en medio de crecimiento suplementado con 1 nanogramo/mililitro o de 10 nanogramos/mililitro oncostatina M (Chargraui (2003) Blood 101 (8): 2973-2982). Las células se hicieron crecer en estas condiciones durante 4 semanas.

#### Método 6

[0369] *Células derivadas del cordón umbilical (P5) y NHDF adulta.* Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en gelatina en medio de crecimiento suplementado con 10 nanogramos/mililitro bFGF, 10 nanogramos/mililitro de HGF, 10 nanogramos/mililitro de SCF. (Okumoto et al. (2003) Biochem Biophys Res Commun 304 (4): 691-695) Las células se hicieron crecer en estas condiciones durante 4 semanas.

[0370] **Aislamiento total de ARN y RT-PCR cuantitativa.** Se extrajo ARN de células derivadas del cordón umbilical y fibroblastos cultivados como se describe en cada protocolo. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contiene beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) y ARN extraída de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de ADNasa 2,7 unidades/muestra (Sigma). La ARN se eluye con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. La ARN se transcribió de forma inversa 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.

[0371] **PCR en tiempo real.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND para la albúmina (Hs00609411), citocromo P450 2B6 (Hs00167937), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la mezcla maestra TaqMan Universal de PCR de acuerdo con el fabricante de instrucciones (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencia 7000 con el software ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Datos PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario nº 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

[0372] **Inmunofluorescencia.** Los cultivos de células se fijaron con 4% de paraformaldehído frío (4°C) durante un período de 10 minutos a temperatura ambiente (v/w). La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: queratina 9 (K9; 1: 400; Chemicon, Temecula, CA), queratina 19 (K19; 1: 400; Chemicon), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma, St. Louis, MO), vimentina (1: 500; Sigma), desmina (1: 150; Sigma), albúmina (1: 200; Sigma), c-Met (1: 400; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), y HNF-1 alfa (1: 400; Santa Cruz Biotech). En general, los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) de Triton (Triton X-100, Sigma) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. En casos en los que se encuentra el epítomo de interés en la superficie celular (por ejemplo, c-Met), Triton se omitió en todos los pasos del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítomo. Los anticuerpos primarios, se diluyeron en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Soluciones de anticuerpo primario se retiraron a continuación y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenía solución de bloqueo junto con anticuerpo de IgG-Texas Red anti-ratón de cabra (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) para K8, K19, C18, vimentina, y albúmina, anticuerpo IgG-Alexa 488 anti-conejo de cabra (1: 250; Molecular Probes) para desmina y c-Met, o IgG FITC anti-burro de cabra (1: 150; Santa Cruz Biotech) para la tinción de HNF-1 alfa. Los cultivos se lavaron y se aplicó 10 DAPI micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0373] Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Imágenes representativas fueron tomadas utilizando una cámara de vídeo digital en color y software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras de triple manchado, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión. Montajes en capas se prepararon a continuación, utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

#### Resultados

[0374] Con el fin de determinar si las células derivadas del cordón umbilical podían expresar marcadores epiteliales, las células se cultivaron en medio Chang C. Células derivadas del cordón umbilical de (P2) se cultivaron en medio Chang C durante 11 días. Células derivadas del cordón umbilical tiñeron negativo para citoqueratina 18 y queratina 8 por análisis de inmunocitoquímica. Las muestras cultivadas en Medio de Crecimiento fueron negativas para ambos marcadores.

[0375] Se investigó el efecto de paso, así como sustratos de gelatina y fibronectina. Las células se cultivaron en

medio Chang C durante 11 días. Se analizó la expresión de ARN y proteína de las proteínas epiteliales/específicas de hepatocitos. Tinción inmunocitoquímica para citoqueratina 18, queratina 8, queratina 19, c-met, albúmina, desmina, y HNF-1 alfa fueron negativos en todas las condiciones. Las células se tiñeron positivas para vimentina. Se detectó la expresión de albúmina y citocromo P450 2B6 en niveles más bajos que de las células HepG2 humanas con cebadores ASSAYS-ON-DEMAND. La albúmina y la expresión 2B6 del citocromo p450 también se detectaron en las células cultivadas en Medio de Crecimiento.

[0376] Las células derivadas del cordón umbilical se trataron como se describe en el método 1 de acuerdo con un protocolo desarrollado por Schwartz et al. (2002) J. Clin. Invertir. 109 (10): 1391-02).. Tanto la albúmina y del citocromo P450 2B6 se detectaron con ASSAYS- cebadores bajo demanda a niveles más bajos que el control HepG2 positivo. No surgió un patrón claro entre las condiciones aplicadas y los niveles de expresión de genes, es decir, la expresión de albúmina y citocromo P450 2B6 también se detectó en muestras de control. Alguna expresión de albúmina y de citocromo P450 2B6 se detectó con los cebadores ASSAYS-ON-DEMAND, sin embargo, los niveles fueron significativamente inferiores a los observados en las células HepG2.

[0377] La oncostatina M a una concentración baja de 1 nanogramo/mililitro aumentó los niveles de expresión de citocromo p450 2B6 en células derivadas del cordón umbilical cultivadas en Medio de Crecimiento en matraces recubiertos de gelatina (datos no mostrados). FGF-4 y el tratamiento HGF tuvieron poco efecto y pueden haber reducido la expresión de albúmina y de citocromo p450 2B6.

[0378] **Resumen.** Seis protocolos fueron examinados por su capacidad de inducir la diferenciación de las células derivadas del cordón umbilical a fenotipo de hepatocito. Se detectó la expresión de marcadores específicos de hepatocitos, tales como la albúmina y el citocromo P450 2B6, indicando de este modo que las células se sometieron a cierta diferenciación en hepatocitos.

## EJEMPLO 19

### Diferenciación adipogénica de las células derivadas del cordón umbilical

[0379] Las poblaciones de células madre se han demostrado para diferenciarse en un fenotipo adipogénico (Janderova et al. (2003) *Obes Res* 11 (1): 65-74; Zangani et al. (1999) *Diferenciación* 64 (2): 91-101; Liu et al. (2003) *Curr Mol Med* 3 (4): 325-40). Se evaluó el potencial de las células derivadas del cordón umbilical de diferenciarse en un fenotipo adipogénico.

#### Métodos y materiales

[0380] **Diferenciación de adiposo.** Células derivadas del cordón umbilical de (P4) se sembraron a 200.000 células por pocillo en placas de cultivo tratadas con tejido de 6 pocillos en medio de crecimiento. Las Células madre mesenquimatosas (P3, IF2155), osteoblastos (P5, CC2538; Cambrex, Walkerville, MD), células omentales (P6) (aisladas de tejido omental de NDRI, siguiendo el protocolo utilizado para el aislamiento de células derivadas de posparto en el Ejemplo 1), células derivada de adiposo (US6555374 B1) (P6) y fibroblastos (P6, CC2509) (Cambrex, Walkerville, MD) fueron también sembradas en las mismas condiciones. Antes de la iniciación de la adipogénesis, células madre mesenquimatosas se cultivaron en un kit de bala de medio de crecimiento de células madre (Cambrex, Walkerville, MD). Después de 2 días, el medio gastado se retiró por aspiración y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). El medio de cultivo luego se cambió al Medio Esencial Mínimo de Dulbecco-glucosa alta (DMEM-Hg; Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene 10 por ciento FBS (v/v, Hyclone, Logan UT), 0,02 miligramos por mililitro de insulina (Sigma, St. Louis, MO), y 100 unidades de penicilina por mililitro, 100 miligramos de estreptomycin por mililitro, 0,25 microgramos anfotericina B por mililitro; (Invitrogen, Carlsbad, CA). Una vez que las células habían alcanzado la confluencia, se aspiró medio gastado. Las células se cultivaron después en un medio de diferenciación de adiposo (DMEM-Hg (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene 10 por ciento de suero bovino fetal definido ((v/v), Hyclone, Logan, UT), 0,02 miligramos por insulina mililitro (Sigma, St. Louis, MO) y 100 unidades de penicilina por mililitro, 100 microgramos de estreptomycin por mililitro, 0,25 microgramos anfotericina B por mililitro, 5 micromolar isobutimetilxantina (Sigma, St. Louis, MO), 100 micromolar dexametasona (Sigma, St. Louis, MO), y 2,5 micromolar indometacina (Sigma, St. Louis, MO) durante un máximo de 4 semanas. Las células se tiñeron con Oil-Red-O para determinar la presencia de formación de gotas de lípidos.

[0381] **Tinción con Oil Red O.** Las células fueron fijadas con 10 por ciento (v/v) de formalina tamponada neutral (Richard-Allan Kalamazoo, MI). Después de la fijación, las células se lavaron en agua desionizada y se incubaron durante dos minutos en propilenglicol (absoluto; Poli Scientific, Bay Shore, NY). El propilenglicol se retiró por aspiración, y las muestras se incubaron en Oil Red O (Poli Scientific) durante una hora. La solución de tinción se eliminó por aspiración y muestras teñidas fueron incubadas en 85 por ciento (v/v) de solución de propilenglicol (Poli Scientific) durante un minuto. Muestras teñidas se lavaron con dos cambios de agua desionizada. Las muestras teñidas fueron contra-teñidas con hematoxilina de Mayer (Poli Scientific) y se examinaron con microscopía de luz. Las imágenes fueron tomadas con una ampliación de 20 X.

[0382] **Ensayo de leptina.** Células derivadas de tejido adiposo y células derivadas del cordón umbilical se sembraron a 200.000 células/pocillo en placas de cultivo tratadas con tejido de 6 pocillos. Las células se sembraron inicialmente en Medio de Crecimiento, que se cambió a un medio de diferenciación adipogénica (medio DMEM-Hg; Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene 1 micromolar dexametasona (Sigma, St. Louis, MO), 0,2 milimolar indometasona (Sigma), 0,01 miligramos por insulina de microlitro (Sigma), 0,5 milimolar isobutimetilxantina (Sigma), 10 por ciento (v/v) de suero bovino fetal (Nº de Cat SH30070.03; Hyclone, Logan, UT), 100 unidades de penicilina

por mililitro, y 100 microgramos de estreptomina por ml (GIBCO)). Al final del ensayo, se recogió el medio acondicionado y los niveles de leptina se midió usando un kit de ELISA (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN).

## 5 Resultados

[0383] **Diferenciación de adiposa.** Morfológicamente células derivadas de MSCs y de tejido adiposo demostraron la formación de lípidos tan pronto como 5 días en este ensayo. Se observaron grandes cantidades de formación de gotas de lípidos en estos cultivos por 15 días de cultivo. Los cultivos de osteoblastos también depositan grandes cantidades de lípidos en estas condiciones después de 10 días en cultivo y extensamente a los 15 días. Se observó la formación de gotas de lípidos en cultivos celulares derivados de cordón umbilical y omental después de 15 días de cultivo. Se observó la formación de gotitas de lípidos de bajo nivel en los cultivos de fibroblastos después de 20 días en condiciones de inducción de adipogénico.

[0384] **Leptina.** La leptina no fue detectada por ELISA en medio acondicionado por células derivadas del cordón umbilical.

[0385] **Resumen.** Mientras que la leptina no se detectó en células derivadas del cordón umbilical por ELISA después de los protocolos de diferenciación adipogénica utilizados, los datos demuestran claramente que las células derivadas del cordón umbilical se someten a un bajo nivel de diferenciación a un fenotipo de adipocitos cuando se compara con cultivos de células madre mesenquimatosas, células derivadas de tejido adiposo, o los osteoblastos.

## 20 EJEMPLO 20

### Diferenciación en el fenotipo de células beta

[0386] El páncreas contiene células endocrinas, organizados en los islotes de Langerhans, que producen insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (PP). La capacidad de las células derivadas del cordón umbilical de diferenciarse hacia células con un fenotipo productor de insulina se ensayó bajo ocho protocolos de inducción diferentes.

### 30 Métodos y materiales

[0387] Las células derivadas del cordón umbilical (varios aislados - véase más abajo), así como fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales o adultos (NHDF) cultivados en Medio de Crecimiento, en matraces T75 recubiertos con gelatina, así como en diferentes condiciones de diferenciación que promueven células beta. Los matraces se recubrieron con 2% (p/v) de solución de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La solución de gelatina se aspiró y los matraces se lavaron con PBS. El factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa) y factor de crecimiento fibroblástico 10 (FGF-10) se adquirieron de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). GLP-1 se adquirió de Sigma (St. Louis, MO)

[0388] Se examinaron los siguientes protocolos:

#### *Protocolo 1:*

[0389] **Células:** se utilizaron células derivadas de tejido adiposo (US 6.555.374) y células derivadas epiplón, células derivadas del cordón umbilical, (P15), (P17), (P3), y fibroblastos dérmicos humanos normales de adultos (NHDF) (P10). Las células se mantuvieron bajo condiciones o bien normales o de 5% de O<sub>2</sub>. Las células se sembraron a baja densidad (5.000 células/cm<sup>2</sup>) en matraces T75 recubiertos con gelatina en gelatina y cultivadas en medio F12 de Ham (Clonetics, Santa Rosa, CA), 2% (v/v) FBS, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomina (50 microgramos/mililitro), 10 nanogramos/mililitro EGF, 20 nanogramos/mililitro bFGF hasta confluencia. Las células confluentes se tripsinizaron y se sembraron en placas a 50.000 células/cm<sup>2</sup> en tejidos de 24 pocillos de cultivo de poliestireno (TCPS; BD Biosciences, Bedford, MA) placas con o sin recubrimiento de gelatina o colágeno. Las células se cultivaron en medio F12 de Ham, FBS al 2%, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomina (50 microgramos/mililitro), 10 nanogramos/mililitro de EGF, 20 nanogramos/mililitro bFGF y 15 nanomolarGLP-1 (7-37 isoforma) durante un máximo de 3 semanas.

#### *Protocolo 2:*

[0390] **Células:** Las células derivadas del cordón umbilical, aislado 2 (P17), aislado 1 (P15), aislado 4 (P10) y NHDF P10 adulta se utilizaron. Las células se sembraron a 50.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de TCP de 24 pocillos y se cultivaron en DMEM: F12 de Ham (1: 1) medio, suplemento B-27 (Gibco, Carlsbad, CA), 50 unidades de penicilina por mililitro, 50 miligramos de estreptomina por mililitro, a 20 nanogramos/mililitro EGF, se generaron 40 nanogramos/mililitro bFGF cúmulos esféricos - por lo general 4-6 días. Después de ese período, se recogieron los cúmulos esféricos, se centrifugaron y se volvieron a sembrar en placas, recubiertas con laminina de 24 pocillos (BD Biosciencias, Bedford, MA), y se cultivaron hasta 3 semanas en B-27 suplementado con medio que contiene 10 nanomolarGLP-1 (7-37) pero no otros factores de crecimiento (es decir, sin bFGF y EGF no).

Protocolo 3:

**[0391] Células:** Las células derivadas del cordón umbilical, aislado 2 (P17) aislado 1 (P15), aislado 4 (P10), y se utilizó NHDF adulta (P10). Las células se sembraron a una densidad elevada (50.000 células/cm<sup>2</sup>) en placas de 24 pocillos TCPS y cultivadas en DMEM: F12 de Ham (1: 1) medio, B-27 de suplementos, P/S, 20 nanogramos/mililitro de EGF, 40 nanogramos/mililitro bFGF cúmulos esféricos se generaron - por lo general 4-6 días. Después de ese período, se recogieron los cúmulos esféricos, se centrifugaron y se volvieron a sembrar en placas de 24 pocillos recubiertas con laminina y se cultivaron hasta 3 semanas en B-27 suplementado con medio que contiene 10 nanomolar GLP- 1 (1-37 isoforma) pero ningún otro factor de crecimiento (es decir, sin bFGF y sin EGF).

Protocolo 4:

**[0392] Células:** NHDF adulta (P15), derivadas del cordón umbilical, aislado 1 (P18), aislado 2 (P21), aislado 3 (P5), se aisló 3 (P4), se aislaron de acuerdo con el método de Mitchell et al. (2). Las células se sembraron a 50.000 células/cm<sup>2</sup> en placas recubiertas de gelatina TCPS de 24 pocillos y se cultivaron en DMEM: F12 de Ham (1: 1) medio, Suplemento B-27, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro), 10 nanogramos/mililitro FGF-10, y/o de 40 nanogramos/mililitro TGF alfa durante más de dos semanas.

Protocolo 5:

**[0393] Células:** NHDF adulta, derivadas del cordón umbilical, aislado 1 (P18), aislado 2 (P21) aislado 3 (P5), aislado 3 (P4), se aislaron de acuerdo con el método de Mitchell et al. (2). Las células se sembraron a 50.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina TCPS y se cultivaron en medio EBM-2, a 10 nanogramos/mililitro FGF-10, y/o de 40 nanogramos/mililitro TGF alfa para más de dos semanas.

Protocolo 6:

**[0394] Células:** derivadas de cordón umbilical, aislado 3 (P2) se utilizaron. Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 en gelatina y se dejaron crecer ya sea en medio de crecimiento o en medio F12 de Ham, FBS al 2%, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro), 10 nanogramos/mililitro EGF, 20 nanogramos/mililitro bFGF hasta confluencia. Las células confluentes se tripsinizaron y se sembraron en placas a 50.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos TCPS, con o sin recubrimiento de gelatina. Se utilizaron tres tipos de medios básicos durante un máximo de 3 semanas:

- Medio Beta I: medio de Ham F12, 2% de FBS, 10 milimolar nicotinamida, penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro), 25 milimolar glucosa;
- Medio Beta II: Partes iguales de medios DMEM/F12 de Ham, FBS al 2%, 10 milimolar nicotinamida, 25 milimolar de glucosa; y
- Medio basal de células endoteliales (EBM), (Clonetics, Santa Rosa, CA).

**[0395]** Se añadieron los siguientes factores de crecimiento para cada uno de los medios: 10 nanogramos/mililitro EGF, 20 nanogramos/mililitro bFGF, 10 GLP-1 nanomolar (7-37 isoforma).

**[0396] aislamiento de ARN total y RT-PCR cuantitativa.** Se extrajo ARN de células derivadas del cordón umbilical y fibroblastos cultivados como se describe en cada protocolo. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contiene beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini kit, Qiagen, Valencia, CA) y ARN extraído de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento/muestra ADNasa 2,7 U (Sigma St. Louis, MO). La ARN se eluye con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. ARN se invirtió transcrito usando hexámeros aleatorios con los reactivos TaqMan inversos de transcripción (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.

**[0397] PCR en tiempo real.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión de genes ASSAYS-ON-DEMAND. PDX-1 (Hs00426216), pro-insulina (Hs00355773), NGN-3 (Hs00360700) y Glut-2 (Hs00165775) GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) y mezcla maestra TaqMan PCR Universal de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencia 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Además, se ensayó otro conjunto de cebadores diseñados en casa para PDX-1 y NGN-3. Tabla 20-1 contiene secuencias de los cebadores. PCR que usa estos cebadores se realizó como se ha descrito anteriormente. ARN total de páncreas (Ambion, Austin, TX) se utilizó como control. Datos de PCR se analizaron según el método  $\Delta\Delta CT$  recomendado por Applied Biosystems (1).

Tabla 20-1.

Nombre de cebador	Secuencia
Cebador delantero PDX-1	5 'CTGGATTGGCGTTGTTTGTG-3' (SEQ ID NO: 11)
Cebador inverso PDX-1	5 'TCCCAAGGTGGAG TGCTGTAG-3'
	(SEQ ID NO: 12)
PDX-1-TaqMan sonda	5 'CTGTTGCGCACATCCCTGCC-3' (SEQ ID NO: 13)
Cebador delantero NGN-3	5 'GGCAGTCTGGCTTTCTCAGATT-3' (SEQ ID NO: 14)
Cebador inverso NGN-3	5 'CCCTCTCCCTTACCCTTAGCA-3' (SEQ ID NO: 15)
Sonda TaqMan NGN-3	5 'CTGTGAAAGGACCTGTCTGTGCGC-3' (SEQ ID NO: 16)

**[0398] Inmunofluorescencia.** Tejido pancreático humano adulto se cosechó y la inmersión se fijó en 4% (p/v) de paraformaldehído (Sigma, St. Louis, MO) durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: insulina (suero de insulina; 1:50; Linco Research, St. Charles, MO), PDX-1 (1:50; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), glucagón (1: 100; Santa Cruz Biotech), somatostatina (1: 100; DakoCytomation, Carpinteria, CA), y citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma, St. Louis, MO). Brevemente, las muestras fijadas se bloquearon con un escalpelo y se colocan dentro del Compuesto embebido O.C.T. (Tissue-Tek PTU; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contiene etanol. Los bloques congelados fueron entonces seccionados (10 micras de espesor) utilizando un criostato estándar (Leica Microsystems), y se montaron en portaobjetos de vidrio para tinción.

