

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 041**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/18</b>	(2006.01) <b>A61L 27/52</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01) <b>A61P 29/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/51</b>	(2015.01)	
<b>A61K 35/12</b>	(2015.01)	
<b>A61K 35/50</b>	(2015.01)	
<b>A61L 27/22</b>	(2006.01)	
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)	
<b>A61L 27/54</b>	(2006.01)	
<b>C12N 5/073</b>	(2010.01)	
<b>A61K 35/48</b>	(2015.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2012 PCT/US2012/038407**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12158952**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2012 E 12725939 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2709637**

54 Título: **Tratamiento de degeneración de disco intervertebral usando células derivadas de tejido del cordón umbilical e hidrogel**

30 Prioridad:  
**19.05.2011 US 201113111933**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.07.2017**

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

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

74 Agente/Representante:  
**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 625 041 T3

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

## DESCRIPCIÓN

**Tratamiento de degeneración de disco intervertebral usando células derivadas de tejido del cordón umbilical e hidrogel****CAMPO DE LA INVENCION**

5 [0001] La invención se refiere en general al campo de la terapéutica a base de células. En algunos aspectos, la invención se refiere al uso de Células derivadas de tejido de cordón umbilical para tratar una enfermedad o condición relacionada con la degeneración del disco intervertebral.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 [0002] Varias publicaciones, incluyendo patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos se citan a lo largo de la memoria descriptiva.

15 [0003] El dolor de espalda es una de las discapacidades más comunes, y causa malestar físico y emocional importante en los individuos afectados. El deterioro de la estructura del disco intervertebral (IVD) es una de las principales causas de dolor de espalda inferior. El IVD está formado de un anillo fibroso exterior fibroso que rodea al núcleo pulposo gelatinoso más suave. Las fibras del anillo fibroso se unen a las placas terminales de los cuerpos vertebrales de la médula espinal e interceptan el núcleo pulposo, la creación de un entorno isobárico. Bajo una carga axial, el núcleo pulposo comprime y radialmente transfiere esa carga al anillo fibroso. La naturaleza laminada del anillo fibroso proporciona una alta resistencia a la tracción y por lo tanto permite que se expanda radialmente en respuesta a esta carga transferida.

20 [0004] En un IVD sano, las células dentro del núcleo pulposo forman sólo alrededor del uno por ciento del tejido del disco en volumen. Estas células producen una matriz extracelular (ECM) que contiene un alto porcentaje de proteoglicanos. Los proteoglicanos contienen grupos sulfatados funcionales que retienen el agua, proporcionando de este modo al núcleo pulposo sus cualidades de amortiguación. Las células de núcleo pulposo también pueden secretar pequeñas cantidades de citoquinas y metaloproteinasas de matriz (MIVIPs), que ayudan a regular el metabolismo de las células de núcleo pulposo.

25 [0005] En algunos casos de la enfermedad de IVD, la degeneración gradual de la IVD es causada por las inestabilidades mecánicas en otras porciones de la columna vertebral. En estos casos, el aumento de cargas y presiones en el núcleo pulposo hacen que las células dentro del disco (o macrófagos invasores) emitan cantidades más grandes de las normales de las citoquinas mencionadas anteriormente. En otros casos de enfermedad IVD, los factores genéticos o apoptosis pueden causar una disminución en el número de células del disco y/o una liberación de cantidades tóxicas de citoquinas y MMPs. En algunos casos, la acción de bombeo del disco puede funcionar mal (debido a, por ejemplo, una disminución en la concentración de proteoglicanos dentro del núcleo pulposo), retardando de este modo el flujo de nutrientes en el disco, así como el flujo de productos de desecho de el disco. Esta capacidad reducida para proporcionar nutrientes a las células y eliminar los residuos puede dar lugar a disminución de la viabilidad celular y el metabolismo, resultando en una mayor degradación de la ECM, junto con la acumulación de altos niveles de toxinas que pueden causar la irritación del nervio y el dolor.

30 [0006] A medida que la degeneración de IVD progresa, los niveles tóxicos de citoquinas y MMPs presentes en el núcleo pulposo empiezan a degradar el ECM. En particular, MMPs (mediadas por citoquinas) comienzan la escisión de las porciones de retención de agua de los proteoglicanos, lo que reduce las capacidades de retención de agua. Esta degradación conduce a un núcleo pulposo menos flexible, que cambia el patrón de carga dentro del disco, y a su vez puede conducir a la deslaminación del anillo fibroso. Estos cambios provocan inestabilidad más mecánico, lo que puede causar que las células emitan incluso más citoquinas y conducir a la regulación positiva de MMPs. A medida que esta cascada destructiva continúa y degeneración de IVD progresa, el disco comienza a abultarse ("una hernia de disco"), y a continuación, en última instancia, se rompe, provocando que el núcleo pulposo entre en contacto con la médula espinal y produce dolor.

35 [0007] Actualmente, las terapias principales para la degeneración de IVD son intervenciones quirúrgicas en las que discos degenerados se escinden o se fusionan con los discos vecinos. Las terapias quirúrgicas tienen como objetivo aliviar el dolor y otros síntomas de la degeneración de IVD, pero no hacen nada para reparar o regenerar los IVD enfermos. Un enfoque para el tratamiento de células degeneradas IVD y tejidos es el uso de terapias a base de células, en las que se administran las células vivas para reparar, reemplazar y/o remodelar los tejidos enfermos. Varios estudios recientes han investigado el uso de terapias para enfermedades degenerativas a base de células IVD. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N<sup>os</sup> 6.352.557 ("Ferree") y 6.340.369 ("Ferree II") enseñan la extracción de células IVD vivas de un paciente, el cultivo de las células y su trasplante en un IVD afectado. Del mismo modo, Alini, *Eur. Spine J.*, 2002: 11 (Supp.2): S215 220, describe el aislamiento y el cultivo de células de núcleo pulposo, la incorporación de las células en una biomatriz, y luego la inyección de las células embebidas en pacientes para restaurar la funcionalidad a IVDs afectadas. Estos enfoques, aunque prometedores, han demostrado una eficacia limitada en la reparación de los IVD degenerados y sufren de complicaciones causadas por la incompatibilidad inmunológica entre los donantes y los receptores celulares.

[0008] Un enfoque terapéutico a base de células alternativo es el uso de células madre, que tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en células que comprenden los tejidos enfermos. El trasplante de células madre puede utilizarse como una herramienta clínica para reconstituir un tejido diana, restaurando con ello la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de la tecnología de células madre es amplia, incluyendo la ingeniería de tejidos, administración de terapia génica, y la terapéutica de células, es decir, administración de agentes bioterapéuticos a un lugar de destino a través de células vivas suministradas exógenamente o componentes celulares que producen o contienen aquellos agentes (para una resumen, véase Tresco, P.A. *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000; 42: 237). La identificación de las células madre ha estimulado la investigación dirigida a la generación selectiva de tipos de células específicas para medicina regenerativa. Uno de los obstáculos a la realización del potencial terapéutico de la tecnología de células madre ha sido la dificultad de obtener un número suficiente de células madre. Tejido embrionario, o fetal, es una fuente de células madre. Las células madre y progenitoras embrionarias se han aislado a partir de un número de especies de mamíferos, incluyendo seres humanos, y varios de estos tipos de células se han demostrado capaces de autorrenovación y la expansión, como la diferenciación bien en un número de diferentes linajes de células. Sin embargo, la obtención de células madre a partir de fuentes embrionarias y fetales ha planteado muchas cuestiones éticas y morales que han impedido un mayor desarrollo de la terapéutica de células madre embrionarias.

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

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

## RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] En un aspecto, los métodos se proporcionan en este documento para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD (IDD). Los métodos comprenden la administración de células derivadas de tejido de cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o condición. El tejido del cordón umbilical del que se obtienen las células es preferiblemente sustancialmente libre de sangre. Las Células derivadas de tejido de cordón umbilical son preferiblemente capaces de autorrenovación y expansión en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse, por ejemplo, a un fenotipo de células IVD; requerir L-valina para el crecimiento; puede crecer en al menos aproximadamente 5% de oxígeno; no producen CD117 ni HLA-DR ni telomerasa; expresan actina de músculo liso alfa; y expresar, con relación a fibroblastos humanos, células madre mesenquimales o célula médula ósea de cresta ilíaca, aumento de los niveles de interleucina 8 y reticulon 1.

[0012] En otro aspecto, las composiciones farmacéuticas se proporcionan para su uso en el tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD, las composiciones que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y células de cordón derivadas de tejido umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección, en el que el tejido del cordón umbilical del que se obtienen las células está sustancialmente libre de sangre, y en donde las células son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse, por ejemplo, a un fenotipo de células IVD; requieren L-valina para el crecimiento; puede crecer en al menos aproximadamente 5% de oxígeno; no producen CD117 o HLA-DR o telomerasa; expresan actina de músculo liso alfa; y expresan, con relación a fibroblastos humanos, células madre mesenquimales, o células de médula ósea de cresta ilíaca, aumento de los niveles de interleucina 8 y reticulon 1.

[0013] Los kits se describen para el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD, los kits comprenden instrucciones para usar el kit en un método para tratar una enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y células de cordón derivadas de tejido umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección, en la que el tejido del cordón umbilical del que se obtienen las células está sustancialmente libre de sangre, y en el que las células capaces de autorrenovación y expansión en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse, por ejemplo, a un fenotipo de células IVD; requerir L-valina para el crecimiento; puede crecer en al menos aproximadamente 5% de oxígeno; no producen CD117 o HLA-DR o telomerasa; expresan actina de músculo liso alfa; y expresan, con relación a fibroblastos humanos, células madre mesenquimales o célula de cresta ilíaca de médula ósea, aumento de los niveles de interleucina 8 y reticulon 1. En algunas realizaciones, los kits proporcionados en este documento comprenden además al menos un reactivo y/o instrucciones para el cultivo de las células. En algunas realizaciones, los kits proporcionados en este documento comprenden instrucciones para la inducción de células a diferenciarse al menos parcialmente *in vitro*, por ejemplo, en células que muestran un fenotipo de núcleo pulposo celular y/o un

fenotipo de células de anillo fibroso.

[0014] En diversas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical utilizadas en los métodos, composiciones y/o kits descritos en el presente documento expresan receptor de lipoproteína oxidada de baja densidad 1, reticulon, ligando del receptor de quimiocina 3, y/o proteína quimiotáctica de granulocitos 2. En algunas realizaciones, células derivadas de tejido del cordón umbilical descritas en este documento expresan CD10, CD13, CD44, CD73, y CD90. En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical descritas en este documento tienen la capacidad de diferenciarse en anillo fibroso y/o células de núcleo pulposo.

[0015] En diversas realizaciones, la enfermedad o condición relacionada con la degeneración de IVD puede ser causada o inducida por la edad, trauma, autoinmunidad, reacción inflamatoria, un defecto genético, la deposición de inmunocomplejo, y/o combinaciones de los mismos. Un IVD seleccionado para tratamiento puede ser intacto o en cualquier etapa de daño o degeneración. Por ejemplo, un IVD seleccionado para tratamiento puede ser herniado, roto, deslaminado, y/o de otra manera dañado o degenerado.

[0016] Los métodos proporcionados en el presente documento comprenden la administración de células derivadas de tejido umbilical indiferenciadas con un hidrogel. Células humanas derivadas de tejido umbilical producen factores tróficos beneficiosos incluyendo pero no limitados a citocinas, factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, proteínas de matriz extracelular que promueven la supervivencia, el crecimiento y diferenciación de células progenitoras IVD o precursores endógenos. Los factores tróficos descritos aquí podrían ser secretados directamente por las células humanas derivadas de cordón umbilical trasplantadas tisulares en el entorno de acogida. Los factores tróficos u otros derivados de células podrían ser recogidos a partir de células derivadas de tejido umbilical humano ex vivo y posteriormente introducidas en el paciente.

[0017] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical descritas en este documento son inducidas *in vitro* para diferenciarse en células de un linaje de condrocitos, y/o en células que muestran el fenotipo de una célula de anillo fibroso, una célula de núcleo pulposo, y/u otra célula de tipo IVD antes de, después de o simultáneamente con la administración de las células. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento comprenden además la etapa de inducir células derivadas de tejido del cordón umbilical para diferenciarse al menos parcialmente *in vitro*.---

[0018] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden manipularse genéticamente para expresar un producto de gen, tal como, pero no limitado a un producto génico que promueve la reparación y/o regeneración de los tejidos de IVD. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical están diseñadas genéticamente para expresar un factor trófico u otro producto génico. En algunas realizaciones, el producto del gen ejerce un efecto trófico o de otra manera modula las células derivadas de tejido del cordón umbilical, tipos de células adicionales administradas con células derivadas de tejido del cordón umbilical, células IVD endógenas, y/u otras células endógenas. En algunas realizaciones, el producto génico es un componente de la matriz extracelular o un agente que modula la matriz extracelular. En algunas realizaciones, el producto del gen estimula la expresión de una o más proteínas de matriz extracelular.

[0019] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran con al menos otro tipo de células, tales como, pero no limitado a una célula de anillo fibroso, una célula de núcleo pulposo, un fibroblasto, un condrocito, una célula madre mesenquimal, de células derivadas de tejido adiposo, u otro tipo de células madre multipotentes o pluripotentes. El al menos otro tipo de célula se puede administrar simultáneamente con, antes de, o después de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

[0020] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical y el hidrogel se administran con al menos un agente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran con un factor trófico, tal como, pero no limitados a, TGF-beta, GDF-5, TIMP 1, y PDGF-BB. En diversas realizaciones, el al menos un agente ejerce un efecto atrófico o de otra manera modula el células derivadas de tejido del cordón umbilical, uno o más tipos adicionales de células administradas con células del cordón umbilical, células derivadas de tejido IVD endógenas, y/u otras células endógenas. En algunas realizaciones, el al menos un agente estimula la expresión de una o más proteínas de matriz extracelular. Otros agentes incluyendo, pero no limitado a, agentes antiinflamatorios, agentes de supervivencia celular, agentes reductores del dolor y agentes inmunomoduladores. El agente puede administrarse simultáneamente con, antes de, o después de la administración de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

[0021] En diversos aspectos, las células pueden administrarse, ser dirigidas a administrarse o formularse para ser administradas por inyección en un IVD, incluyendo, por ejemplo, el núcleo pulposo y/o el anillo fibroso de un IVD degenerado. En algunas realizaciones, se administran células, dirigidas a administrarse o formularse para ser administradas de tal manera que las células se encapsulan dentro de un dispositivo implantable o por implantación de un dispositivo o matriz que comprende las células.

[0022] Otra realización de la invención es un método de tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con la degeneración del disco intervertebral, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende

al menos (1) un hidrogel y (2) una población homogénea aislada de células obtenida a partir de tejido del cordón umbilical humano a un disco intervertebral en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección, por lo que el tejido del cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en el que la población homogénea aislada de las células es capaz de autorrenovación, expansión en cultivo, y tiene el potencial para diferenciar y no expresar CD117 y/o telomerasa. La población homogénea aislada de células puede tener adicionalmente cualquiera de las siguientes características: (a) expresa reticulon, ligando de receptor de quimiocina 3, y la proteína de granulocitos quimiotáctica; (b) no produce CD31, CD34 ni HLA-DR; (c) expresa, con relación a fibroblastos humanos, células madre mesenquimales, o células de cresta ilíaca de la médula ósea, el aumento de los niveles de interleucina 8 y reticulon 1; y (d) expresa CD10, CD13, CD44, CD73, y CD90. En otra realización de la invención, la población homogénea aislada de células expresa receptor de lipoproteínas oxidadas de baja densidad 1, reticulon, ligando del receptor de quimioquinas 3, y/o proteína de granulocitos quimiotáctica. La composición se puede administrar mediante inyección. En una realización, la composición comprende además (a) al menos otro tipo de célula, que puede ser modificado genéticamente para expresar al menos un producto génico exógeno (como por ejemplo, un factor trófico), y/o (b) al menos un agente, tal como por ejemplo factor atrófico (por ejemplo TGF-beta, GDF-5, PDGF-BB y TIMP-1). En otra realización, la composición se administra en un disco intervertebral degenerado como el núcleo pulposo o en el anillo fibroso del disco intervertebral. La población aislada de células puede ser al menos parcialmente inducida a diferenciarse *in vitro* antes de la administración. En una realización de la invención, la población homogénea aislada de células es inducida para diferenciarse en células que muestran un fenotipo de células de anillo fibroso o en células que muestran un fenotipo celular núcleo pulposo.

[0023] La invención es un método de tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con la degeneración del disco intervertebral, que comprende administrar un hidrogel y una población homogénea aislada de células obtenida a partir de tejido del cordón umbilical humano a un disco intervertebral en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección, en la que el tejido del cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en donde la población homogénea aislada de las células es capaz de autorrenovación, expansión en cultivo, y tiene potencial para diferenciarse y no expresar CD117 y/o telomerasa. La población homogénea aislada de células puede tener adicionalmente cualquiera de las siguientes características: (a) expresa reticulon, ligando de receptor de quimiocina 3, y la proteína de granulocitos quimiotáctica; (b) no produce CD31, CD34 y HLA-DR; (c) expresa, con relación a fibroblastos humanos, células madre mesenquimales o célula de médula ósea de cresta ilíaca, aumento de los niveles de interleucina 8 y reticulon 1; y (d) expresa CD10, CD13, CD44, CD73, y CD90. En otra realización, la población homogénea aislada de células expresa lipoproteínas oxidadas de baja densidad del receptor 1, reticulon, ligando del receptor de quimioquinas 3 y la proteína quimiotáctica de granulocitos. El hidrogel y la población homogénea aislada de células se pueden administrar mediante inyección. El hidrogel se administra simultáneamente con, o antes de, o después de la población homogénea aislada de células obtenidas a partir de tejido del cordón umbilical humano. En una realización, la población homogénea aislada de células se administra dentro de un dispositivo implantable. En otra realización, el método además comprende la administración de al menos otro tipo de células simultáneamente con, o antes de, o después de la población homogénea aislada de células obtenidas a partir de tejido del cordón umbilical humano. El al menos otro tipo de célula puede modificarse por ingeniería genética para expresar al menos un producto génico exógeno (tal como el factor atrófico o un producto del gen exógeno que modula la expresión de una o más proteínas de matriz extracelular).

[0024] El método puede comprender además la administración de al menos un agente tal como por ejemplo un factor trófico (por ejemplo, TGF-beta, GDF-5, PDGF-BB y TIMP-1) que puede ejercer un efecto trófico sobre la población de células homogéneas aisladas obtenidas a partir de tejido del cordón umbilical humano. En algunas realizaciones, la población de células homogéneas aisladas e hidrogel se administran en un disco intervertebral degenerado como el núcleo pulposo del disco intervertebral o el anillo fibroso del disco intervertebral. En otras realizaciones, la población homogénea aislada de células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano son células pueden inducirse a diferenciarse en células que muestran un fenotipo de células de anillo fibroso o en células que muestran un fenotipo celular de núcleo pulposo.

[0025] Cualquier hidrogel conocido en la técnica (tales como los divulgados en el presente documento) pueden usarse para el método. En una realización, el hidrogel comprende fibrinógeno y trombina. En otra realización, el hidrogel comprende una cola de fibrina tal como, por ejemplo, cola de fibrina EVICEL® (sellador de fibrina EVICEL® (humano), Omrix Pharmaceuticals, Ltd.).

[0026] Las anteriores y otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027] El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderá mejor cuando se lea en conjunción con las figuras adjuntas. Para el propósito de ilustrar la invención, las cifras demuestran realizaciones de la presente invención.

[0028] Las Figuras 1 y 2 muestran imágenes de resonancia magnética de la columna vertebral lumbar (véase el Ejemplo 12). Imágenes de resonancia magnética Midsagital T2 ponderadas muestran discos sanos que aparecen en

el grupo de control. Los discos en el grupo pinchado sufren degeneración (oscurecimiento y pérdida de altura). Los discos en los grupos tratados se someten a menos evidencia de la degeneración de los discos en el grupo pinchado. En particular, las figuras 1 y 2 muestran imágenes de resonancia magnética de la columna vertebral lumbar ponderadas por muestra T2 de L1-2 por L5-6, en puntos de tiempo 0 (antes de la punción anular), 3 semanas (antes de la cirugía de la inyección), 6 semanas, y 12 semanas (antes del sacrificio). Los discos perforados (L2-3, L3-4, y L4-5) se describen por las cajas (L2-3, L3-4, L4-5 y de arriba a abajo). Los discos de control no perforados (L1-2 y L5-6) no muestran ninguna evidencia de degeneración. Los discos de la muestra de control no degeneran (Figura 1A), tal como se esperaba. Los discos perforados (Figura 1b) se hacen más pequeños y más oscuros en todos los puntos de tiempo, lo que sugiere la degeneración. Los discos que se perforaron y después se trataron con vehículo (Figura 1C), células + tampón (Figura 2A), y células + vehículo (Figura 2B), demuestran menos evidencia de degeneración en todos los puntos de tiempo en comparación con los discos perforados (Figura 1b).