**[0399]** Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteína que contiene PBS, 4% (v/v) de suero de cabra (Chemicon, Temecula, CA), y 0,3% (v/v) Triton (Triton X-100, Sigma) durante 1 hora. Los anticuerpos primarios, se diluyeron en solución de bloqueo, se aplicaron a las muestras durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Soluciones de anticuerpos primarios se retiraron y las muestras se lavaron con PBS antes de la aplicación de las soluciones de anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente que contiene la solución de bloqueo, junto con anticuerpo IgG-Texas Red de anti-ratón de cabra (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) para CK18, IgG Alexa 488 anti-conejo de cabra (1: 250; Molecular Probes) durante glucagón y somatostatina, IgG-FITC anti-cobaya de cabra (1: 150; Santa Cruz Biotech) para la insulina, o IgG-FITC anti-cabra de burro (1: 150; Santa Cruz Biotech) para tinción PDX-1. Las muestras se lavaron y 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) se aplicaron durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

**[0400]** Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). Imágenes representativas fueron tomadas utilizando una cámara de vídeo digital en color y software 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).

### Resultados

**[0401]** Para las células derivadas del cordón umbilical tratadas de acuerdo con los protocolos de 1-6, la expresión del marcador específico al páncreas no se detectó utilizando PCR en tiempo real y los cebadores ASSAYS-ON-DEMAND, con la excepción de que los bajos niveles de NGN-3 se detectaron en las células de protocolo 6. Los mismos cebadores produjeron resultados positivos con ADNc derivada de ARN de tejido pancreático.

**[0402]** PCR en tiempo real para NGN-3 se realizó en muestras de ADNc derivadas de cordón umbilical humano cultivadas según el protocolo 6. PCR se realizó también utilizando cebadores Ngn-3 ASSAYS-ON-DEMAND (Hs00360700). ADNc derivada del páncreas humano se utilizó como control. No se detectaron otros marcadores específicos de páncreas (PDX-1, pro-insulina o GLUT-2) con los cebadores ASSAYS-ON-DEMAND.

**[0403]** Las condiciones experimentales en los protocolos 2 y 6 aplicados a los tejidos derivados del cordón umbilical, pero no fibroblastos, produjeron estructuras que se parecen al conjunto celular de las células epiteliales pancreáticas en islotes. Estas estructuras surgieron 3-5 días después de la aplicación del protocolo. Sin embargo a diferencia de islotes, estas estructuras fueron negativos para expresión de marcadores pancreáticos (PDX-1, Ngn3, GLUT-2 y pro-insulina) (examinada por PCR en tiempo real).

**[0404]** Se detectaron marcadores específicos de páncreas en el tejido derivado de un páncreas humano usando la técnica de inmunofluorescencia y un conjunto de anticuerpos (véase materiales y métodos). La expresión de marcadores específicos de páncreas (por ejemplo, insulina, PDX-1, glucagón, somatostatina, y citoqueratina 18) en el tejido pancreático humano era fácilmente detectable.

**[0405] Resumen.** Expresión limitada de PDX-1 y Ngn-3 se ha observado en células derivadas del cordón umbilical tratados con una variedad de protocolos experimentales. No hubo diferencias en los resultados entre los cebadores de la casa diseñados y disponibles en el mercado. Por ejemplo, mientras que el protocolo número 1 dio datos positivos para PDX-1 y Ngn-3 usando cebadores diseñado en casa, cebadores ASSAYS-ON-DEMAND para los mismos genes produjeron datos negativos. Los resultados no fueron verificados directamente por técnicas inmunológicas. A pesar de tales diferencias, la expresión de varios marcadores pancreáticos se ha logrado lo que sugiere el potencial de las células derivadas del cordón umbilical de diferenciarse hacia los fenotipos pancreáticos.



**Referencia para el Ejemplo 20****[0406]**

- 5 1. Boletín de usuario nº 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System  
 2. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerensrauch M, Abou-Easa K,  
 Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. (2003) Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*  
 21(1):50-60.  
 3. H. Edlund. (2002) Pancreatic organogenesis - developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat.*  
 10 *Rev. Genet.* 3:524-532.  
 4. S.K. Kim and M. Hebrok. (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes*  
*Dev.* 15:111-127.  
 5. Street CN, Rajotte RV, Korbitt GS. (2003) Stem cells: a promising source of pancreatic islets for  
 transplantation in type 1 diabetes. *Curr Top Dev Biol.* 58:111-36.

**EJEMPLO 21****Diferenciación condrogénica de las células derivadas del cordón umbilical**

20 **[0407]** El daño y defectos del cartílago conducen a aproximadamente 600.000 procedimientos quirúrgicos cada año  
 solamente en los Estados Unidos (1). Una serie de estrategias se han desarrollado para el tratamiento de estas  
 condiciones, pero han tenido un éxito limitado. Uno de los enfoques, Cartecel (Genzyme), usa condrocitos autólogos  
 que se recogen de un paciente, se expanden *in vitro* y después se implantan en el paciente (1). Este enfoque tiene  
 la desventaja de recoger cartílago sano y que requiere un segundo procedimiento para implantar las células  
 25 cultivadas. Una posibilidad alternativa es una terapia basada en células madre en la que se colocan las células en o  
 cerca del sitio del defecto para sustituir directamente el tejido dañado. Las células pueden diferenciarse en  
 condrocitos antes de las células de aplicación o se pueden utilizar células progenitoras que pueden diferenciarse *in*  
*situ*. Tales células trasplantadas reemplazarían los condrocitos perdidos en el defecto.

30 **[0408]** Las células candidatas para esta indicación deben ser evaluadas por su capacidad de diferenciarse en  
 condrocitos *in vitro*. Una serie de protocolos se han desarrollado para examinar la capacidad de las células para  
 diferenciarse y expresar genes marcadores de condrocitos. Se ensayaron células derivadas del cordón umbilical por  
 su capacidad de diferenciarse en condrocitos *in vitro* en dos sistemas de ensayo diferentes: el sistema de cultivo de  
 ensayo de sedimento y los cultivos de gel de colágeno. El sistema de cultivo de sedimento ha sido utilizado con éxito  
 35 con las porciones seleccionadas de células madre mesenquimatosas humanas (MSC). Se ha demostrado que MSC  
 cultivadas en este ensayo y tratadas con factor de crecimiento transformante-beta3 se diferencian en condrocitos  
 (2). El sistema de gel de colágeno se ha utilizado para los condrocitos de cultivo *in vitro* (3). Los condrocitos  
 cultivados bajo estas condiciones forman una estructura de tipo cartílago.

**Materiales y métodos**

40 **[0409] Cultivo celular.** Se recibieron cordones umbilicales humanos y se prepararon células derivadas del cordón  
 umbilical como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces  
 TCP recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células usadas en los  
 experimentos iban desde el paso 4 hasta el paso 12.

45 **[0410]** Condrocitos articulares humanos se adquirieron de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en el mismo  
 medio que las células del posparto. Veinticuatro horas antes del experimento, el medio de cultivo se cambió a un  
 medio que contiene 1% de FBS.

**[0411]** Las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) se compraron de Cambrex (Walkersville, MD) y se  
 cultivaron en MSCGM (Cambrex). Las células utilizadas para los experimentos estaban entre los pasos 2 y 4.

50 **[0412] Ensayos de gel de colágeno.** Las células cultivadas se trataron con tripsina para eliminarse la placa de  
 cultivo. Se lavaron las células con centrifugación dos veces a 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se  
 contaron. Las células se mezclaron con los siguientes componentes en las concentraciones finales indicadas.  
 Colágeno de cola de rata (1 miligramo/mililitro, BD DiscoveryLabware, Bedford, MA), 0,01 normal NaOH y medio  
 celular de condrocitos DMEM, penicilina (100 unidades/mililitro), estreptomina (100 microgramos/mililitro), 2  
 55 milimolar de L-Glutamina, 1 milimolar de piruvato de sodio, 0,35 milimolar de L-prolina, 100 nanomolar de  
 dexametasona, 0,17 milimolar de L-ácido ascórbico, 1% (v/v) ITS (insulina, la transferencia, el selenio) (todos los  
 componentes de Sigma Chemical Company). Las células se mezclaron suavemente con el medio, las muestras se  
 dividieron en alícuotas en pocillos individuales de una placa de clúster ultra-baja de 24 pocillos (Corning, Corning,  
 NY) a una concentración de o bien 2 x 10<sup>5</sup> por pocillo o 5 x 10<sup>5</sup> por pocillo. Los cultivos se colocaron en una  
 60 incubadora y se dejaron reposar durante 24 a 48 horas. El medio se reemplazó con medio de condrocitos fresco  
 suplementado con factor de crecimiento apropiado cada 24 a 48 horas. Las muestras se dejaron cultivarse hasta 28  
 días, momento en el que se retiraron y se fijaron en 10% (v/v) de formalina (VWR Scientific, West Chester, PA) y se  
 procesaron para examen histológico. Las muestras se tiñeron con safranina O o hematoxilina/eosina para la  
 evaluación.

65 **[0413] Ensayos de cultivo de gránulos.** Las células cultivadas se trataron con tripsina para extraerse de la placa  
 de cultivo. Se lavaron las células con centrifugación dos veces a 300 x g durante 5 minutos en DMEM sin suero y se

contaron. Las células se resuspendieron en medio de condrocitos fresco (descrito anteriormente) a una concentración de  $5 \times 10^5$  células por mililitro. Las células se dividieron en alícuotas en nuevos tubos de polipropileno a  $2,5 \times 10^5$  células por tubo. Las muestras apropiadas se trataron a continuación con TGF-beta3 (10 nanogramos/mililitro, Sigma) o GDF-5 (100 nanogramos/mililitro; R&D Systems, Minneapolis, MN). Las células se centrifugaron a 150 x g durante 3 minutos. Los tubos se transfirieron a continuación a la incubadora y se dejaron reposar durante 24-48 horas en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio se reemplazó con medio de células de condrocitos frescas y factor de crecimiento, en su caso, cada 2-3 días. Las muestras se dejaron cultivar hasta 28 días, en cuyo momento fueron retiradas y fijadas y teñidas como se ha descrito anteriormente.

## **Resultados**

[0414] Se prepararon gránulos y se cultivaron como se ha decrito en Métodos. Los sedimentos se cultivaron en medio (control), o medio suplementado con TGF beta3 (10 nanogramos/mililitro) o GDF-5 (100 nanogramos/mililitro), que fue reemplazado cada 2 a 3 días. Los sedimentos se recogieron después de 21 días de cultivo y se tiñeron con safranina O para probar la presencia de glicosaminoglicanos. Los gránulos tratados con TGFbeta3 y GDF-5 mostraron cierta tinción positiva de safranina O, en comparación con las células de control. La morfología de las células del cordón umbilical mostró cierta morfología limitada similar a condrocitos.

[0415] **Resumen.** Células derivadas del cordón umbilical se diferenciaron parcialmente en condrocitos *in vitro* en el cultivo de sedimento y los sistemas de ensayo de gel de colágeno. Las células derivadas del cordón umbilical mostraron algunos indicios de expresión de glicosaminoglicano por las células. La morfología mostró similitud limitada al tejido del cartílago. Estos resultados sugieren que las condiciones pueden ser optimizadas para estimular más completamente la diferenciación de los condrocitos de las células derivadas del cordón umbilical.

## **Referencia para el Ejemplo 21**

### **[0416]**

1. U.S. Markets for Current and Emerging Orthopedic Biomaterials Products and Technologies. Medtech Insight L.L.C. 2002
2. Johnstone, B, T. M. Hering, A.I. Caplan, V.M. Goldberg y J.U. Yoo. In Vitro Chondrogenesis of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. 1998. Exp Cell Res 238:265-272.
3. Gosiewska, A., A. Rezanian, S. Dhanaraj, M. Vyakarnam, J. Zhou, D. Burtis, L. Brown, W. Kong, M. Zimmerman y J. Geesin. Development of a Three-Dimensional Transmigration Assay for Testing Cell-Polymer Interactions for Tissue Engineering Applications. 2001 Tissue Eng. 7:267-277.

## **EJEMPLO 22**

### **Evaluación adicional de potencial condrogénico de las células derivadas de tejido del cordón umbilical en un Ensayo *In Vitro* a base de cultivo de gránulos**

[0417] La evaluación del potencial condrogénica de las células derivadas de tejido umbilical se realizó utilizando ensayos *in vitro* basados en cultivo de gránulo. Se utilizaron células de cordón umbilical en el paso temprano (P3) y paso tardío (P12). El potencial condrogénico de las células se evaluó en ensayos de cultivo de sedimento, bajo condiciones de inducción condrogénicas en medio suplementado con factor de crecimiento transformante beta-3 (TGFbeta-3), el crecimiento humana recombinante y el factor de diferenciación 5 (rhGDF-5), o una combinación de ambos.

## **Materiales y Métodos**

[0418] **Reactivos.** Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomocina, se obtuvieron de Invitrogen, Carlsbad, CA. Suero de ternero fetal (FCS) se obtuvo de Hyclone (Logan, UT). Medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (MSCGM) y el kit de bala de diferenciación condrogénica hMSC se obtuvieron de BioWhittaker, Walkersville, MD. TGF-beta-3 se obtuvo de los productos de investigación Oncogene, San Diego, CA. rhGDF-5 se obtuvo de Biopharm, Heidelberg, Alemania (WO9601316 A1, US5994094 A).

[0419] **Células.** Células madre mesenquimatosas humanas (Nº de Lote 2F1656) se obtuvieron de BioWhittaker, Walkersville, MD y se cultivaron en MSCGM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este lote ha sido examinado previamente, y se muestra que es positivo en los ensayos de condrogénesis. Fibroblastos humanos neonatales y de adultos y se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA y se cultivaron en medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo de tejido recubiertos de gelatina. Se utilizaron células derivadas de tejido de posparto, aisladas de cordones umbilicales humanos, como se describe en los ejemplos anteriores. Las células se cultivaron en Medio de Crecimiento de una manera similar al cultivo de los fibroblastos. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células usadas para los experimentos estaban en los pasos 3 y 12.

[0420] **Ensayo de cultivo de gránulos.** Para los cultivos de gránulos, se colocaron  $0.25 \times 10^6$  células en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente para formar un sedimento esférico según el protocolo para el ensayo condrogénico de BioWhittaker. Los gránulos se cultivaron en medio de

inducción condrogénica que contiene TGFbeta-3 (10 nanogramos/mililitro), rhGDF-5 (500 nanogramos/mililitro), o una combinación de TGFbeta-3 (10 nanogramos/mililitro), y rhGDF-5 (500 nanogramos/mililitro) durante tres semanas. Los controles no tratados se cultivaron en medio de crecimiento. Durante el cultivo, los gránulos fueron re-  
alimentados con medio fresco cada dos días. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

5

Grupo de tratamiento

**[0421]**

- 10 A. Paso temprano de células derivadas del cordón umbilical (U EP) + rhGDF-5
- B. Paso tardío de células derivadas del cordón umbilical (U LP) + rhGDF-5, n = 2
- C. Células madre mesenquimatosas humanas (HMSC) + rhGDF-5
- D. Células adultas de fibroblastos humanos (HAF) + rhGDF-5
- 15 E. Pase temprano de células derivadas del cordón umbilical (U EP) + TGFbeta-3
- F. Paso tardío de células derivadas del cordón umbilical (U LP) + TGFbeta-3, n = 2
- G. Células madre mesenquimatosas humanas (HMSC) + TGFbeta-3
- H. Células adultas de fibroblastos humanos (HAF) + TGFbeta-3
- I. Paso temprano de células derivadas del cordón umbilical (U EP) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
- 20 J. Paso tardío de células derivadas del cordón umbilical (U LP) + rhGDF-5 + TGFbeta-3, n = 2
- K. Células madre mesenquimatosas humanas (HMSC) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
- L. Células adultas de fibroblastos humanos (HAF) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
- M. Células de fibroblastos neonatales humanos (HNF) + rhGDF-5 + TGFbeta-3
- N. Paso temprano de células derivadas del cordón umbilical (U EP)
- 25 O. Paso tardío de células derivadas del cordón umbilical (U LP)
- P. Células madre mesenquimatosas humanas (HMSC)
- Q. Células de fibroblastos adultas humanas (HAF)

20

25

**[0422] Histología de muestras *in vitro*.** Al final del periodo de cultivo, los gránulos se fijaron en 10% de formalina tamponada y se enviaron a MPI Research (Mattawan, MI) para la inclusión en parafina, seccionado, y tinción con hematoxilina y eosina (H & E) y tinción con safranina O (SO).

30

**Resultados**

**[0423]** Las células derivadas del cordón umbilical, las MSC y los fibroblastos formaron gránulos de células en medio de inducción condrogénica con los diferentes factores de crecimiento. El tamaño de los gránulos al final del periodo de cultivo varía entre los diferentes tipos de células. Los gránulos formados con las células del cordón umbilical tendían a ser más grandes y más flexibles que los formados por MSCs y fibroblastos. Los gránulos formados con todos los tipos de células y cultivados en medio de control eran más pequeños que los gránulos cultivados en medio de inducción condrogénica.

35

**[0424]** El examen de secciones transversales de gránulos teñidos con H & E y safranina O mostraron que las células derivadas del cordón umbilical en el pase temprano tenían el potencial de sufrir diferenciación condrogénica. Se observó condrogénesis según la evaluación de la condensación de células, morfología celular y tinción positiva con safranina O de la matriz en los gránulos celulares umbilicales cultivados en medio de inducción condrogénica suplementado con TGFbeta-3, rhGDF-5 o ambos. Condrogénesis en gránulos fue similar para TGFbeta-3, rhGDF-5 y los tratamientos combinados. Gránulos de control cultivados en medio de crecimiento no mostraron evidencia de la condrogénesis. Potencial condrogénico de las células derivadas del cordón umbilical fue marginalmente inferior que el observado con las MSC obtenidas a partir de Biowhittaker.

40

45

**[0425]** Las células derivadas del cordón umbilical en paso tardío no demostraron un potencial condrogénico tan distinto como lo hicieron células derivadas de cordón umbilical de paso temprano. Sin embargo, esto puede deberse al hecho de que las condiciones de inducción condrogénicas se optimizaron para MSCs, no para las células derivadas del posparto. Cierta condensación celular se observó con los fibroblastos, pero no se asoció con tinción de safranina O.

50

**EJEMPLO 23**

55

**Diferenciación al fenotipo de cardiomiocitos**

**[0426]** Existe una tremenda necesidad de una terapia que retarde la progresión de la enfermedad cardíaca y/o curación, tales como la enfermedad isquémica del corazón e insuficiencia cardíaca congestiva. Las células que pueden diferenciarse en cardiomiocitos que pueden integrarse totalmente en el músculo cardíaco del paciente sin arritmias son altamente deseables. Las células madre mesenquimatosas de roedores tratados con 5-azacitidina se han demostrado expresar marcadores de los cardiomiocitos (Fukuda et al. (2002) CR Biol 325: 1027-1038). Esto no se ha demostrado para las células madre humanas adultas. Los factores adicionales se han utilizado para mejorar la diferenciación de células madre incluyendo bajo oxígeno (Storch (1990) Biochim Biophys Acta 1055: 126-9), ácido retinoico (Wobus et al. (1997) J. Mol Cell Cardiol 29: 1525 -39), DMSO (Xu et al. (2002). Circ Res 91: 501-8), y cloruro de queleritrina (publicación internacional PCT N° WO03/025149), que efectúa la translocación de PKC desde

60

65

el citosol a membrana plasmática y es un inhibidor de la actividad PKC.

[0427] En este ejemplo, las células derivadas del cordón umbilical fueron tratadas con 5-azacitidina ya sea solo o en combinación con DMSO o cloruro de queleritina y los marcadores de cardiomiocitos medidos por PCR en tiempo real.

5

### **Métodos y materiales**

[0428] **Células.** Células criopreservadas derivadas del cordón umbilical (P10) se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces recubiertos de gelatina. Las células se sembraron a  $5 \times 10^4$  células/pocillos en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento durante 24 horas. El medio se cambió a 0, 3, 10 y 30 micromolar de 5-azacitidina (Sigma, St. Louis, MO) solo o con 5 microM cloruro de queleritina (Sigma), 1% (v/v) sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma) o 1 micromolar de ácido retinoico (Sigma) en MEM alfa (Sigma), insulina, transferrina y selenio (ITS; Sigma), 10% (v/v) de suero bovino fetal, penicilina y estreptomycin. Las células se incubaron a 37°C, 5% (v/v) O<sub>2</sub> durante 48 - 72 horas. El medio se cambió a MEM alfa, insulina, transferrina y selenio, 10% de suero fetal bovino (v/v), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomycin (50 microgramos/mililitro), y las células se incubaron a 37°C, 5% (v/v) O<sub>2</sub> durante 14 días.

[0429] **Extracción de ARN y transcripción inversa.** Las células se lisaron con tampón RLT de 150 microlitros que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy 96 kit, Qiagen, Valencia, CA) y se almacenaron a -80°C. Los lisados celulares se descongelaron y se extrajo ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy 96 kit, Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento de ADNasa 2,7 unidades/muestra (Sigma St. Louis, MO). La ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. La ARN se transcribió a la inverso utilizando hexámeros al azar con los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

[0430] **PCR.** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND de la miosina cardíaca (Hs00165276 ml), miosina esquelética (Hs00428600), GATA 4 (Hs00171403 ml), GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA), y mezcla maestra de TaqMan Universal 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). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. ADNc a partir de corazón y músculo esquelético (Ambion, Austin TX) se utilizaron como controles.