[0029] La Figura 3 muestra imágenes de resonancia magnética ponderadas por T2 (área del disco e índice MRI) (véase el Ejemplo 12). En particular, la media de la zona NP IRM (Figura 3A) y el índice de IRM (Figura 3B) que combinan L2-3, L3-4 y L4-5 (los discos tratados) para cada grupo de conejo, expresado como un porcentaje del valor de tiempo 0, demuestran que el grupo perforado se somete a la mayor disminución en el área y el índice a través de puntos de tiempo, mientras que los grupos que se perforaron y posteriormente se trataron con el vehículo, las células en tampón (B + C), o células en vehículo (C + C) se someten a una menor disminución en área e índice. En la Figura 3,  $\pm$  indica la significación comparación con el control y \* indica importancia en comparación con la punción .. Además, el índice de IRM en la Figura 3 se determina como sigue:

Índice de imágenes de resonancia magnética = NP Area x señal de intensidad

[0030] La Figura 4 muestra curvas de desplazamiento promedio total normalizado (fase de rampa + fluencia) de L3-4 FSU después de 12 semanas (véase el Ejemplo 12). El desplazamiento dependiente del tiempo bajo una carga constante genera curvas de fluencia de distinta apariencia. Tampón + células se comporta más como vehículo pinchado + células se comporta más como control, vehículo solo cae en algún lugar en el medio. Las curvas promedias de fluencia se generaron para cada condición. Las pruebas axiales generan curvas de fluencia de apariencia distinta en la fase temprana de la prueba (tiempo de 0 a 200 segundos). Los límites de puntos representan el error estándar de medición. Las curvas generadas para la punción y tampón + células parecen similares, al igual que las curvas para el control y el vehículo + células. Cada uno de estos grupos aparece distinto de la curva generada para el grupo de vehículo.

[0031] Las figuras 5, 6 y 7 muestran la rodajas sagitales de histología de disco L4-5 obtenidas después del sacrificio a las 12 semanas para cada grupo de tratamiento, se tiñeron con H&E, ampliada 20x y 100x (véase Ejemplo 12). La Figura 5A muestra la rebanada sagital de histología de disco L4-5 para el grupo de control. La figura 5B muestra la rebanada sagital de histología de disco L4-5 para el grupo de pinchado. La Figura 6A muestra la rebanada sagital de histología de disco L4-5 para el grupo de vehículo. La figura 6B muestra la rebanada sagital de histología de disco L4-5 para el grupo de tampón y células. La Figura 7 muestra la rebanada sagital de histología de disco L4-5 para el grupo de soporte y células.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0032] Varios términos relacionados con los métodos y otros aspectos de la presente invención se utilizan en toda la memoria y las reivindicaciones. A tales términos se les debe dar su significado ordinario en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente se interpretarán de una manera coherente con la definición proporcionada en este documento.

[0033] Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

[0034] El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferiblemente  $\pm 5\%$ , incluso más preferiblemente  $\pm 1\%$ , y aún más preferiblemente  $\pm 0,1\%$  desde el valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos descritos.

[0035] "Derivado" se utiliza para indicar que las células se han obtenido a partir de su fuente biológica y crecido, se expandió en cultivo, se inmortalizaron, o se manipularon de otra manera *in vitro*.

[0036] "Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" de su estado natural. Si una molécula o composición se produce en la naturaleza, se ha "aislado" si se ha cambiado o retirado de su entorno original, o ambos.

[0037] El término "expresar", "expresado", o "expresión" de una molécula de ácido nucleico o gen se refiere a la biosíntesis de un producto génico, por ejemplo, la biosíntesis de un polipéptido.

[0038] Los "factores tróficos" son sustancias que promueven la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación, la

proliferación y/o la maduración de una célula, o estimulan una mayor actividad biológica de una célula. Derivados de células se refieren a cualquier material que se puede obtener a partir de células e incluyen medios de células acondicionadas, lisado celular, proteínas de matriz extracelular, factores tróficos, fracciones de células, membranas celulares.

- 5 [0039] "Degeneración" se refiere a cualquier daño físico, lesión, degeneración o trauma a un IVD.
- [0040] "Patología" se refiere a cualquier indicio estructural o funcional de una desviación del estado normal de una célula, tejido, órgano o sistema, según se mide mediante cualquier medio adecuado en la técnica.
- 10 [0041] Una "enfermedad" es cualquier desviación de o deterioro en la salud, condición, o el funcionamiento de una célula, tejido, órgano, sistema o organismo en su conjunto, según se mide mediante cualquier medio adecuado en la técnica.
- 15 [0042] "Tratar," tratando" o 'tratamiento' se refieren a cualquier éxito o indicio de éxito en la atenuación o mejora de la enfermedad, daño o condición, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión, disminución de síntomas o hacer la enfermedad, daño o condición más tolerable para el paciente, la desaceleración de la velocidad de degeneración o declive, haciendo que el punto final de la degeneración sea menos debilitante, o mejorando el bienestar físico o mental de un sujeto. El tratamiento o mejora de los síntomas se pueden basar en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico, examen neurológico y/o evaluaciones psiquiátricas.
- 20 [0043] "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una cantidad de un compuesto, material, o composición, tal como se describe en el presente documento eficaz para lograr un resultado biológico particular, tal como, pero no limitado a, los resultados biológicos descritos, se describe, o se ejemplifica en el presente documento. Tales resultados pueden incluir, pero no se limitan al tratamiento de la enfermedad IVD o daño en un sujeto, tal como se determina por cualquier medio adecuado en la técnica.
- 25 [0044] "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el paciente desde un punto de vista y para el químico farmacéutico fabricante desde un punto de vista físico/químico farmacológico/toxicológico respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y no es tóxico para el huésped al que se administra.
- 30 [0045] Se ha descubierto que las enfermedades y condiciones relacionadas con la degeneración del disco intervertebral (IVD) se pueden tratar mediante la administración de Células derivadas de tejido de cordón umbilical ZT y un hidrogel como se ha descrito en este documento. Ventajosamente, los métodos, composiciones y kits proporcionados en este documento promueven la reparación y la regeneración de IVDs degenerados, y de este modo alivian uno o más síntomas asociados con la degeneración IVD. Por consiguiente, en un aspecto, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD, que comprende la administración de Células derivadas de tejido de cordón umbilical a un IVD en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o condición.
- 35 [0046] En diversas realizaciones, la enfermedad o condición relacionada con la degeneración de IVD puede ser causada o inducida por la edad, trauma, autoinmunidad, reacción inflamatoria, un defecto genético, la deposición de inmunocomplejo (por ejemplo, formación de tejido de cicatriz), y/o combinaciones de los mismos. Un IVD seleccionada para tratamiento puede ser intacto o en cualquier etapa de daño o degeneración. Por ejemplo, un IVD seleccionada para tratamiento puede ser herniada (por ejemplo, donde una porción del anillo fibroso tiene una protuberancia u otro saliente), rota (por ejemplo, donde al menos una porción del anillo fibroso se rompe, lo que resulta en una disminución de la presión y/o el volumen del núcleo pulposo), deslaminada (por ejemplo, donde dos o más capas del anillo fibroso se han separado), y/o se ha dañado o degenerado (por ejemplo, donde el anillo fibroso tiene fisuras, grietas, lágrimas, o similares, y/o donde la matriz extracelular se degrada o altera).
- 40 [0047] En diversas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran a un IVD degenerado, por ejemplo por inyección, trasplante, implante, inyección o la administración de un complejo de célula de matriz, o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar la terapia celular. En algunas realizaciones, las células se administran directamente al anillo fibroso y/o en el núcleo pulposo del IVD. En algunas realizaciones, las células se administran a un IVD indirectamente. Por ejemplo, las células pueden estar en un vehículo acuoso, encapsulado en un dispositivo o se siembran en una matriz, que se implanta a continuación en o cerca de un IVD degenerado. Los vehículos acuosos incluyen, pero no se limitan a soluciones de tampón fisiológicas, tales como solución salina tamponada, solución salina tamponada con fosfato, solución de sales equilibradas de Hank, solución salina tamponada con Tris y solución salina tamponada con Hepes. En diversas realizaciones, un dispositivo, matriz, u otro depósito celular se pueden implantar de manera que se unen a una pared exterior del anillo fibroso, o sitúan fuera de, pero junto a una pared del anillo fibroso, o adyacente a una placa terminal de un cuerpo vertebral que rodea la IVD.
- 45  
50  
55  
60  
65

[0048] En algunas realizaciones, las células se administran en la forma de un dispositivo tal como un complejo de células de matriz. Materiales de dispositivos incluyen, pero no se limitan a materiales biorreabsorbibles tales como colágenos, 35/65 poli(epsilon-caprolactona)(PCL)/poli(ácido glicólico) (PGA), construcciones bioabsorbibles PANACRYL™, VICRYL™ poliglactina 910, y péptidos de automontaje y materiales no reabsorbibles tales como fluoropolímeros (por ejemplo, fluoropolímeros de TEFLON®), plástico y metal. Matrices incluyen andamios biocompatibles, celosías, estructuras de automontaje y similares, ya sean bioabsorbibles o no, líquido, gel o sólido. Tales matrices se conocen en la técnica del tratamiento terapéutico de células, la reparación quirúrgica, la ingeniería de tejidos y curación de heridas. Preferiblemente, las matrices se tratan previamente con las células terapéuticas. Más preferiblemente, las matrices están pobladas con células en estrecha asociación con la matriz o sus espacios. Las células pueden adherirse a la matriz o pueden atraparse o contenerse dentro de la matriz sus espacios. Los más preferidos son complejos de células de matriz en los que las células están creciendo en estrecha asociación con la matriz y cuando se utiliza terapéuticamente, el crecimiento, reparación y/o regeneración de las propias células IVD del paciente es estimulado y apoyado, y la angiogénesis adecuada es estimulada o apoyada de manera similar. Las composiciones células de matriz pueden introducirse en el cuerpo de un paciente de cualquier modo conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitados a la implantación, inyección, fijación quirúrgica, trasplante con otro tejido, y similares. En algunas realizaciones, las matrices se forman *in vivo*, o incluso más preferiblemente *in situ*, por ejemplo geles polimerizables *in situ* se pueden utilizar de acuerdo con la invención. Ejemplos de tales geles se conocen en la técnica.

[0049] Células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran a un IVD degenerada como parte de una composición que comprende un hidrogel. En otra realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran a un IVD degenerada junto con un hidrogel.

[0050] Las células descritas en este documento también pueden sembrarse en matrices tridimensionales, tales como andamios y se implantan *in vivo*, donde las células sembradas pueden proliferar sobre o en el marco, o ayudar a establecer tejido de reemplazo *in vivo* con o sin la cooperación de otras células. El crecimiento de las células derivadas de tejido del cordón umbilical en el marco tridimensional de resultados de preferencia en la formación de un tejido tridimensional, o fundación del mismo, que puede utilizarse *in vivo*, por ejemplo para reparar y/o regenerar tejido dañado o enfermo.

[0051] Las células pueden sembrarse en un marco tridimensional o matriz, tal como un andamio, una espuma, un andamio electrostáticamente por hilado, un andamio no tejido, micropartículas porosas o no porosas, o hidrogel y se administran en consecuencia. El marco se puede configurar en varias formas, tales como la tubular sustancialmente plana, sustancialmente cilíndrica o, o puede ser completamente de forma libre como puede requerirse o desearse para la estructura correctiva bajo consideración. Dos o más marcos sustancialmente planos se pueden colocar uno encima de otro y asegurarse juntos como sea necesario para generar un marco de múltiples capas.

[0052] En tales marcos tridimensionales, las células pueden coadministrarse con otros tipos de células, u otros progenitores de tipo de tejidos blando, incluyendo las células madre. Cuando se cultivan en un sistema tridimensional, las células proliferantes pueden madurarse y segregarse apropiadamente para formar componentes de tejidos adultos análogos a las contrapartes encontradas naturalmente *in vivo*.

[0053] Las matrices descritas y ejemplificadas en el presente documento pueden diseñarse de tal manera que la estructura de la matriz soporta las células derivadas de tejido del cordón umbilical sin degradación posterior, apoya a las células desde el momento de la siembra hasta que el trasplante de tejido se remodela por el tejido del huésped, o permite que las células sembradas se adjunten, se proliferen, y se desarrollen en una estructura de tejido que tiene suficiente integridad mecánica para apoyarse *in vitro*, en cuyo momento, la matriz se degrada.

[0054] Las matrices, andamios, tales como espumas de materiales no tejidos, estructuras electrostáticamente hiladas, micropartículas y sistemas de automontaje contemplados para uso en esta invención pueden implantarse en combinación con una o más células, factores de crecimiento, medicamentos u otros componentes, tales como agentes bioactivos que promueven cicatrización, regeneración, reparación o crecimiento de tejido, o estimulan la vascularización o la inervación de la misma o de otra manera aumentan o mejoran el resultado terapéutico o la práctica de la invención, además de las células de la invención.

[0055] En algunas realizaciones, las células descritas en este documento se pueden cultivar libremente en cultivo, eliminarse del cultivo e inocularse en un marco tridimensional. La inoculación del marco tridimensional con una concentración de células, por ejemplo, aproximadamente  $10^6$  a  $5 \times 10^7$  células por mililitro, se traduce preferiblemente en el establecimiento del soporte tridimensional en periodos relativamente cortos de tiempo. Además, en algunas aplicaciones puede ser preferible utilizar un número mayor o menor de células dependiendo del resultado deseado.

[0056] En algunos aspectos, es útil recrear en el cultivo el microambiente celular encontrado *in vivo*, de tal manera que el grado en que las células se cultivan antes de la implantación *in vivo* o *in vitro* utilizado puede variar. Las células pueden ser inoculadas en el marco antes o después de formar la forma deseada para la implantación, por ejemplo, cuerdas, tubos, filamentos, y similares. Después de la inoculación de las células sobre el marco, el marco

se incubaba preferiblemente en un medio de crecimiento apropiado. Durante el período de incubación, las células inoculadas crecerán y envolverán el marco y pueden, por ejemplo abarcar, o parcialmente abarcar los espacios intersticiales. Es preferible, pero no necesario cultivar las células a un grado apropiado, que refleja la densidad celular *in vivo* de tejido que está siendo reparado o regenerado. En otras realizaciones, la presencia de las células, incluso en números bajos en el marco estimula el crecimiento hacia dentro de las células sanas endógenas para facilitar la curación, por ejemplo, del tejido dañado o lesionado.

[0057] Ejemplos de matrices, por ejemplo andamios, que pueden usarse incluyen esteras, espumas porosas o semiporosas, péptidos de automontaje y similares. Esterillas no tejidas pueden, por ejemplo, formarse usando fibras compuestas de polímeros naturales o sintéticos. En una realización preferida, los copolímeros absorbibles de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), que se venden bajo el nombre comercial VICRYL™ (Ethicon, Inc., Somerville, NJ) se utilizan para formar una estera. Espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(epsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procesos tales como liofilización, o liofilización, como se discute en la patente de Estados Unidos N° 6.355.699, también puede servir como andamios.

[0058] Los geles se utilizan en este documento. Ejemplos de geles incluyen geles inyectables, en geles polimerizables *in situ*, e hidrogeles; geles pueden estar compuestos de péptidos de automontaje. Estos materiales se utilizan frecuentemente como soportes para el crecimiento de tejido. Por ejemplo, cuando se usa como un gel inyectable, un gel puede estar compuesto por agua, solución salina o solución tamponada fisiológica y un material gelificante. materiales gelificantes incluyen, pero no se limitan a proteínas, tales como, colágeno, elastina, trombina, fibronectina, gelatina, fibrina, tropoelastina, polipéptidos, laminina, proteoglicanos, cola de fibrina, coágulo de fibrina, coágulo de plasma rico en plaquetas (PRP), coágulo de plasma pobre en plaquetas (PPP), hidrogeles de péptidos de automontaje, y atelocolágeno; polisacáridos tales como, pectina, celulosa, celulosa oxidada, quitina, quitosano, agarosa, ácido hialurónico; polinucleótidos tales como ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos, y otros tales como, alginato, alginato reticulado, poli(N-isopropilacrilamida), poli(oxialquileño), copolímeros de poli(óxido de etileno) poli(óxido de propileno), poli(alcohol vinílico), poli(acrilato), monostearoilglicerol co-succinato/polietileno glicol (MGS/PEG) copolímeros y combinaciones de los mismos. En una realización, el material de gelificación (es decir, el hidrogel) comprende fibrinógeno (factor I), tal como por ejemplo fibrinógeno recombinante o fibrinógeno purificado a partir de sangre. En otra realización el hidrogel comprende fibrinógeno y trombina. En aún otra realización, el gel es cola de fibrina EVICEL® (sellador de fibrina EVICEL® (humano), Omrix Pharmaceuticals, Ltd.) (BAC2 (fibrinógeno) y trombina).

[0059] En general, los hidrogeles son materiales poliméricos reticulados que pueden absorber más de 20% de su peso en agua mientras se mantiene una estructura tridimensional distinta. Además, los hidrogeles tienen una alta permeabilidad para el oxígeno, nutrientes y otros metabolitos solubles en agua. Esta definición incluye polímeros reticulados en seco que se hinchan en medios acuosos, así como materiales hinchados por agua. Una gran cantidad de polímeros hidrófilos se puede reticular para producir hidrogeles, si el polímero es de origen biológico, semisintético o totalmente sintético. El hidrogel puede ser producido a partir de un material polimérico sintético. Tales polímeros sintéticos se pueden adaptar a una amplia gama de propiedades y uniformidad lote a lote predecible, y representan una fuente fiable de material que generalmente está libre de preocupaciones de inmunogenicidad. En una realización de la invención, los hidrogeles se forman a partir de péptidos de automontaje, como los discutidos en la patente de los Estados Unidos N°s 5.670.483 y 5.955.343, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2002/0160471, la Solicitud PCT N° WO 02/062969.

[0060] Propiedades que hacen que los hidrogeles sean particularmente valiosos como una matriz en esta invención incluyen el grado de hinchamiento de equilibrio, la cinética de sorción, la permeabilidad de solutos, y sus características de rendimiento *in vivo*. La permeabilidad a los compuestos depende en parte del grado de inflamación o contenido de agua y la velocidad de biodegradación. Puesto que la resistencia mecánica de una disminución de gel en proporción directa con el grado de inflamación, sino que también está dentro de la contemplación de la presente invención que el hidrogel se pueda unir a un sustrato de modo que el sistema compuesto mejore la resistencia mecánica. En realizaciones alternativas, el hidrogel se puede impregnar dentro de un sustrato poroso, para obtener la resistencia mecánica del sustrato, junto con las propiedades de administración útil del hidrogel.

[0061] Redes degradables de formación *in situ* también son adecuadas para uso en la invención (véase, por ejemplo, Anseth, K.S. *et al.*, *J. Controlled Release*, 2002; 78: 199-209; Wang, D. *et al.*, *Biomaterials*, 2003; 24:3969-3980, Publicación de patente de EE.UU. 2002/0022676 a He *et al.*). Estos materiales se formulan como fluidos adecuados para inyección, y luego pueden inducirse por una variedad de medios (por ejemplo, cambio en la temperatura, pH, exposición a la luz) para formar redes de hidrogel degradables *in situ* o *in vivo*.

[0062] El marco puede ser un fieltro, que puede estar compuesto de un hilo de multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros de PGA, PLA, PCL o mezclas, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro utilizando técnicas de procesamiento textil estándar que consta de engaste, corte, cardado y punción. Las células de la invención pueden sembrarse en los andamios de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Además, el marco tridimensional puede ser moldeado en una forma útil, tal como una estructura específica en o alrededor del IVD a repararse, reemplazarse, o aumentarse.

[0063] El marco puede ser tratado antes de la inoculación de las células de la invención con el fin de mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación con las células de la invención, las matrices de nylon pueden ser tratadas con ácido acético 0,1 molar y se incubaron en polilisina, PBS, y/o colágeno para recubrir el nylon. El poliestireno puede ser tratado de forma similar utilizando ácido sulfúrico.

[0064] Además, las superficies externas del marco tridimensional pueden ser modificadas para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tales como por recubrimiento de plasma del marco o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, pero no limitado a, gelatina, alginatos, agar, agarosa, y gomas vegetales, entre otros.

[0065] El andamio puede estar compuesto de o tratado con materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a los materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal, tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN® (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, CA). Estos materiales pueden ser tratados adicionalmente para hacer que el andamio sea no trombogénico. Tales tratamientos incluyen agentes antitrombóticos tales como heparina, y tratamientos que alteran la carga superficial del material tal como recubrimiento por plasma.

[0066] Diferentes proporciones de los diferentes tipos de colágeno, por ejemplo, depositados sobre el marco pueden afectar el crecimiento de células de tejido específico u otras que pueden inocularse más tarde en el marco o que pueden crecer sobre la estructura *in vivo*. Alternativamente, el marco puede inocularse con una mezcla de células que sintetizan los tipos de colágeno adecuados deseados. Dependiendo del tejido a cultivar, el tipo de colágeno apropiado para inocularse en el marco o producirse por las células sembradas pueden seleccionarse. Por ejemplo, las cantidades relativas de las fibras colágenas y elásticas presentes en el marco pueden modularse mediante el control de la relación de células productoras de colágeno para células productoras de elastina en el inóculo inicial.

[0067] El marco tridimensional sin semillas o inoculado puede ser para el trasplante o la implantación de cualquiera de las células cultivadas obtenidas a partir de la matriz o la propia matriz cultivada *in vivo*. Los andamios tridimensionales pueden usarse para reemplazar o aumentar el tejido existente, para introducir tejido nuevo o alterado, para modificar prótesis artificiales, o unir tejidos o estructuras biológicas.

[0068] Las células se pueden administrar (por ejemplo, inyectar) en una IVD a través de una aguja, tal como una pequeña aguja de calibre. En algunas formas de realización, la aguja tiene un diámetro de alrededor de calibre 22 o menos, a fin de mitigar la posibilidad de herniar la IVD. Cuando la inyección de volúmenes en el núcleo pulposo, es deseable que el volumen de fármaco suministrado sea no más de aproximadamente 3 ml, preferiblemente no más de aproximadamente 1 ml, más preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5 ml. Cuando se inyecta en estas cantidades más pequeñas, se cree que el volumen añadido no causará un aumento de presión apreciable en el núcleo pulposo. Si el volumen de la inyección directa de la formulación es suficientemente alto para provocar que una preocupación de la sobrepresurización del núcleo pulposo, entonces se prefiere que al menos una porción del núcleo pulposo se retire antes de la inyección directa. En algunas realizaciones, el volumen de núcleo pulposo eliminado es sustancialmente similar al volumen de la formulación a inyectar. Por ejemplo, el volumen de núcleo pulposo eliminado puede estar dentro de aproximadamente 80-120% del volumen de la formulación a inyectarse. En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se concentran antes de administrarse.

[0069] Las células útiles en los métodos, composiciones y kits proporcionados en este documento se pueden derivar de cordón umbilical de mamífero recuperado en o poco después de la terminación de cualquiera de un embarazo a término o prematuro, por ejemplo, después de la expulsión después del nacimiento o la extirpación quirúrgica después de una cesárea. Sangre y residuos se eliminan del tejido del cordón umbilical antes del aislamiento de las células, por ejemplo, por lavado con cualquier medio o tampón adecuado.

[0070] Las células pueden aislarse de tejido del cordón umbilical por la fuerza mecánica o por digestión enzimática. Las enzimas preferidas son las metaloproteasas, proteasas neutras y proteasas mucolíticas. Por ejemplo, varias combinaciones de colagenasa, dispasa, y la hialuronidasa se pueden utilizar para disociar las células del tejido del cordón umbilical. 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 adecuadas para uso en los presentes procedimientos. Otras fuentes de enzimas son conocidas, y el experto en la técnica también puede obtener tales enzimas directamente desde sus fuentes naturales. El experto en la técnica también se bien preparado para evaluar enzimas nuevas o adicionales o combinaciones de enzima para su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Tratamientos enzimáticos preferidos son 0,5, 1, 1,5, o 2 horas de duración o más.

[0071] Las células aisladas se pueden utilizar para iniciar cultivos celulares. Las células aisladas se transfirieron a

recipientes de cultivo de tejidos estériles o bien no recubiertos o recubiertos de matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (nativo desnaturalizado, atelo, o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular. Células derivadas de tejido del cordón umbilical se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sostener el crecimiento de las células tales como, pero no limitados a, DMEM (glucosa alta o baja), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), Medio de Hayflick, Medio de Dulbecco modificado por Iscove, Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, y CELL-GRO-FREE. El medio de cultivo se puede complementar con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero bovino fetal, preferiblemente alrededor de 2-15% (v/v); suero equino; suero humano; suero de ternera fetal; betamercaptoetanol, preferiblemente de aproximadamente 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF) y eritropoyetina; aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solo o en combinación.

[0072] Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. En una realización, las células se cultivaron a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO<sub>2</sub> en aire. En algunas realizaciones, las células se cultivaron a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento O<sub>2</sub> en el aire, preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento O<sub>2</sub> en el aire. Las células preferiblemente se cultivan a aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C y más preferiblemente se cultivan a 37°C. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical se cultivan preferiblemente bajo estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con la adición de glutatión, vitamina C, catalasa, vitamina E, N-acetilesteína), lo que significa ningún o poco daño de radicales libres a las células cultivadas.

[0073] Células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden pasarse o eliminarse a un recipiente de cultivo separado que contiene medio fresco del mismo o de diferente tipo que el utilizado inicialmente, donde la población de células se puede expandir mitóticamente. Las células de la invención se pueden usar en cualquier punto entre el paso 0 y la senescencia. Las células preferiblemente se pasan entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, se pasan más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferiblemente se pasan 10 o 11 veces. La clonación y/o subclonación se pueden realizar para confirmar que una población clonal de las células ha sido aislada.

[0074] En una realización de la invención, las células pueden ser cultivadas (expandidas) en un microvehículo. Los microsoportes son partículas, perlas o gránulos útiles para la unión y crecimiento de células dependientes de anclaje en cultivo. Los microvehículos pueden ser sólidos, porosos o un núcleo sólido con un revestimiento poroso. Microvehículos adecuados ejemplares incluyen, pero no se limitan a Cytodex 1®, Cytodex 2®, Cytodex 3® (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway NJ) o HILLEX® (SoloHill Engineering, Inc. Ann Arbor, MI). Microvehículos adecuados ejemplares y componentes microvehículos se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2008/016632.

[0075] Diferentes tipos de células presentes en el tejido del cordón umbilical pueden fraccionarse en subpoblaciones. Esto puede conseguirse usando técnicas estándar para la separación celular incluyendo, pero no limitado al tratamiento enzimático; clonación y selección de tipos celulares específicos, por ejemplo pero no limitado a la selección basada en marcadores morfológicos y/o bioquímicos; el crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mezclada como, por ejemplo, con la aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación contra streaming); unidad de separación por gravedad; distribución en contracorriente; electroforesis; por fluorescencia de células activadas (FACS); y similares.

[0076] Ejemplos de células aisladas de tejido del cordón umbilical se depositaron en la American Type Culture Collection el 10 de junio de 2004, y se asignan números de acceso ATCC de la siguiente manera: (1) a la designación de la cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el N° de Acceso PTA6067; y (2) a la designación de la cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el N° de Acceso PTA6068.

[0077] Las células de la médula derivadas de tejido umbilical pueden ser caracterizadas por, por ejemplo, las características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo, pasajes a la senescencia de duplicación), análisis cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos), perfiles de expresión génica (por ejemplo, ensayos de chips de genes; reacción de cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteínas (por ejemplo, por ensayo de coagulación de plasma o el análisis de medio condicionado PDC, por ejemplo, por ensayo inmunoenzimático (ELISA)), reacción mixta de linfocitos (por ejemplo,

como medida de la estimulación de PBMCs), y/u otros métodos conocidos en la técnica.

[0078] En diversos aspectos, las células derivadas de tejido del cordón umbilical tienen una o más de las siguientes características de crecimiento: requerir L-valina para el crecimiento en cultivo; son capaces de crecimiento en atmósferas que contengan oxígeno de aproximadamente 5% a al menos aproximadamente 20%; tienen el potencial de por lo menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de llegar a la senescencia; y/o adjuntar y expandir en un recipiente de cultivo de tejido revestido o no revestido, en el que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

[0079] En algunas realizaciones, las células tienen un cariotipo normal, que se mantiene como se pasan las células. El cariotipo es particularmente útil para identificar y distinguir las células neonatales de las maternas derivadas de placenta. Los métodos para la determinación del cariotipo están disponibles y conocidos por los expertos en la técnica.

[0080] En algunas realizaciones, las células pueden ser caracterizadas por la producción de ciertas proteínas, incluyendo la producción de al menos uno de factor tisular, vimentina, y actina de músculo liso alfa; y la producción de al menos uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFRalfa, PD-L2 y HLA-A, B, marcadores de superficie celular de C, tal como se detecta mediante, por ejemplo, citometría de flujo. En otras realizaciones, las células pueden ser caracterizadas por la falta de producción de al menos uno de marcadores de superficie celular CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR, HLA-DP, y/o HLA-DQ, tal como se detecta por cualquier medio adecuado, tales como citometría de flujo. En algunas realizaciones, las células que producen al menos dos de factor tisular, vimentina, y actina de músculo liso alfa se prefieren. En algunas realizaciones, se prefieren células que producen tres del factor de proteínas de tejido, vimentina, y actina de músculo liso alfa.

[0081] En algunas realizaciones, las células tienen, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, el aumento de expresión de un gen que codifica al menos una de la interleucina 8; reticulon 1; quimiocinas (CXC motivo) ligando 1 (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa); quimiocina (motivo CXC) ligando 6 (granulocitos de proteína quimiotáctica 2); quimiocina (motivo CXC) ligando 3; factor de necrosis tumoral, proteína inducida alfa 3.

[0082] En aún otras realizaciones, las células tienen, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, la reducción de expresión de un gen que codifica al menos uno de: homeobox de estatura corta 2; choque térmico de 27 kDa proteína 2; quimiocinas (motivo CXC) ligando 12 (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supraválvular, síndrome de WilliamsBeuren); *Homo sapiens* ARNm; ADNc DKFZp586M2O22 (a partir del clon DKFZp586M2O22); homeobox mesénquimo 2 (homeobox de crecimiento de detención específica); homólogo homeobox sine oculis 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado desaliñado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión del plasminógeno); homología src tres (SH3) y dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado runt 3; receptor de interleucina 11, alfa; promotor de procolágeno cendopeptidasa; homólogo de frizzled 7 (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína homeobox Iroquois 5; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína de vesícula sináptica 2; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión de factor de crecimiento de la insulina 2, 36kDa; *Homo sapiens* ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor de tipo receptor de citoquina 1; potasio intermedio/pequeña conductancia del canal activado por calcio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo homeobox sine oculis 2 (*Drosophila*); proteína KIAA1034; proteína de membrana asociada a vesícula 5 (miobrevina); proteína de la matriz extracelular de tipo fibulina que contiene EGF 1; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox no distal 5; proteína hipotética FLJ20373; reductasa aldocoeto familia 1, miembro C3 (deshidrogenasa hidroxiesteroide 3-alfa, tipo II); biglicano; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de tipo EGF de repetición); *Homo sapiens* ARNm de longitud completa de ADNc inserto del clon Euroimage 1968422; EphA3; proteína K1AA0367; receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (péptido atrionatriurético receptor C); proteína hipotética FLJ14054; *Homo sapiens* ARNm; ADNc DKFZp564B222 (a partir del clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus E1B 19kDa proteína de interacción de tipo 3; AE proteína de unión 1; y el citocromo c oxidasa subunidad VIIa polipéptido 1 (músculo).

[0083] En algunas realizaciones, las células pueden ser caracterizadas por la secreción de al menos una de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HBEGF, BDNF, TPO, MIP1b, RANTES, y TIMP-1. En algunas realizaciones, las células pueden ser caracterizadas por la falta de secreción de al menos una de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1a y VEGF, como se detecta por ELISA.

[0084] En algunas realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más de las características anteriormente enumeradas de crecimiento, producción de marcadores de proteína/superficie, expresión génica o secreción de sustancias. En algunas realizaciones, las células que comprende, tres, cuatro, o cinco o más de las características preferidas. En algunas realizaciones, las células comprenden seis, siete, u ocho o más de las características preferidas. En algunas realizaciones, se prefieren las células que comprenden la totalidad de las características

anteriores. En otras realizaciones, las células derivadas del cordón umbilical tienen cualquiera de las características descritas en la patente de Estados Unidos N<sup>os</sup> 7.510.873 y 7.524.489.

5 [0085] Entre las células que se prefieren para su uso con los diversos aspectos de la invención están las células que tienen las características descritas anteriormente, y más particularmente aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con pases, y donde las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-A,B,C, donde las células producen las proteínas inmunológicamente detectables que corresponden a los marcadores enumerados. También se prefieren aquellas células que, además de lo anterior, no producen proteínas correspondientes a cualquiera de los marcadores CD31, 10 CD34, CD45, C117, CD141, o HLA-DR,DP,DQ, tal como se detecta por cualquier medio adecuado en la técnica, tal como citometría de flujo. Muy preferidas son las células que no expresan CD117 o HLA-DR o telomerasa.

15 [0086] En algunos aspectos preferidos, los métodos comprenden la administración de un hidrogel y células obtenidas o aisladas a partir de tejido del cordón umbilical humano a un IVD degenerado, en el que las células son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, requieren L-valina para el crecimiento, pueden crecer en al menos aproximadamente 5% de oxígeno, no producen CD117 o HLA-DR o telomerasa, expresan actina de músculo liso alfa, y expresan, con relación a fibroblastos humanos, células madre mesenquimales o célula de médula ósea de cresta ilíaca, aumento de los niveles de interleucina 8 y reticulon 1. Las células aisladas de tejido de cordón umbilical humano pueden expandirse en cultivo antes de la administración. En algunas realizaciones, las células 20 obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano tienen el potencial de diferenciarse en células de un fenotipo IVD, tales como, pero no limitado a, un fenotipo de células de anillo fibroso o un fenotipo de células del núcleo pulposo. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden integrarse en IVD del paciente, o, alternativamente, pueden proporcionar soporte para el crecimiento o la estimulación para diferenciar células madre IVD naturalmente presentes. La supervivencia de las células administradas no es determinante del éxito o resultados de su uso donde hay una mejora en la enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD y/o la salud 25 general del paciente. En algunas realizaciones, las células preferiblemente al menos parcialmente integran, se multiplican, o sobreviven en el paciente. En algunas realizaciones, el paciente experimenta los beneficios de la terapia, por ejemplo de la capacidad de las células para apoyar el crecimiento de otras células, incluyendo las células madre o células progenitoras presentes en el IVD y/o los tejidos circundantes, desde el crecimiento interno del tejido o la vascularización del tejido, y/o de la presencia de factores beneficiosos celulares, quimiocinas, citocinas y similares, pero las células no se integran o se multiplican en el paciente. En algunos aspectos, el paciente se beneficia del tratamiento terapéutico con las células, pero las células no sobreviven por un período prolongado en el paciente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células disminuyen gradualmente en número, la viabilidad o la actividad bioquímica. En algunas realizaciones, una disminución de este tipo puede ser precedida por un periodo de 30 actividad, por ejemplo el crecimiento, división o actividad bioquímica. En algunas realizaciones, células senescentes, no viables o incluso muertas son capaces de tener un efecto terapéutico beneficioso.

35 [0087] Ciertas células que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de las líneas que conducen a diferentes fenotipos son inestables y por lo tanto pueden diferenciarse espontáneamente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se prefieren las células que no se diferencian de forma espontánea. Por ejemplo, algunas células preferidas, cuando se cultivan en medio de crecimiento, son sustancialmente estables con respecto a los marcadores de células producen en su superficie, y con respecto al patrón de expresión de diversos genes, por ejemplo como se determina usando perfiles de expresión génica usando, por ejemplo, ácido nucleico o ensayos de polipéptidos. Tales células permanecen sustancialmente constantes, por ejemplo en sus características de marcador 40 de superficie, sobre los pases, a través de múltiples duplicaciones de la población.

45 [0088] En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento inducen a las células derivadas de tejido del cordón umbilical para diferenciarse a lo largo de una vía celular IVD, hacia fenotipos de células IVD, o progenitores o parientes más primitivos de los anteriores. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden integrarse en IVD del paciente, o, alternativamente, pueden proporcionar soporte para el crecimiento o la estimulación de diferenciar para células madre IVD naturalmente presentes. La supervivencia de las células administradas no es determinante del éxito o los resultados de su uso donde hay mejora en la enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD y/o la salud general del paciente. En algunas realizaciones, las células preferiblemente al menos parcialmente integran, se multiplican, o sobreviven en el paciente. En algunas 50 realizaciones, el paciente experimenta los beneficios de la terapia, por ejemplo de la capacidad de las células para apoyar el crecimiento de otras células, incluyendo las células madre o células progenitoras presentes en el IVD y/o los tejidos circundantes, desde el crecimiento interno del tejido o la vascularización del tejido, y/o la presencia de factores beneficiosos celulares, quimiocinas, citocinas y similares, pero las células no se integran o se multiplican en el paciente. En algunos aspectos, el paciente se beneficia del tratamiento terapéutico con las células, pero las células no sobreviven por un período prolongado en el paciente. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células disminuyen gradualmente en número, la viabilidad o la actividad bioquímica. En algunas realizaciones, una disminución de este tipo puede ser precedida por un periodo de actividad, por ejemplo el crecimiento, división o actividad bioquímica. En algunas realizaciones, células senescentes, no viables o incluso muertas son capaces de tener un efecto terapéutico beneficioso. 55

60 [0089] Los métodos comprenden además la evaluación del paciente para mejoras en la estructura y/o función IVD, 65

y/o mejoras en la salud en general. Tales evaluaciones pueden proceder de acuerdo a cualquier medio adecuado en la técnica, incluyendo los descritos y ejemplificados en el presente documento.

[0090] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran conjuntamente con uno o más de otros tipos de células, incluyendo, pero no limitado a, otras células multipotentes o pluripotentes, o condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células que recubren el hueso, o células de médula ósea. Las células de diferentes tipos se pueden mezclar con las células derivadas de tejido del cordón umbilical inmediatamente o poco antes de la administración, o se pueden cocultivar juntos durante un período de tiempo antes de la administración. En algunas realizaciones, una población de células derivadas de tejido del cordón umbilical apoya la supervivencia, proliferación, el crecimiento, el mantenimiento, la maduración, la diferenciación, y/o el aumento de la actividad de uno o más de otros tipos de células administradas en conjunción con las células derivadas de tejido del cordón umbilical, y/o vice versa.

[0091] Células derivadas de tejido del cordón umbilical proporcionan soporte trófico a otros tipos de células con las que se administran, y/o viceversa. En algunas realizaciones, es deseable que las células derivadas de tejido del cordón umbilical y las células cocultivadas estén en contacto. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la siembra de las células como una población heterogénea de células en medio de cultivo o sobre un sustrato de cultivo adecuado. Alternativamente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical primera pueden cultivarse hasta la confluencia y se emplea como un sustrato para las células cocultivadas. En otras realizaciones, las células cocultivadas pueden cultivarse en contacto con un medio acondicionado, matriz extracelular y/o lisado celular de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

[0092] Células derivadas de tejido del cordón umbilical se pueden administrar en combinación con un agente biológicamente activo, tal como un agente que modula la proliferación, diferenciación, y/o otras actividades celulares. El agente puede administrarse antes, después, o simultáneamente como las células derivadas de tejido del cordón umbilical. El agente particular elegido puede ser a discreción del profesional médico que dirige el tratamiento del paciente, y puede variar de acuerdo a las necesidades particulares o la condición del paciente. El agente elegido puede utilizarse para diversos fines, tales como, pero no limitado a, la facilitación de la administración de las células, la mejora de la reparación y/o regeneración de la IVD, la mejora de la salud general del paciente, la reducción del dolor, la reducción o la prevención del rechazo de las células trasplantadas, y similares.

[0093] Los ejemplos de agentes que pueden administrarse con células derivadas de tejido del cordón umbilical incluyen, pero no se limitan a, vitaminas y otros suplementos nutricionales; agentes antitrombogénicos; agentes antiapoptóticos; agentes antiinflamatorios; inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, rapamicina); antioxidantes; hormonas; glicoproteínas; fibronectina; péptidos y proteínas; hidratos de carbono (simples y/o complejos); proteoglicanos; oligonucleótidos (ADN y/o ARN sentido y/o antisentido); proteínas morfogenéticas óseas (BMPs); factores de diferenciación; anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos a agentes infecciosos, tumores, fármacos u hormonas); y reactivos de terapia génica. En algunas realizaciones, el agente es una sustancia, tal como un analgésico, antiinflamatorio, narcótico, relajante muscular, o una combinación de los mismos que alivia uno o más síntomas de una enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD.

[0094] En algunas realizaciones, el agente adicional es un factor trófico u otro agente que ejerce un efecto trófico contra las células derivadas de tejido del cordón umbilical, frente a células adicionales administradas con las células derivadas de tejido del cordón umbilical, contra las células IVD endógenas (por ejemplo, células de anillo fibroso, células de núcleo pulposo), y/o contra otras células endógenas (por ejemplo, células progenitoras de tejido conectivo). En algunas realizaciones, el factor trófico es uno que es secretado por las células derivadas de tejido del cordón umbilical, en cuyo caso se puede derivar a partir de preparaciones de tales Células derivadas de tejido de cordón umbilical o de otra fuente. Ejemplos de tales factores o agentes incluyen, pero no se limitan a, los miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF1 y FGF2) y FGF4; miembros del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), incluyendo PDGF-AB, PDGF-BB y PDGF-AA; EGF, miembros del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), incluyendo IGF-I y II; la superfamilia TGF-beta, incluyendo TGF-beta1, 2 y 3 (incluyendo MP52), factor inductor de osteoide (OIF), angiogenina, endotelinas, factor de crecimiento de hepatocitos y factor de crecimiento de queratinocitos; miembros de la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), tales como BMP-1, BMP-3, BMP-2, OP-1, BMP-2A, BMP-2B, BMP-4, BMP-7 y BMP-14; HBGF1 y HBGF2; factores de diferenciación de crecimiento (GDFs); miembros de la familia hedgehog de proteínas, incluyendo indio, sónico y erizo del desierto; ADMP-1; GDF-5; TIMP-1 y miembros de la familia estimulante de colonias de los factores (CSF), incluyendo CSF-1, G-CSF y GM-CSF; y análogos e isoformas de los mismos.

[0095] En algunas realizaciones, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste de TGF-beta, TGF-beta1, FGF, bFGF, e IGF-1. Se cree que estos factores de crecimiento promueven la regeneración del núcleo pulposo, estimulan la proliferación y/o diferenciación de condrocitos, y promueven la secreción de matriz extracelular. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento es TGF-beta. Más preferiblemente, TGF-beta se administra en una cantidad de entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 5.000 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 50 ng/ml y aproximadamente 500 ng/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 100 ng/ml y aproximadamente 300 ng/ml.