### **Resultados**

[0431] ARN de control desde el músculo cardíaco mostraron expresión de la miosina cardíaca y GATA 4, RNA de músculo esquelético mostró miosina esquelética y miosina cardíaca, pero ninguna expresión GATA 4. Células derivadas del cordón umbilical (P12) tratadas durante 48 h con los factores y cultivadas durante otros 14 días expresaron bajos niveles de GATA 4, pero ninguna miosina esquelética o miosina cardíaca. Las muestras adicionales a partir de células derivadas del cordón umbilical también mostraron expresión de GATA 4.

[0432] **Resumen.** Células derivadas del cordón umbilical sin tratar expresan constitutivamente GATA 4, un factor de transcripción nuclear en cardiomiocitos, células de Sertoli, y hepatocitos.

### **EJEMPLO 24**

#### **Evaluación de las células derivadas del cordón umbilical para la terapia cardiovascular en un modelo de ligadura coronaria de roedor**

[0433] Los modelos animales de insuficiencia cardíaca han facilitado la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y han ayudado en el desarrollo de nuevos tratamientos para la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). La ligadura de la arteria coronaria, o el bloqueo de los vasos que irrigan el tejido del corazón en la rata imita estrechamente la fisiopatología de infarto agudo de miocardio en seres humanos y se ha utilizado con éxito para estudiar las intervenciones farmacológicas para CHF. El trasplante de células de las células humanas en lesiones cardíacas es un potencial tratamiento terapéutico viable para CHF.

[0434] Se evaluó la eficacia del tratamiento de células derivadas de cordón umbilical humano intracardíaco cuando se administre 15 minutos tras la oclusión de la arteria post-coronaria en un modelo de roedor de infarto de isquemia/infarto.

### **Métodos y Materiales**

[0435] La instalación de ensayo de Charles River Worcester, MA está acreditada por la Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International (AAALAC) y registrada en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para llevar a cabo la investigación en animales de laboratorio. Todas las condiciones de la prueba se ajustaban a la Ley de Bienestar Animal (9 CFR) y sus modificaciones. El protocolo fue revisado y aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) en las instalaciones de prueba para el cumplimiento de la normativa previa a la iniciación del estudio.

[0436] Los animales que tienen características identificadas en la Tabla 24-1 se alojaron individualmente en jaulas

micro-aisladoras sobre la ropa de cama en autoclave. Las jaulas se ajustaban a las normas establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

**Tabla 24-1. Características de los animales**

Especie: *Rattus norvegicus*

Cepa: Rnu

Fuente: Charles River Laboratories

Edad en la Dosificación: 6-8 semanas

Peso en Dosificación: ~200-250 gramos

Número de machos (incluyendo repuestos): 40 + 10

[0437] Se proporcionó Dieta Certificada PURINA (irradiada) a los animales *ad libitum*. Esta dieta se analizó de forma rutinaria por el fabricante para componentes nutricionales y contaminantes ambientales. Los resultados de los análisis del fabricante están archivados en el Centro de Prueba.

[0438] Agua del grifo filtrada autoclave se proporcionó *ad libitum*. Las muestras del agua filtrada se analizaron para los sólidos disueltos totales, dureza, contenido microbiológico especificado, y contaminantes ambientales seleccionados. Los resultados de estos análisis se encuentran archivados en el Centro de Prueba.

[0439] Los controles ambientales se establecieron para mantener las temperaturas de 18 a 26°C (64 y 79°F) con humedad relativa a 30% a 70%. Se mantuvo un ciclo luz:oscuridad de 12:12 horas. Diez o más cambios de aire por hora se mantuvieron en las salas de los animales. Tras la recepción y antes de su uso en el estudio, se detuvieron los animales durante un mínimo de cuatro días para el acondicionamiento de acuerdo con el Programa de Gestión de Vendedores del Centro de Pruebas como se describe en el Procedimiento de Funcionamiento Estándar del Centro de Pruebas, Recepción, Acondicionamiento y Cuarentena de Animales Laboratorio.

[0440] Cada animal se identificó por un número único indicado por un punzón en el oído. Los animales se asignaron aleatoriamente a grupos por una distribución ordenada de peso de tal manera que los pesos corporales individuales no excedieron  $\pm 20\%$  de peso medio.

[0441] Los animales se anestesiaron con pentobarbital de sodio (40 miligramos/kilogramo) y buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo) como una sola mezcla administrada por vía intramuscular (IM). Tras el establecimiento de la anestesia, los animales fueron intubados utilizando angiocaths de calibre 18 a 16, de longitud de 2 pulgadas, o angiocath de tamaño apropiado, y se mantuvieron en la respiración de aire ambiente (suplementado con oxígeno) y un ventilador de presión positiva durante todo el procedimiento quirúrgico. Se administró anestesia adicional de forma incremental según sea necesario. También se administró terapia antibiótica preoperatoria, benzatina/procaína penicilina G, 40.000 unidades/kilogramo, IM. Tratamiento antibiótico adicional se administró cada 48 horas.

[0442] Almohadillas de electrodos se colocaron alrededor de las patas apropiadas de los animales para recibir una señal ECG utilizable. Los animales se colocaron en una almohadilla caliente para ayudarlos a mantener la temperatura del cuerpo durante todo el procedimiento. Una sonda de temperatura rectal se insertó en el animal para controlar la temperatura corporal. Pomada oftálmica se administró a cada ojo. Los sitios quirúrgicos (área torácica) se prepararon para la cirugía aséptica mediante la eliminación de cualquier exceso de piel, y para limpiar suavemente el área con las esponjas empapadas en alcohol isopropílico al 70%, que se dejó secar. Iodona (MEDISEPPS, o solución similar) se aplicó entonces a la zona y se dejó secar. El área se cubrió apropiadamente para la cirugía aséptica estricta.

[0443] Una incisión quirúrgica se realizó en la piel sobre el cuarto espacio intercostal. La disección roma a través de las capas musculares se utilizó para acceder a la cavidad torácica. Un retractor se insertó cuidadosamente en el cuarto espacio intercostal y se abrió para permitir el acceso a la cavidad interior. El pericardio se abrió cuidadosamente a través de las burlas suave con hisopos de algodón humedecido en una solución salina estéril. Un hisopo de algodón húmedo se usó para empujar suavemente la punta del corazón en la abertura donde estaba conectada una longitud de sutura de seda 6-0 en el miocardio para la manipulación del corazón. Después de una pausa para permitir que el corazón se recuperara, la sutura colocada en el vértice se utilizó para aliviar el corazón fuera de la cavidad torácica y para colocar una tensión suficiente sobre el corazón para permitir el acceso al corazón superior y la descendente anterior de la arteria coronaria (LAD). Otra longitud de sutura de seda 6-0 se colocó en el miocardio de manera que rodeara la LAD. La presión sobre la sutura apical fue liberada y se permitió que el corazón volviese al interior de la cavidad torácica.

[0444] Una vez que el ritmo cardíaco y ECG volvieron a los valores de línea de base, las ligaduras alrededor de la LAD fueron atadas para ocluir la LAD. Esto fue una oclusión permanente con la sutura atada y los extremos recortados. Después de ligarse la ligadura, el cirujano buscó las siguientes indicaciones de oclusión exitosa: cambios en el color de la zona del corazón directamente debajo de la ligadura a un color blanco/grisáceo blanquecino como resultado de la terminación del flujo de sangre al área y un cambio significativo en el ECG que corresponde a la oclusión de la LAD. Las arritmias pueden haberse desarrollado dentro de los primeros 10 minutos de la oclusión. La rata se controló de cerca durante este período de tiempo en el caso de ser necesaria la reanimación. En el caso de arritmia grave e insuficiencia de la rata para convertirse a ritmo sinusal normal sin ayuda, la ayuda se realizó mediante masaje cardíaco. Aproximadamente 15 minutos después de la iniciación de la oclusión LAD, el área del ventrículo izquierdo isquémico fue tratada con vehículo o artículo de ensayo mediante inyección directa en el miocardio isquémico. El tratamiento consistió en tres a diez inyecciones intramiocárdicas (100  $\mu$ L/inyección) en la zona isquémica del miocardio.

[0445] Las células humanas se cultivaron en Medio de Crecimiento en frascos T300 recubiertos de gelatina. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco, Carlsbad CA) y se tripsinizaron usando

tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad CA). La tripsinización se detuvo añadiendo Medio de Crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 xg, el sobrenadante se eliminó, y el sedimento celular se resuspendió en aproximadamente 1 mililitro medio de crecimiento por millón de células. Una alícuota de las células se retiró y se añadió al azul tripán (Sigma, St. Louis, MO). El número de células viables se estimó usando un hemocitómetro. La suspensión celular se centrifugó y se resuspendió en 1 mililitro medio de crecimiento que contiene 10% (v/v) DMSO (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO) por 5 millones de células y se transfiere en crioviales (Nalgene). Las células se enfriaron a aproximadamente 1°C/minuto durante la noche en un congelador a -80°C usando un recipiente de congelación "Mr. Frosty" (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de células se transfirieron a nitrógeno líquido. Los viales se envían desde CBAT, Somerville, NJ a Charles River, Worcester, MA en hielo seco y se almacenaron a -80°C. Aproximadamente 1-2 horas antes de la inyección de las células en el animal, un vial de células se descongeló rápidamente en un baño de agua 37 C°. En condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad BSL2, se añadieron las células a 40 mililitros de PBS con magnesio y calcio (Sigma St. Louis, MO) y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos antes de resuspender el sedimento celular en 10 mililitros de PBS. Se estimó el número de células y viabilidad como se ha descrito anteriormente. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS a una concentración final de 10<sup>6</sup> células viables/100 microlitros. La suspensión celular se cargó en jeringas de 1 mililitro con una aguja 30G y se mantuvo en hielo. La viabilidad se evaluó de nuevo hasta 5 horas en hielo.

[0446] Tras la administración de tratamiento (Tabla 24-2) y la estabilización del corazón, el cirujano comenzó a cerrar la incisión quirúrgica. Se retiró el retractor. Los pulmones estaban sobre-inflados durante 3 a 4 respiraciones e se inspeccionaron visualmente tanto como era posible para asegurarse de que estaban completamente re-inflados. Esto crea una presión negativa necesaria para prevenir el neumotórax post-recuperación. Para evacuar el aire del fluido y el exceso de la cavidad torácica después de cerrar la cavidad, un catéter intravenoso (es decir, calibre 20, 2 milímetros de longitud) se coloca a través de las capas de piel y músculo de manera que la punta se mantiene en la cavidad torácica. Se tuvo cuidado para que la punta no perforó ni el pulmón ni el corazón. Las costillas separadas y músculo asociado se suturó con sutura apropiada. Las capas superiores de músculo se suturaron usando un patrón continuo simple. La piel se cerró con seda 4-0 usando un patrón de colchón horizontal. Una jeringa de 10 mililitros fue unida al catéter intravenoso que había sido colocado previamente en la cavidad torácica y el émbolo lentamente hacia atrás para retirar fluidos y aire de la cavidad. Al mismo tiempo, el catéter fue retirado lentamente desde el sitio de entrada, permitiendo de este modo que la masa muscular circundante y la piel sellaran la punción. El paño quirúrgico se retiró y se aplicaron los fluidos (es decir, Solución de Ringer con lactato, /kilogramo por vía subcutánea o por vía intraperitoneal [IP] 25 mililitros [SC]).

Tabla 24-2. Los regímenes de tratamiento

Nº de gramo	Nº de varones	Artículo de prueba	Nivel de dosis (células/ animal)	Conc. dosis. (Células/ml)	Régimen ruta/dosis	Momento de la administración del tratamiento	Día de necropsia
1	8	Vehículo	0	0	La inyección directa en la región isquémica del ventrículo izquierdo del corazón, que consta de 3 a 10 inyecciones intramiocárdicas de 100 µl total.	15 minutos después de la ligadura de la arteria coronaria	Día 28 (± 1 Día)
2	8	Umbilical (P10) (B)	1 millón	10 millones			
2	8	Fibroblastos humanos 1F1853 (P10) (D)					
<b>Gramo. = Grupo;</b> <b>Nº = Número;</b> <b>Conc. = Concentración</b>							

[0447] Inmediatamente después de someterse cada rata a tratamiento con el artículo de prueba y la incisión se suturó, el animal se sometió a un examen ecocardiografía (ECG). La anestesia se mantuvo a lo largo de la realización del examen de eco. Tras la finalización del examen de eco, se interrumpió la ventilación, y la rata se volvió a la zona de recuperación para recuperar en una jaula de recuperación climatizada oxigenada.

[0448] Un segundo examen de eco de cada animal que sobrevive se completó al final del estudio (aproximadamente 28 días después del tratamiento), antes de la terminación. Durante el segundo examen, los animales se

anestesiaron como se describió anteriormente.

[0449] Para cada examen de eco, la zona torácica izquierda se afeitó, y se calentó, gel ultrasónico se aplica a la piel para mejorar el contacto con el transductor. Almohadillas de electrodos se colocan alrededor de las extremidades apropiadas para recibir una señal ECG. Imágenes ecocardiográficas incluyen eje corto y vistas según el eje largo para permitir la determinación de dimensiones de la cavidad ventricular, la contractilidad, el flujo de sangre a través de la vasculatura, y espesor de pared. Estas imágenes se guardan en el disco óptico para su posterior análisis. Después del examen, el medio de gel se retira de la piel con una gasa o toalla de papel. La rata se retira del ventilador y se coloca en una jaula de recuperación calentado hasta móvil.

[0450] A la conclusión de los procedimientos quirúrgicos, la ventilación respiratoria fue desactivado. Los animales se observaron para reflejo pedal. Los electrodos de la sonda y del ECG rectales posteriormente se eliminaron, y el animal se retira la intubación y se colocaron en una jaula de recuperación oxigenada calentado. Después de la recuperación completa de la anestesia, los animales se les dio buprenorfina (0,05 miligramos/kilogramo, SC). Las observaciones se realizaron con regularidad hasta que los animales mostraron una movilidad total y un interés por la comida y el agua. Los animales luego se colocaron en una jaula de carcasa limpia y volvieron a la sala de carcasa de los animales. Los animales fueron controlados para la integridad de la incisión quirúrgica dos veces al día después de la cirugía.

[0451] Los analgésicos (es decir, buprenorfina, 0,05 miligramos/kilogramo SC.) Se administra dos veces al día durante 4 días después de la operación y después, según sea necesario. Indicaciones visuales del dolor postoperatorio incluyen la falta de posturas normales cuerpo y el movimiento (por ejemplo, animal permanece en posición encorvada), antipatía, la falta de comer/beber, falta de aseo personal, y similares.

[0452] El peso corporal se registró para cada animal antes del tratamiento inicial, después semanalmente, y en el día de la necropsia. Animales encontrados muertos se pesaron y se realizó la necropsia.

[0453] Para que el corazón que se recogerá, cada rata fue anestesiada como se hizo para la cirugía. La vena yugular se canuló. El corazón fue detenido en la diástole con KCl infundió a través de la cánula yugular. A continuación, el corazón se retiró de la cavidad torácica. Entonces A necropsia limitada se realizó en el corazón después de lo cual el corazón se colocó en 10% de formalina tamponada neutra. A continuación, el resto de cada carcasa se descartó sin evaluación adicional.

[0454] Los corazones de todos los animales que fueron encontrados muertos o sacrificados moribundo se colocaron en 4% de paraformaldehído hasta que sea evaluado. A continuación, el resto de cada carcasa se descartó sin evaluación adicional.

[0455] **Histología y análisis de imágenes.** Tejidos fijados seccionados con una matriz de acero inoxidable corazón coronal (Harvard Apparatus, Holliston, MA) produjo cuatro secciones gruesas de tejido de serie de dos milímetros. Las secciones se procesan y en serie incluidos en parafina usando procedimientos rutinarios. Secciones de cinco micras se obtienen mediante microtomo y se tiñeron con de Masson Tri-cromo para el tejido conectivo (Poli Scientific, Bay Shore, NY) usando los procedimientos del fabricante. Fotomicrografías electrónicas fueron capturados y analizados usando métodos de imagen desarrollado por la fase 3 del sistema de imágenes (Glen Mills, PA). Las fotomicrografías de las secciones de tri-cromo teñidas se analizaron colorimétricamente electrónicamente para determinar el área total del ventrículo y la pared libre y el área de la tinción diferencial.

## Resultados

[0456] No hubo pérdida en la viabilidad de las células durante 5 horas en el vehículo cuando se mantuvo en hielo. Las células se inyectan en el infarto con uno a tres puntos de entrada de la aguja y múltiples cambios de dirección de la orientación de la aguja.

[0457] Los valores acortamiento fraccional se calcularon como se describe por Sahn et al. (1978) Circulation 58: 1072-1083. El acortamiento fraccional de los animales tratados con vehículo había una disminución significativa de 47,7%  $\pm$  8,3% en el día 0 hasta el 23,5%  $\pm$  30,2% en el día 28 ( $p < 0,05$ ). Los animales que fueron tratados con células derivadas del cordón umbilical mostraron pequeñas diferencias, no significativa entre el acortamiento fraccional entre el día 0 y 28. No hubo diferencias significativas entre el acortamiento fraccional entre los grupos de tratamiento en el día 0.

[0458] A la terminación del estudio, se recogieron los corazones y se sometieron a análisis histológico. Los corazones fueron detenidos en diástole y se fijaron. Los resultados se calcularon a partir de un algoritmo para estimar el porcentaje de área del corazón total, que comprende el infarto. El tamaño del infarto en los animales tratados con vehículo fue 22,9%  $\pm$  6,7% del área del corazón, mientras que el tamaño del infarto en los corazones tratados con células del cordón umbilical era 12,5%  $\pm$  2,5%, con células derivadas de la placenta (aislar 2) era 12,9%  $\pm$  3,4%, y con fibroblastos era 19,3%  $\pm$  8,0%. La diferencia de tamaño del infarto de los animales tratados con células en relación con animales tratados con vehículo no fue estadísticamente significativa basada en la prueba t de Student.

[0459] **Resumen.** Los resultados del presente estudio sugieren que las células derivadas del cordón umbilical tienen algún beneficio en la reducción de los daños de un infarto de miocardio inducido quirúrgicamente en ratas. Los animales tratados con vehículo mostraron una reducción significativa en la función cardíaca del día 0 al día 28, tal como se mide por la fracción de acortamiento, mientras que los animales tratados con células derivadas del cordón umbilical mostraron un cambio mínimo durante el estudio de 28 días. Los animales de fibroblastos tratados mostraron cambios mínimos, pero sólo dos animales sobrevivieron al estudio. Evaluación del tamaño del infarto sugirió que hay algún modesto, pero no estadísticamente significativa, reducción en el tamaño del infarto en los animales tratados con células derivadas del posparto en comparación con los controles de vehículo en el Día 28. En

conjunto, estos datos apoyan la eficacia soporte de las células derivadas del cordón umbilical de en la reducción del daño de un infarto de miocardio.

## EJEMPLO 25

5

### Uso de células derivadas del cordón umbilical en el tratamiento de la retinitis pigmentosa

10 [0460] En la actualidad no existe un tratamiento real para los trastornos que se derivan de la degeneración de las células en la retina cegadora. La pérdida de fotorreceptores, como resultado de la apoptosis o la degeneración secundaria conducen a un deterioro progresivo de la visión, y en última instancia a la ceguera. Enfermedades en las que esto ocurre incluyen degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y la retinitis pigmentosa (RP). RP es más comúnmente asociado con una sola mutación de genes, lo que contribuye a la muerte celular de fotorreceptores.

15 [0461] Los fotorreceptores de la retina y el epitelio pigmentario de la retina adyacente forman una unidad funcional. La rata del Royal College of Surgeons (RCS) presenta un defecto del receptor de tirosina quinasa (MerTK) que afecta a la fagocitosis segmento exterior, lo que lleva a la muerte celular de fotorreceptores (1). Se encontró que el trasplante de células de pigmento de retina epiteliales (RPE) en el espacio subretinal de ratas RCS limitaba el progreso de la pérdida de fotorreceptores y preservaba la función visual (2). En este ejemplo, se demuestra que las células derivadas del cordón umbilical se pueden utilizar para promover rescate fotorreceptor en un modelo RCS.

20

### Métodos y Materiales

25 [0462] **Trasplantes de células.** Los cultivos de umbilical humano adulto y células de fibroblastos (paso 10) se ampliaron para 1 paso. Todas las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. Para pasos posteriores, todas las células se trataron como sigue: Después de la tripsinización, las células viables se contaron después de tinción con azul de tripano. Brevemente, 50 microlitros de suspensión celular se combinaron con 50 microlitros de 0,04% p/v de azul de tripano (Sigma, St. Louis MO) y el número de células viables, se estimó utilizando un hemocitómetro. Las células se trataron con tripsina y se lavaron tres veces en sin suplemento de DMEM: medio de glucosa baja (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los cultivos de células del cordón umbilical y de fibroblastos humanos en el paso 11 se trataron con tripsina y se lavaron dos veces en medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen, Carlsbad, CA).