- 5 [0096] En algunas realizaciones, concentrado de plaquetas se proporciona como un agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, el concentrado de plaquetas es autólogo. En algunas realizaciones, el concentrado de plaquetas es rico en plasma en plaquetas (PRP). PRP es ventajoso, ya que contiene factores de crecimiento que pueden reestimar el crecimiento de la ECM, y porque su matriz de fibrina proporciona un andamio adecuado para el nuevo crecimiento del tejido. En algunas realizaciones, el agente adicional es un lisado celular, una fracción celular soluble, una fracción celular rica en membranas, medios de cultivo celular (por ejemplo, medio acondicionado), o de la matriz extracelular derivada de células derivadas de tejido de cordón umbilical u otras células.
- 10 [0097] Células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden administrarse junto con un inhibidor de reductasa de HMG-CoA, incluyendo, pero no limitado a simvastatina, pravastatina, lovastatina, fluvastatina, cerivastatina y atorvastatina.
- 15 [0098] Células derivadas de tejido del cordón umbilical se pueden diseñar genéticamente para expresar uno o más agentes, tales como, pero no limitado a, uno o más de los agentes terapéuticos adicionales que se describen en este documento. Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética utilizando cualquiera de una variedad de vectores, incluyendo, pero no limitado a la integración de vectores virales, por ejemplo, vector de retrovirus o vectores virales adenoasociados; vectores de replicación no integradores, por ejemplo, vectores de virus papiloma, vectores SV40, vectores adenovirales; o vectores virales de replicación defectuosa. Otros métodos de introducción de ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o por inyección directa de ADN.
- 20 [0099] Células huésped se transforman o se transfectan con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos apropiados de control de expresión tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable de preferencia.
- 25 [0100] Después de la introducción del ADN extraño, las células manipuladas pueden dejarse crecer en medio enriquecido y después se cambiaron a medios selectivos. El marcador seleccionable en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y crecen para formar focos, que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método se puede utilizar ventajosamente para diseñar líneas celulares, que expresan el producto del gen.
- 30 [0101] Cualquier promotor puede ser usado para conducir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, promotores virales incluyen, pero no se limitan al promotor/potenciador CMV, SV40, virus del papiloma, virus Epstein-Barr o promotor del gen de la elastina. Preferiblemente, los elementos de control utilizados para controlar la expresión del gen de interés deben permitir la expresión regulada del gen de modo que el producto se sintetiza sólo cuando sea necesario *in vivo*. Si se desea la expresión transitoria, los promotores constitutivos se utilizan preferiblemente en un vector no integrador y/o de replicación defectuosa. Alternativamente, los promotores inducibles se podrían utilizar para conducir la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a aquellos asociados con proteínas de metelotioneina y de choque térmico.
- 35 [0102] Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para expresión de factores "knock out" o "knock down" que promueven la inflamación o rechazo en el sitio de implante. Técnicas moduladoras negativas para la reducción de los niveles de expresión del gen diana o los niveles de actividad del producto del gen diana se discuten a continuación. "Modulación negativa", como se usa aquí, se refiere a una reducción en el nivel y/o actividad de producto de gen diana en relación con el nivel y/o actividad del producto del gen diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen puede ser reducido o eliminado utilizando una serie de técnicas que incluyen, por ejemplo, inhibición de la expresión mediante la inactivación del gen completo (comúnmente denominado "knockout") utilizando la técnica de recombinación homóloga. Por lo general, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' a la región) se interrumpe por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, la prevención de la producción de ARNm normal a partir del gen diana y que resulta en la inactivación del gen. Un gen también puede ser inactivado mediante la creación de una delección en parte de un gen, o mediante la supresión del gen entero. Mediante el uso de una construcción con dos regiones de homología al gen diana que son muy separadas en el genoma, las secuencias que intervienen las dos regiones se pueden eliminar (Mombaerts #et al#., Proc Nat Acad Sci EE.UU., 1991; 88:3084-3087).
- 45 [0103] ARN antisentido, de interferencia pequeña, ADNzimas y moléculas de ribozima que inhiben la expresión del gen diana también pueden usarse de acuerdo con la invención para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, moléculas de ARN antisentido, que inhiben la expresión de los principales complejos de genes de histocompatibilidad (HLA), han demostrado ser más versátiles con respecto a las respuestas inmunes. Aún más, moléculas de triple hélice pueden utilizarse en la reducción del nivel de actividad del gen diana.
- 50 [0104] Estas y otras técnicas se describen en detalle por LG Davis *et al.* (eds), Basic Methods in Molecular Biology, segunda ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn., (1994) 2.
- 55
- 60
- 65

[0105] IL-1 es un potente estimulador de la resorción del cartílago y de la producción de mediadores inflamatorios por los condrocitos (Campbell *et al.*, J. Immun, 1991; 147 (4): 1238-1246). Usando cualquiera de las técnicas anteriores, la expresión de IL-1 puede ser eliminada o derribada en las células de la invención para reducir el riesgo de la resorción del cartílago implantado o la producción de mediadores inflamatorios por las células de la invención. Igualmente, la expresión de moléculas MHC de clase II puede ser eliminada o derribada con el fin de reducir el riesgo de rechazo del tejido implantado.

[0106] Una vez que las células de la invención han sido diseñadas genéticamente, pueden ser directamente implantadas con el hidrogel en el paciente para permitir el tratamiento de una enfermedad o condición relacionada a degeneración IVD, por ejemplo mediante la producción de un producto que tiene un efecto terapéutico contra uno o más síntomas de la enfermedad o afección, tal como un producto génico antiinflamatorio. Alternativamente, las células modificadas por ingeniería genética se pueden usar para producir nuevo tejido *in vitro*, que se implanta a continuación en el sujeto, como se describe en el presente documento.

[0107] En algunos aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden células derivadas de tejido de cordón umbilical, como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento pueden inducir células derivadas de tejido del cordón umbilical para diferenciarse a lo largo de una vía celular IVD o linaje, por ejemplo para mostrar un fenotipo de núcleo pulposo celular y/o un fenotipo de células de anillo fibroso. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta modulan los procesos celulares de células endógenas IVD y/o células de los tejidos circundantes, incluyendo pero no limitado a la división celular, la diferenciación y la expresión génica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento promueven la reparación y la regeneración de un IVD degenerado.

[0108] Kits para el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad o daño de al menos un IVD se proporcionan. Los kits comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o condición, tal como aquellas células que se describen y se ejemplifican en este documento, y las instrucciones para usar el kit en un método para tratar un paciente que tiene una enfermedad o condición relacionada con degeneración IVD. Los kits pueden comprender además al menos un reactivo e instrucciones para el cultivo de las células. Los kits pueden comprender además una población de al menos otro tipo de célula y/o al menos un agente.

[0109] En algunos aspectos, los kits comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, un lisado, matriz extracelular, o medio acondicionado preparado a partir de células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano, cuyas células tienen las características que se describen y se ejemplifican en este documento. Los kits son útiles para facilitar la reparación y/o regeneración de un IVD que está dañado o enfermo.

[0110] Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con mayor detalle. Están destinados a ilustrar, no limitar, la invención. Además, como se usa en los siguientes ejemplos y en otros lugares en la especificación, las células derivadas de tejido del cordón umbilical útiles en los métodos de la invención pueden ser aisladas y caracterizadas de acuerdo con la descripción de la Patente de Estados Unidos N<sup>os</sup> 7.510.873 y 7.524.489.

## EJEMPLO I

### Aislamiento de células derivadas de tejido del cordón umbilical

[0111] Los cordones umbilicales se obtuvieron de National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Se obtuvieron los tejidos después de partos normales. El protocolo de aislamiento de células se realizó asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los residuos, el cable se lavó en tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de antimicóticos y antibióticos (100 unidades/mililitro penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina, 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B). Los tejidos entonces se disociaron mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm<sup>2</sup> en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-Baja glucosa o DMEM-Alta glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido se trocó en una pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos de 50 ml cónicos (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo). Después, el tejido fue digerido ya sea en medio de DMEM-Baja glucosa o medio de DMEM-Alta glucosa, conteniendo cada uno antimicóticos y antibióticos como se describe anteriormente. En algunos experimentos, una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa se utilizó ("C:D;" colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 unidades/mililitro; y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro en DMEM: medio bajo de glucosa). En otros experimentos una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:D:H") se utilizó (colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro; y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro, en DMEM:-Baja glucosa). Los tubos cónicos que contiene el tejido, enzimas medianas y la digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Enviro, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

[0112] Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 xg 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) suero bovino fetal (FBS; suero bovino definido; Lote#AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) 2-

mercaptoetanol (Sigma), 1 mililitro por 100 mililitros de antibiótico/antimicótico como se describió anteriormente. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de células de nylon de 70-micrometros (BD Biosciences). 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 micrometros (BD Biosciences) y se extrajo con un enjuague de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

[0113] El filtrado se volvió a suspender en medio de crecimiento (volumen total 50 mililitros) y se centrifugó a 150 xg durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

[0114] Tras la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento fresco. Se determinó el número de células viables mediante tinción con azul tripán. Las células se cultivan a continuación bajo condiciones estándar.

[0115] Las células aisladas a partir de cordones umbilicales se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces de T-75 cm<sup>2</sup> revestidas de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento con antibióticos/antimicóticos como se describió anteriormente. Después de 2 días (en varios experimentos, las células se incubaron de 2-4 días), medio gastado se aspiró de los matraces. Las células se lavaron con PBS tres veces para eliminar los residuos y las células derivadas de sangre. Las células entonces se rellenaron con medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días desde el pase 0) para el paso 1. En pasajes posteriores (del paso 1 a 2 y así sucesivamente), las células alcanzaron subconfluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 45 días. Para estos pasajes posteriores, las células se sembraron a 5000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron en un incubador humidificado con 5 por ciento de dióxido de carbono y oxígeno del aire, a 37°C.

## **EJEMPLO 2**

### **Evaluación de marcadores de superficie de células humanas derivadas tras el parto por citometría de flujo**

[0116] El tejido del cordón umbilical se caracterizó usando citometría de flujo para proporcionar un perfil para la identificación de células obtenidas del mismo.

[0117] Las células fueron cultivadas en Medio de Crecimiento (Gibco Carlsbad, CA) con penicilina/estreptomicina. Las células fueron cultivadas en matraces de cultivo tisular tratadas con plasma T75, T150, T225 y (Corning, Corning, NY) hasta la confluencia. Las superficies de crecimiento de los frascos fueron revestidas con gelatina mediante incubación de 2% (p/v) de gelatina (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

[0118] Las células adherentes en matraces se lavaron en PBS y se desprendieron con tripsina/EDTA. Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de 1x10<sup>7</sup> por mililitro. De acuerdo a las especificaciones del fabricante, el anticuerpo para el marcador de superficie celular de interés (véase más adelante) se añadió a un centenar de microlitros de suspensión de células y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento citómetro (Becton Dickinson, San Jose, CA).

[0119] Se utilizaron los siguientes anticuerpos a marcadores de superficie celular:

	Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
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
	CD45RA	BD Pharmingen	555489
15	CD73	BD Pharmingen	550257
	CD90	BD Pharmingen	555596
	CD1 17	BD Pharmingen	340529
20	CD141	BD Pharmingen	559781
	PDGFR-alfa	BD Pharmingen	556002
	HLA-A,B,C	BD Pharmingen	555553
25	HLA-DR,DP,DQ	BD Pharmingen	555558
	IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
30	IgG-PE	Sigma	P-4685

[0120] Las células se analizaron en los pasajes 8, 15, y 20, y las células derivadas de tejido del cordón umbilical de diferentes donantes se compararon entre sí. Además, las células cultivadas en matraces revestidas de gelatina se compararon con células cultivadas en frascos no recubiertos.

[0121] Las Células derivadas de tejido de cordón umbilical mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicada por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicada por los valores de fluorescencia comparable al control de IgG. Las variaciones en los valores de fluorescencia de las curvas de positivos se representaron. La media (*es decir*, CD13) y rango (*es decir*, CD90) de las curvas positivas mostraron alguna variación, pero las curvas parecían normales, lo que confirma una población homogénea. Ambas curvas exhibieron individualmente valores mayores que el control de IgG.

[0122] Células en el paso 8, 15, y 20 expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicadas por el aumento de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CDI 17, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, indicadas por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0123] Los aislados de donantes separados cada uno mostraron expresión positiva de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0124] Las células expandidas en gelatina y matraces sin recubrir fueron positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, con aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD1 17, CD141, y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0125] Así, células derivadas de tejido 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, y revestimiento de superficie de recipiente de cultivo. Se observó alguna variación en medios y rangos de curva de histograma de valor de fluorescencia individual, pero todas las curvas positivas bajo todas las condiciones ensayadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia mayores que el control de IgG, lo que confirma que las células comprenden una población homogénea que tiene la expresión positiva de los marcadores.

**EJEMPLO 3****Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos de células**

5 [0126] Se cosechó tejido del cordón umbilical humano y se fijó en inmersión fijada al 4% (p/v) de paraformaldehído durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1: 500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150, generado contra conejo; Sigma; o 1: 300, generado contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), actina muscular lisa alfa (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma), y CD34 (CD34 humano Clase III; 1: 100; DAKOCarpinteria, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores: GROalfa antihumano - PE (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 antihumano (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), LDL anti-humano oxidada del receptor 1 (Ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGO-A antihumano (1: 100; Santa Cruz Biotech). Las muestras fijadas se recortaron con un bisturí y se colocaron dentro del compuesto de incrustación OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contiene etanol. Los bloques congelados fueron entonces seccionados (espesor de 10 µm) utilizando un criostato estándar (Leica Microsystems) y montado en portaobjetos de vidrio para tinción.

20 [0127] La inmunohistoquímica se realizó similarmente a los estudios anteriores (Messina *et al.*, *Exper Neurol.*; 2003; 184: 816-29). En resumen, las secciones de tejido se lavaron con solución salina 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), 3% (v/v) de suero de burro se utilizó 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 contenía bloque junto con IgG - Texas Red anti-ratón de cabra (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG - Alexa 488 anti-conejo 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.

35 [0128] La fluorescencia se visualizó usando el filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva fue representada por la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Imágenes representativas fueron capturadas utilizando una cámara de video a color digital y software de IMAGE-PRO® (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras de tinción triple, cada imagen fue tomada utilizando un solo filtro de emisión a la vez.

40 [0129] Marcadores de vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF, y CD34 se expresaron en un subconjunto de las células que se encuentran dentro del cordón umbilical. En particular, expresión de vWF y CD34 estaban restringidos a los vasos sanguíneos contenidos en el cable. Las células CD34<sup>+</sup> estaban en la capa más interna (lado de lumen). La expresión de vimentina se encontró en toda la matriz y los vasos sanguíneos de la cuerda. SMA se limitó a la matriz y paredes exteriores de la arteria y vena, pero no contenida en los propios vasos. CK18 y desmina fueron observadas dentro de los vasos solamente, limitándose la desmina a las capas media y exterior. La expresión de GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1, y NOGO-A no se observaron dentro de tejido del cordón umbilical.

**EJEMPLO 4****Análisis de ensayo de oligonucleótidos**

50 [0130] Ensayos Affymetrix GeneChip® se utilizaron para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas de tejido del cordón umbilical 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 e marcadores moleculares únicos identificados para estas células.

55 [0131] Cordones umbilicales humanos se obtuvieron a partir del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) a partir de un parto normal a término con el consentimiento del paciente. Se recibieron los tejidos y las células fueron aisladas como se describió anteriormente. Las células fueron cultivadas en medio de crecimiento (usando DMEM-LG) sobre matraces de plástico de cultivo tisular revestidas de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>

60 [0132] Fibroblastos dérmicos humanos fueron adquiridos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Número de lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Hyclone) y penicilina/estreptomina (Invitrogen). Las células se cultivaron en el plástico tratado con tejido estándar.

65

[0133] Las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) se compraron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; números de lote 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en medio MSCGM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico cultivado por tejido estándar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

5 [0134] Médula ósea de cresta ilíaca humana se recibió de NDRI con el consentimiento del paciente. La médula se procesó de acuerdo con el método descrito por Ho, *et al.* (WO 2003/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (155 mM NH<sub>4</sub>CL, 10mM KHCO<sub>3</sub>, y 0,1 mM EDTA, pH 7,2) en una proporción de médula ósea de 1 parte a 20 partes tampón de lisis. La suspensión de células se 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 Minimal Essential Medium-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 tripán-azul (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se siembran en matraces de plástico cultivado por 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> a ya sea O<sub>2</sub> atmosférica estándar o en 5% O<sub>2</sub>. Las células se cultivaron durante 5 días sin un cambio de medio. Los medios y las células no adherentes se retiraron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en el cultivo.

20 [0135] Cultivos de crecimiento activo de las células se retiraron de los frascos con un raspador de células en PBS frío. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en PBS fresco y se centrifugaron de nuevo. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente y se almacenó a 80°C. ARNm celular se extrajo y se transcribió en ADNc, que después se transcribió en ARNc y marcado con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con ensayos de oligonucleótidos HG-U133A GeneChip (Affymetrix, Santa Clara CA). La colección de hibridación y los datos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los análisis se realizaron usando "Análisis de significancia de microensayos" (SAM) versión 1,21 software de ordenador (Universidad de Stanford; Tusher *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2002; 98: 511 621).

30 [0136] Se analizaron catorce poblaciones diferentes de células. Las células junto con información de pasaje, sustrato de cultivo, y los medios de cultivo se enumeran en la Tabla 1.

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

Población celular	Paso	Sustrato	Medio
Cordón umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Cordón umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
Cordón umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-ME
ICBM (070203) (5% O <sub>2</sub> )	3	Plastico	MEM, 10% FBS
ICBM (062703) (std. O <sub>2</sub> )	5	Plastico	MEM, 10% PBS
ICBM (062703) (5% O <sub>2</sub> )	5	Plastico	MEM, 10% PBS
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plastico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plastico	MSCGM
hMSC (Lote 2171657)	3	Plastico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plastico	DMEM-F12, 10% FBS
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plastico	DMEM-F12, 10% FBS

60 [0137] Los datos fueron evaluados por un análisis de componentes principales, el análisis de los 290 genes que son expresados diferencialmente en las células. Este análisis permite una comparación relativa de las similitudes entre las poblaciones. La Tabla 2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de las parejas de células. Las distancias euclidianas se basan en la comparación de las células a partir de los 290 genes que son expresados diferencialmente entre los tipos de células. La distancia euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes (*es decir*, cuanto mayor sea la distancia, menor la similitud que existe)

**Tabla 2. Distancias euclidianas para los pares de células.**

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

[0138] Las tablas 3 y 4 a continuación muestran la expresión de genes aumentados en las células derivadas de tejido del cordón umbilical (Tabla 3), y la reducción en las células derivadas de tejido del cordón umbilical (Tabla 4). La columna titulada "Conjunto de sondas ID" se refiere al código de identificación del fabricante para conjuntos de varias sondas de oligonucleótidos localizados en un sitio en particular en el chip, que se hibridan con el gen llamado (columna "Gen"), que comprenden una secuencia que se puede encontrar dentro de la NCBI (GenBank) de base de datos en el número de acceso especificado (columna "Número de adhesión NCBI").

**Tabla 3. Genes que muestran tener expresión específicamente aumentada en las células derivadas de tejido del cordón umbilical en comparación con otras líneas celulares ensayadas.**

**Genes aumenta en las células derivadas de tejido de cordón umbilical**

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

**Tabla 4. Los genes muestran una disminución en la expresión de células derivadas de tejido de cordón umbilical en comparación con otras líneas celulares ensayadas.**

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Genes disminuidos en el tejido del cordón umbilical y células derivada de placenta		
Conjunto de sondas ID	Nombre del gen	Número de adhesión NCBI
210135_s_at	homeobox de baja estatura 2	AF022654,1
205824_at	proteína 27 kDa choque térmico 2	NM 001,541,1
209687_at	quimiocina (motivo CXC) ligando 12 (factor derivado de células estromales 1)	U19495,1
203666_at	quimiocina (motivo CXC) ligando 12 (factor derivado de células estromales 1)	NM 000,609,1
212670_at	elastina (estenosis aórtica supraavalvular, Williams-Beuren síndrome de Down)	AA479278
213381_at	ARNm <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (de DKFZp586M2022 clonar)	N91149
206201_s_at	homeobox mesénquima 2 (homeobox de crecimiento de detención específica)	NM 005,924,1
205817_at	sine homólogo oculis homeobox 1 ( <i>Drosophila</i> )	NM 005.982,1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007 162,1
212793_at	desaliñado activador asociado de la morfogénesis 2	13244 BF5
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049 176
205200_at	tetranectina (plasminógeno proteína de unión)	NM 003.278,1
205743_at	src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003 149,1
200921_s_at	De células B translocación gen 1, anti-proliferativa	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM 003.956,1
204198_s_at	factor de transcripción relacionados con runt-3	AA54 1630
219747_at	hipotética FLJ23191 proteína	NM 024.574,1
204773_at	interleucina 11 receptor, alfa	NM 004.512,1
202465_at	procolágeno C-endopeptidasa potenciador	NM 002.593,2
203706-s-at	homólogo de frizzled 7 ( <i>Drosophila</i> )	NM 003.507,1
212736_at	hipotético BC008967 gen	BE299456
214587_at	colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	tenascina C (hexabrachion)	NM_002160,1

(continuación)

<b>Genes disminuidos en el tejido del cordón umbilical y células derivada de placenta</b>		
<b>Conjunto de sondas ID</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Número de adhesión NCBI</b>
210239_at	proteína homeobox Iroquois 5	U90304,I
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	Homo sapiens ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU_147799
206315_at	citoquina similar al receptor de factor 1	NM_004750,1
204401_at	potasio intermedio/pequeña conductancia de calcio canal activado, N subfamilia, miembro 4	NM_002250,1
216331_at	integrina, alfa 7	AK022548,1
209663_s_at	integrina, alfa 7	AF072132,1
213125_at	proteína DKFZP586LI51	AW007573
202133_at	co-activador transcripcional con PDZ vinculante motivo (TAZ)	AA081084
206511_s_at	sine oculis homólogo homeobox 2 (Drosophila)	NM_016932,1
213435_at	proteína KIAA1034	AB028957,1
206115_at	respuesta de crecimiento temprano 3	NM_004430,1
213707_s_at	distal-less homeobox 5	NM_005221,3
218181_s_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792,1
209160_at	aldo-ceto reductasa familia 1, miembro de C3 (3-alfa hidroxisteroide_dehidrogenasa, _type_II)	AB018580,1
213905_x_at	biglicano	AA845258
201261_x_at	biglicano	BC002416,I
202132_at	co-activador transcripcional con PDZ vinculante motivo (TAZ)	AA081084
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395,1
213791_at	proencefalina	NM_006211,1
205422_s_at	integrina, beta-I (con repetición similar a EGF dominios)	NM_004791,1

ES 2 625 041 T3

(continuación)

<b>Genes disminuidos en el tejido del cordón umbilical y células derivada de placenta</b>		
<b>Nombre del gen</b>	<b>Número de adhesión NCBI</b>	
214927_at	Homo sapiens ARNm de longitud completa clon de ADNc inserto EUR01MAGE 1968422	AL359052,1 -
206070_s_at	EphA3	AF213459,1
212805_at	proteína K1AA0367	AB002365,1
219789_at	receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (_C _receptor atrionatriurético_péptido)	A1628360
219054 en	proteína hipotética FLJ 14054	NM 024.563,1
213429_at	ARNm Homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (de clonar DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesículas 5 (Miobrevina)	NM_006634,1
201843_s_at	EGF que contienen matriz extracelular de tipo fibulina proteína 1	NM_004105,2
221478_at	BCL2/adenovirus E1B I9kDa proteína de interacción tipo 3	AL132665.1
201792_at	proteína de unión AE I	NM 001129,2
204570_at	citocromo c oxidasa subunidad VIIa polipéptido I (músculo)	NM_001864.1
201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad I	NM_005380,1
202718_at	proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36kDa	NM_000597,1

[0139] Las Tablas 5, 6 y 7 muestran la expresión de genes aumentados en fibroblastos humanos (Tabla 5), células ICBM (Tabla 6), y MSCs (Tabla 7).

<b>Tabla 5. Los genes que mostraron tener una mayor expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas</b>
fosfatasa doble especificidad 2
proteína K1AA0527
Homo sapiens ADNc FLJ23224 fis clon ADSU02206
dineína citoplásmico, polipéptido intermedio 1
anquirina 3, nodo de Ranvier (anquirina G)
inhibina, beta A (activina A activina AB polipéptido alfa
ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función putativa)
proteína KIAA1053
proteína asociada a microtubulos 1A
proteína de dedo zinc 41
proteína HSPCO
<i>Homo sapiens</i> ADNc: FLJ23564 fis, clon LNG10773
ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564AO72 (a partir del clon DKFZp564A072)
proteína LIM (similar a enigma de unión C de quinasa de proteína de rata
inhibidor potenciador de gen polipéptido de kappa en células B, proteína asociada al complejo de quinasa
proteína hipotética FLJ22004
secuencias humana ARNm (clon CTG-A4)
ESTs, moderadamente similares a factor de tipo receptor de citoquina 2
precursor del CRL2 de receptor de citoquina [Homo sapiens]
factor de crecimiento transformante, beta 2
proteína hipotética MGC29643
antígeno identificado por anticuerpo monoclonal MRC OX-2
proteína de retinopatía putativa vinculada por X

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

5	•proteína con repetición de anquirina cardíaca
	•MHC de clase I región ORF
10	•integrina, alfa 10
	•proteína hipotética FLJ22362
	•UDP-N-acetilo-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
15	•Proteína inducida por interferon 44
	•SRY (región determinante del sexo Y)-caja 9 (displasia campomélica, inversión de sexo autosómico)
	•proteína asociada a queratina 1-1
20	•hipocalcina de tipo 1
	dentada 1 (síndrome de Alagille)
25	•proteoglicano 1, gránulo secretor

**Tabla 7. Genes que se mostraron tener una mayor expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas**

30	•interleucina 26
	•maltasa-glucoamilasa (alfa-galactosidasa)
	•subfamilia nuclear de receptores 4, grupo A, miembro 2
35	•v-fos FMJ murino osteosarcoma viral homólogo de oncogén
	•proteína hipotética DC42
	•subfamilia nuclear de receptores 4, grupo 4, miembro 2
40	•FBJ murino viral osteosarcoma oncogén viral homólogo B
	•WNT1 señalización inducible proteína de ruta 1
45	•secuencia transformadora derivada de línea celular MCF.2
	•canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
	•cartílago de clase emparejada homeoproteína 1
50	•Homo sapiens ADNc FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
	•Homo sapiens ADNc FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
	•jun B proto-oncogén
55	•Células B CLL/linfoma 6 (proteína de dedo zinc 51)
	•proteína de dedos zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

60

[0140] El análisis anterior incluye células derivadas de tres cables de diferentes cordones umbilicales y dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesenquimales, y tres líneas de células de médula ósea de la cresta iliaca. El ARNm que se expresó por estas células se analizó utilizando una matriz de oligonucleótidos que contenía sondas para 22.000 genes. Los resultados mostraron que 290 genes se expresan

65

diferencialmente en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen siete genes incrementados específicamente en las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Se encontró que 54 genes tenían niveles específicamente más bajos de expresión en las células derivadas de tejido del cordón umbilical, en comparación con los otros tipos de células. La expresión de genes seleccionados ha sido confirmada por PCR. Estos resultados demuestran que células derivadas de tejido del cordón umbilical tienen un perfil de expresión de genes distintos, por ejemplo, en comparación con células derivadas de médula ósea y fibroblastos.

## EJEMPLO 5

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

[0141] Como se demostró anteriormente, se identificaron genes "de firma" para las células derivadas del posparto: LDL oxidada de receptor 1, interleucina-8, renina, reticulon, ligando del receptor de quimioquinas 3 (CXC ligando 3), y la proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes "de firma" se expresaron en niveles relativamente altos en células derivadas del posparto.

[0142] Los procedimientos descritos en este ejemplo se llevaron a cabo para verificar los datos de microensayos y encontrar concordancia/discordancia entre el gen y la expresión de proteínas, así como para establecer una serie de ensayo fiable para la detección de identificadores únicos para células derivadas de tejido del cordón umbilical.

[0143] Células derivadas de tejido del cordón umbilical (cuatro aislados), y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatales y adultos) se cultivaron en Medio de Crecimiento con penicilina/estreptomicina en un matraz T75 revestido de gelatina. Las células madre mesenquimáticas (MSC) se cultivaron en kit de bala de Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM; Cambrex, Walkersville, MD).

[0144] Para el protocolo IL-8, las células se descongelaron a partir de nitrógeno líquido y se colocaron en placas en matraces revestidas de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup>, se cultivaron durante 48 horas en medio de crecimiento y después se cultivaron durante 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero (DMEM-baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina/estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA) y 0,1% (p/v) albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)). Después de este tratamiento, se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares. Los sobrenadantes se congelaron a 80°C para el análisis ELISA.

[0145] Las células de posparto derivadas del cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano se cultivaron en Medio de Crecimiento en matraces T75 revestidos de gelatina. Las células se congelaron a paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se contaron. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> que contiene 15 mililitros de medio de crecimiento a 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El medio de privación de suero se recogió al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos (y se almacena a 20°C).

[0146] Para estimar el número de células en cada frasco, 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) se añadió a cada matraz. Después de las células desprendidas del matraz, la actividad de tripsina se neutralizó con 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y 1 mililitro de Medio de Crecimiento se añadió a cada tubo para resuspender las células. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

[0147] La cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero se analizó utilizando ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se ensayaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

[0148] Se extrajo ARN de células derivadas de tejido de cordón umbilical confluentes y fibroblastos o para la expresión de IL-8 a partir de células tratadas como se describió anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contiene beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con 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 sometió a tratamiento con ADNasa (2,7 U/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluye con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a 80°C.

[0149] El ARN también fue extraído de tejido del cordón umbilical humano. El tejido (30 miligramos) se suspendió en 700 microlitros de tampón que contenía 2-mercaptoetanol RLT. 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. El ARN se invirtió y se transcribió 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.

[0150] Los genes identificados por microensayo ADNc como regulados de forma única en las células después del parto (genes de firma incluyendo receptor de LDL oxidada, interleucina-8, renina y reticulon), se investigaron adicionalmente usando PCR convencional y en tiempo real.

[0151] PCR se realizó en muestras ADNc usando productos de expresión genética Assays-on-Demand™: receptor de LDL oxidada (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); CXC ligando 3 (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) se mezclaron con ADNc y la mezcla maestra TaqMan Universal PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando un sistema de detección de secuencia 7000 con ABI Prism 7000 SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA). condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 mm y 95°C para 10 mm, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C por 1 mm. Los datos de PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boletín del usuario n° 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

[0152] PCR convencional se realizó utilizando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Massachusetts, EE.UU.) para confirmar los resultados de PCR en tiempo real. PCR se realizó usando 2 microlitros de solución a ADNc, 1 x tampón de reacción PCR mezcla universal AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) y desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. La amplificación se optimiza para cada conjunto de cebadores. Para IL-8, CXC ligando 3, y reticulon (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para el receptor de LDL oxidada y GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores usados para la amplificación se enumeran en la Tabla 8. La concentración de cebador en la reacción de PCR final fue 1 micromolar a excepción de GAPDH, que fue de 0,5 micromolar. cebadores GAPDH fueron los mismos que PCR en tiempo real, excepto que la sonda TaqMan no se agregó por el fabricante 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 Universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ), utilizando una cámara Polaroid de longitud focal (VWR International, South Plainfield, NJ).

**Tabla 8: Cebadores utilizados**

Nombre de imprimación	Cebadores
Receptor de LDL oxidada	S:5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG3' (SEQ ID NO:1)
	A:5'-AGAATGGAAACTGGAATAGG-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'-AGTAAACATTGAAACCACAGCC3' (SEQ ID NO: 6)
Interleucina-8	S:5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO: 7)
	A:5'-CTTCAAAACTTCTCCACAACC3' (SEQ ID NO: 8)
Quimiocina (CXC) ligando 3	S:5'-CCCACGCCACGCTCTCC3' (SEQ ID NO: 9)
	A:5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC-3' (SEQ ID NO: 10)

[0153] Las células se fijaron con 4% frío (p/v) de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Un aislado en el pase 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y dos aislados en el paso 11 (P11), y se utilizaron fibroblastos (P11). La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1: 500, Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150; Sigma - elevado contra conejo; o 1: 300; Chemicon, Temecula, CA - levantado contra ratón), actina de músculo liso alfa (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; Dako, Carpinteria, CA). Además, los siguientes marcadores fueron probados en células de posparto de paso 11: GRO alfa PE antihumano (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 antihumano (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor I de LDL oxidada antihumana (Ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech), y NOGAA antihumano (1: 100; de Santa Cruz, Biotech).

[0154] 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, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a antígenos intracelulares. Cuando el epítipo de interés se encuentra en la superficie celular (CD34, Ox-LDL R1), Triton X-100 se omitió en todos los pasos del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítipo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se planteó en contra de cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), 3% (v/v) de suero de burro se utilizó en lugar de suero de cabra. Los anticuerpos primarios, se diluyeron en solución de bloqueo, se aplicaron a los cultivos durante un período 1 de 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 contenía bloque junto con IgG - Texas Red 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 anticabra de burro (1: 150, Santa Cruz Biotech). Después, los cultivos se lavaron y se aplicó 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0155] Después de la inmunotinción, la fluorescencia se visualizó usando un filtro de fluorescencia correspondiente en un microscopio de epifluorescencia 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 capturadas utilizando una cámara de video a color digital y software de IMAGEPRO® (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras de tinción triple, 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).

[0156] Células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y separadas con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron 3% (v/v) de FBS en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. Cien alícuotas de microlitros fueron administradas a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón de perm/lavado (BD Pharmingen, San Diego, CA). El anticuerpo se añadió a alícuotas como por especificaciones de fabricación 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, de acuerdo con las especificaciones de fabricante y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 de LDL oxidada (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), Ratón IgG1 kappa, (P4685 y M5284; Sigma), IgG de Burro contra Cabra (SC3 743; Santa Cruz, Biotech). La citometría de flujo se realizó con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

[0157] Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron por el método  $\Delta\Delta CT$  y se expresaron en una escala logarítmica. Los niveles de reticulon y expresión del receptor de LDL oxidada fueron más altos en las células derivadas de tejido del cordón umbilical en comparación con otras células. No hay diferencia significativa en los niveles de expresión de CXC ligando 3 y GCP-2 se encontraron entre las células derivadas del posparto y controles. Los resultados de PCR en tiempo real fueron confirmadas por PCR convencional. La secuenciación de los productos de PCR validaron aún más estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de CXC ligando 3 entre las células derivadas del posparto y controles utilizando los cebadores de PCR CXC ligando 3 convencionales mencionadas anteriormente.

[0158] La producción de la citoquina de IL-8 en las células después del parto fue elevada tanto en células cultivadas por Medio de Crecimiento y células derivadas del posparto privadas de suero. Todos los datos de PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y mediante la secuenciación de productos de PCR.

[0159] Cuando los sobrenadantes de las células cultivadas en medio exento de suero se examinaron para la presencia de IL-8, se detectaron cantidades más altas en medios derivados de las células umbilicales y algunos aislados de células de la placenta (Tabla 9). No se detectó IL-8 en un medio derivado de fibroblastos dérmicos humanos.

<b>Tabla 9. Cantidad de proteína IL-8 medida por ELISA</b>	
<b>Tipo de célula</b>	<b>IL-8</b>
hFibro	ND
Umb Aislado 1	2058,42 ± 144,67
UMB Aislado 2	2368,86 ± 22,73
Valores picogramos/millones de células n = 2 sem ND = No Detectado	

[0160] Células derivadas del tejido del cordón umbilical humano en el pase 0 se examinaron para la producción 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 de tejido de cordón umbilical fueron positivas para actina de músculo liso alfa y vimentina, con el patrón de tinción consistente a través del paso 11.

[0161] La concordancia entre los niveles de expresión de genes medidos por microensayo y PCR (tanto en tiempo real como convencional) se ha establecido para cuatro genes: receptor 1 de LDL oxidada, renina, reticulon y TL8. La expresión de estos genes se regula diferencialmente en el nivel de ARNm en PPDCs, con IL-8 también se regularon diferencialmente a nivel de proteínas. Las células derivadas del tejido de 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.

## EJEMPLO 6

### **Evaluación inmunológica *in vitro* de células derivadas de posparto**

[0162] Se evaluaron *in vitro* células derivadas del posparto (PPDCs) por sus características inmunológicas en un esfuerzo para predecir la respuesta inmunológica que, en su caso, estas células provocarían en el trasplante *in vivo*. PPDCs se analizaron por citometría de flujo para la presencia de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2. Estas proteínas se expresaron por las células que presentan antígenos (APC) y son necesarias para la estimulación directa de las células ingenuas CD4<sup>+</sup> T (Abbas & Lichtman, *Cellular and Molecular Immunology*, quinta Ed. (Saunders, Philadelphia, 2003; p. 171)). Las líneas celulares también se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas y Lichtman, 2003, supra), CD 178 (Coumans, *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, 1999; 224: 185196), y PD-L2 (Abbas y Lichtman, 2003, supra; Brown, *et al.*, *The Journal of Immunology*, 2003; 170: 1257-1266). Se cree que la expresión de estas proteínas por las células que residen en los tejidos de placenta median el estado inmunoprivilegiado de tejidos de la placenta en el útero. Para predecir el grado en que placenta y líneas de células derivadas de tejido de cordón umbilical provocan una respuesta inmune *in vivo*, las líneas celulares se examinaron en una reacción de linfocitos mixtos de sentido único (MLR).

[0163] Las células se cultivaron hasta la confluencia en Medio de Crecimiento que contenía penicilina/estreptomicina en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con 2% de gelatina (Sigma, St. Louis, MO).

[0164] 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. El anticuerpo (Tabla 10) se añadió a un centenar de microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante y se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se volvieron a suspender en quinientos microlitros de PBS y se

<b>Tabla 10. Anticuerpos</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Numero de catalogo</b>
HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557227
CD86	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555665
B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, RU)	ab 7904-100

analizaron mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

[0165] Viales criopreservadas de células derivadas de tejido de cordón umbilical de paso 10 etiquetadas como línea celular fueron enviados sobre hielo seco a CTBR (Senneville, Quebec) para realizar una reacción mixta de linfocitos usando CTBR SOP N° CAC-031. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron recogidas de donantes voluntarios múltiples femeninos y masculinos. PBMC alérgico estimulador (donante), PBMC autólogo, y las líneas celulares posparto fueron tratadas con mitomicina C. Se añadieron células estimuladoras autólogas y tratadas con mitomicina C a PBMCs respondedores (receptores) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, [<sup>3</sup>H]timidina se añadió a cada muestra y se cultivó durante 18 horas. Después de la cosecha de las células, el ADN radiomarcado se extrajo, y la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina se midió utilizando un contador de centelleo.

[0166] 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 la PPDC se calculó como la proliferación del receptor más línea de células posparto tratadas con mitomicina C dividida por la proliferación de línea de base del receptor.

[0167] Seis donantes de sangre de voluntarios humanos se examinaron para identificar un único donante alogéneo que exhibirá una respuesta de proliferación robusta en una reacción de linfocito mixto con otros cinco donantes de sangre. Este donante se seleccionó como donante de control positivo alogéneo. Los cinco donantes de sangre restantes se seleccionaron como destinatarios. El donante de control positivo alogéneo y las líneas celulares de placenta se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción de linfocito mixto con los cinco receptores alogéneos individuales. Las reacciones se realizaron en triplicado utilizando dos placas de cultivo de células con tres receptores por placa (Tabla 11). El índice de estimulación medio se varió entre 6,5 (placa 1) a 9 (placa 2) y los controles positivos de donante alogéneo se varió entre 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 12).

**Tabla 11. Datos de reacción de linfocito mixto - Línea celular A (cordón umbilical)**

DPM para ensayo de proliferación							
Placa ID: Placa 1							
Número analítico	Sistema de cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2478	La proliferación de la línea de base de receptor Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) Donante alogénico MLR de IM04-2477 (tratado con mitomicina C) MLR con línea celular (tipo celular A tratado con mitomicina C)	1074	406	391	623.7	390.07	62.5
		672	510	1402	861.3	475.19	55.2
		43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7
		2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3
SI (donante)				70			
SI (línea celular)				8			
IM04-2479	La proliferación de la línea de base de receptor Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) Donante alogénico MLR de IM04-2477 (tratado con mitomicina C) MLR con línea celular (tipo celular A tratado con mitomicina C)	530	508	527	521.7	11.93	2.3
		701	567	1111	793.0	283.43	35.7
		25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1
		5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3
SI (donante)				47			
SI (línea celular)				7			
IM04-2480	La proliferación de la línea de base de receptor Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) Donante alogénico MLR de IM04-2477 (tratado con mitomicina C) MLR con línea celular (tipo celular A tratado con mitomicina C)	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)				23			
SI (línea celular)				3			
IM04-2481	La proliferación de la línea de base de receptor Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C) Donante alogénico MLR de IM04-2477 (tratado con mitomicina C) MLR con línea celular (tipo celular A tratado con mitomicina C)	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)				31			
SI (línea celular)				8			

(continuación)

ID Plate: Placa 2							
Número analítico	Sistema de cultivo	Réplicas			Media	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2482	La proliferación de la línea de base de receptor Control de la autoestimulación (células estológicas tratadas con mitomicina C) Donante alotgénico MLR de IM04-2477 (tratado con mitomicina C) MLR con línea celular (tipo celular A tratado con mitomicina C)	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)				70			
SI (línea celular)				9			
IM04-2477 (donante alotgénico)	La proliferación de la línea de base de receptor Control de la autoestimulación (células estológicas tratadas con mitomicina C)	312	419	349	360.0	54.34	15.1
		567	604	374	515.0	123.50	24.0
Línea celular tipo A	La proliferación de la línea de base de receptor Control de la autoestimulación (células estológicas tratadas con mitomicina C)	5101	3735	2973	3936.3	1078.19	27.4
		1924	4570	2153	2882.3	1466.04	50.9

Tabla 12. Índice de estimulación medio de células derivadas de tejido de cordón umbilical y un donante alotgénico en una reacción mixta de linfocitos con cinco receptores alotgénicos individuales.

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

[0168] Histogramas de células derivadas de tejido del cordón umbilical analizadas por citometría de flujo muestran citometría de expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86, y B7-H2, como se ha señalado por valor de fluorescencia coherente con la IgG de control, lo que indica que las líneas celulares umbilicales carecen de las moléculas de superficie celular requerida para estimular directamente las células T CD4<sup>+</sup>. Los histogramas de las células derivadas de tejido del cordón umbilical analizadas por flujo muestran citometría de expresión positiva de PD-L2, como se indicó por el aumento del valor de la fluorescencia con respecto al control IgG, y la expresión negativa de CD178 y HLA-G, como se ha señalado por valor de fluorescencia coherente con el control de IgG.

[0169] En las reacciones de linfocitos mixtos realizadas con líneas de células derivadas de tejido de cordón umbilical el índice medio de estimulación varió de 6,5 a 9, y la de los controles positivos alotgénicas varió de 42,75 a 70. Las líneas de células derivadas de tejido de cordón umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas estimulantes HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86, y B7-H2, medidas por citometría de flujo. Las líneas de células derivadas de tejido de cordón umbilical fueron negativas para la expresión de proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178 y positivas para la expresión de PD-L2, medidas por citometría de flujo. PBMCs de donantes alotgénicos contienen células que presentan antígeno expresando HLA-DR, DQ, CD8, CD86, y B7-H2, permitiendo de este modo la estimulación de células T ingenuas CD4<sup>+</sup>. La ausencia de moléculas de superficie de células que presentan antígeno en placenta y células derivadas de tejido de cordón umbilical requeridas para la estimulación directa de las células T CD4<sup>+</sup> ingenuas y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el índice de baja estimulación exhibido por estas células en un MLR en comparación con controles alotgénicos.

### EJEMPLO 7

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

[0170] se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de células derivadas de tejido de cordón umbilical. Factores seleccionados para la detección incluían: (1) los conocidos por tener actividad angiogénica, tal como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen *et al.*, *Ciba Found Symp.*, 1997; 212:215-26), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Salcedo *et al.*, *Blood*, (2000; 96: 3440), interleucina-8 (IL-8) (Li *et al.*, *J. Immunol.*, 2003; 170: 3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes *et al.*, *Ann Thorac Surg*, 2004; 77: 812-8), la matriz de metaloproteínasa 1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión por heparina (HB-EGF), factor 1 alfa derivado por stromal (SDF-1alfa); (2) los conocidos por tener actividad neurotrófica/neuroprotectora, tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng *et al.*, *Dev Biol*, 2003; 258: 319-33), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFbeta2); y (3) los conocidos por tener actividad de quimioquinas, tales como proteína inflamatoria de macrófagos 1alfa (MIP1a), proteína inflamatoria de macrófagos 1beta (MIP1b), quimioatrayente 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, quimioquina derivada de macrófagos (MDC), IL-8.