30 [0463] Para el procedimiento de trasplante, ratas RCS distróficas fueron anestesiadas con xilazina-ketamina (1 miligramos/kilogramo ip de la siguiente mezcla: 2,5 mililitros xilazina a 20 miligramos/mililitro, 5 mililitros ketamina a 100 miligramos/mililitro, y 0,5 mililitro de agua destilada) y sus cabezas aseguradas por una barra de nariz. Las células carentes de suero se resuspendieron (2 x 10<sup>5</sup> células por inyección) en 2 microlitros de Leibovitz, medio L-15 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transplantaron usando una pipeta de vidrio fino (diámetro interno 75-150 micras) trans-escleróticamente.

35 [0464] Las células se administraron en el espacio subretiniano dorso-temporal de anestesiados 3 semanas de edad distróficos pigmentada RCS ratas (N = 10/tipo celular total). Las células se inyectaron unilateralmente en el ojo derecho, mientras que el ojo izquierdo se inyectó con medio de vehículo solo (control Sham; medio L-15 de Leibovitz). La viabilidad de las células de trasplante residuales se mantuvo en más de un 95% como se evaluó mediante exclusión con azul de tripano al final de la sesión de trasplante. Después se llevaron a cabo inyecciones de células, los animales fueron inyectados con dexametasona (2 miligramos/kilogramo) durante 10 días post trasplante. Durante la duración del estudio, los animales se mantuvieron en ciclosporina oral A (210 miligramos/litro de agua potable; resultante sangre con- centración: 250-300 microgramos/litro) (laboratorios Bedford, Bedford, Ohio) a partir de 2 días pre-trasplante hasta el final de la estudiar. Alimentos y el agua estaban disponibles ad libitum. Los animales fueron sacrificados a los 60 o 90 días después de la operación, con algunos animales se euthanitized en puntos de tiempo anteriores para la evaluación histológica de los cambios a corto plazo asociados con el trasplante de células.

40 [0465] **Registros de ERG.** Después de adaptación a la oscuridad durante la noche, los animales se prepararon para la grabación de ERG bajo luz roja tenue, como se describe previamente (3). En resumen, bajo anestesia (con una mezcla de 150 miligramos/kilogramo ketamina ip, y 10 miligramos/kilogramo ip xilazina) la cabeza del animal se aseguró con un soporte de cabeza estereotáxico y la temperatura del cuerpo supervisa a través de un termómetro rectal y se mantuvo a 38°C usando una manta homeotérmica. Pupilas dilatadas usando partes iguales de tópica de fenilefrina 2,5% y 1% de tropicamida. La anestesia tópica con 0,75% vacaine bupi- se usó para prevenir cualquier reflejos corneales y se aplicó con frecuencia una gota de 0.9% de solución salina en la córnea para evitar su deshidratación y permitir el contacto eléctrico con el electrodo de registro (bucle de alambre de oro). Una aguja de calibre 25 insertada bajo el cuero cabelludo, entre los dos ojos, sirvió como electrodo de referencia. La amplificación (en 1-1.000 de paso de banda Hz, sin filtrado muesca), la presentación del estímulo, y la adquisición de datos fueron proporcionados por el sistema UTAS-3000 de LKC Technologies (Gaithersburg, MD). Los ERG se registraron a los 60 y 90 días de edad en los grupos de células del cordón umbilical y a los 60 días sólo en los grupos de fibroblastos.

60 [0466] **Registro mixto de onda a y b.** Para la cuantificación de las ondas b adaptadas a la oscuridad, los registro consistieron en presentaciones flash individuales (10 microsegundos de duración), repitieron 3 a 5 veces para verificar la fiabilidad de respuesta y mejorar la relación de señal a ruido, si es necesario. Los estímulos se presentaron en seis crecientes intensidades en pasos unitarios uno de registro que varían desde -3,6 hasta 1,4 log Candila/m<sup>2</sup> en luminancia. Para minimizar el blanqueo potencial de varillas, los intervalos inter-estímulo se

65



incrementaron como la luminancia del estímulo fue elevado desde 10 segundos a una intensidad de estímulo más bajo a 2 minutos a alta intensidad del estímulo. La amplitud máxima de la onda b se define como la obtenida de la serie de la intensidad del flash, independientemente de la intensidad del estímulo. El verdadero  $V_{max}$  del ajuste de los datos con una curva de Naka-Rushton no se utilizó porque las respuestas de ERG fueron a menudo errática en niveles de luminancia más altos en los animales distróficos y mostraron tendencias para las respuestas deprimidas alrededor de 0,4 y 1,4 log Candela/m<sup>2</sup>. Para determinar la edad en que se obtuvieron o se pierden componentes ERG, se utilizaron amplitudes criterio: 20 microvoltios para A y B ondas, y 10 microvoltios para las respuestas STR-como. La amplitud de la onda b se midió desde el pico negativo de la onda A hasta el vértice positivo de la onda b, y no hasta el pico de las oscilaciones, que puede superar el vértice de la onda b (4).

**[0467] Aislamiento de respuestas de conos y bastones.** Se utilizó el protocolo de doble flash para determinar el aislamiento de conos y bastones respuestas (5). Un destello sonda se presentó 1 segundo después de un acondicionamiento flash, usando una característica específica del sistema UTAS-3000 (LKC Technologies) con ganzfeld calibrada; asegurando la recarga completa de la estimulador en las condiciones utilizadas. El papel del flash acondicionado en el procedimiento era para saturar transitoriamente varillas para que se volvieron insensibles al flash de la sonda. Respuesta al flash sonda fue tomada como un reflejo de la actividad de cono accionado. A-onda b varilla de guiado se obtuvo restando la respuesta de los conos impulsada desde la respuesta mixta (obtenido después de la presentación de un flash sonda sola, es decir, no precedido por cualquier acondicionado flash).

**[0468] Evaluación funcional.** Las pruebas de sensibilidad de la retina Physiological se realizaron para demostrar respuesta de la retina a la luz tenue. Los animales se anestesiaron con una dosis de recuperación de uretano en injerto poste 1,25 gramos/kilogramo ip evaluación fisiológica en los animales se ensayó en animales a los 90 días mediante el registro de la actividad extracelular de unidades múltiples en el colículo superior a la iluminación de las respectivas campos receptivos visuales (6). Este procedimiento se repitió para 20 puntos independientes (espaciados 200 milímetros de distancia, con cada paso que corresponde a aproximadamente 10-150 desplazamientos en el campo visual), que cubre el campo visual. Umbrales visuales se midieron como el aumento de la intensidad sobre el fondo y se mantuvieron a 0,02 Candela/m<sup>2</sup> (unidad de luminiscencia) [al menos 2,6 unidades logarítmicas por debajo de la saturación de varilla (7)], se requiere para la activación de las unidades en las superficiales 200 micras del colículo superior con un punto de luz de diámetro 3°. Los parámetros de respuesta se compararon entre los ojos trasplantado y control simulado que recibieron vehículo solo.

**[0469] Histología.** Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de uretano (12,5 gramos/kilogramo). La orientación del ojo se mantuvo mediante la colocación de una sutura de 6,0 a través del músculo recto superior antes de la enucleación. Después de hacer una incisión en la córnea, los ojos se fijaron con paraformaldehído al 2,5%, 2,5% de glutaraldehído, ácido pícrico al 0,01% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Después de la fijación, la córnea y la lente se eliminaron mediante el corte alrededor del cuerpo ciliar. Un pequeño nick se hizo en la periferia de la retina dorsal antes de la eliminación del recto superior para ayudar a mantener la orientación. Las retinas fueron entonces después de la fijada en 1% de tetróxido de osmio durante 1 hora. Después de la deshidratación a través de una serie de alcoholes para epoxipropano, las retinas fueron incorporados en TAAB incrustación de resina (TAAB Laboratories, Alderminster, UK). Semi-secciones finas se tiñeron con 1% azul de toluidina en tampón de borato 1% y las secciones de ultra delgadas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

**[0470]** Para la tinción de Nissl, las secciones se tiñeron con 0,75% de violeta de cresilo (Sigma, St. Louis, MO) después de lo cual se deshidrataron a través de alcoholes graduados a los 70, 95 y 100% dos veces, colocado en xileno (Sigma, St. Louis, MO), se enjuagaron con PBS (pH 7,4) (Invitrogen, Carlsbad, CA), coverslipped y montado con DPX medio de montaje (Sigma, St. Louis, MO).

## **Resultados**

**[0471] Registros ERG.** Los animales que recibieron inyecciones de células derivadas del cordón umbilical exhibieron relativa preservación de las propiedades de respuesta visuales 60 y 90 días después de la operación (Tabla 25-1). La respuesta observada en estos animales era mayor que la observada con fibroblastos o animales tratados simulados.

**[0472]** Animales trasplantados con células derivadas del cordón umbilical (n = 6) demostraron buena mejora en todas las medidas de resultado ensayados a 60 días (Tabla 25-1), una onda (27 ± 11) frente a controles simulados (0), se mezcló b onda \* (117 ± 67) frente a controles simulados (18 6 13), -b-onda de cono (55 ± 25) frente a controles simulados (28 6 11), y en la contribución varilla (49 ± 16%) versus controles simulados (6 ± 7%). Además, a los 90 días, la mejora de las respuestas se midieron en dos animales ensayados, con medidas que incluyen: una onda (15 ± 7) versus controles simulados (0), de la onda b mixto (37 6 15) frente a controles simulados (0), cono b-onda (16 ± 11) frente a controles simulados (7 ± 5), y en la contribución varilla (58 ± 39%) versus controles simulados (0%). Estos resultados indican que la capacidad de respuesta visual mejoró en células animales trasplantados ombligo derivado con la evidencia para el rescate de los fotorreceptores. Aunque se observó una disminución en la capacidad de respuesta a ERG en los animales de 90 días ensayados, su preservación de la función visual en comparación con el SHAM-controles tratados era bueno.

**[0473]** En contraste con las células derivadas del cordón umbilical, trasplantes de fibroblastos no mostraron mejora en cualquiera de los parámetros ensayados.

Tabla 25-1: Datos ERG

Grupo	Onda A		Onda B mixta		Onda B cono		% contribución varilla	
	Sin tratar	Tratada	Sin tratar	Tratada	Sin tratar	Tratada	Sin tratar	Tratada
Sham 60d	0	0	7 ± 9	0	23 ± 5	12 ± 16	N/A	N/A
U (n=6) 60d	0	27 ± 11	18 ± 13	117±67	28 ± 11	55 ± 25	6±7	49 ± 16
U (n=6) 90d	0	15 ± 7	0	37 ± 15	7±5	16 ± 11	0	58 ± 39
NB simulado = control (medio solamente), U = trasplante de células de origen umbilical								

**[0474] Histología.** Después del trasplante, no hubo evidencia histológica de una reacción inflamatoria y células inmunes infiltrantes no se observaron en secciones teñidas con Nissl en los grupos de células del posparto. Sin embargo, implantaciones de fibroblastos resultó en la muerte de los animales (n = 7) y las indicaciones de las respuestas inflamatorias en etapa temprana. Histológicamente en el punto de tiempo de 90 días en la célula de animales trasplantados ombligo derivado de rescate anatómica de los fotorreceptores se demostró claramente. Los fotorreceptores forman una capa de espesor separadas por un hueco de la capa nuclear interna, compuesta de otras células de la retina. En comparación, la anchura de la capa exterior en el control simulado era, en el mejor, una sola capa discontinua en oposición a alrededor de 5 células de espesor en el ojo injertado. En comparación con un animal normal esto es ligeramente más de la mitad del espesor de las capas de células fotorreceptoras normalmente observada.

**[0475] Evaluación funcional.** La eficacia de los trasplantes en la prevención de la pérdida visual se controló mediante la evaluación de la capacidad de respuesta electrofisiológica en dos animales. La respuesta de sensibilidad de umbral a la luz se utiliza para definir el área de rescate campo visual en los ojos simulacro de control inyectado frente a los ojos trasplantados con células derivadas del cordón umbilical. En las ratas no distróficas, umbrales visuales nunca excedieron 0.5 log Candila/m<sup>2</sup> por encima del fondo. En ratas distróficas no operadas, los umbrales son generalmente en la magnitud de 4 log Candila/m<sup>2</sup> unidades (8). Por el contrario, En ratas distróficas no operadas de inyección simulada, los umbrales eran del orden de 2,9 -4,9 log Candila/m<sup>2</sup> unidades con un umbral medio de 4,0 log Candila/m<sup>2</sup> unidades, en algunos casos no grabación podría alcanzarse. Por lo tanto, las ratas de inyección simulada mostraron algún rescate funcional altamente localizado en la retina temporal. Sin embargo, las ratas de células trasplantadas derivadas del cordón umbilical humano exhiben sustancialmente mayores niveles de preservación visual con umbrales que van desde 0,8 hasta 2,1 de registro Candila/m<sup>2</sup> unidades, con un umbral medio de 1,3 log Candila/m<sup>2</sup> unidades.

**[0476] Resumen.** El trasplante de células derivadas del cordón umbilical en ratas RCS distróficas puede preservar fotorreceptores. En este modelo degenerativa, uno esperaría que la onda a desaparecer dentro de 30 a 60 días y la onda b desaparecer dentro de los 3 meses. Por lo tanto, el básicamente retuvo una onda indica que la función varilla real y normal se conserva. Contribución de varilla a b-onda sugiere que la función varilla anormal es todavía posible. La b-onda sin varilla sostenida es la medida de la función cono cuánto se mantiene, que es una medida real de la visión. Por lo tanto, el nivel de mejora evaluó tanto fisiológica y anatómicamente después de un trasplante de células derivadas del cordón umbilical está bien definido aquí. Mediciones ERG proporcionan una evaluación de la función visual después de la pérdida de fotorreceptores, lo que indica cambios en la actividad eléctrica de la retina. Sin embargo, ERG no proporciona información directa sobre la capacidad de formación de imágenes. La medición de sensibilidad umbral colicular utilizado en este estudio proporciona una indicación de conservación relativa de los campos visuales. La importancia de esta medida se basa en una correlación entre las cantidades de rescate funcional y preservación anatómica y que los datos recogidos se compara con las pruebas de perimetría de campo visual en los seres humanos (9). El trasplante ha demostrado un retraso del proceso de la enfermedad en los animales de prueba. Por lo tanto, los resultados presentados en este documento demuestran una clara evidencia de la eficacia funcional del injerto de células derivadas de cordón umbilical humano en el espacio subretiniano, y que preservación de los fotorreceptores se produce en la región general en la que se encuentran las células injertadas.

#### Referencias para el Ejemplo 25

#### **[0477]**

1. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat. Hum Mol Genet. 2000 Mar 1;9(4):645-51.
2. Li LX, Turner JE. Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. Exp Eye Res. 1988 Dec;47(6):911-7.
3. Sauve, Y, Lu, B and Lund RD. The relationship between full field electroretinogram and perimetry-like visual thresholds in RCS rats during photoreceptor degeneration and rescue by cell transplants. Vision Res. 2004

Jan;44(1):9-18.

4. Nusinowitz, S., Ridder, WH 3rd, and Heckonlively, HR. Rod multifocal electroretinograms in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 Nov;40(12):2848-58.

5. Nixon, PJ, Bui, PV, Armitage, JA, and Vingrys AJ. The contribution of cone responses to rat electroretinograms. Clin Experiment Ophthalmol. 2001 Jun;29(3):193-6.

6. Lund RD, Adamson P, Sauve Y, Keegan DJ, Girman SV, Wang S, Winton H, Kanuga N, Kwan AS, Beauchene L, Zerbib A, Hetherington L, Couraud PO, Coffey P, Greenwood J. Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 14;98(17):9942-7.

7. Siminoff R, Kruger L. Properties of reptilian cutaneous mechanoreceptors. Exp Neurol. 1968 Mar;20(3):403-14.

8. Balkema, G.W. and Drager, U.C. 1991. Visual Neuroscience. 6:577-585.

9. Beck RW, Bergstrom TJ, Lichten PR. A clinical comparison of visual field testing with a new automated perimeter, the Humphrey Field Analyzer, and the Goldmann perimeter. Ophthalmology. 1985 Jan;92(1):77-82

## EJEMPLO 26

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

[0478] El potencial condrogénico de células derivadas del cordón umbilical o tejido de placenta se evaluó después de la siembra en andamios de factor-cargado de crecimiento biorreabsorbible y la implantación en ratones SCID.

#### Materiales y Métodos

[0479] **Los reactivos.** Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomycin, se obtuvieron de Invitrogen, Carlsbad, CA. Suero de ternero fetal (FCS) se obtuvo de Hyclone (Logan, UT). Medio de crecimiento de Células madre mesenquimatosas (MSCGM) se obtuvo de BioWhittaker, Walkersville, MD. TGF-beta-3 se obtuvo de los productos de investigación Oncogene, San Diego, CA. rhGDF-5 se obtuvo de Biopharm, Heidelberg, Alemania (Internacional PCT publicación nº WO96/01316 A1, la patente de EE.UU. Nº 5,994,094A). Medio de crecimiento de condrocitos que comprende glucosa DMEM de alta suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS), 10 milimolar HEPES, 0,1 milimolar ácidos no esenciales aminoácidos, 20 microgramos/mililitro L-prolina, ácido ascórbico 50 microgramos/mililitro, penicilina 100 unidades/mililitro, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B. bovina fibrinógeno se obtuvo de Calbiochem.

[0480] **Células.** Células madre mesenquimatosas humanas (hMSC, Lot # 2F1656) se obtuvieron de BioWhittaker, Walkersville, MD y se cultivaron en MSCGM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este lote fue probado en el laboratorio previamente en *in vitro* experimentos y se muestra que es positivo en los ensayos de condrogénesis. Fibroblastos humanos adultos se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se cultivaron en Medio de Crecimiento en recubierto gelatin- tejido matraces de plástico de cultivo. Se prepararon células aisladas derivadas del posparto de cordones umbilicales humanos (Nº de Lote 022703Umb) y placenta (Nº de Lote 071003Plac) como se describe previamente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en medio de crecimiento en el tejido matraces de plástico de cultivo recubiertos con gelatina. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células usadas para los experimentos estaban en pasos 5 ("Low paso") y 14 ("High paso").

[0481] **Andamios.** Espumas compuestas de 35/65 de poli(epsilon-caprolactona) (PCL)/poli(ácido glicólico) (PGA) copolímero (35/65 PCL/PGA), reforzadas con Poldioxanona (PDS) de malla (PGA/PCL espuma-PDS malla) fueron formadas por el proceso de liofilización, como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.355.699. Las espumas eran de 4 cm x 5 cm, y 1 mm de espesor. Las espumas se esterilizaron mediante tratamiento con óxido de etileno (ETO). Punzones (3,5 milímetros) hechas de andamios se cargaron con cualquiera de rhGDF-5 (3,4 microgramos/andamio), TGFbeta-3 (10 nanogramos/andamio), una combinación de rhGDF-5 y TGFbeta-3, o medio de control, y se liofilizó.

[0482] **Siembra de células en andamios.** Placenta- y células derivadas del cordón umbilical se trataron con tripsina y se determinó el número de células y la viabilidad. 7,5 x 10<sup>5</sup> células se resuspendieron en 15 microlitros de Medio de Crecimiento y sembradas en golpes de andamio 3,5 milímetros en una placa de cultivo celular. El andamio sembrado de células se incubó en un incubador de cultivo celular (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) durante 2 horas tras lo cual se colocan dentro de los anillos de cartílago de explantes.

[0483] **Explantos de cartílago bovino.** Explantes de cartílago de 5 milímetros de diámetro se hicieron a partir del cartílago obtenido de hombro bovino joven. Punzones (3 milímetros) se escindieron del centro del explante y se reemplazan con células sembradas en 3,5 milímetros de andamio reabsorbible. Los andamios con células fueron retenidas dentro de los explantes utilizando pegamento de fibrina (60 microlitros de fibrinógeno bovino, 3 miligramos/mililitro). Las muestras se mantuvieron en medio de crecimiento de condrocitos durante la noche, se lavaron en tampón fosfato salino el día siguiente, y se implantaron en ratones SCID.

[0484] **Animales.** Ratones SCID (*Mus musculus*/Fox Chase SCID/Hombre), 5 semanas de edad, se obtuvieron de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, Indiana) y Charles River Laboratories (Portage, Michigan). Los animales utilizados en el estudio fueron seleccionados sin ningún sesgo sistemático aparente. Una etiqueta se coloca en cada jaula individuo animales con el número de adhesión, técnica de implantación, el número de animales, especies/deformación, fecha de la cirugía, *in vivo* período, y la fecha de la eutanasia. Los animales fueron identificados por números secuenciales marcados en la oreja con un marcador de tinta indeleble.

**[0485] Diseño Experimental.** Se analizaron un total de 42 ratones. Dos andamios se implantaron subcutáneamente en cada ratón como se describe a continuación; 42 ratones para la implantación subcutánea; 28 tratamientos con n-valor de 3 por tratamiento. El estudio corresponde al número de aprobación del IACUC: Skillman CICUAL 01-037. El estudio duró seis semanas.

5

**Implantación SCID.**

*A. Pesos corporales*

10 **[0486]** Cada animal se pesó antes de ser anestesiados y en la necropsia.

*B. La anestesia y la reparación quirúrgica:*

15 **[0487]** Toda la manipulación de los ratones SCID se produjo bajo una campana. Los ratones se pesaron individualmente y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de KETASET® (clorhidrato de ketamina [60 miligramos/kilogramo]), Rompun® (xilazina [10 miligramos/kilogramo]), y solución salina.

20 **[0488]** Después de la inducción de la anestesia, toda la parte posterior del animal desde el área cervical dorsal a la zona lumbosacra dorsal era cortante libre de pelo usando maquinilla para animales eléctricos. El área fue borrado con diacetato de clorhexidina, se aclaró con alcohol, se secó, y se pinta con una solución de yodóforo acuosa de 1% de yodo disponible. Pomada oftálmica se aplicó a los ojos para evitar el secado del tejido durante el período de anestésico. El animal anestesiado y preparado quirúrgicamente se colocó en la posición reclinada deseada.

*C. Técnica de implantación subcutánea:*

25 **[0489]** Una incisión de piel de aproximadamente 2 centímetros se hizo justo lateral a la columna torácica paralelo a la columna vertebral. La piel fue separada del tejido conectivo subyacente mediante disección roma. Cada ratón SCID recibieron 2 tratamientos que fueron colocados en bolsillos subcutáneos creados por disección roma en cada hemitórax a través de una incisión en la piel (Tabla 26-1) Tacking suturas de 5-0 ETHIBOND EXCEL (poliéster) (Ethicon Inc., Somerville, NJ) fueron utilizados para virar la piel para musculatura alrededor de cada andamio para evitar la migración subcutánea. Los andamios se implantaron durante 6 semanas y después se recogieron. El diseño experimental se resume en la Tabla 26-1.

30

**Tabla 26-1. Diseño Experimental: Tratamiento (N = 3 por tratamiento)**

35 **[0490]**

- A. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con placentaria derivada células, EP, TGFB3
- B. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5
- C. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con células derivadas de la placenta, EP, rhGDF-5 + TGFB3
- 40 D. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con placentaria derivada células, EP, control
- E. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con células derivadas de la placenta, LP, TGFB3
- F. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5
- G. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con células derivadas de la placenta, LP, rhGDF-5 + TGFB3
- 45 H. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con células derivadas de la placenta, LP, control
- I. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con células umbilicales derivados, EP, TGFB3
- J. 65/35 PGA/PCL espuma + PDS malla cultivadas con células umbilicales derivados, EP, rhGDF-5
- K. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con células umbilicales derivados, EP, rhGDF-5 + TGFB3.
- 50 L. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con células umbilicales derivados, EP, control de
- M. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con células umbilicales derivados, LP, TGFB3
- N. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con células umbilicales derivados, LP, rhGDF-5
- O. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con umbilical deriva células, LP, rhGDF-5 + TGFB3
- P. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con células umbilicales derivados, LP, control
- 55 Q. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con hMSC, TGFB3
- R. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con hMSC, rhGDF-5
- S. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con hMSC, rhGDF-5 + TGFB3
- T. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivaron con hMSC, el control de
- U. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con fibroblastos, TGFB3 adulto
- 60 V. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con fibroblastos, rhGDF-5 adulto
- W. 65/35 PGA/PCL Espuma + PDS malla cultivadas con fibroblastos, rhGDF-5 + TGFB3 adulto
- X. 65/35 PGA/PCL espuma + PDS malla cultivadas con fibroblastos, el control adulto
- Y. 65/35 de PGA/PCL malla Espuma + PDS, TGFB3
- Z. 65/35 PGA/PCL malla Espuma + PDS, rhGDF-5
- 65 AA. 65/35 PGA malla/PCL Espuma + PDS, rhGDF-5 + TGFB3
- BB. 65/35 PGA malla/PCL Espuma + PDS, control

*D. Preparación de necropsia y histológica*

5 **[0491]** El examen macroscópico se realizó en todos los animales que murieron durante el curso del estudio o fueron sacrificados en estado moribundo. Tejidos seleccionados se guardan en la discreción del director del estudio y/o patólogo.

10 **[0492]** Los ratones fueron sacrificados por CO<sub>2</sub> inhalación en sus intervalos designados. Se registraron observaciones bruto de los sitios implantados. Las muestras de los sitios de implantación subcutánea con su piel suprayacente se extirparon y se fijaron en formalina al 10% tamponada. Cada implante se dividía en dos mitades, y una media fue enviado a MPI Research (Mattawan, MI) para la inclusión en parafina, seccionado, y la tinción con hematoxilina y eosina (H & E) y safranina O (SO).

**Resultados**

15 **[0493]** La formación de nuevo cartílago y hueso se observó en la mayoría de las muestras, incluyendo andamios sembrado de células cargados de factor de crecimiento, andamios de control sembrados de células, y andamios cargadas con factor de crecimiento solo. El alcance de nueva formación de cartílago y hueso varió dentro de los grupos de tratamiento y de control.

20 **[0494]** Andamios sembrados de células derivadas de placenta de paso temprano y tardío mostraron nueva formación de cartílago y de hueso dentro de los andamios. No se observaron diferencias obvias en la nueva formación de cartílago y hueso entre los andamios sembrados de células factor de carga diferentes de crecimiento y andamios sembrados con células solas. En comparación con los andamios de control (sin factores de crecimiento y sin células), parecía que había una mayor extensión de la nueva formación de cartílago en andamios sembrados de células con y sin factores de crecimiento y en el crecimiento de los andamios de factor-cargado solo. Nueva formación de cartílago con andamios sembrados de células derivadas de placenta era similar al MSC y andamios sembrados de fibroblastos.

25 **[0495]** En andamios tratados con factor de crecimiento y de control sembrados con células derivadas del cordón umbilical en los pasos tempranos y tardíos, se observó nueva formación de cartílago y de hueso. La extensión de la formación de cartílago parecía ser menor que la observada con las células derivadas de la placenta. Ninguna muestra en concretos mostró extensa formación de cartílago como se ve con las células derivadas de la placenta. La formación ósea parece ser mayor en los andamios sembrados con células derivadas del cordón umbilical en los andamios que contenían tanto TGFbeta-3 como rhGDF-5.

30 **[0496]** Andamios cargados de hMSC también mostraron nueva formación de cartílago y de hueso. El alcance de la nueva formación de cartílago y de hueso fue similar para todos los grupos de tratamiento hMSC. Andamios sembradas adulto de fibroblastos humanos también demostraron nueva formación de cartílago y de hueso. Los resultados fueron similares a los obtenidos con células derivadas de la placenta y hMSCs

35 **[0497]** En el grupo control, en el que el crecimiento andamios o andamio factor de carga solo se colocaron en anillos de cartílago y se implantaron, también se observó nueva formación de cartílago y de hueso. No es sorprendente que la extensión de la nueva formación de cartílago fue mayor en los andamios con factor de crecimiento que en los andamios sin factor de crecimiento. Formación de hueso aumentada estaba presente en el control con la combinación de los dos factores de crecimiento ensayados.

40 **[0498]** Se observó adyacente formación de cartílago nuevo a los anillos de cartílago de explantes, así como dentro de los andamios. Nueva formación de cartílago dentro de los andamios adyacentes a los anillos de cartílago podría ser un resultado de la migración de condrocitos. La formación de cartílago visto como islas dentro de los armazones puede ser el resultado de cualquiera de la migración de condrocitos dentro de los andamios, la diferenciación de células o diferenciación de células progenitoras de ratón endógenos sembradas. Esta observación se deriva del hecho de que en el control del crecimiento andamios factor de carga con no hay células sembradas, islas de diferenciación condrogénica fueron observados. Se observó la formación de hueso nuevo dentro de los andamios de forma independiente y también asociados con condrocitos. La formación de hueso puede haber surgido de la diferenciación de osteoblastos así como la osificación endocondral.

45 **[0499]** Es difícil separar nueva formación de cartílago y de hueso asociada con condrocitos que migraron frente a la de cualquier diferenciación condrogénica y osteogénica de células sembradas que pueden haber ocurrido. La tinción de secciones con anticuerpos humanos específicos puede distinguir la contribución de las células sembradas a la condrogénesis observada y la osteogénesis. También es posible que las células células derivadas de la placenta y ombligo estimularon la migración de condrocitos.

50 **[0500]** Se observaron abundantes nuevos vasos sanguíneos con los andamios cargados con células células derivadas de la placenta y del cordón umbilical. Los vasos sanguíneos eran abundantes en las zonas de formación de hueso. Los nuevos vasos sanguíneos, también se observaron dentro de la hMSC- y andamios de fibroblastos cabeza de serie asociados con la formación de hueso nuevo.

55 **[0501]** Los efectos sistémicos del andamio adyacente (con factor de crecimiento (GF)) en los andamios de control (sin GF, sin células) en la promoción de nuevo cartílago y la formación ósea no se pueden descartar. Análisis de nueva formación de cartílago y de hueso en los andamios, tomando en consideración los andamios implantados adyacentes a la misma en ratones SCID, no mostró ningún patrón claro de efecto sistémico de factor de crecimiento desde el andamio adyacente.

60 **[0502] Resumen.** Los resultados mostraron que se observaron nueva formación de cartílago y hueso en los andamios de factor de crecimiento y de control sembrados con células derivadas de placenta y del ombligo. Los

resultados con células derivadas de la placenta fueron similares a la observada con células madre mesenquimatosas humanas, mientras que la medida de nueva formación de tejido de tipo cartílago era ligeramente menos pronunciada en las células derivadas del cordón umbilical. Andamios cargados de factor de crecimiento implantados sin células también demostraron nueva formación de cartílago y de hueso. Estos datos indican que la nueva formación de cartílago dentro de los andamios puede surgir a partir de condrocitos que migraron de los explantes de las especies bovinas, a partir de la diferenciación condrogénica de las células progenitoras endógenas, y de diferenciación condrogénica de las células sembradas.

[0503] Estos resultados sugieren que las células derivadas de la placenta y del ombligo se someten a diferenciación condrogénica y osteogénica. Estos resultados también sugieren que las células derivadas de la placenta y del ombligo pueden promover la migración de condrocitos a partir del explante de cartílago en los andamios. Abundantes nuevos vasos sanguíneos también se observaron en los andamios especialmente asociados con la formación de hueso nuevo.

## EJEMPLO 27

### Identificación y el desarrollo de los medios sin suero para el aislamiento y expansión de células derivadas del posparto

[0504] **Resumen:** En la actualidad, los métodos más comunes a crecer células humanas primarias para cultivo a largo plazo utilizaban suero bovino fetal (FBS). FBS estimula significativamente el crecimiento celular a causa de las proteínas que contiene, por lo que es un sustrato preferido o suplemento para *in vitro* el crecimiento celular. Hay, sin embargo, una serie de inconvenientes a la utilización de medios que contienen productos de origen animal en lugar de los medios químicamente definidos, o al menos libre de suero. Al igual que con todos los productos biológicos, las variaciones en la composición de proteína de suero de lote a lote y la creciente preocupación acerca de la transmisión de enfermedades tales como la encefalopatía espongiiforme bovina suscitan obstáculos significativas a la comercialización o la aprobación reguladora de los productos relacionados con las células que contienen o son producidos con componentes del suero.

[0505] Se investigó el desarrollo de formulaciones de medios de cultivo celular exentos de suero, pero que conserva la capacidad de apoyo de expansión de poblaciones de células expansión suficientes para aplicaciones comerciales. Se ensayaron un número de formulaciones de medios, utilizando a corto plazo o la proliferación celular a largo plazo de las células del cordón umbilical posparto derivados como índices de utilidad.

[0506] DMEM avanzada (Invitrogen) se ha utilizado como un medio basal para optimizar el crecimiento libre de suero de células de posparto- derivada. Aunque libre de suero, DMEM avanzada no carece de todas las proteínas animales. Componentes de proteína animal contenidos dentro DMEM Avanzada, tales como albúmina e insulina, pueden ser reemplazados por alternativas producidas de manera recombinante antes de su uso para la fabricación de células o productos biológicos terapéuticos comercializados. Células derivadas del posparto (PPDCs) obtenidas de aislamiento en DMEM avanzada se han caracterizado y se demostró que han reducido la expresión de PDGFR-alfa y HLA-ABC, con relación a la observada en medios que contienen suero.

[0507] **Introducción:** Terapias basadas en células han sido o están siendo desarrollados para el tratamiento de pacientes con enfermedades como de amplio que van como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, enfermedades oculares como la retinitis pigmentosa y degeneración macular, y diabetes. Se requieren cantidades almacenables de células, estimulando con ello los esfuerzos para aislar y expandir dichas células con rapidez y eficacia.

[0508] La mayoría de los medios para el cultivo de cultivos primarios de células humanas incorporan algunas de suero bovino o de ternera fetal. En general, las formulaciones de medios disponibles comercialmente requieren suplementos de suero de aproximadamente 10-20% (v/v) ya que este componente contribuye a la supervivencia y expansión de numerosas poblaciones de células. Una miríada de proteínas se encuentran en el suero de vacas incluyendo PDGF y FGF, conocidos factores de crecimiento que pueden tener influencias importantes en el crecimiento celular y la diferenciación de las poblaciones de madre y células progenitoras. Las desventajas de utilizar productos de suero extrajeros para la terapéutica humana se discute anteriormente.

[0509] Para superar las desventajas de suero bovino fetal, se evaluaron numerosas formulaciones de medios con y sin una variedad de factores de crecimiento recombinantes humanos conocidos para ayudar a la expansión de células. Tanto perfiles de expansión a corto plazo como a largo plazo de las células derivadas del posparto fueron examinados y los resultados se presentan en este documento. Aunque las formulaciones numerosos medios proporcionan beneficios significativos a corto plazo, varias formulaciones fueron útiles en la expansión de estas células a través de múltiples pasos.

### **Materiales y Métodos**

#### *Aislamiento PPDC*

[0510] PPDCs se aislaron como en los ejemplos anteriores.

#### *Recubrimiento de células PPC*

[0511] Las células derivadas del posparto (ombligo 022803 (P12)) previamente cultivadas en medio de crecimiento

se sembraron a 5.000 células por cm cuadrado y destetados de suero durante el transcurso de una semana por el reducir el contenido de suero del 15% al 2%. Las células se transfirieron a continuación a medio de crecimiento sin suero antes de la aprobación y enrevestimiento para el ensayo de MTS a corto plazo.

5 *Ensayo de MTS para evaluar expansión a corto plazo*

10 **[0512]** Con el fin de evaluar una amplia gama de condiciones de crecimiento, se utilizó un ensayo de MTS para cuantificar colorimétricamente contenido de ADN, una medida indirecta del número de células y la proliferación celular de este modo. Células derivadas del cordón umbilical (022,803 (P11)) se sembraron a una densidad de 1.000 células/pocillo (formato de placa de 96 pocillos; equivalente a 5.000 células/cm-cuadrado, en 100 microlitros de medio) en cuadruplicado para cada condición de prueba. Ambas composiciones de medios basales con aditivos y formulaciones de medios completos que no requieren la suplementación con aminoácidos se ensayaron. Consulte la Tabla 27-1 para obtener una lista de todas las condiciones (tenga en cuenta que todos los medios incluyen penicilina/estreptomicina en una cantidad eficaz, Invitrogen). Después de cuatro días, las muestras fueron tratados de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega MTS Assay Kit).

15 **[0513]** Brevemente, 20 microlitros de CellTiter Aqueous One Solution Reagent (Promega) se pipetearon en cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1-2 horas a 37 grados en un incubador humidificado (que contiene 5% de dióxido de carbono). Después de la incubación, se añadieron 25 microlitros de SDS al 10% a cada pocillo para detener la formación del producto de formazina soluble producido por reducción celular del MTS. A continuación, la absorbancia se registró usando un fotómetro de absorbancia colorimétrica (Spectramax190, Molecular Dispositivos) en ambos 490 y 700 nanómetros.

20 **[0514]** Se generaron curvas de concentración estándar y ecuaciones lineales se ajustaron a las curvas y se utilizaron para extrapolar el número de células sobre la base de los valores promediados de las muestras ejecutadas en cuadruplicado. Los gráficos se generan entonces para representar gráficamente los valores de muestra y sus respectivos errores estándar.

	MEDIO BASAL	SUPLEMENTO	FACTOR CRECIMIENTO	DE
30	Medio de Crecimiento (que contiene 15% de FBS)	ITS	BFGF (F)	
	F10	ITS + 1	PDGF (P)	
	DMEM/baja glucosa	ITS + 3	EGF (E)	
	DMEM/LG + MCDB201 (40%)	SITE	IGF-1 (I)	
35	DMEM avanzada (alta glucosa) + L-glutamina (4 mM)	SPITE	F + P	
	UltraCulture (Cambrex)	SPIT	F + E	
40			F + I	
			P + E	
			P + I	

45 \* cada medio basal fue emparejado con cada posibles suplementos y factor de crecimiento  
 Abreviaturas: ITS = bovina insulina páncreas derivados, transferrina humana, y selenito de sodio;  
 ITS + 1 = ITS componentes, además de albúmina de suero bovino y ácido linoleico;  
 ITS + 3 = ITS + 1 componentes más ácido oleico;  
 SITIO = sus componentes, además de etanolamina;  
 SPITE = componentes de sitio, además de piruvato;  
 50 SPIT = sus componentes, además de piruvato.

*Análisis expansión a largo plazo*

55 **[0515]** De los aproximadamente 150 diferentes condiciones de crecimiento ensayados en el ensayo MTS, las 9 mejores condiciones de crecimiento más el control (medio de crecimiento) se ensayaron para determinar su capacidad de apoyar la expansión de poblaciones de células a través de múltiples pasos. Para este análisis, las células derivadas del cordón umbilical (022,803 (P10)) se descongelaron de criopreservación (células se hicieron crecer previamente en medio de crecimiento) y se sembraron directamente en las condiciones experimentales (véase la Tabla 27-2). Los medios utilizados en todas las condiciones contenían penicilina/estreptomicina como en la formulación Medio de Crecimiento (ver arriba Ejemplos). Las células se pasaron cada 3-4 días y se pasaron/tripsinizaron equivalente en un medio de base utilizada para esa condición de crecimiento (por ejemplo DMEM avanzada más bFGF). Las curvas de crecimiento fueron generados para las condiciones que apoyaban el crecimiento de PPC derivadas del cordón umbilical durante más de 10 pasos. Condiciones que no favorecen el crecimiento no se consideraron para su posterior análisis en este momento.

65

Tabla 27-2

	Medio de composición	Suplemento	Factor de crecimiento
5	Medio de crecimiento	15% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT) ITS + 3	Ninguno
	DMEM/LG (Gibco) + MCDB 201 (40%)	ITS + 3	F
10	DMEM/LG (Gibco) + MCDB 201 (40%)	ITS + 3	P
	DMEM/LG (Gibco) + MCDB 201 (40%)	ITS + 3	E
15	DMEM/LG (Gibco) + MCDB 201 (40%)	SITE	F
	DMEM/LG (Gibco) + MCDB 201 (40%)	SITE	P
	DMEM/LG (Gibco) + MCDB 201 (40%)	SITE	E
20	DMEM avanzada (glucosa alta) (Gibco) + L-glutamina (4 mM)	Ninguno	F
	DMEM avanzada (glucosa alta) (Gibco) + L-glutamina (4 mM)	Ninguno	P
25	DMEM avanzada (glucosa alta) (Gibco) + L-glutamina (4 mM)	Ninguno	E
	Abreviaturas: consulte la tabla 1.		

*Citometría de flujo*

30 **[0516]** Se llevó a cabo un análisis de flujo citométrico de los marcadores utilizados en la caracterización de las PPC-umbilicales derivados (véanse los Ejemplos anteriores) para establecer si el crecimiento in DMEM avanzada + L-glutamina + bFGF (10 ng/ml) alterada la expresión de marcadores de superficie en comparación a las células equivalentes cultivadas en Medio de Crecimiento (que contenía suero bovino fetal al 15%). Los resultados de las muestras teñidas se compararon con controles sin anticuerpo primario para establecer diferencias entre la tinción positiva y los niveles de fluorescencia de fondo. Para estos experimentos, las células-umbilicales derivados de varios donantes 090304A (P4 y P10), se utilizaron 091504A (P4), 063004B (P4), y 042.303 (P33).