5 [0171] Las células de cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano se cultivaron en Medio de Crecimiento con penicilina/estreptomicina en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células fueron crioconservadas en el paso 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de la descongelación de las células, el medio de crecimiento se añadió a las células, seguido de la transferencia a un tubo de centrifuga de 15 ml y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó. El sedimento celular se resuspendió en 4 mililitros de medio de crecimiento, y se contaron las células. Las células se sembraron a 10 375.000 células/matraz de 75 cm<sup>2</sup> que contienen 15 mililitros de medio de crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio libre de suero (DMEM-baja glucosa (Gibco), 0,1% (p/v) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina/estreptomicina (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. Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con PBS y se desconectaron usando 2 mililitros de tripsina/EDTA. Actividad de tripsina fue inhibida por adición de 8 mililitros de Medio de Crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de Medio de Crecimiento. El número de células se estimó usando un hemocitómetro.

20 [0172] Las células fueron cultivadas a 37°C en 5% de dióxido de carbono y oxígeno atmosférico. Células derivadas de placenta (lote 101503) también se cultivaron en 5% de oxígeno o beta-mercaptoetanol (BME). La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, GCP-2, IL-8, y TGF-beta 2 producidas por cada muestra de células se midió mediante un ensayo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

25 [0173] Las quimiocinas (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, I309, TARC, eotaxina, MDC, 1L8), BDNF, y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HGF-EGF, se midieron usando matrices de proteoma SEARCHLIGHT® (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteoma son ELISAs de sandwich multiplexados para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Las matrices se producen mediante la detección de un patrón 2 x 2, 3 x 3, o 4 x 4 de cuatro a 16 anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento de sándwich ELISA, toda la placa se forma para capturar señal quimioluminiscente generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. La cantidad de señal generada en cada punto es proporcional a la cantidad de proteína diana en el estándar original o muestra.

35 [0174] MCP-1 e IL-6 fueron secretadas por células derivadas de tejido de cordón umbilical y fibroblastos dérmicos (Tabla 13). SDF-1alfa fue secretada por fibroblastos. GCP-2 e IL-8 fueron secretadas por las células derivadas de tejido del cordón umbilical cultivadas en presencia de BME o 5% de O<sub>2</sub>. GCP-2 también se secretó por los fibroblastos humanos. TGF-beta2 no era detectable por matriz de ELISA.

40 **Tabla 13. Resultados del ensayo de ELISA**

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

50 Los valores presentados son picogramos/mililitro/millón de células (n=2, sem) ND = No detectado.

55 [0175] TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC, y la IL-8 se secretaron a partir de células derivadas de tejido del cordón umbilical (Tablas 14 y 15). Ningún Ang2, VEGF, o PDGF-bb se detectó.

60

65

5

10

15

**Tabla 14. Resultados de ensayo multiplexado ELISA SearchLight®**

	TIMP1	ANG2	PDGFb <sub>b</sub>	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
Hfb	1930 6,3	ND	ND	230, 5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
U1	5771 8,4	ND	ND	1240 0,0	5,8	559, 3	148, 7	ND	9,3	165,7
U3	2185 0,0	ND	ND	1134 0,5	9,0	195, 6	30,8	ND	5,4	388,6

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

20

25

30

**Tabla 15. Resultados de ensayo SearchLight® multiplexado ELISA**

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

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

[0176] Células derivadas de tejido del cordón umbilical secretan una serie de factores tróficos altamente beneficiosos. Algunos de estos factores tróficos, tales como TIMP1, un inhibidor catabólico, desempeña un papel crítico en la prevención de la degradación de la matriz extracelular por metaloproteasas de matriz. HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, juegan un papel importante en las funciones de supervivencia celular y la diferenciación celular. Otros factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen papeles importantes en regeneración neural.

#### 40 EJEMPLO 8

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

45 [0177] Las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano de cultivo expandido (022803 P4) se sembraron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos y se cultivaron en Medios de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)-bajo glucosa, suero bovino fetal al 15% (FBS), penicilina/estreptomina (P/S), beta-mercaptoetanol (BME) a aproximadamente 70% de confluencia. Las células se trataron entonces con medios que contienen 10µM de inhibidor de reductasa HMG-CoA respectivo (ácido simvastático (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza) formulado como reactivos madre 10mM en DMSO) o vehículo DMSO - 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) y se incubó durante la noche. El medio se retiró por aspiración y se reemplazó con medio que contenía 500U/ml rhIFN-gamma (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) y 10µM de inhibidor de reductasa HMG-CoA respectivo y se incubaron durante 3 días. En el tercer día, las células se recogieron con tripsina. [0178] Las células recogidas se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 100 µl de 3% FBS en PBS con 20µl HLA-DR,DP,DQ etiquetado por FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) o anticuerpo IgG etiquetado por FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) y se incubaron durante una hora. Las células se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en PBS 500µl y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

**Tabla 16. Expresión de HLA-DR, DP, DQ de HUTC medida por valores de intensidad de fluorescencia FITC de inhibidor de reductasa pretratado con HMG-CoA y tratado adicionalmente con citoquina IFN-gamma inflamatoria.**

Tratamiento	Control de IgG		IFN-gamma-tratado		Sin tratamiento por citoquinas	
	Media	Desv Est	Media	Desv Est	Media	Desv Est
No tratado	4,88	5,12	274,23	219,04	5,56	8,97
0,1% control portador DMSO	4,09	5,67	294,08	257,08	5,54	5,46
Simvastatina	4,4	2,38	5,57	3,98	5,66	3,25

[0179] Como se muestra en la Tabla 16, no tratado y 0,1% vehículo de DMSO de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano de control incubadas con la citoquina inflamatoria IFN-gamma mostró un aumento en expresión HLA-DR, DP, DQ como se ve por el aumento de la fluorescencia detectada por el flujo de citometría. Células derivadas de tejido de cordón umbilical humano pretratadas con un inhibidor de reductasa HMG-CoA y posteriormente incubadas con IFN mostraron expresión HLA-DR, DP, DQ similar a los controles de vehículos y no tratados.

[0180] Estos datos indican que la reductasa HMG-CoA inhibe la expresión inflamatoria mediada por citoquina de HLA-DR, DP, DQ en células derivadas de tejido del cordón umbilical humano.

#### **EJEMPLO 9**

#### **Eficacia de células derivadas de tejido del cordón umbilical (hUTC) en un modelo de conejo de la degeneración del disco intervertebral**

[0181] Se realizó un estudio para determinar si las células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC) son eficaces en un modelo de conejo de degeneración de disco intervertebral (IVD). Se inyectaron células en el sitio de lesión y dimensiones de disco evaluadas mediante formación de imágenes de rayos X. El análisis de los tejidos se realizó en la necropsia.

[0182] Para evaluar los efectos de las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (hUTC) en la degeneración de discos intervertebrales (IVD), hUTC se inyectaron en un IVD perforado. Radiografías bisemanales se obtuvieron y se analizaron para el cambio de altura del disco en comparación con el control tratado con vehículo lesionado. El tratamiento con hUTC resultó en un incremento de altura del disco así como aumento de la tasa de recuperación en comparación con los controles del vehículo.

[0183] La creación de modelo de degeneración del disco: Conejos NZW hembra a los 6 meses de edad fueron seleccionados sin ningún tipo de sesgo sistémico. Los animales fueron etiquetados y se pesaron antes de la inscripción e inmediatamente antes de la necropsia. Los conejos recibieron glicopirolato (0,01 a 0,02 mg/kg SQ) antes de la sedación para reducir las secreciones orotraqueales y disminuir bradicardia asociada con la anestesia. La buprenorfina (buprenorfina HCl 0,03 mg/kg) se administró antes de la operación como un analgésico preventivo. Los conejos se anestesiaron mediante la administración de hidrocloreuro de ketamina (25 mg/kg) y maleato de acepromazina (1 mg/kg, 10 mg/ml) para facilitar la intubación endotraqueal. Una radiografía preoperatoria fue tomada como un control de línea de base. Una dosis de xilacina a 5 mg/kg se administró por vía subcutánea o por vía intramuscular después de completarse las radiografías preoperatorias. Los animales se mantuvieron por inhalación de isoflurano (inducido en el 23%, y se mantuvieron a 0,52%).

[0184] Se colocaron los conejos (que pesaban 3,5 kg) en una posición de decúbito prono lateral. Siguiendo preparación y drapeado, los IVDs lumbares fueron expuestos a través de un enfoque retroperitoneal posterolateral mediante disección roma del músculo psoas. Se expusieron las superficies anteriores de tres IVDs lumbares consecutivos (L2/3, L3/4 y L4/5). Usando una aguja 18G con un dispositivo de tapón que permite que la aguja entre a una profundidad de 5 mm, el anillo fibroso se pinchó en el aspecto ventral en el núcleo pulposo en niveles L2/3 y L4/5. Una grapa vascular y una sutura se colocaron en el músculo psoas en el nivel L3/4 como marcadores. La herida quirúrgica creada fue reparada en capas. La piel se cerró con grapas.

[0185] Después de la operación, una radiografía postoperatoria fue tomada para confirmar el nivel de la punción. Se administró 1,5 mg de meloxicam por vía oral (un día antes de la cirugía y 2-3 días después de la operación). Un analgésico (buprenorfina HCl 0,01 - 0,03 mg/kg) se administró hasta dos veces al día durante 2-3 días, según sea necesario, en consulta con el personal veterinario. Después de la recuperación de la anestesia, los conejos fueron

devueltos a sus jaulas y movilizados ad lib. Chaquetas de conejo se utilizaron en conejos para evitar que entren en contacto con y perturben la incisión quirúrgica y retiren las grapas.

5 [0186] Evaluación de los tratamientos: Cuatro semanas después de la cirugía inicial (punción anular), un procedimiento quirúrgico similar se hizo desde el lado opuesto para evitar el sangrado de la cicatriz formada a partir de la primera operación. Una vez que los discos de degeneración quirúrgica se confirmaron por rayos X y la inspección visual, PBS, 1.000.000 o 100.000 células se inyectaron intradiscalmente en el área de núcleo pulposo con una microjeringa usando una aguja 28G, tanto en niveles L2/3 como L4/5 para cada conejo. L3/4 se dejó como control no perforado, no tratado. Después de la reparación de la herida quirúrgica, los conejos fueron devueltos a sus jaulas y estrechamente vigilados. Como se describió previamente, un analgésico y antibiótico se administró durante tres días. Cada conejo recibió 1,5 mg de meloxicam por vía oral (un día antes de la cirugía y 23 días después de la operación). El comportamiento, el apetito y el cambio en el peso corporal fueron monitorizados y la personal veterinario y los investigadores monitorizaron el estrés postquirúrgico.

15 [0187] Todos los materiales de inyección se prepararon en condiciones estériles. hUTC de calidad para investigación (Lote Q030306), evaluados en cuanto a esterilidad, micoplasma, cariotipo, y los patógenos se utilizaron para este estudio. Células criogénicamente almacenadas se descongelaron rápidamente y se diluyeron en PBS. Las células se centrifugaron y el sobrenadante se eliminó. Las células se resuspendieron en PBS y se contaron para lograr una concentración final de células de cualquiera de 100.000 o 10.000 células por microlitro. Tripano azul se utilizó para evaluar la viabilidad. Diez microlitros de células se cargaron en microjeringas preesterilizadas y se inyectaron en el IVD como se describió anteriormente.

20 [0188] A las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 semanas postpunción y el sacrificio a las 16 semanas postpunción, se tomaron radiografías para medir la altura IVD después de la administración de hidrocloreto de ketamina (25 mg/kg) y maleato de acepromazina (1 mg/kg).

25 [0189] A las 16 semanas después de la punción anular inicial (correspondiente a la semana 12, después de la inyección (células)), ocho conejos en cada grupo se anestesiaron con hidrocloreto de ketamina (25 mg/kg) y maleato de acepromazina (1 mg/kg) y la eutanasia con una dosis en exceso de pentobarbital (90 mg/kg, eutanasia solución B: Henry Schein Inc., Melville, NY).

30 [0190] Películas radiográficas obtenidas antes de la punción, en cada punto de tiempo después de la punción, y en la eutanasia se digitalizaron y se midieron la altura de altura del cuerpo y el disco vertebral. La altura IVD se expresó como el DHI de acuerdo con métodos publicados (Chujo *et al.*, *Spine*, 2006; 31: 290.917; Masuda *et al.*, *Spine*, 2006; 31: 742-54). Un investigador ortopédico, cegado al grupo de tratamiento, interpretado de forma independiente todas las imágenes de la radiografía. Las radiografías digitalizadas, mediciones, incluyendo la altura del cuerpo vertebral y la altura IVD, se analizaron mediante el programa personalizado para el software MATLAB (Natick, MA). Los datos fueron transportados al software Excel y la altura IVD se expresó como índice de altura de disco (DHI = altura IVD / altura del cuerpo IVD adyacente) basado en el método de Lu *et al.*, *Spine*, 22: 182 834 (1997), con una ligera modificación. La altura media IVD (DHI) se calculó promediando las mediciones obtenidas a partir de las porciones anterior, medio y posterior del IVD y dividiéndose por la media de las alturas de los cuerpos vertebrales adyacentes. %DHI se expresó como (DHI postoperatorio/DHI preoperatorio) x 100. Además, %DHI se normalizó utilizando el nivel L3/4 como el nivel de control. El % de DHI normalizado = (nivel experimental %DHI / L3/4 %DHI) x 100. También se calculó la tasa de recuperación de la siguiente manera: (%DHI (punto de tiempo) - %DHI (4W [punción])) / (100%DHI (4W [punción])).

35 [0191] La significación de las diferencias entre las medias de los datos de mediciones radiográficas se analizó mediante medidas ANOVA de dos vías repetidas, o ANOVA unidireccional y PLSD de Fisher como una prueba post hoc. Todos los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de programas de Statview (Versión 5.0, SPSS, Chicago, IL) con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

40 [0192] Índice de altura del disco se evaluó cada dos semanas como se describió anteriormente. Los discos con menos de un déficit de 10% fueron excluidos del estudio. Datos (mostrados en la Tabla 17) indican la altura del disco se aumentó con una dosis hUTC de 100.000 células y se disminuyó con una dosis de 1.000.000 células en comparación con el control entre 212 semanas después del trasplante (6-16 semanas postpunción) ( $p < 0,05$  hUTC (1.000.000) vs. hUTC (100.000) 2, 4, 6, y 14 semanas después del trasplante;  $p < 0,01$  8 semanas después del trasplante).

60

65

5

10

Altura de disco (%)	0 Pre-OP	2 2W-P	4 4W-P	6 2W	8 4W	10 6W	12 8W	14 10W	16 12W
Control	100,0	79,4	79,3	78,9	79,5	78,5	77,1	74,8	78,5
Control-SE	0,0	3,2	2,8	2,1	2,6	3,4	4,6	3,6	2,0
1.00E+06	100,0	76,6	76,6	74,8	74,6	72,7	70,8	74,4	72,9
SE	0,0	2,2	1,5	2,1	1,8	2,1	1,4	1,8	2,8
1,00E+05	100,0	84,8	76,6	83,7	83,8	81,3	86,0	82,4	82,2
SE	0,0	1,7	2,6	2,7	3,3	1,9	3,1	4,2	3,8

15 [0193] La tasa de recuperación se midió como se describió anteriormente. Los discos con menos de un déficit de 10% fueron excluidos del estudio. Los datos (mostrados en la Tabla 18) indican que la tasa de recuperación se aumentó con una dosis hUTC de 100.000 y la disminución con una dosis de 1.000.000 en comparación con el control entre 2-12 semanas después del trasplante (6-16 semanas postpunción). (P <0,05 de control vs. hUTC (100.000 células) 2 y 14 semanas después del trasplante; p <0,01 12 semanas de postrasplante).

20

25

30

Velocidad de recuperación	0 Pre-OP	2 2W-P	4 4W-P	6 2W	8 4W	10 6W	12 8W	14 10W	16 12W
Control	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,3	-0,2
Control-SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
1.00E+06 %	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,2	-0,3	-0,1	-0,2
SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
1,00E+05 %	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,4	0,3	0,3
SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1

35 [0194] Por lo tanto, se evaluaron los efectos de hUTC sobre la degeneración de IVD en un modelo de conejo de degeneración de IVD mediante la inyección hUTC en un IVD pinchado en dosis de 1.000.000 y 100.000 células/inyección. Radiografías bisemanales se obtuvieron y se analizaron para el cambio de altura del disco como comparación con el control no tratado perforado. Los datos indicaron que el tratamiento con hUTC a una concentración de 100.000 dio como resultado un aumento de la altura del disco, donde el tratamiento con una concentración de 1.000.000 altura del disco disminuida en comparación con el control tratado por PBS (Tabla 17). El análisis adicional de los datos reveló que la velocidad de recuperación (la cantidad de recuperación/disminución total de DHI % normalizado) de los discos tratados con hUTC (100.000) era mayor que la de control (Tabla 18).

#### 45 EJEMPLO 10

##### Expresión de la proteínas de matriz extracelular por células derivadas de tejido de cordón umbilical humano *in vitro*

50 [0195] Se realizó un estudio para determinar el grado de expresión de las tres proteínas de la matriz extracelular agregcano, colágeno I y colágeno II por hUTC *in vitro*. Las células se ensayaron solas y después de la estimulación con los factores tróficos, TGF-beta, GDF-5 y PDGF-BB.

55 [0196] Los cultivos de células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC; lote 120304) se mantuvieron en cultivo bajo condiciones estándar. En resumen, las células se sembraron a 5000 células por cm cuadrado en matraces T con pasaje y resiembra cada 34 días. Las células para el experimento de factor trófico se encapsularon en perlas de alginato y se trataron con factores al medio de crecimiento estándar. Los cultivos se complementaron con ácido ascórbico a 100 µg/ml. Factores probados fueron PDGF-BB a 10 ng/ml, TGF-beta1 en 5 ng/ml y GDF-5 a 200 ng/ml. Cinco grupos de tratamiento fueron creados, hUTC solo, hUTC con GDF-5, hUTC con TGF-beta1, hUTC con PDGF-BB y hUTC con TGF-beta1 y GDF-5.

60 [0197] Después de 2 semanas en cultivo, las células fueron liberadas de alginato, se lavaron, se sedimentaron y se congelaron. Se aisló el ARN y la transcripción inversa se realizó para generar ADNc. Las muestras se analizaron por PCR en tiempo real para la expresión de agregcano, colágeno de tipo I y de tipo II.

65 [0198] Los resultados de los análisis de PCR en tiempo real muestran la expresión bajo cinco condiciones de cultivo

diferentes. Los resultados se muestran en la Tabla 19 y se expresan como expresión relativa a hUTC sin tratamiento de factor de crecimiento. Los cultivos tratados con PDGF-BB y GDF-5 con TGF-beta1 mostraron una expresión comparable de agrecano, colágeno I y colágeno II. Las células tratadas con TGFbeta1 mostraron cierta inducción de colágeno I y colágeno II y agrecano de aproximadamente 1020 veces. La inducción más alta de se observó con el tratamiento GDF-5. Las células mostraron un aumento de aproximadamente 50 veces en agrecano y colágeno de tipo I y un aumento de más de 300 veces en la expresión de colágeno de tipo II.

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

**EJEMPLO 11**

**Expresión de telomerasa en las células derivadas del cordón umbilical**

[0199] Funciones de telomerasa para sintetizar repeticiones teloméricas que sirven para proteger la integridad de los cromosomas y para prolongar la vida replicativa de las células (Liu, K, *et al.*, *PNAS*, 1999; 96: 5147-5152). La telomerasa consta de dos componentes, plantilla de ARN de telomerasa (hTER) y la transcriptasa inversa de la telomerasa (hTERT). La regulación de la telomerasa es determinada por la transcripción de hTERT, pero no hTER. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) para hTERT ARNm, por tanto, es un método aceptado para determinar la actividad de la telomerasa de las células.

[0200] **Aislamiento de células.** Se llevaron a cabo experimentos de PCR en tiempo real para determinar la producción de la telomerasa de las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano. Se prepararon células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, de acuerdo a los ejemplos expuestos anteriormente. Generalmente, cordones umbilicales obtenidos a partir del National Disease Research Interchange (Philadelphia, Pa.) después de un parto normal se lavaron para eliminar la sangre y los residuos y se disociaron mecánicamente. Después, el tejido se incubó con enzimas de digestión, incluyendo la colagenasa, dispasa y hialuronidasa en medio de cultivo a 37°C. Células derivadas de tejido de cordón umbilical humano se cultivaron de acuerdo con los métodos establecidos en los ejemplos anteriores. Las células madre mesenquimales y fibroblastos de la piel dérmicos normales (cc-2509 lote nº 9F0844) se obtuvieron de Cambrex, Walkersville, Md. Una línea celular de carcinoma embrionario testicular humano pluripotente (teratoma) células nTera-2 (NTERA-2 cl.DI), (véase, Plaia *et al.*, *Stem Cells*, 2006; 24 (3): 531-546) se adquirió de ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron de acuerdo con los métodos establecidos anteriormente.

[0201] Aislamiento de ARN total. Se extrajo el ARN de las células usando kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, Ca.). El ARN se eluye con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a 80°C. El 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.

[0202] PCR en tiempo real. PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando el Applied Biosystems AssaysOnDemand™ (también conocido como ensayos de expresión genética TaqMan®) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems). Este kit comercial es ampliamente utilizado para el ensayo de la telomerasa en las células humanas. Brevemente, hTERT (gen humano de la telomerasa) (HS00162669) y GAPDH humana (control interno) se mezclaron con ADNc y la mezcla maestra TaqMan Universal PCR usando un sistema de detección de secuencia 7000 con software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los datos de PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

[0203] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (ATCC Nº de Acceso PTA6067), fibroblastos y células madre mesenquimales se ensayaron por hTERT y 18S ARN. Como se muestra en la Tabla 20, hTERT, y por lo tanto la telomerasa, no se detectó en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

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

[0204] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (aislado 022803, ATCC N° de Acceso PTA6067) y células nTera-2 se ensayaron y los resultados no mostraron expresión de telomerasa en dos lotes de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano mientras que la línea de células de teratoma reveló un alto nivel de expresión (Tabla 21).

5

Tipo de células	hTERT		GAPDH		Norma hTERT
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	
nTera2	22,85	27,31	16,41	16,31	0,61
022803	-	-	22,97	22,79	-

10

15 [0205] Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano de la presente invención no expresan telomerasa.

### **EJEMPLO 12**

#### **Inyección de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano en el núcleo pulposo altera el curso de la degeneración del disco intervertebral *in vivo***

20 [0206] Este ejemplo investiga la utilidad de la inyección de células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC) directamente en el núcleo pulposo (NP) en un modelo *in vivo* quirúrgico de degeneración IVD. Los hUTC se inyectaron con y sin un vehículo de hidrogel. Este estudio es uno de los primeros en investigar la IRM y respuestas biomecánicas al tratamiento en este modelo de degeneración.

25

#### **Métodos**

30 [0207] Como se describe más en detalle a continuación, se utilizaron treinta conejos blancos de Nueva Zelanda esqueléticamente maduros (control n = 6, punción n = 6, vehículo de hidrogel n = 6, células + tampón PBS n = 6, células + vehículo de hidrogel n = 6) en un modelo de conejo de anulotomía previamente validado para la degeneración del disco intervertebral (véase Sobajima *et al.* Spine 2005; 30 (1): 15-24). Los discos L2-3, fueron pinchados L3-4, L4-5 y se pincharon con una aguja 16G para inducir degeneración y después se trataron posteriormente con células derivadas de tejido del cordón umbilical humano con o sin un vehículo de hidrogel. IRMs de la columna vertebral seriadas obtenidas a las 0, 3, 6, y 12 semanas se analizaron utilizando una bobina de rodilla 3T para la evidencia de la degeneración de acuerdo con la metodología previamente validada. Los conejos se sacrificaron a las 12 semanas y los discos L4-5 se analizaron histológicamente. Propiedades viscoelásticas de los discos de L3-4 se analizaron mediante pruebas de desplazamiento normalizadas a carga uniaxial. Curvas de fluencia se modelaron matemáticamente de acuerdo con un modelo exponencial de dos fases previamente validado.

35

40

#### **Conejos**

45 [0208] Treinta conejos blancos de Nueva Zelanda esqueléticamente maduros sanos fueron utilizados en este estudio (hembra, 1 año de edad, 5 kg de peso). Se dividieron en el control no perforado (n = 6), punción (n = 6), punción seguida de la inyección de vehículo solo (n = 6), punción seguida de la inyección de las células en tampón de PBS (n = 6), y la punción seguida de la inyección de células en vehículo (n = 6).

45

#### **Preparación de la muestra**

50 [0209] Tejido del cordón umbilical humano se obtuvo de un donante que ha dado su consentimiento de someterse a la administración ya sea por vía vaginal o por cesárea. Se aislaron células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (hUTC) y se expandieron desde el cordón umbilical de un solo donante. Brevemente, el cordón umbilical se desmenuzó manualmente y se digirió con una mezcla de 0,5 unidades/ml de colagenasa (Nordmark), 5,0 Unidades/ml, dispasa (Roche Diagnostics), y 2 unidades/ml de hialuronidasa (ISTA Pharmaceuticals) hasta digerirse casi por completo. La suspensión celular se pasó a través de un tamiz para eliminar el tejido no digerido, y las células se centrifugaron y se sembraron a 5.000 células por cm<sup>2</sup> en matraces de porcino revestidas de gelatina en Medios de Crecimiento 1 (DMEM-baja glucosa (Cambrex/SAFC Biosciences), 15% (vol/vol) suero bovino fetal definido (FBS; HyClone, Logan, UT), 0,001% betamercaptoetanol (Sigma), 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (Lonza)). Las células se expandieron en matraces T estáticas, bajo condiciones de cultivo tisular estándar en oxígeno atmosférico con dióxido de carbono al 5% a 37° hasta alcanzar cinco duplicaciones de la población (PD) y se peraltaron. Las células se expandieron en matraces T estáticas a aproximadamente 12 PD acumuladas en el Medio de Crecimiento 2 (DMEM-baja glucosa, 15% (vol/vol) de suero bovino fetal definido (FBS; HyClone), 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen)) y se almacenaron. Las células fueron entonces expandidas adicionalmente en HILLEX® II microvehículos (SoloHill Engineering) en matraces de agitación (Corning, NY) en medio de crecimiento 2. Los matraces de agitación que contenían células se colocaron en placas

55

60

65

spinner fijadas a 60 rpm y las células se cultivaron bajo condiciones estándar en oxígeno atmosférico con dióxido de carbono al 5% a 37°C hasta que alcanzaron aproximadamente 2.530 duplicaciones de población total acumulativas. Las células se recogieron a partir de microvehículos utilizando TrypLE™ (Invitrogen), criopreservadas y almacenadas a temperaturas criogénicas. Las alícuotas del banco de células se descongelaron para las pruebas de caracterización que incluían la viabilidad, la recuperación, la esterilidad, la endotoxina, micoplasma, cariología y inmunofenotipo de marcador de superficie celular para garantizar la seguridad y la identidad. Las células se ensayaron a un paso temprano para patógenos virales por un método basado en PCR para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos para HIV-1, HIV-2, CMV, HBV, HCV, HTLV y EBV. Las células se almacenaron a temperaturas criogénicas hasta su uso y se prepararon para inyección inmediatamente antes de la administración. Inmediatamente antes de las inyecciones a los animales, los viales de células se descongelaron en un baño de agua a 37 °C, y después se lavaron con PBS. Las alícuotas de la suspensión de células se retiraron y se mezclan con azul de tripano y se contaron con un hemocitómetro. La concentración celular se ajustó a la densidad apropiada para la administración. La solución de vehículo era o bien PBS o un vehículo formador de hidrogel *in situ* derivado de los componentes de la cola de fibrina EVICEL® (sellador de fibrina EVICEL® (humano), Omrix Pharmaceuticals, Ltd.). Para cargar células en el hidrogel, las células se mezclaron con fibrinógeno humano (6,8-10,6 mg/ml) en PBS. Este reactivo se mezcló con trombina humana (0,4-0,6 U/ml) en PBS. La gelificación se produjo poco después de la mezcla.

### **Cirugía de punción**

[0210] En una sala de operaciones veterinaria, en condiciones quirúrgicas estériles y anestesia general, las espinas lumbares de los conejos fueron expuestas desde una aproximación anterolateral izquierda. Se identificó el disco intervertebral L4-5 basado en su posición relativa a la cresta ilíaca, y se pinchó con una aguja de calibre 16 a una profundidad de 5 mm de tal manera que la punta de la aguja estaba en el centro del disco. La aguja entró en el disco paralelo a las placas terminales con el céfalo apuntado con bisel. Discos L3-4 y L2-3 se identificaron posteriormente por visualización directa y palpación, y se punzó como anteriormente. Después de la cirugía, los conejos fueron alojados en grandes jaulas privadas que permiten el movimiento sin restricciones. La anulotomía de IVD de un conejo por este método induce una lenta cascada de degeneración, fiable, reproducible, demostrable por IRMs ponderadas de serie T2 (véase Masuda *et al.* Spine 2005; 30 (1): 514).

### **Cirugía de inyección**

[0211] Los conejos en los grupos de tratamiento volvieron a cirugía 3 semanas después de la cirugía inicial de punción. La columna se expuso desde un abordaje anterolateral derecho (contralateral a la cirugía de punción anterior). Una jeringa Hamilton de microlitros 100 (1710TPLT; producto nº 81041) y una aguja aguda de calibre Hamilton 30 de punta afilada con un cubo de plástico (KF 730 NDL 6/paquete, 30G/2"; producto nº 90130) se utilizaron para las inyecciones terapéuticas en el centro de la NP. Para el grupo de vehículo, 15 microlitros de hidrogel se hizo entrar en la jeringa, y se inyectó lentamente en cada disco (en menos de 4,5 minutos para facilitar la inyección de líquido antes de la gelificación). Para las células + grupo de tampón (solución salina tamponada de fosfato), células 10<sup>5</sup> en 15 microlitros de PBS estéril se inyectaron en cada disco. Para las células en el grupo de vehículo, se inyectaron 10<sup>5</sup> células en 15 microlitros de vehículo de hidrogel. Las inyecciones se realizaron bajo la guía de brazo C para confirmar que la aguja estaba en el centro del disco. Todas las inyecciones se realizaron a una velocidad deliberadamente lenta y constante durante el transcurso de un minuto para evitar un rápido incremento en la presión del disco y la extrusión posterior de los materiales. Los conejos fueron cerrados, revividos, y cuidados de la manera descrita para la cirugía de punción.

### **Imagen de resonancia magnética**

[0212] IRMs sagitales se obtuvieron en el tiempo 0 (antes de la punción anular), 3 semanas (antes de la cirugía de la inyección), 6 semanas, y 12 semanas (antes del sacrificio). Un imán de 3 Tesla Siemens y una bobina de rodilla estándar humana se utilizaron para obtener imágenes ponderadas de T1 (TR = 650 ms, TE = 14 ms, grosor de corte = 0,6 mm) e imágenes ponderadas T2 (TR = 3.800 ms, TE = 114 ms, grosor de corte = 0,6 mm). Los conejos fueron sedados y colocados en la bobina de la rodilla en la posición supina. Las imágenes ponderadas T1 se utilizaron para comprobar cualitativamente la presencia de anomalías óseas de la columna vertebral. Las imágenes ponderadas T2 se utilizaron para cuantificar la cantidad de degeneración en los discos. La rebanada sagital media de las secuencias ponderadas T2 fue identificada por un médico entrenado en base a la anchura del cuerpo vertebral, la médula espinal, y las apófisis espinosas. Se empleó un método de segmentación automatizado previamente validado para identificar el NP como la región de interés (véase Bechara *et al.* Am J Neuroradiology 2010; 31 (9): 1640-1644). El índice de IRM se calcula como la suma del área de píxeles multiplicada por la intensidad de píxeles para cada píxel dentro de la región de interés. El porcentaje de área NP e índice relativo IRM a los valores de control en la semana 0 se promediaron a través de los tres discos de interés y se representaron frente a los puntos de tiempo. La significación estadística se calculó con una prueba T de Student (p < 0,05).

### **Sacrificio y procesamiento de la muestra**

[0213] Todos los conejos fueron sacrificados 12 semanas después de la cirugía de punción inicial (después de

5 obtenerse la IRM final). Inmediatamente después de la muerte, las espinas fueron disecadas *en bloque*. El disco L4-5 se preparó para el análisis histológico. Los discos se fijaron y se descalcificaron con DECALCIFIER I® (Surgipath Medical Indus., Inc.) durante dos semanas, luego deshidratados en procesador de tejidos de histología y embebidos en parafina. A continuación, los discos se seccionaron a un espesor de 5 µm en el plano sagital. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) (Sigma) usando el protocolo de histología estándar, y se fotografiaron usando un microscopio Nikon E800.

### **Biomecánica**

10 [0214] Después del sacrificio, el disco L3-4 se diseccionó como una unidad espinal funcional (FSU, hueso-disco-hueso) para el análisis biomecánico. Las muestras se limpiaron de elementos posteriores, en resina epoxi, y se montaron con accesorios personalizados en una máquina de ensayo axial controlada con un Matlab (Matlab R2008a, The Mathworks, Inc., Natick, MA) programa de lógica difusa. Todos los discos fueron envueltos en gasa empapada de salina para minimizar la deshidratación, y la prueba se realizó en el mismo día que el sacrificio. Los especímenes fueron acondicionados previamente con 20 ciclos de carga de compresión (de 0 a 1,0 MPa, 0,1 mm/s) y después se sometieron a compresión constante (1,0 MPa) durante 1100 segundos. Este objetivo de carga se seleccionó debido a que es comparable a las presiones experimentadas por IVD humana en las actividades de la vida diaria (ajustada para el tamaño más pequeño de los discos de conejo) (Wilke *et al.* Spine 1999; 24 (8): 755-762). La fase inicial de rampa se definió como los primeros 200 microsegundos de la prueba, mientras que la fase de fluencia se definió como el resto de la prueba. Después de las pruebas, las curvas de fluencia fueron equipadas con un modelo exponencial bifásico

$$25 \quad \frac{d(t)}{L_0} = \frac{1}{S_1} \left( 1 - e^{-S_1 t / \eta_1} \right) + \frac{1}{S_2} \left( 1 - e^{-S_2 t / \eta_2} \right)$$

30 donde  $d(t)$  es el desplazamiento axial en el tiempo,  $L_0$  es la carga axial aplicada,  $S_1$  y  $S_2$  son coeficientes elásticos de amortiguación (N/mm), y  $\eta_1$  y  $\eta_2$  son coeficientes de amortiguación viscosos (Ns/mm). Curvas promedias se generaron y se equiparon con el modelo exponencial para cada condición.

### **Resultados**

#### **Conejos**

35 [0215] No se observaron efectos adversos en ningún grupo como resultado de tratamiento.

#### **Resonancias magnéticas**

40 [0216] Las resonancias magnéticas ponderadas sagital medio T1 de los discos L2-3, L3-4, y L4-5 no mostraron cambios significativos ni formación de osteofitos. Las resonancias magnéticas de sagital medio ponderadas T2 de los discos en el grupo de pinchado degeneraron (la ROI se oscureció y se desplomó de 0 a 12 semanas), en comparación con los controles no perforados. Todos los tres grupos de tratamiento demostraron menos degeneración, cualitativamente, que el grupo de perforado, como se muestra en las Figuras 1 y 2. Los discos pinchados (y no tratados) mostraron la mayor degeneración con una disminución de 59% en el área NP y una disminución del 64% en índice de resonancia magnética a través de los puntos de tiempo. Los tres grupos de tratamiento mostraron menos degeneración basándose tanto en el área NP total e índice de IRM que el grupo de pinchado. El grupo de vehículo + células tuvo la menor disminución de la superficie y el índice de IRM entre los grupos tratados y se parecía más al grupo de control (Figura 3). A las 0 y 3 semanas no hubo diferencias estadísticamente significativas en el índice de resonancia magnética o área entre control frente a cualquiera de los tres grupos de tratamiento y de punción, o entre punción vs. grupos de tratamiento. A las 6 y 12 semanas las diferencias tanto en el índice de resonancia magnética como en el área entre el control y la punción fue estadísticamente significativa, como era de esperar de un modelo de degeneración válida. Los grupos de control y de soporte mostraron diferencias estadísticamente significativas en el índice IRM a 6 y 12 semanas, y en la zona a las 12 semanas. Los grupos de células de control y de tampón + eran estadísticamente y significativamente diferentes en el índice de resonancia magnética a las 12 semanas. Los grupos de células de control y de tampón + fueron estadísticamente y significativamente diferentes tanto en el índice IRM como el área a las 6 y 12 semanas. Los grupos de punción y vehículos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación de resonancia magnética a través de los puntos de tiempo. Los grupos de células de punción y tampón + fueron estadísticamente significativamente diferentes tanto en el índice IRM como en el área a las 6 y 12 semanas. Los grupos de células de punción y vehículo + fueron significativamente diferentes en el índice IRM y el área a las 12 semanas.

### **Biomecánica**

65 [0217] Las curvas que representan desplazamientos totales de carga normaliza (fase inicial de rampa y fase de

fluencia posterior) se muestran en la Figura 4. Hay una tendencia hacia diferencias entre los grupos. Específicamente, la curva generada por los grupos de control es similar al vehículo + grupo de células, el grupo pinchado es similar al tampón + grupo de células, y el grupo del vehículo se encuentra entre estos grupos. La mayor parte de la variabilidad entre los grupos fue desde la fase inicial de rampa. A pesar de estas tendencias, cuando la fase de fluencia de la curva se encaja con un modelo exponencial de dos fases, los coeficientes de amortiguamiento primeros y viscosos finales y elásticos no dieron ninguna diferencia estadísticamente significativa (datos no mostrados).

### **Histología**

[0218] Cortes sagitales representativos de disco L4-5 se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se inspeccionaron a magnificación 20x y 100x (Figuras 5, 6 y 7). Discos de control mantuvieron su arquitectura. Como era de esperar, los discos perforados demostraron pérdida de celularidad y fibrosis en el NP, sugestivos de degeneración. Discos perforados tratados con el vehículo de hidrogel resultaron en cierta pérdida de celularidad pero mantuvieron una matriz extracelular robusta. El tratamiento con células + tampón demostró preservación relativa de área NP, aunque se observó fibrosis significativa. El tratamiento con células + vehículo resultó en la mejora de la celularidad y la arquitectura en comparación con discos perforados.

### **Discusión**

[0219] Este ejemplo contiene una amplia y variada gama de medidas de resultado, incluyendo nueva tecnología de resonancia magnética y la biomecánica, no sólo para cuantificar degeneración del disco intervertebral (IDD), sino también para mostrar una respuesta a un tratamiento dirigido por la degeneración del disco. Como se discutió en detalle en este ejemplo, los grupos de tratamiento demostraron propiedades viscoelásticas que eran distintas de control y valores perforados.

[0220] En base a los criterios de IRM, histológicos, y biomecánicos, la inyección de discos lumbares intervertebrales de conejo (IVD) sometidos a IDD con hUTC en un vehículo tiene un efecto beneficioso en comparación con cualquiera de vehículo solo o células + tampón solo. Los tres tratamientos parecieron beneficiosos en comparación con discos perforados no tratados. En la RM, el área de núcleo pulposo (NP) y el índice para los tres grupos de tratamiento estaba entre las condiciones de control (no degenerado), y de punción (más degenerada), lo que indica que el tratamiento ayudó parcialmente a retrasar la altura del disco y los cambios de intensidad de la señal. La carga axial generó curvas de desplazamiento que eran distintas apareciendo para cada condición. La histología mostró restauración variable de la arquitectura de disco y celularidad con el tratamiento.

[0221] Las células + grupo PBS generaron datos de IRM que cayeron entre los valores de control y perforados, y tenía un aspecto muy similar a los datos de IRM del grupo de vehículo. Sin embargo, esta curva de desplazamiento del grupo era más similar al estado pinchado, lo que sugiere que a pesar de este tratamiento ayudó a restaurar parcialmente área de NP y de intensidad de la señal en la RM, que no era muy eficaz en la restauración de las propiedades mecánicas nativas del disco.

[0222] El grupo de vehículo sólo generó datos IRM que cayeron entre los valores perforados y no perforados. En el presente ejemplo, la curva de desplazamiento para el grupo de hidrogel también se redujo entre el estado perforado y no perforado, que indica que el vehículo de hidrogel era capaz de restaurar algunas propiedades mecánicas al disco independiente de cualquier síntesis de la matriz extracelular por las células nativas o trasplantadas. La histología del grupo de vehículo tiene más celularidad lo que podría esperarse de un tratamiento no celular, lo que posiblemente indica que el hidrogel proporciona un refugio seguro en el que las células nativas podrían prosperar.

[0223] Las células + grupo de vehículo incorporaron tanto el trasplante de células como la inyección de hidrogel de los otros dos grupos. Este grupo tenía una tendencia consistente, pero no significativa hacia medidas degenerativas de resonancia magnética que eran mejores que los otros dos grupos de tratamiento (más parecidos al estado de control, aunque sigue siendo significativamente diferente de los valores de control). Este grupo también tuvo una curva de desplazamiento que era más similar a la curva de control, lo que sugiere la mejor respuesta mecánica. La histología de este grupo tenía un notable incremento en la celularidad en comparación con el grupo de perforado y una preservación relativa en arquitectura, pero no hay pruebas de la fibrosis.

[0224] No hubo evidencia histológica de una respuesta inmune generada a partir de trasplante de células humanas en un disco de conejo. Ninguno de los conejos tratados exhibió signos de enfermedad, y no hubo evidencia histológica de una respuesta inflamatoria.

[0225] El tejido de posparto umbilical humano es una fuente atractiva para células terapéuticas al ser tejido de donante fácilmente disponible y las células se recogen fácilmente sin los conflictos éticos que están asociados con células madre embrionarias o fetales.