*Análisis de criopreservación*

40 **[0517]** Las células derivadas del cordón umbilical de (042803 P21) y células derivadas de la placenta (071503 P10) cultivadas en Medio de Crecimiento ya sea o in DMEM avanzada y 10 ng/ml de bFGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ)], en un matraz T225 recubierto de gelatina se lavaron con tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen) y se tripsinizaron usando 1 ml de tripsina/EDTA (Invitrogen). La reacción de tripsinización se diluyó mediante la adición de 20 ml de DMEM avanzada. Las células se centrifugaron a 150 x g y el sobrenadante se retiró por aspiración. Las células se lavaron en DMEM avanzada. Las alícuotas de células, 60 µl, se retiraron y cada uno se añadió a 60 µl h azul de tripano (Sigma). El número de células viables se estimó usando un hemocitómetro. Las células se centrifugaron a 150 xg, el sobrenadante se retiró y el sedimento celular se resuspendió en la formulación de congelación: DMEM Avanzada, estreptomycin glutamina penicilina (Invitrogen) (4 mM), 10% de DMSO (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 2% (p/v) de albúmina de suero bovino (fracción V, Sigma, St. Louis, MO) y 10 ng/ml de bFGF (PeproTech) a 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml. Alícuotas de 1 ml se distribuyeron en crioviales (Nalgene). Las células se congelaron dentro de los 15 minutos de exposición al medio de congelación en un congelador del tipo de control (Cryomed Congelador 7452, ThermoForma, Marietta, OH) usando el siguiente protocolo:

55 Paso 1 Espere al 4,0°C  
 Paso 2 1,0°C/min a -4,0°C  
 Paso 3 25,0°C/min a -40°C  
 Paso 4 10,0°C/min a -12,0°C  
 Paso 5 1,0°C/min a -40°C  
 Paso 6 10,0°C/min a -90°C  
 60 Paso 7 FIN

65 **[0518]** Los viales de células se transfirieron a una unidad de almacenamiento vapor de nitrógeno (Cryomed 7400, ThermoForma, Marietta, OH) durante 2 días antes de descongelarse rápidamente en un baño de agua a 37°C con agitación suave hasta que no se pudieron detectar cristales de hielo visibles. Las células se añadieron a 10 ml de Medio de Crecimiento y se centrifugaron antes de estimarse el número de células y viabilidad como anteriormente. Las células se sembraron en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup> para determinar si las células



eran capaces de unirse y proliferar.

[0519] Las células también se ensayaron para determinar la senescencia usando las células senescencia tinción histoquímica Kit (Sigma, St Louis, MO) según la especificación del fabricante. Brevemente, las células se sembraron en placas de 6 pocillos recubiertas con gelatina al  $1,5 \times 10^5$  células por pocillo en medio de crecimiento. Después de tres días, las células se lavaron una vez con PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubaron en la solución de fijación durante 6-7 minutos a temperatura ambiente (RT). Las células se aclararon después 3 veces con PBS y se añadieron 1,5 ml de solución de tinción a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37°C en un agitador con agitación suave hasta que las células teñidas de color azul. Se determinó el porcentaje de células azules (senescentes).

[0520] ensayo Una MTS se realizó como se ha descrito anteriormente. Del mismo modo, las células se sembraron en 8 réplicas en placas de 96 pocillos a una concentración inicial de 1.000 células por pocillo en el medio de crecimiento (que no fueron re-sembraron en DMEM Avanzada).

## Resultados

### *Expansión a corto plazo de PPC umbilicales*

[0521] Más de 150 formulaciones de medios diferentes se compararon mediante el ensayo de MTS para examinar la proliferación de células a corto plazo (1, 3, y 4 días) de PPC derivadas de cordón umbilical de paso 11. Las células se sembraron en placas a 1.000 células por pocillo.

[0522] Con respecto a los medios basal (sin aditivos), DMEM/MCDB, medio F10, DMEM avanzada (que contienen L-glutamina) y Medio de Crecimiento soportados crecimiento PPC derivadas del cordón umbilical durante cuatro días en cultivo. Hubo una reducción en el número de células en general desde el día 3 a día 4 en medio UltraCulture, y las células parecieron poco saludables.

[0523] El análisis de los suplementos ensayados indicó que ITS + 3 fue superior en la expansión de las PPC derivadas del cordón umbilical de más de 4 días, en relación con el medio basal solo.

[0524] Análisis de los factores de crecimiento añadidos a los medios basal indica que el bFGF, EGF, PDGF y eran todos individualmente útil en la expansión umbilical PPC, con bFGF ser el factor de crecimiento que estimula el más expansión basado en el número de células a los 4 días. Este efecto superó los resultados observados con el medio de crecimiento. Curiosamente, la adición de varios factores de crecimiento no estimuló la mayor expansión en las condiciones ensayadas. La conversión de los datos a duplicaciones de la población entre los días 1 y 4, PDGF, EGF e IGF superaron bFGF. Este resultado puede explicarse por la unión celular mejorada y crecimiento entre tiempo cero y día 1 para las células en bFGF.

### *Análisis de expansión a largo plazo*

[0525] Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos de expansión a corto plazo destinados a reducir la búsqueda de una alternativa libre de suero, se seleccionaron 10 combinaciones de medios y las PPC derivadas del cordón umbilical se ampliaron de paso 10 (pre viamente cultivado en medio de crecimiento) a una densidad de siembra de 5.000 células por centímetro cuadrado. Aparte de la condición de control (medio de crecimiento), las únicas combinaciones medianas que apoyaron la expansión de las PPC derivadas del cordón umbilical más allá de 10 pasos fue DMEM Avanzada suplementado con L-glutamina (4 mM) y bFGF (10 ng/ml). DMEM Avanzada continuó para apoyar la expansión de las PPC derivadas del cordón umbilical, aunque a un ritmo menor que el Medio de Crecimiento, durante al menos aproximadamente 23 pasos, con estas células finalmente senescentes en el paso 33.

### *Resultados de citometría de flujo*

[0526] Tanto las células del cordón umbilical de paso temprano como de paso tardío cultivadas en DMEM avanzada suplementada (que contiene L-glutamina y bFGF, 10 ng/ml) se tiñeron para una variedad de marcadores de superficie celular utilizados previamente para caracterizar PPDCs cultivadas en Medio de Crecimiento. PPC derivadas del cordón umbilical cultivadas en Medio de Crecimiento se utilizaron para la comparación para evaluar las diferencias atribuibles a la composición del medio. Mientras que la expresión de la mayoría de los marcadores fue similar, dos marcadores diferían en su expresión entre composiciones de medios. Tanto HLA-ABC y PDGFr-alfa se expresaron en medio de crecimiento, pero tampoco se expresó en DMEM Avanzada. (Tablas 27-3 y 4). Esto se observó tanto con temprano (P4) y el paso tarde (P33) células derivadas del cordón umbilical.

Tabla 27 - 3

Paso ID de muestra de tejido medio	Medio de crecimiento umbilical 090304A 4		
	Presente/ausente	Media	Media Geo
CD10-PE	+	147.44	91.89
CD13-PE	+	479.09	375.84
CD31-PE	-	1.66	1.46
CD34-FITC	-	1.65	1.50
CD44-FITC	+	285.41	253.22
CD45-PE	-	1.70	1.50
CD73-PE	+	296	250.27
CD90-FITC	na	na	Na
CD117-PE	-	1.84	1.58
CD141-PE	-	2.64	2.12
SSEA-4-PE	+/-	32.44	11.84
PD-L2-FITC	+/-	10.44	8.30
PDGFRalpha-PE	+/-	10.81	8.76
HLA-ABC-PE	+	152.15	124.92
HLA-DRDPDQ-FITC	-	1.86	1.63
<b>Controles</b>		<b>Media</b>	<b>Media Geo</b>
IgG-PE		2.40	2.03
IgG-FITC		1.86	1.66

\* na = no disponible

Tabla 27 - 4

Paso ID de muestra de tejido medio	AdvDMEM + bFGF umbilical 91504 4		
	Presente/ausente	Media	Media Geo
CD10-PE	+	27.50	24.49
CD13-PE	+	20.98	16.87
CD31-PE	-	3.23	2.73
CD34-FITC	-	2.77	2.43
CD44-FITC	+	10.37	8.11
CD45-PE	-	3.12	2.67
CD73-PE	+	11.66	9.46
CD90-FITC	+	160.33	136.83
CD117-PE	-	3.22	2.69
CD141-PE	-	3.29	2.79
SSEA-4-PE	-	3.39	2.93
PD-L2-FITC	Na	na	Na
PDGFRalpha-PE	-	2.91	2.50
HLA-ABC-PE	-	5.00	4.62
HLA-DRDPDQ-FITC	-	2.66	2.34
<b>Controles</b>		<b>Media</b>	<b>Media Geo</b>
IgG-PE		3.19	2.73

(continúa)

Controles	Media	Media Geo
IgG-FITC	2.8	2.46
* na = no disponible		

**Resultados de criopreservación**

[0527] La viabilidad inicial de las células como se evaluó mediante tinción con azul de tripano antes de la criopreservación estaba cerca de 100%. La viabilidad de las células poste células descongelación y% senescente se resume en la Tabla 27-5.

Tabla 27-5

Tipo de célula	Medio antes de la congelación	Índice de recuperación	de Senectud
Derivada de placenta	Medio de crecimiento	94%	~ 3%
	Adv DMEM + bFGF	98%	<1%
derivada de cordón umbilical	Medio de crecimiento	77%	~ 7%
	Adv DMEM + bFGF	86%	~ 7%

[0528] Hubo una ligera reducción en la viabilidad celular en tanto derivada de placenta y células de cordón umbilical derivado de cultivar en el medio de crecimiento antes de la criopreservación. Las células viables criopreservadas en el medio basado en DMEM avanzada dividen y producen una monocapa confluyente el plazo de 3 días. No hubo diferencias discernibles en las tasas de crecimiento (como se determina a partir de las mediciones de MTS). El ensayo de la senescencia reveló <1% y población de células senescentes 3% de células derivadas de la placenta cultivadas en DMEM avanzada y Medio de Crecimiento respectivamente. Para células de cordón umbilical derivados de los porcentajes de células senescentes fueron ligeramente superiores, aproximadamente el 7%.

**Discusiones y conclusiones**

[0529] Los datos indican que, además del Medio de Crecimiento actualmente utilizado (que contenía suero bovino fetal al 15%) hay formulaciones de medios que soportan el crecimiento de las células derivadas del posparto. De las estudiadas, la formulación del medio mejor definido era DMEM Avanzada (Invitrogen) que contenía alta glucosa suplementado con 10 ng/ml de bFGF. Este medio podría apoyar tanto a corto como a largo plazo de expansión de paso 10 PPDCs umbilical derivado previamente cultivadas en Medio de Crecimiento. Aunque las células crecieron y las poblaciones expandidas así, el crecimiento no fue tan sustancial que el obtenido en Medio de Crecimiento con la administración de suplementos de suero.

[0530] Otro hallazgo inesperado fue que las células cultivadas DMEM Avanzada carecían de expresión de HLA-ABC, mientras que las células equivalentes cultivadas en Medio de Crecimiento hicieron expresar este marcador. Si esto tiene implicaciones para influir (por ejemplo, reducir) el rechazo del injerto está claro y requerirá estudios en animales con células cultivadas en medio libre de suero. El cambio en los marcadores HLA-ABC y PDGFr puede influir en la eficacia preclínica. Preliminarmente, sin embargo, sería beneficioso para examinar los cambios en la expresión génica como resultado del crecimiento de células en estas dos formulaciones de medios.

[0531] Finalmente, un análisis de la capacidad de tales células para ser criopreservadas sugiere que los medios DMEM Avanzada pueden ser de beneficio en la reducción del número de células no viables (en comparación con medio de crecimiento). Para ambas derivadas del cordón umbilical y fotocopadoras derivadas de placenta, tasa de recuperación se incrementó, aunque modestamente. La tasa de recuperación aparentemente más baja para las células del cordón derivado bilical um- frente a células derivadas de la placenta podría ser debido a paso superior (21) de las células que también se reflejó en los resultados del ensayo senescencia. Así, las células derivadas del cordón umbilical cultivadas en Medio de Crecimiento se pueden criopreservar in DMEM avanzada con ciertas ventajas.

**EJEMPLO 28**

**Identificación y desarrollo adicionales de los medios libre de suero para el aislamiento y expansión de células derivadas del posparto**

[0532] **Resumen:** El ejemplo anterior describió DMEM avanzada (Invitrogen) como un medio basal útil para optimizar para el crecimiento libre de suero de las células derivadas del posparto. Células derivadas del cordón

umbilical cultivadas a partir de aislamiento en DMEM avanzada se caracterizaron y se demostró que han reducido la expresión de PDGFr-alfa y HLA-ABC. Células derivadas del posparto cultivadas en tanto DMEM Avanzada y medio de crecimiento se caracterizaron adicionalmente usando citometría de flujo para determinar el efecto del medio de crecimiento en la célula surfac expresión e marcador. Perfiles de expresión génica fueron comparados con los de otras células incluyendo dérmica y fibroblastos de prepucio, y las Células madre mesenquimatosas (MSCs). Medios de conmutación puede alterar tanto la expresión de HLA-ABC y PDGFr como se determina por citometría de flujo. Los patrones de expresión para particulares "firma genes" (descritos en los Ejemplos en este documento) fue similar en ambos medios. Esto confirma que las células de la médula posparto derivado umbilical son células únicas de aislamiento que se pueden propagar en un medio definido sin ningún cambio aparente en la expresión de estos genes "de firma". La alteración de la expresión de marcadores de superficie celular de HLA-ABC puede afectar injerto o implantación incorporación o rechazo.

**[0533] Introducción:** expresión alpha HLA-ABC y PDGFr ha demostrado ser alterado cuando las células fueron cultivadas posparto en dos medios diferentes (Medio de Crecimiento frente DMEM Avanzada suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)). Este hallazgo fue interesante y provocó más investigaciones sobre si este fenómeno era debido, por ejemplo, para la promoción de una subpoblación diferente de células derivadas del posparto, o si una población específica de células del posparto tenía la capacidad de modular la expresión de estos superficie celular marcadores en diferentes medios de cultivo.

**[0534]** Para investigar esta cuestión, se realizaron dos series de experimentos. En el primero, se cultivaron células derivadas del posparto y del cordón umbilical en Medio de Crecimiento, DMEM avanzada más bFGF, o cambiar entre los dos, y luego se analizaron para HLA-ABC y expresión PDGFr por citometría de flujo. La ARN se aisló a partir de cultivos de estas células cultivadas en condiciones idénticas, y la PCR se realizó para determinar los patrones de expresión de genes que se encuentran previamente que se expresa exclusivamente (en comparación con otras poblaciones de células). Se analizaron las diferencias entre las condiciones de los medios, al igual que las diferencias entre los otros tipos de células control.

**[0535]** Los resultados de estos experimentos indican que mientras que las células derivadas del posparto cultivadas tanto en Medio de Crecimiento y el Advanced medio DMEM expresan patrones similares de genes, su expresión de marcadores de superficie celular puede ser alterada entre los dos medios. Esto es importante por muchas razones incluyendo distinguir varias células de posparto-derivados de uno al otro, así de otras células de tipo vástago de de adultos, origen fetal o neonatal. El método descrito en este documento para reducir la expresión de HLA-ABC también abre oportunidades significativas para producir células con propiedades mejoradas para injertos o la implantación. Tal método podría reducir la posibilidad de rechazo del injerto en ausencia de un inmunosupresor como la ciclosporina A.

## **Materiales y Métodos**

### *Aislamiento PPC*

**[0536]** Se aislaron células como se describe en el presente documento a lo largo de los ejemplos anteriores.

### *Recubrimiento de células PPC*

**[0537]** Las células derivadas del posparto (ombligo 063004B) obtenidas in DMEM avanzada suplementado con bFGF (según lo estipulado en el Ejemplo 27) a partir de aislamiento se sometieron a pasos en cualquiera P3 o P4, y en ese punto cambiaron a medio de crecimiento. Las células se sembraron a 5.000 células por cm cuadrado en matraces estándar de cultivo de tejidos recubiertos con gelatina. La citometría de flujo se realizó en células P3 para PDGFr alfa, HLA-ABC, y HLA-DRDPDQ, y los controles respectivos que carecen de anticuerpo primario (IgG-PE, y IgG-FITC). P4 a pasos/media cambiaron células se hicieron crecer hasta el paso 8 por pasos cada 3 o 4 días, en el que la citometría de flujo del tiempo se realizó para los marcadores de superficie celular.

**[0538]** También se realizó el experimento recíproco en el que se cambiaron las células cultivadas en Medio de Crecimiento a A-D- DMEM avanzadas suplementado con bFGF (10 ng/ml). (063004B) las células del posparto Umbilicus derivados se cultivaron en Medio de Crecimiento de aislamiento hasta el paso 12. En el paso 13, las células se cambiaron a DMEM + avanzada bFGF y se hicieron crecer hasta el paso 14, en el que la citometría de flujo del tiempo se realizó. Del mismo modo, se cultivaron derivadas del cordón umbilical (090304A) las células del posparto en Medio de Crecimiento de aislamiento hasta el paso 8, y después se cambiaron en el paso 9 a DMEM Avanzada + bFGF. Los cultivos se mantuvieron hasta llevarse a cabo el paso 10 en el que la citometría de flujo del tiempo Finalmente, umbilicus- derivados (042303) las células del posparto se cultivaron en Medio de Crecimiento de aislamiento hasta el paso 10, momento en el que se crioconservaron en medio de crecimiento suplementado con 10% de DMSO (Sigma, St. Louis, MO) y se colocaron en un nitrógeno líquido recipiente (protocolo como se describe en el Ejemplo 27). Las células fueron luego descongelados y directamente en placas a 5.000 células por cm cuadrado en el matraces recubiertos de gelatina en DMEM Avanzada suplementado con bFGF (10 ng/ml). Los cultivos se man- CONTENIDAS hasta el paso 33, en el que la citometría de flujo del tiempo se realizó para los marcadores de superficie celular de interés.

### *Citometría de flujo*

**[0539]** Se llevó a cabo análisis de flujo citométrico de los marcadores de interés para determinar si el crecimiento in

DMEM avanzada + bFGF (10 ng/ml) alterada la expresión de marcadores de superficie en comparación con células equivalentes cultivadas en Medio de Crecimiento (con su suero bovino fetal al 15%). Los resultados de las muestras teñidas se compararon con los controles de IgG adecuadas para establecer diferencias entre la tinción positiva y los niveles de fondo de fluorescencia.

5

*Condiciones de crecimiento de célula de control*

**[0540]** Fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatal y adulto) fueron cultivados en Medio de Crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células madre mesenquimáticas (MSC, Cambrex, Walkersville, MD) se cultivaron en mesenquimatosas kit Medium bala (MSCGM; Cambrex) Tallo crecimiento celular.

10

*Aislamiento ARN Total*

**[0541]** Se extrajo ARN de células de cordón umbilical derivado confluentes cultivadas en diferentes condiciones. ARN también se extrajo a partir de fibroblastos y MSC. Las células se lisaron con 350 µl de tampón RLT que contiene beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) y La ARN se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) con un tratamiento 2,7 U/muestra de ADNasa (Sigma St. Louis, MO). La ARN se eluye con 50 µl de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C.

15

20

*Transcripción inversa*

**[0542]** La ARN se invierte transcrito usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción TaqMan inversa (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un ciclo de temperatura/tiempo de 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos, y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C. Los genes, denominados "genes de firma" (receptor de LDL oxidada, la interleucina-8, renina y reticulon), se investigaron adicionalmente usando en tiempo real y PCR convencional.

25

30

*PCR en tiempo real*

**[0543]** Se realizó la PCR en muestras de ADNc utilizando productos de expresión de genes ASSAYS-ON-DEMAND™: receptor de LDL oxidada (Hs00234028), la renina (Hs00166915), reticulon (Hs00382515), IL-8 (Hs00174103) y GAPDH (Applied Bio-Systems, Foster City, CA) se mezclaron con ADNc y PCR universal TaqMan mezcla maestra de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con ABI Prism 7000 software SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 min y 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min.

35

40

*PCR convencional*

**[0544]** 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 µl de solución de ADNc, 1 3 tampón de reacción AmpliTaq Gold universal de mezcla de PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) y desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. La amplificación se optimiza para cada conjunto de cebadores. Para IL-8, y reticulon (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 30 ciclos), para la renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos para 38 ciclos) para 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 28-1. Concentración de cebador en la reacción de PCR final fue de 1 µM a excepción de GAPDH que fue de 0,5 M cebadores M. 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) usando una cámara Polaroid™ de distancia focal (VWR International, South Plainfield, Nueva Jersey).

50

55

60

65

Tabla 28-1

Cebadores usados

Nombre de cebador	Cebadores
Receptor LDL oxidada	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO: 1) A: 5'AGAATGGAAAACCTGGAATAGG-3' (SEQ ID NO: 2)
Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (SEQ ID NO: 3) A: 5'GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 4)
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'CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC-3' (SEQ ID NO: 8)

## Resultados

*Las diferencias en la superficie celular de expresión de marcador entre las poblaciones celulares cultivadas en DMEM avanzada y Medio de Crecimiento de Aislamiento*

[0545] En el Ejemplo 27, se ensayaron células derivadas del posparto y del cordón umbilical cultivadas en Medio de Crecimiento y DMEM Avanzada + bFGF de aislamiento utilizando citometría de flujo para una batería completa de los anticuerpos a la célula marcadores de superficie. Mientras que la expresión de la mayoría de los marcadores fue similar, dos marcadores difieren sustancialmente en su expresión entre las formulaciones de medios. Tanto HLA-ABC y PDGFr-alfa se expresaron en medio de crecimiento, mientras que ni se expresó en DMEM Avanzada (Tablas 27-3 y 27-4 en el Ejemplo 27).

*Impacto de conmutación de medios en la expresión de marcadores de superficie celular*

[0546] Para determinar si las composiciones de medios eran responsables de la alteración de la expresión de marcadores de superficie celular, cultivos de posparto derivados del cordón umbilical se cultivaron primero en una de las dos composiciones de medios antes mencionados y después cambiaron a la otra. Cuando las células se cultivaron inicialmente en DMEM avanzada + bFGF y luego cambiaron a medio de crecimiento, los cultivos celulares se volvió inmediatamente en la expresión de HLA-ABC de un modo gradual con el aumento de paso. Receptor alfa PDGF, sin embargo, no pareció encenderse, incluso con el paso prolongado.

[0547] Cuando las células se cultivaron primero en medio de crecimiento y luego más tarde cambiaron a DMEM Avanzada + bFGF, la expresión de HLA-ABC se mantuvo en el corto plazo (063004B + P14, 090304A + P10), pero después de varios pasos, HLA-ABC expresión se perdió (042.303 + P33). En comparación con las células cultivadas exclusivamente en Medio de Crecimiento de aislamiento, PDGF expresión del receptor alfa se perdió ya en el segundo paso de DMEM Avanzada + bFGF.

[0548] Además de HLA-ABC y PDGFr alfa, cada uno de estos aislados (excepto 042303 + P33) se ensayó para la expresión de HLA-DRDPDQ. Todos los aislados fueron negativos independientemente del medio que se mantuvieron en.

*Resultados de PCR*

[0549] Los resultados de PCR en tiempo real para genes seleccionados "de firma" realizados en ADNc a partir de células derivadas de células humanas derivadas del cordón umbilical cultivadas en dos diferentes medios, los fibroblastos adultos, y MSCs indican que los niveles de reticulon y oxidado ARN del receptor LDL fueron mayores en las células derivadas del cordón umbilical en comparación con otros tipos de células. Los resultados también confirmaron que el patrón de expresión de genes de firma no cambió con medio independientemente de si las células se cultivaron in DMEM avanzada + 10 ng/ml bFGF, o en Medio de Crecimiento de aislamiento, o se les cambió posteriormente de un medio a otro. Los resultados de PCR en tiempo real fueron confirmadas por PCR convencional. Es de destacar, es que las bandas, mientras que existen, fueron menos intensos para el receptor de la LDL-ox (P14 063004B, 090304A P10). Desde PCR convencional no es cuantitativo, sin embargo, las posibles diferencias en el nivel de expresión no podían discernirse aquí. Células derivadas del cordón umbilical no expresaron renina, un marcador presente en las células derivadas de placenta.

[0550] La expresión de la citoquina, IL-8, en las células derivadas del posparto fue elevado en ambos + células Medio de Crecimiento-cultivadas y DMEM Avanzada 10 ng/ml de bFGF-cultivadas del cordón umbilical derivados. Esta observación fue confirmada por PCR convencional.

## Discusiones y conclusiones

[0551] La conmutación células entre Medio de Crecimiento y DMEM Avanzada suplementada con bFGF (10 ng/ml) afecta la expresión del marcador de superficie celular de HLA-ABC, y PDGF-R alfa en PPDCs. Bajo las condiciones examinadas, HLA-DRDPDQ no se detectó. Expresión alpha HLA-ABC y PDGFr puede ser modulada sobre la base

de los cambios en el medio de crecimiento de las células. Esta observación podría tener implicaciones significativas para los rechazos de injertos o la implantación de células terapéuticas. El marcador de HLA-DRDPDQ nunca fue expresado independientemente de la composición de los medios.

[0552] La expresión de genes de firma, tales como el receptor de LDL oxidada y reticulon se mantuvieron sin cambios a pesar de la composición del medio usado para cultivar estas células de posparto derivadas del cordón umbilical. Debido a que los niveles de estos genes eran detectablemente mayores que en otros tipos de células tales como las MSC, estos genes, de hecho, constituyen una firma útil para determinar y distinguir las células de posparto derivadas del cordón umbilical. Ya sea subpoblaciones separadas pueden existir con en la población umbilicus- derivado sigue siendo una pregunta, pero la consistencia del perfil de la expresión génica firma es poderosa evidencia de que cualquiera de tales subpoblaciones están estrechamente relacionados entre sí y más lejanamente relacionado en todo caso a otros tipos celulares ensayadas.

[0553] El hallazgo de que la expresión de HLA-ABC varió sugiere que, de hecho, la expresión de HLA-ABC puede ser modulada. Si esto podría afectar el rechazo del injerto es un punto de interés adicional en la que una población de células que carecen de la expresión de este marcador puede ser capaz de injertarse mejor, potencialmente, en ausencia de los inmunosupresores.

[0554] El hallazgo de que PDGFr alfa puede ser desconectado fácilmente y no puede ser inmediatamente encendido, puede indicar la naturaleza delicada y rápida rotación de los receptores del factor de crecimiento y su necesidad de condiciones de crecimiento muy particulares para su expresión. Dada la falta de tales receptores (o cualquier otro receptor del factor de crecimiento debido a, por ejemplo, los cambios de los medios), la potencia de células puede ser alterada, en particular, los paradigmas de modelo animal.

## EJEMPLO 29

### Características de crecimiento de células derivadas del cordón umbilical en Medio de Crecimiento estandar y Medio de Crecimiento sin BME, y en matraces recubiertos de gelatina y de CELLBIND

[0555] Como se describe en este documento y anteriormente, las células derivadas del cordón umbilical se pueden cultivar en medio de crecimiento en matraces con superficies recubiertas de gelatina. En este ejemplo se exploró si se requieren dos de los componentes en un protocolo de cultivo celular preferido. Se examinó, en particular, si (1) beta-mercaptoetanol (BME), como un aditivo en el medio de crecimiento estándar, se requiere para el crecimiento, y (2) si se requiere gelatina (una proteína de origen animal) como un revestimiento para la frascos de cultivo celular. Además, la eficacia de un revestimiento sintético para promover la unión, CELLBIND® (Corning, Corning, NY), se puso a prueba como una alternativa a la gelatina u otros productos derivados de animales. CellBIND® es un recubrimiento matraz patentado, disponible comercialmente que utiliza plasma altamente reactivo para reducir los grupos aromáticos de la superficie de poliestireno.

### Materiales y Métodos

[0556] **Reactivos:** Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM), penicilina y estreptomycin, se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Suero bovino fetal (FBS) (suero bovino definido) se obtuvo de Hyclone (Logan, UT). Beta-mercaptoetanol se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO).

[0557] **Diseño experimental:** Se aislaron células derivadas del cordón umbilical en dos medios (Medio de Crecimiento y Medio de Crecimiento sin BME) y en los vasos recubiertos con cualquiera de gelatina o CELLBIND®). Por lo tanto, se examinaron cuatro conjuntos de condiciones: (1) de gelatina-Coating/Medio de Crecimiento (condiciones normales), (2) CELLBIND®-Coating/Medio de Crecimiento, (3) Medio Gelatin- Coating/Crecimiento sin BME y (4) Cellbind ®-Coating/Medio de Crecimiento sin BME. Las células se sometieron a pasos en serie desde el aislamiento hasta la senescencia en su conjunto designado de condiciones. La cinética de crecimiento de la población se calcularon en cada conjunto de condiciones para determinar los efectos de los medios y de la superficie de revestimiento de los vasos, y para evaluar los cambios en el crecimiento. La expresión de un conjunto de marcadores de superficie celular se evaluó como una pantalla inicial para cambios fenotípicos.

[0558] **Células.** Se obtuvo un único cordón umbilical a través de National Disease Research Interchange (Filadelfia, PA) con el pleno consentimiento y se dividió en dos trozos de aproximadamente el mismo tamaño.

[0559] **Procedimientos de aislamiento y medios:** células de posparto fueron aislados generalmente como se describe anteriormente en este documento. El tejido se pica y se divide en partes aproximadamente iguales. Una porción se aisló en medio de crecimiento estándar (DMEM: LG, 15% de FBS; beta-mercaptoetanol (1 µl por 100 ml); 50 microlitros/ml de penicilina/50 microgramos/ml de estreptomycin (1 ml por 100 ml (10.000 unidades por ml)). La otra porción se aisló en medio de crecimiento tal como se describe sin medio de beta-mercaptoetanol (BME) (crecimiento w/o BME).

[0560] **Crecimiento de las células:** Las células aisladas de cada porción del tejido espinal se sembraron a 3000 células/cm<sup>2</sup> en recubierto gelatin- matraces T225 y matraces T225 Cellbind recubierto (Corning) en el mismo medio en el que se aislaron. Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera humidificada, 5% de CO<sub>2</sub> atmósfera. Como las células alcanzaron aproximadamente el 85% de confluencia que se tripsinizaron y se contaron. Las células viables se sembraron a 5000 células/cm<sup>2</sup> en nuevos matraces con medio apropiado y revestimiento de la superficie. Rendimiento Celular, duplicaciones de la población (ln (célula final/célula inicial)/ln2) y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo (h)/duplicación de la población) se determinaron en cada paso. El proceso se repitió hasta que las células parecían alcanzar la senescencia, es decir, las células parecían o perder sus capacidades proliferativas, o dejaron

de proliferar más allá.

**[0561] Análisis de marcadores de superficie celular:** marcadores de superficie celular se analizaron por citometría de flujo esencialmente como se describe anteriormente en este documento. Los análisis se realizaron en los pasos 3, 7 y 15 para las células cultivadas en gelatina, ya sea en medio de crecimiento estándar o en Medio de Crecimiento sin BME, y en el paso 7 para las células cultivadas en Cellbind-revestimientos, ya sea en medio de crecimiento o medio de crecimiento sin BME. En particular, después de tripsinización y recuento, se suspendieron 500.000 células en 100 µl de salina tamponada con fosfato con 3% de suero bovino fetal por muestra. Para cada muestra de 20 µl del anticuerpo correspondiente al marcador que se analiza se añadió. Las células se incubaron a 4°C durante 1 hora. Después de la incubación se lavaron las células una vez con 3 ml de PBS y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS. Las muestras se analizaron usando un citómetro de (Becton Dickinson), y los resultados se compilaron utilizando el software adjunto (Cell Quest, Aplicaciones BD).

**Resultados**

**[0562]** Las células aisladas de los cordones umbilicales se pueden cultivar en medios con o sin BME, y en cualquiera de los vasos recubiertos de gelatina o CELLBIND. Se observó la mayor tasa de proliferación (0,51 duplicaciones/día) en estos experimentos con células cultivadas en Medio de Crecimiento sin BME en matraces recubiertos con gelatina. Células derivadas del cordón umbilical proliferaron a tasas más altas en medio de crecimiento sin BME como se refleja por un mayor número de duplicaciones por día; 0,51 duplicaciones por día (Medio de crecimiento sin BME/gelatina) en comparación con 0,33 duplicaciones por día (Estándar Medio de Crecimiento/gelatina). Las células crecieron en las superficies recubiertas Cellbind en medio con o sin BME.

**[0563]** Las células derivadas del cordón umbilical cultivadas en recipientes recubiertos de gelatina, ya sea en medio de crecimiento o en Medio de Crecimiento sin BME fueron capaces de ampliar durante hasta aproximadamente 120 días. Células derivadas del cordón umbilical también crecieron en cualquier medio de crecimiento o medio de crecimiento sin BME, en la superficie Cellbind recubierto durante hasta aproximadamente 103 días.

**[0564]** Los marcadores de superficie celular se analizaron por citometría de flujo en los pasos 3, 7 y 15 para las células cultivadas en vasos recubiertos de gelatina en medios con o sin BME, y en el paso 7 para las células cultivadas en Cellbind recubiertas con, ya sea en medios. Los resultados mostraron ninguna evidencia de cambios fenotípicos como se refleja en el patrón de expresión de los marcadores de superficie celular analizados. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 29-1.

Tabla 29-1: Expresión de marcador de superficie celular para poblaciones de células cultivadas en diferentes condiciones en el paso 7. Resultados en los pasos 3 y 15 son similares.

Marcadores	Paso		P7		
	Superficie de crecimiento medio	No BME Gelatina	Hayflick Gelatina	No BME CellBIND	Hayflick CellBIND
CD10-PE		+	+	+	+
CD13-PE		+	+	+	+
CD31-PE		-	-	-	-
CD34-FITC		-	-	-	-
CD44-FITC		+	+	+	+
CD45RA-PE		-	-	-	-
CD73-PE		+	+	+	+
CD90-FITC		+	+	+	+
CD117-PE		-	-	-	-
CD141-PE		-	-	-	-
SSEA-4-PE		+	+	NA	+/-
PD-L2-FITC		+/-	+/-	-	+/-
PDGFRalpha-PE		+/-	- (ligero + cambio)	-	+/-
HLA-ABC-PE		+	+	+	+
HLA-DP DQ DR-FITC		-	-	-	-

**[0565] Resumen.** Los resultados proporcionan evidencia de que las células derivadas del cordón umbilical se pueden hacer crecer en cultivo sin BME.

**EJEMPLO 30**

**Condiciones alternas para el aislamiento de células de tejido del cordón umbilical**



5 **[0566]** Se llevaron a cabo esfuerzos iniciales para aislar una población de células de tejido del cordón umbilical humano utilizando un método de procesado de tejido con una formulación de medios de cultivo celular básico que contiene suero como se describe aquí anteriormente. Aquí, se describen métodos alternativos para el aislamiento de células de tejido del cordón umbilical picada en presencia de varias formulaciones de medios y condiciones de cultivo diferentes. Otro objetivo fue determinar si las condiciones de aislamiento alternativos permitidos para la consecuencia de un nuevo tipo de célula no caracterizado previamente. Células derivadas del cordón umbilical, cultivadas a partir de aislamiento bajo estas diferentes condiciones se caracterizaron en cuanto a su: (1) el potencial de crecimiento a largo plazo, (2) fenotipo marcador de superficie celular, (3) del vástago de la expresión génica específica de la célula, y (4) producción del factor trófico. Los datos demuestran que células derivadas del cordón umbilical se pueden aislar usando una variedad de formulaciones de medios y condiciones de crecimiento.

### **Materiales y Métodos**

15 **[0567] Reactivos.** Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM), solución salina tamponada con fosfato, penicilina y estreptomycin, y dispasa se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). suero bovino fetal (FBS) (suero bovino definido) se obtuvo de Hyclone (Logan, UT). La colagenasa, hialuronidasa, y beta-mercaptoetanol se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO).

20 **[0568] Aislamiento de las células de los cordones umbilicales humanos:** Cordones umbilicales humanos se obtuvieron de la National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA) tras partos normales. Para eliminar la sangre y los residuos, el cable se lavó en de Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM de baja glucosa) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los tejidos fueron entonces disociados mecánicamente en placas de cultivo de tejidos hasta que el tejido se troceó a una pulpa fina. El tejido picado se transfirió a un tubo cónico de 50 mililitros y se digirió en una mezcla de enzimas que contiene 500 unidades/colagenasa mililitro, 500 unidades/dispasa mililitro, y 50 unidades/hialuronidasa mililitro. La mezcla de enzima se combina con una formulación de medios específico ("medio de cultivo de ensayo") como se indica en la Tabla 30-1 a continuación. Los tubos cónicos que contiene el tejido, medio, y las enzimas de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital a 225 rpm durante 2 horas.

30 **[0569]** Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de cultivo de ensayo (Tabla 30-1). La suspensión celular se filtró a través de un 40 micrones nylon BD FALCON Cell colador (BD Biosciences, San Jose, CA). El filtrado se volvió a suspender en medio (volumen total = 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró de nuevo, y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de cultivo de ensayo fresco. El proceso se repitió dos veces.

35 **[0570]** Después de la centrifugación final, se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de medio de cultivo de ensayo fresco. Se determinó el número de células viables utilizando un instrumento Guava (Guava Technologies, Hayward, CA). Las células se sembraron a densidades de siembra de 300 células/cm<sup>2</sup> 2000 células/cm<sup>2</sup> o 5000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de cultivo de tejido recubierto gelatin-. Las células se cultivaron en medio y en las condiciones descritas en la Tabla 30-1. Se utilizaron controles de medio de crecimiento para determinar la viabilidad de los aislados para cada tipo de medio.

45

50

55

60

65

Tabla 30-1: formulaciones de medios y condiciones de cultivo usadas para aislar células del cordón umbilical de tejido del cordón umbilical.

Aislamiento	Aislado	Tipo de medio	Condición de cultivo	Duplicaciones
1	Umb042105	<b>EGM2</b> (endothelial growth medium-2 (Cambrex BioScience, MD))	Normoxia (baja densidad)	>5
2	Umb042105	<b>EGM2</b>	Normoxia (alta densidad)	>5
3	Umb052405	<b>REGM</b> (Renal epithelial growth medium (Cambrex))	hipoxia	>5
4	Umb052405	<b>REGM</b>	normoxia	>5
5	Umb032905	<b>SmGM2</b> (smooth muscle growth medium-2 (Cambrex))	Normoxia (baja densidad)	5
6	Umb051705	<b>SMGM2</b>	Hipoxia (alta densidad)	>5
7	Umb051705	<b>SMGM2</b>	Hipoxia (baja densidad)	>5
8	Umb032905	<b>SMGM2</b>	Normoxia (alta densidad)	5
9	Umb060805	<b>Medio Sonic hedgehog</b> (DMEM-Baja glucosa (Invitrogen), 2 por ciento (v) de suero v/bovino fetal (FBS; define suero bovino fetal; N° de Lote AND18475; (Hyclone), penicilina a 100 unidades/ml, estreptomycin a 100 ug/ml (ambos de Invitrogen), 10 ng/ml de factor de crecimiento sonic hedgehog recombinante (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)).	Hipoxia	5
10	Umb080305	<b>Medio de crecimiento de queratinocitos</b> (Gibco)	Normoxia	5

"Hipoxia", indica cultivos crecidos bajo una atmósfera que contiene 5% de oxígeno "Normoxia", indica cultivos se hicieron crecer en condiciones normales de oxígeno atmosférico. "Baja densidad", indica que los cultivos se sembraron inicialmente a 300 células/cm<sup>2</sup>.  
 "Alta densidad", indica que los cultivos se sembraron inicialmente a 2000 células/cm<sup>2</sup> = Número aproximado "duplicaciones" de duplicaciones de la población en el paso 4.

**[0571] Análisis FACS:** Análisis de citometría de flujo se realizó en células derivadas del cordón umbilical cultivadas según las formulaciones de medios y condiciones de cultivo descritos en la Tabla 30-1. Las células se expandieron a paso cuatro o cinco en medio de cultivo de prueba en frascos T225 recubiertos de gelatina a 37°C y 5% de dióxido de carbono. Las células adherentes se lavaron en PBS y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco). Se recogieron las células, se centrifugaron y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración de 1x10<sup>7</sup> células/ml. El anticuerpo específico se añadió a 100 microlitros de suspensión de células y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30-45 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y después se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células se resuspendieron en PBS (500 microlitros) y se analizaron por citometría de flujo. Citometría de flujo análisis se realizó con un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 30-2.

Tabla 30-2: Los anticuerpos utilizados para el análisis de marcadores de superficie de células de células derivadas del cordón umbilical.

	<b>Anticuerpo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Nº de catálogo</b>
5	CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
	CD13	BD Pharmingen	555394
	CD31	BD Pharmingen	555446
10	CD34	BD Pharmingen	555821
	CD44	BD Pharmingen	555478
	CD45R	BD Pharmingen	555489
	CD49c	BD Pharmingen	556025
	CD73	BD Pharmingen	550257
15	CD90	BD Pharmingen	555596
	CD117	BD Pharmingen	340529
	CD141	BD Pharmingen	559781
	CD184	BD Pharmingen	555974
20	HLA-A, B, C	BD Pharmingen	555553
	HLA-DR, DP, DG	BD Pharmingen	555558
	IgG-FITC	BD Pharmingen	555748
	IgG-PE	BD Pharmingen	555749

25 **[0572] Aislamiento total de ARN:** Se extrajo ARN de células de cordón umbilical derivado confluentes cultivadas en diferentes condiciones (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). La ARN se eluye con 50 µl de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C.

30 **[0573] Transcripción inversa:** ARN se transcribió inversamente 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. La expresión del receptor de LDL oxidada, la interleucina-8 y reticulon se investigaron utilizando en tiempo real y PCR convencional.