[0226] En resumen, el grupo pinchado se sometió a resonancia magnética y pruebas histológicas de la degeneración en comparación con los controles no perforados, como se esperaba. Los grupos de tratamiento fueron sometidos a

5 menos IRM y evidencia histológica de la degeneración que el grupo de pinchado. Los grupos de tratamiento demostraron propiedades viscoelásticas que eran distintas de valores de control y perforados. Este estudio muestra que la inyección de IVDs lumbares de conejo perforados sometidos a la degeneración con (a) hUTC e (b) hidrogel ralentiza el curso de la degeneración IVD. La inyección de las células en hidrogel retarda la progresión de la degeneración más de cualquiera de (a) hUTC solo o (b) de hidrogel solo. Por lo tanto, este estudio demuestra que el tratamiento de los discos intervertebrales de conejo se punza con células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (hUTC), con y sin una solución de vehículo de hidrogel, ayuda a restaurar IRM, propiedades histológicas y biomecánicas a valores cercanos a los de los controles no perforados.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

[0227]

15 <110> BROWN, LAURA  
GOSIEWSKA, ANNA  
KIHM, ANTHONY J.  
KRAMER, BRIAN

20 <120> TRATAMIENTO DE DEGENERATION DE DISCO INTERVERTEBRAL USANDO CÉLULAS DERIVADAS DE  
TEJIDO DEL CORDÓN UMBILICAL

<130> 18668-332000 (0244C1WO)

25 <140>  
<141> 2012-5-18

<150> 13/111,933  
<151> 2011-5-19

30 <150> 12/337,439  
<151> 2008-12-17

<150> 61/016,849  
<151> 2007-12-27

35 <160> 10

<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
40 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética

<400> 1  
gagaaatcca aagagcaaat gg 22

50 <210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética

<400> 2  
agaatggaaa actggaatag g 21  
60 <210> 3  
<211> 20  
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética

5 <400> 3  
 tcttcgatgc ttcggattcc 20  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética  
 <400> 4  
 gaattctcgg aatctctgtt g 21

15 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética  
 <400> 5  
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21  
 <210> 6  
 <211> 22

25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética  
 <400> 6

30 agtaaacatt gaaaccacag cc 22  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética  
 <400> 7  
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20

40 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética  
 <400> 8  
 ctcaaaaac ttctccaca cc 22  
 <210> 9  
 <211> 17

50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética  
 <400> 9

55 cccacgccac gctctcc 17  
 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Imprimación sintética  
 <400> 10  
 tcctgtcagt tgggtctcc 19

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un hidrogel y una población homogénea aislada de células obtenidas a partir de tejido del cordón umbilical humano, o una composición farmacéutica que comprende dicho hidrogel y población homogénea aislada de células, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o condición relacionada con la degeneración del disco intervertebral, en la que el tratamiento comprende la mejora de la celularidad y la arquitectura de un disco degenerado, en el que el tejido del cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre y la población homogénea aislada de células es capaz de autorrenovación y expansión en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse y no expresa CD117 o telomerasa.
2. El hidrogel y la población de células o composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en la que la población aislada de células tiene una o más de las siguientes características:
- (a) expresa reticulon, ligando del receptor de quimioquinas 3, y/o proteína quimiotáctica de granulocitos;
  - (b) no produce CD31, CD34 y HLA-DR;
  - (c) expresa, con relación a un fibroblasto humano, células madre mesenquimales, o células de médula ósea de cresta ilíaca, niveles incrementados de interleucina 8 y reticulon 1; y
  - (d) expresa CD10, CD13, CD44, CD73, y CD90.
3. El hidrogel y la población de células o composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el tratamiento comprende la administración de la composición farmacéutica por inyección.
4. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, donde la composición farmacéutica comprende además al menos otro tipo celular y/o al menos un agente.
5. El hidrogel y la población de células o composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento comprende la administración del hidrogel y la población de células o composición farmacéutica en un disco intervertebral degenerado, opcionalmente en el núcleo pulposo o en el anillo fibroso del disco intervertebral.
6. El hidrogel y la población de células o composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la inducción de la población homogénea aislada de células obtenidas de tejido del cordón umbilical humano para al menos parcialmente diferenciarse *in vitro*, donde opcionalmente la población homogénea aislada de células se induce para diferenciarse en células que muestran un fenotipo de células de anillo fibroso o un fenotipo de células del núcleo pulposo.
7. El hidrogel y la población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento comprende la administración del hidrogel simultáneamente con, o antes de, o después de la población homogénea aislada de células obtenidas a partir de tejido del cordón umbilical humano.
8. El hidrogel y la población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento comprende la administración de la población homogénea aislada de células dentro de un dispositivo implantable.
9. El hidrogel y la población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento comprende además la administración de al menos otro tipo de células simultáneamente con, o antes de, o después de la población homogénea aislada de células obtenidas a partir de tejido del cordón umbilical humano.
10. El hidrogel y la población de células o composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4 o 9, donde el al menos otro tipo de célula se ha diseñado para expresar al menos un producto exógeno del gen, en el que opcionalmente el producto del gen exógeno es un factor trófico.
11. El hidrogel y la población de células para el uso de la reivindicación 10, donde el producto de gen exógeno modula la expresión de una o más proteínas de matriz extracelular.
12. El hidrogel y la población de células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento comprende además la administración de al menos un agente.
13. El hidrogel y la población de células o composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4 o la reivindicación 12, donde el al menos un agente es un factor trófico, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste de TGF-beta, GDF-5, PDGF-BB y TIMP-1, donde opcionalmente el factor trófico ejerce efecto atrófico en la población celular homogénea aislada obtenida a partir de tejido del cordón umbilical humano.
14. El hidrogel y la población de células o composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, donde el hidrogel comprende fibrinógeno y trombina y/o cola de fibrina.

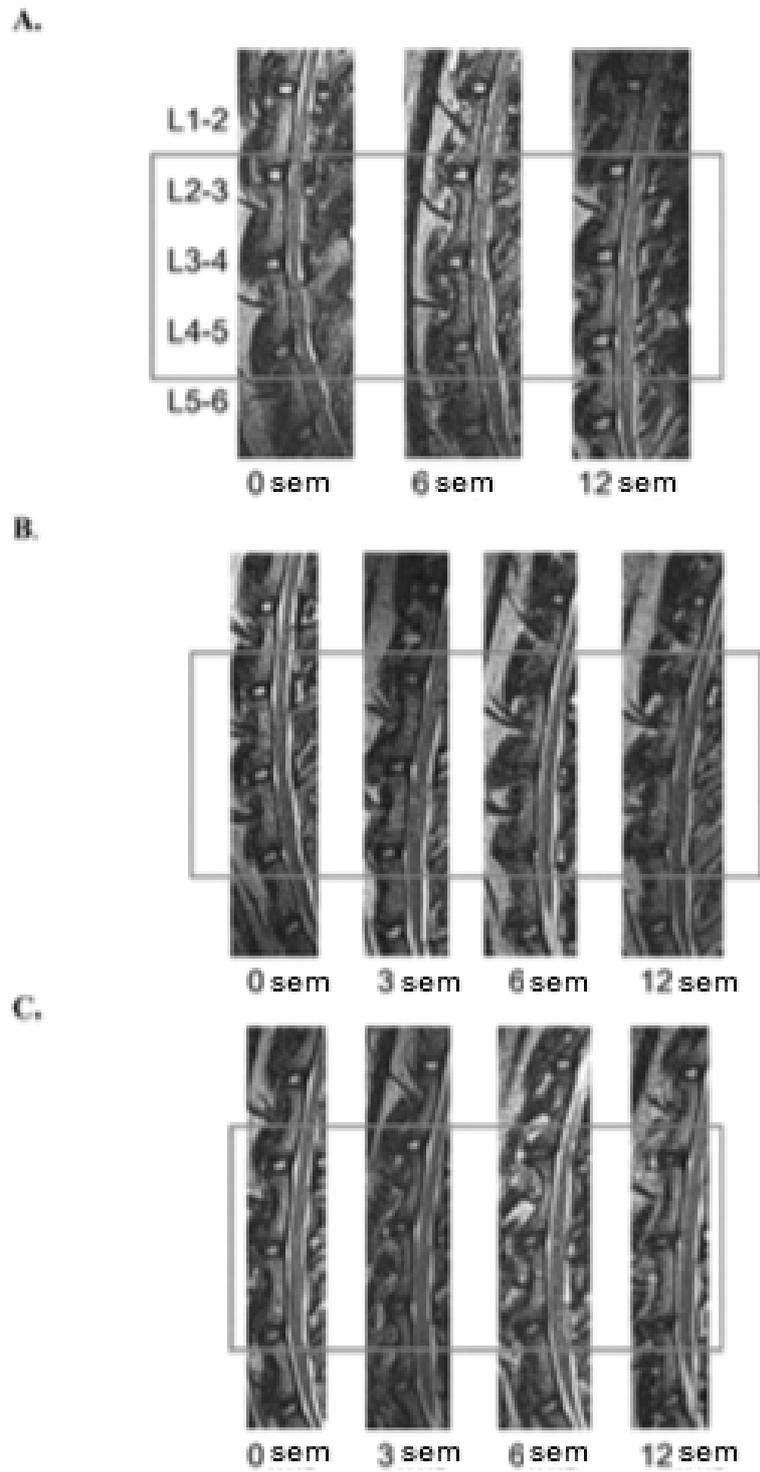
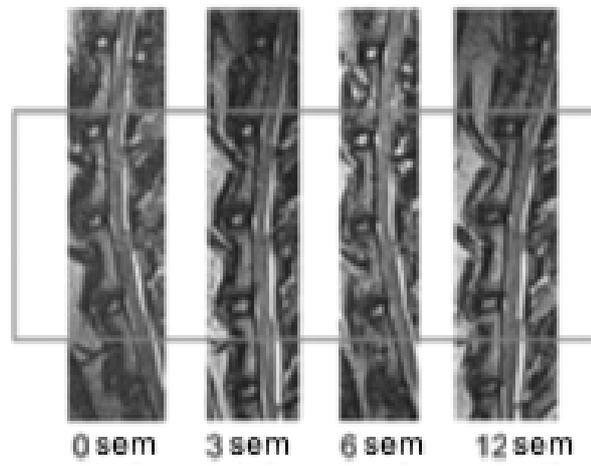
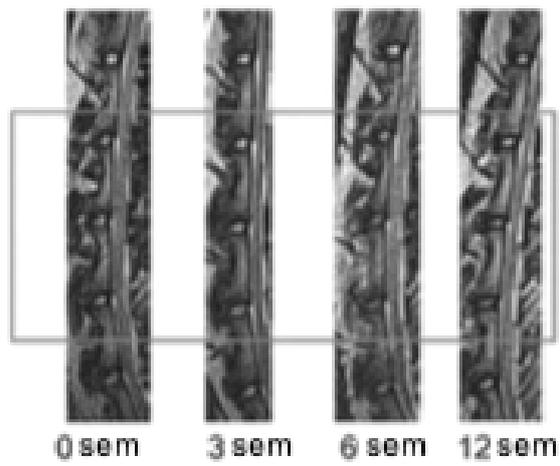


Figura 1

A.

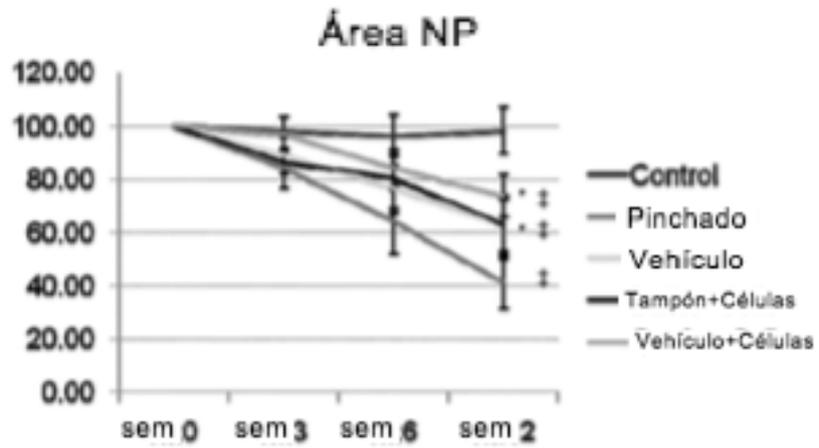


B.

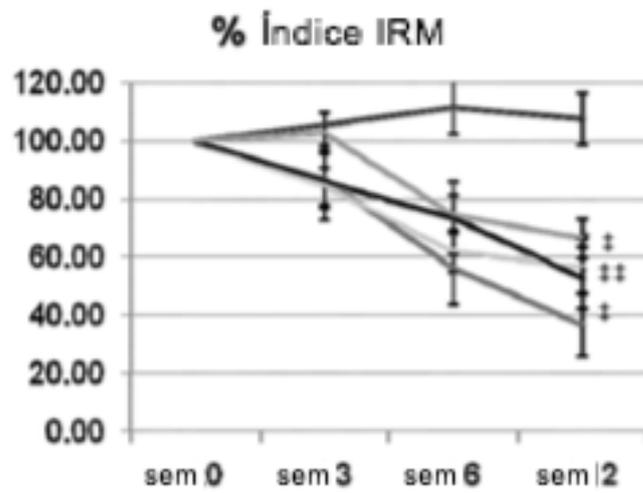


**Figura 2**

A.



B.



**Figura 3**

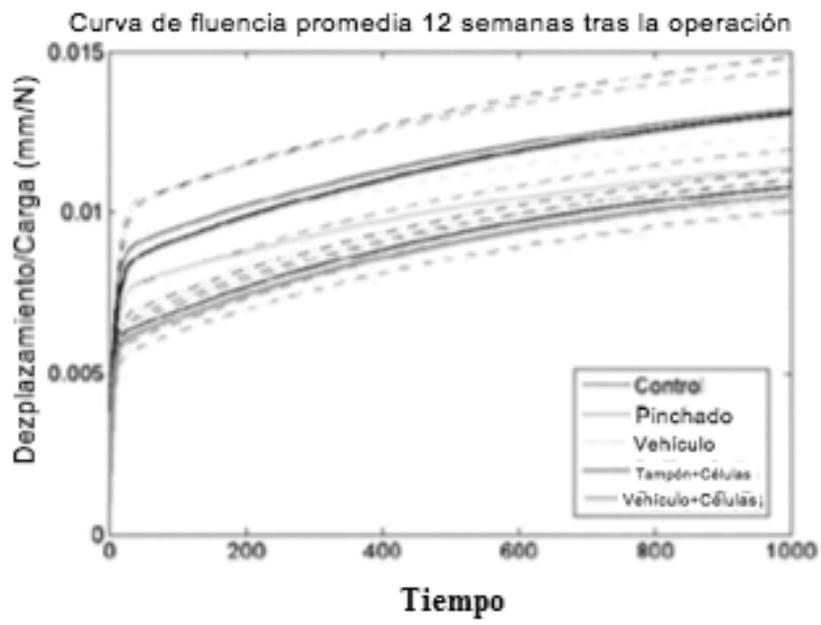
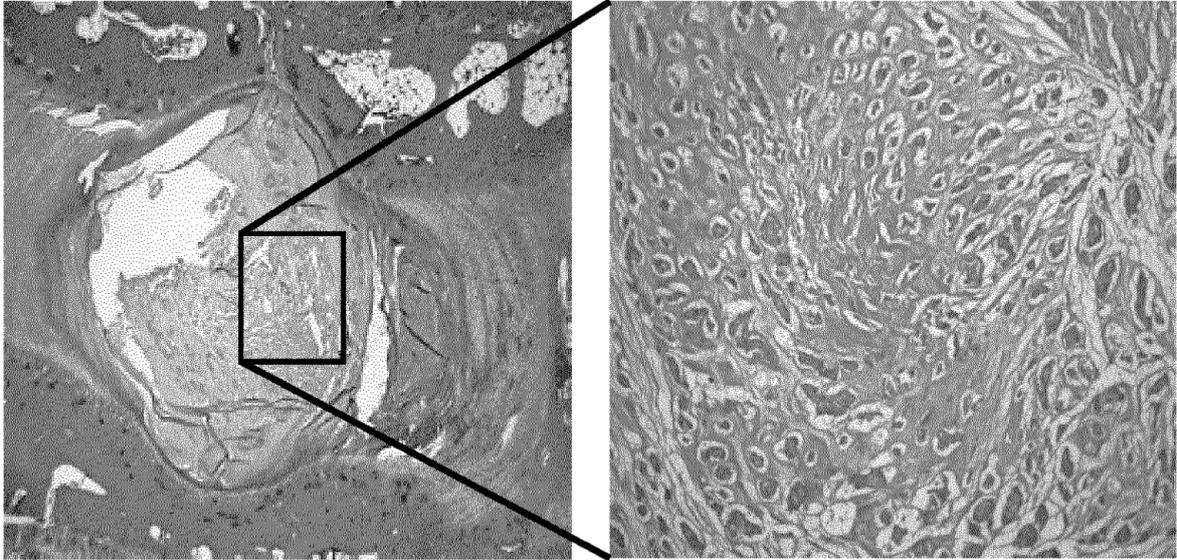
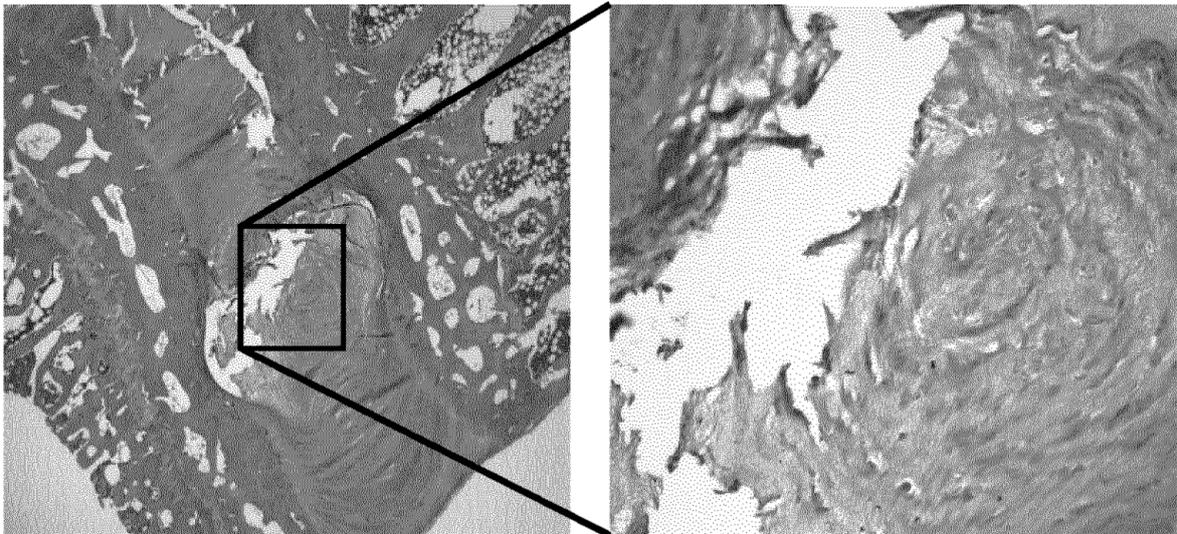


Figura 4

**A.**

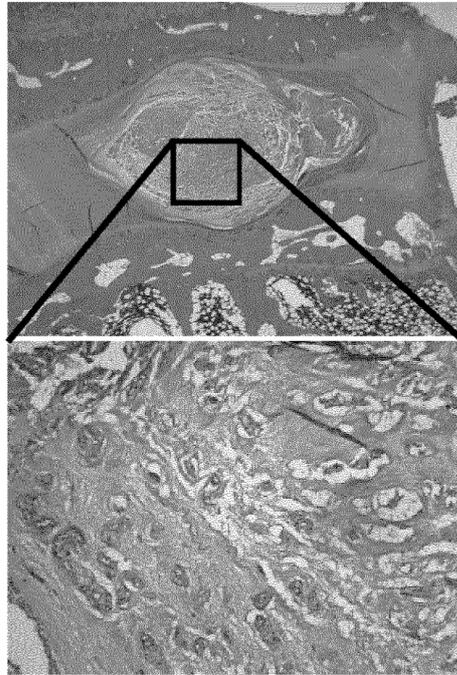


**B.**

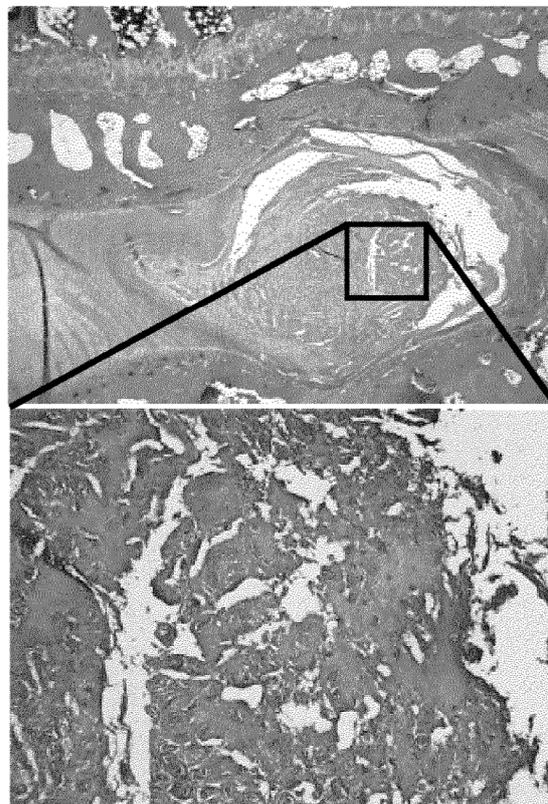


**Figura 5**

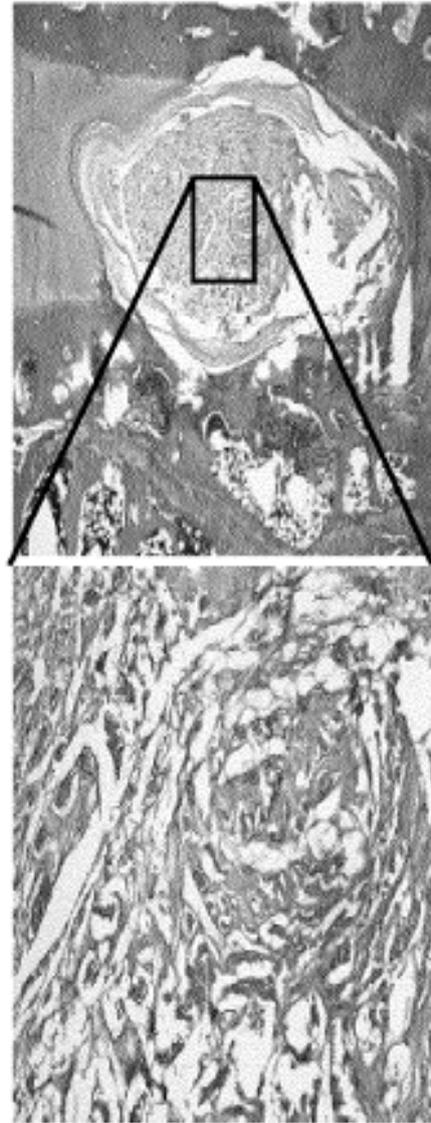
**A.**



**B.**



**Figura 6**



**Figura 7**