35 **[0574] PCR en tiempo real:** PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión de genes ASSAYS-ON-DEMAND™: renina (Hs00166915), receptor de LDL oxidada (Hs00234028), reticulon (Hs00382515), IL-8 (Hs00174103), y GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) fueron mezclados 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 ABI Prism 7000 software SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 min y 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min.

40 **[0575] PCR convencional:** 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 µl de solución de ADNc, 1 3 tampón de reacción AmpliTaq Gold universal de mezcla de PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) y desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. La amplificación se optimiza para cada conjunto de cebadores. Para IL-8 y reticulon (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 30 ciclos), para la renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos para 38 ciclos) para 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 28-3. Concentración de cebador en la reacción de PCR final fue de 1 µm a excepción de GAPDH que fue de 0,5 m cebadores M. 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 667 láminas universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara de distancia focal (VWR International, South Plainfield, Nueva Jersey).

55 Tabla 30-3: Los cebadores usados para la PCR

	<b>Nombre de cebador</b>	<b>Secuencia de cebador (F = hacia adelante, R = inversa)</b>
60	<b>Renina</b>	F: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC -3' (SEQ ID NO: 3) R: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG -3' (SEQ ID NO: 4)
	<b>Receptor de LDL oxidada</b>	F: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO: 1) R: 5'-AGAATGGAAACTGGAATAGG -3' (SEQ ID NO: 2)
	<b>Reticulon</b>	F: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO: 5) R: 5'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO: 6)
65	<b>Interleucina-8</b>	F: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO: 7) R: 5'-CTTCAAAAACCTTCCACAACC- 3' (SEQ ID NO: 8)

[0576] ELISA: Las células derivadas del cordón umbilical congeladas de diferentes condiciones de aislamiento se descongelaron a paso 4 y se sembraron sobre matraces recubiertos de gelatina T75 a 5000 células/cm<sup>2</sup> que contienen cada uno 15 mililitros de su respectivo medio de crecimiento (Tabla 30-1). Las células se cultivaron durante 24 horas a 37°C en dióxido de carbono 5% y oxígeno atmosférico. El medio se cambió después a un medio libre de suero (DMEM de baja glucosa (Gibco), 0,1% (p/v) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomycin (50 ug/ml, Gibco)) y se cultivaron adicionalmente durante 8 horas. Medio libre de suero acondicionado se recogió al final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g durante 5 min y se almacenó a -20°C.

[0577] Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con PBS y se separan por medio de 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). El número de células se estimó utilizando el instrumento Guava (Guava Technologies Hayward, CA). Las muestras se ensayaron entonces para los siguientes factores: inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP1), derivado de plaquetas factor de crecimiento epitelial bb (PDGFBB), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), heparina de unión al factor de crecimiento epidérmico (HB-EGF), inhibidor tisular de metaloproteasa-2 (TIMP2), proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP1), interleucina-6 (IL6), interleuquina 8 (IL-8), factor de crecimiento transformante alfa (TGFA), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor derivado del estroma 1B (SDF1B), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor básico de crecimiento nervioso (bNGF), neurotrofina-3 (NT-3) con el reflector Proteoma Ensayos (Pierce Biotechnology Inc.).

## Resultados

### Aislamiento de células derivadas del cordón umbilical

[0578] Se aislaron células derivadas del cordón umbilical utilizando diferentes composiciones de medios y condiciones de cultivo identificados en la Tabla 30-1. Algunas poblaciones de células aisladas se cultivaron bajo condiciones atmosféricas tanto normoxia como hipóxica (5% O<sub>2</sub>). Las células también se aislaron utilizando densidad inicial de la siembra baja (300 células/cm<sup>2</sup>) o alta (2000 células/cm<sup>2</sup>). Diez combinaciones de condiciones de medio de crecimiento y de crecimiento apoyaron el crecimiento de las células derivadas del cordón umbilical. Estos incluyen EGM2, REGM y SMGM2, todo bajo ambas condiciones atmosféricas normóxicas e hipóxicas. Medio Sonic hedgehog y KGM, en condiciones de hipoxia y normoxia respectivamente, también apoyaron el crecimiento celular.

### Análisis de expansión a largo plazo

[0579] Se seleccionaron formulaciones de medios que apoyaban el crecimiento de células derivadas del cordón umbilical, y las células se expandieron a partir de paso 4 o 5, a una densidad de siembra de 5.000 células/cm<sup>2</sup> en placas revestidas de gelatina. Las poblaciones de células se pasaron continuamente durante varias semanas hasta que se alcanzó la senescencia. La senescencia se determinó cuando las células no lograron alcanzar mayor que una duplicación de la población durante el intervalo de tiempo de estudio.

[0580] Varios aislados fueron probados para el potencial de expansión a largo plazo y demostraron crecimiento más allá de paso 4 (Tabla 30-4). Umb032905, aislado en medio SMGM2 en condiciones de hipoxia, demostró el más robusto potencial de expansión celular de más de 32 duplicaciones de la población. La población alcanzó la senescencia en el día 74 para las células aisladas a baja densidad de siembra, y en 64 días para las células aisladas a alta densidad de siembra. potencial de expansión Modest se observó en umb052405 aislados en REGM y cultivadas en normoxia o condiciones de hipoxia (aislamiento 3,4). Estas condiciones produjeron 18 y 10 duplicaciones de la población, respectivamente.

Tabla 30-4: Máximo número de duplicaciones de la población de células obtenidos.

Aislamiento	Días de cultivo	PD	Viabilidad
3	33	18,3	86,5
4	29	10,2	97
6	64	31,4	98
7	74	31,6	96

"PD", el número de duplicaciones de la población obtenidos cuando las células se cultivaron a partir de paso 4 a la senescencia. "Viabilidad (%)", el por ciento de células que eran vivos en el momento de la senescencia.

### Análisis de fenotipo de marcador de superficie por citometría de flujo

[0581] Las poblaciones celulares generadas a partir de diferentes condiciones de aislamiento se caracterizaron por citometría de flujo. Diez líneas celulares fuera de las veintidós condiciones de aislamiento se ampliaron para el paso 4 y el perfil de marcador de superficie celular se determinó. La mayoría de los aislamientos de células mostraron tinción positiva para CD10, CD13, CD44, CD49c, CD73, CD90 y HLA-ABC. Las células fueron negativas en las condiciones ensayadas para la expresión superficial de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, CD184 y HLA-

DR, DP, DQ. La mayoría de los marcadores mostraron un patrón de expresión similar a las células aisladas usando las condiciones preferidas descritas anteriormente en los ejemplos anteriores, así como a otros aislamientos de células.

## 5 Análisis RT-PCR

**[0582]** Aislamientos de células derivadas del cordón umbilical se analizaron para la expresión de genes específicos de células derivadas del cordón umbilical y genes específicos a células madre. Los datos proporcionados en las Tablas 30-5 muestran que las células derivadas de todas las condiciones de aislamiento expresaron reticulon, LDL-R, y IL-8. Tabla 30-5 muestra los resultados de PCR en tiempo real realizado en ADNc a partir de células derivadas de cordones umbilicales humanas cultivadas en diferentes formulaciones de medios. Los resultados se expresan como una relación de umbrales de ciclo (TC) entre el gen de interés y el control de transcripción interna, GAPDH. Los datos indican que los niveles de expresión de reticulon, receptor de LDL oxidada, y IL-8 eran todas similares.

*Tabla 30-5:* Resultados del análisis de RT-PCR en tiempo real del gen de la firma y el genes específicos de células madre. Los resultados se expresan como una relación CT entre gen de interés y un control de transcripción interna (GAPDH). transcritos de ARNm no expresados por las células (-). Células nTERA-2 sirven como un control positivo para la expresión de genes específicos de células madre.

Aislamiento	Tipo de medio	Condición	renina	reticulon	LGL-R	IL-8
1	EGM2	Normoxia (baja densidad)	-	0,85	0,73	0,86
2	EGM2	Normoxia (alta densidad)	-	0,88	0,78	0,90
3	REGM	Hipoxia	-	1,12	1,05	0,92
5	SMGM2	Hipoxia (baja densidad)	-	0,79	0,73	0,89
6	SMGM2	Hipoxia (alta densidad)	-	0,94	0,90	1,04
7	SMGM2	Normoxia (baja densidad)	-	0,78	0,84	0,96
8	SMGM2	Normoxia (alta densidad)	-	0,74	0,74	0,91
9	Medio Sonic hedgehog	Hipoxia	-	1,00	1,05	0,90
10	KGM	Normoxia	-	0,99	1,08	0,89
	NTERA-2		-	-	-	0,63

## Análisis de la producción de factor trófico

**[0583]** La producción de diferentes factores de crecimiento y citoquinas se analizó por ocho cepas (Tabla 30-6). Todas las condiciones de aislamiento de células derivadas del cordón umbilical resultaron en poblaciones de células que secretan cantidades relativamente altas ( $> 30$  pg/ml/ $1 \times 10^6$  células) de inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP1), factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF), el crecimiento de hepatocitos factor de (HGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), inhibidor tisular de metalinoprotease-2 (TIMP2), interleucina 8 (IL-8), y del estroma derivadas del factor-1b (SDF1b). Indetectable a cantidades bajas ( $< 30$  pg/ml/ $1 \times 10^6$  células) de crecimiento derivado de plaquetas epitelial factor de-bb (PDGFBB), factor básico de crecimiento nervioso (NGF), y neurotrofina-3 (NT-3) se detecta a partir de las mismas muestras.

**[0584]** Las células aisladas con medio EGM2 produjeron poblaciones de células que producen bajas cantidades de muchos factores tróficos incluyendo, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor trófico neuro- derivado del cerebro (BDNF), y el factor neurotrófico ciliar (CNTF). Sin embargo, estas líneas celulares producen cantidades más altas de interleucina-6 (IL-6) en comparación con otras líneas celulares ensayadas. Las células aisladas en SMGM2 bajo atmósfera normal con una baja densidad de siembra inicial producida muy alta (4.737 pg/ml/ $1 \times 10^6$  cantidades de HGF células). Estas células también secretan cantidades muy altas de TIMP2 (26.002 pg/ml/ $1 \times 10^6$  células) en comparación con otras condiciones de aislamiento. Cantidades ligeramente más altas (39,6 pg/ml/ $1 \times 10^6$  células) de TGF-alfa fueron producidos por estas células que otras líneas celulares ensayadas.

**[0585]** condiciones de aislamiento alternativos también proporcionan poblaciones de células secretoras de cantidades variables de VEGF. Células derivadas del cordón umbilical aisladas en REGM en condiciones de normoxia y condiciones de hipoxia produjeron cantidades relativamente altas de VEGF (64,8 pg/mL/ $1 \times 10^6$  células y 131,6 pg/ml/ $1 \times 10^6$  células, respectivamente). Otras condiciones de aislamiento y de crecimiento mostraron secreción comparativamente baja de VEGF.

Tabla 30-6. Análisis de ensayo ELISA de SearchLight multiplexado de producción de factor trófico en células derivadas de cordón umbilical de diferentes condiciones de aislamiento y crecimiento. Cantidades altas (>30 pg/mL/1x10<sup>6</sup> células) de factor trófico se indican en cajas grises y cantidades bajas en cajas blancas.

Aislamiento	TIMP1	PDGFBB	KGF	HGF	FGF	VEGF	HB-EGF	TIMP2	MCP1
C	<9.8	<2.0	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<3.6	23.7	15.1
1	42421.0	4.0	23.0	664.0	52.0	33.0	103.0	2257.0	299.0
2	51515.0	3.0	18.0	350.0	66.0	5.0	93.0	1268.0	752.0
3	371200.0	8.4	10.0	69.7	101.9	131.5	290.4	5700.0	154.7
4	260100.0	<2.0	41.4	102.6	624.6	64.8	648.0	6192.0	122.4
5	225321.0	31.0	41.0	4737.0	408.0	29.0	507.0	26002.0	165.0
6	81300.0	<2.0	31.2	36.5	259.9	20.5	257.6	1336.8	55.5
7	73656.0	<2.0	25.3	45.4	172.6	18.6	262.6	1210.4	33.5
8	137349.0	8.0	24.0	376.0	383.0	37.0	366.0	15997.0	710.0

Aislamiento	IL6	IL8	TGFA	BDNF	SDF1B	CNTF	B-NGF	NT3
C	<8	<8	3.7	8.0	23.4	104.5	3.2	2.8
1	34.0	213.0	4.0	26.0	61.0	81.0	4.0	4.0
2	42.0	2690.0	4.0	29.0	77.0	100.0	4.0	5.0
3	9.5	163.2	12.7	51.7	256.1	<7.8	6.9	<1.6
4	18.0	2678.4	39.6	100.8	507.6	459.0	28.8	30.6
5	17.0	770.0	20.0	99.0	260.0	394.0	16.0	13.0
6	27.4	608.0	<2.4	41.8	200.6	146.7	11.4	13.7
7	19.3	923.3	12.6	33.5	239.6	237.3	9.7	14.9
8	30.0	931.0	13.0	69.0	157.0	373.0	13.0	15.0

"C", muestra de control es medio libre de suero solo sin acondicionado. Los resultados mostrados son la media de mediciones duplicadas.

**Discusión**

[0586] Diferentes formulaciones de medios y condiciones de cultivo se pueden utilizar para aislar células procedentes de tejido del cordón umbilical humano. Sin embargo, estas condiciones de aislamiento alternativos derivaron células que parecen ser similares a las células aisladas usando las condiciones utilizadas inicialmente para aislar y caracterizar estas células.

[0587] Sobre la base del perfil de la superficie marcador, y el análisis de la expresión génica, las células aisladas usando condiciones alternas dan el mismo tipo de célula como las aisladas en medio de crecimiento en las condiciones originales. Además, las células obtenidas a partir de todas las condiciones de aislamiento examinadas mostraron perfiles de secreción de factor trófico similares. Condiciones de aislamiento alternativos pueden estimular algunas células para producir más o menos de uno o más factores particulares, y esto puede tener aplicaciones para el uso terapéutico.

[0588] Potencial de crecimiento a largo plazo es una medida importante para evaluar la capacidad de la condición de aislamiento alternativo para producir una célula para la terapia celular basada en alogénico. Las condiciones descritas en la Tabla 30-1 generalmente produjeron poblaciones de células que podrían ampliarse para aproximadamente 5 duplicaciones de la población.

[0589] Después de comparar el potencial del crecimiento a largo plazo, el fenotipo de marcador de superficie, expresión génica de células madre y de firma y la producción del factor trófico, estas poblaciones de células parecen ser similares a las células aisladas usando condiciones estándar.

**Depósito biológico de células y cultivos derivados del cordón umbilical**

[0590] De acuerdo con la descripción detallada y los ejemplos escritos proporcionados en este documento, los ejemplos de células derivadas del cordón umbilical de la invención fueron depositados con la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) el 10 de junio de 2004, y números de acceso ATCC asignado como sigue: (1) designación de la cepa UMB 022803 fue asignado (P7) N° de Acceso PTA-6067; y (2) designación de la cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el N° de Acceso PTA-6068.

[0591] Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las realizaciones actualmente preferidas, se entiende que la invención no se limita a las realizaciones descritas específicamente y

ejemplificadas en este documento. Numerosos cambios y modificaciones se pueden hacer a la realización preferida de la invención, y tales cambios y modificaciones pueden hacerse sin apartarse del alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Ethicon, Incorporated  
 Harris, Ian Ross  
 Messina, Darin J.  
 Kihm, Anthony J.  
 Seyda, Agnieszka  
 Colter, David C.

15 <120> POSTPARTUM CELLS DERIVED FROM UMBILICAL CORD TISSUE, AND METHODS  
 OF MAKING AND USING THE SAME

<130> CBAT-0040 (ETH-5073 NP1CIP1 PCT)

20 <150> US 60/639,088  
 <151> 2004-12-23

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

25 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

30 <400> 1  
 gagaaatcca aagagcaaat gg 22

35 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic construct

40 <400> 2  
 agaatggaaa actggaatag g 21

45 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic construct

50 <400> 3  
 tcttcgatgc ttcggattcc 20

55 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic Construct

60 <400> 4  
 gaattctcgg aatctctggt g 21

65





5	<400> 10 tcctgtcagt tggtgctcc	19
10	<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial sequence	
15	<220> <223> Synthetic Construct	
20	<400> 11 ctggattggc gttgtttgtg	20
25	<210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial sequence	
30	<220> <223> Synthetic Construct	
35	<400> 12 tccaaggtg gagtgctgta g	21
40	<210> 13 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial sequence	
45	<220> <223> Synthetic Construct	
50	<400> 13 ctgttgcgca catccctgcc c	21
55	<210> 14 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial sequence	
60	<220> <223> Synthetic Construct	
65	<400> 14 ggcagtcctgg ctttctcaga tt	22
70	<210> 15 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial sequence	
75	<220> <223> Synthetic Construct	
80	<400> 15 ccctctcct tacccttagc a	21
85	<210> 16 <211> 23 <212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

ctgtgaaagg acctgtctgt cgc

23

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

1. Un método para la preparación de células terapéuticas o cultivos que comprende:

5 a) aislamiento de las células de tejidos humanos del cordón umbilical libres de sangre en presencia de (i) actividad de la proteasa neutra o (ii) dos o más actividades de la enzima seleccionada de metaloproteasa, proteasa neutra y actividades enzimáticas mucolíticas, siendo dichas células capaces de autorenovación y expansión en cultivo, teniendo el potencial de diferenciarse en células de otros fenotipos, y en donde las células:

10 producen cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-A, B, C, como se detecta por citometría de flujo, y no producen cada uno de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA DR, DP, DQ, como se detecta por citometría de flujo;

15 b) expansión inicial de las células a un número útil en un medio que contiene suero que apoya la expansión de células pero en el que las células producen una cantidad del marcador de superficie celular HLA-ABC;

c) transferencia de las células a un medio en el que las células producen una disminución en la cantidad del marcador de superficie celular HLA-ABC, en el que el medio en el que las células producen una cantidad disminuida del marcador de superficie celular HLA-ABC es un medio libre de suero; y

20 d) pasar las células en el medio en el que las células producen una cantidad disminuida de la HLA-ABC

e) preparando de este modo una célula o cultivo terapéutico.

2. El método de la reivindicación 1 para la producción de células terapéuticas o cultivos para la implantación.

25 3. El método de la reivindicación 1 para la producción de células terapéuticas o cultivos para el injerto.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la actividad de la enzima metaloproteasa es actividad de la enzima colagenasa, la actividad de la enzima proteasa neutra es actividad de la enzima dispasa y/o la actividad de la enzima mucolítica es actividad de la enzima hialuronidasa.

30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las dos o más actividades enzimáticas comprenden las actividades enzimáticas de colagenasa, dispasa y hialuronidasa

35

40

45

50

55

60

65

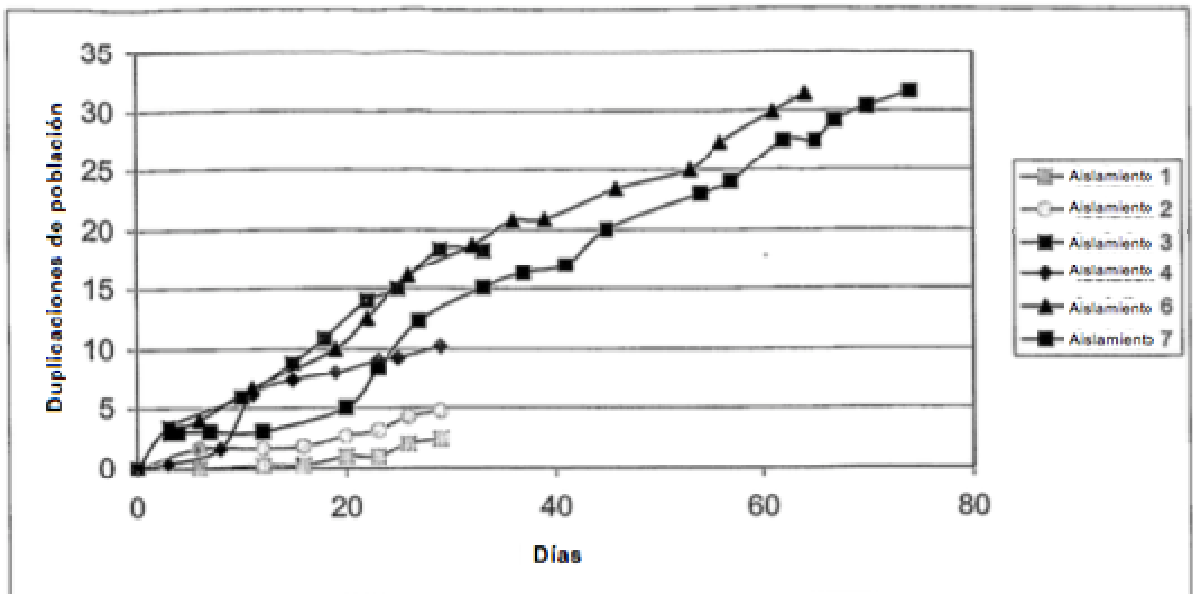


Figura 1