

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 129**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2006 PCT/US2006/062667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2007 WO07076522**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006 E 06848872 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1979050**

54 Título: **Tratamiento de la enfermedad vascular periférica utilizando células derivadas del posparto**

30 Prioridad:

28.12.2005 US 754366 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**DEPUY SYNTHES PRODUCTS, INC. (100.0%)
RT. 22 WEST, P.O.BOX 151
SOMERVILLE, NJ 08876-0151, US**

72 Inventor/es:

KIHM, ANTHONY J.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 628 129 T3

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

Tratamiento de la enfermedad vascular periférica utilizando células derivadas del posparto**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere al campo de la terapia regenerativa o basada en células para pacientes con enfermedad vascular periférica, especialmente aquellos con isquemia periférica. En particular, la invención proporciona células derivadas de tejido de cordón umbilical humano posparto que tiene la capacidad de estimular y soportar la angiogénesis, mejorar el flujo sanguíneo, regenerar, reparar y mejorar el músculo esquelético dañado por un acontecimiento isquémico periférico y proteger el músculo esquelético frente al daño isquémico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 A lo largo de la memoria descriptiva se citan diversas publicaciones, incluyendo patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos.

La enfermedad vascular periférica (DVP) puede deberse a una oclusión aterosclerótica de los vasos sanguíneos, particularmente en las extremidades y áreas distales del corazón, que da como resultado una disminución del flujo sanguíneo e insuficiente perfusión de oxígeno a los tejidos en las proximidades y en zonas posteriores a la oclusión. La PVD se manifiesta con frecuencia en los vasos sanguíneos ilíacos, vasos sanguíneos femorales y poplíteos, y vasos sanguíneos subclavios, y sus efectos pueden agravarse por trombos, embolias o traumatismos. Se estima que aproximadamente 8-12 millones de personas en Estados Unidos, especialmente entre la población anciana y aquellos con diabetes, están afectados por PVD.

Entre los síntomas más frecuentes de PVD incluyen calambres en las extremidades superiores e inferiores, entumecimiento, debilidad, fatiga muscular, dolor en los miembros y extremidades, hipotermia en los miembros extremidades, decoloración de las extremidades, piel seca o escamosa e hipertensión. El síntoma más frecuente es la claudicación, o sensación de dolor, opresión y fatiga en los músculos posteriores al vaso sanguíneo ocluido que se produce durante algún tipo de ejercicio, tal como caminar, pero desaparece espontáneamente después de un período de descanso.

En términos de fisiopatología, los vasos sanguíneos ocluidos causan isquemia de los tejidos en el sitio y distal a la obstrucción. Esta isquemia se denomina, generalmente, isquemia periférica, lo que significa que se produce en lugares distales al corazón. La gravedad de la isquemia es una función del tamaño y el número de obstrucciones, esté la obstrucción cerca de un músculo u órgano y si hay suficiente vasculatura redundante. En los casos más graves, la isquemia da como resultado la muerte de los tejidos afectados y puede dar lugar a la amputación de los miembros afectados o incluso la muerte del paciente.

Los métodos actuales para el tratamiento de los casos más graves de PVD incluyen regímenes quimioterapéuticos, angioplastia, inserción de endoprótesis vasculares, cirugía reconstructiva, injertos de derivación coronaria, resección de tejidos afectados o amputación. Desafortunadamente, para muchos pacientes, estas intervenciones muestran un éxito limitado y muchos pacientes experimentan un empeoramiento de las condiciones o síntomas.

En la actualidad, existe interés en utilizar células madre, que pueden dividirse y diferenciarse, o células musculares de otras fuentes, incluyendo células de músculos lisos y esqueléticos, para ayudar a la reparación o reversión de daño tisular. Se puede utilizar el trasplante de células madre como herramienta clínica para reconstituir un tejido diana, restableciendo de este modo la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de la tecnología de células madre es amplia e incluye ingeniería de tejidos, liberación de terapia génica y terapia celular, es decir, liberación de agentes bioterapéuticos en un lugar objetivo a través de células vivas o componentes celulares suministrados exógenamente que producen o contienen dichos agentes (para una revisión, véase Tresco, P.A. et al., (2000) *Advanced Drug Delivery Reviews* 42:2-37). La identificación de células madre ha estimulado la investigación dirigida a la generación selectiva de tipos específicos de células para la medicina regenerativa.

Un obstáculo para la realización del potencial terapéutico de la tecnología de células madre ha sido la dificultad de obtener un número suficiente de células madre. El tejido embrionario o fetal es una fuente de células madre. Se han aislado células madre y progenitoras embrionarias de varias especies de mamíferos, incluyendo seres humanos, y se ha demostrado que varios tipos de células de este tipo son capaces de autorrenovación y expansión, así como diferenciación en un número de diferentes linajes celulares. Pero la derivación de células madre de fuentes embrionarias o fetales ha planteado muchos problemas éticos y morales que es deseable evitar al identificar otras fuentes de células multipotenciales o pluripotenciales.

Los tejidos posparto, tal como el cordón umbilical y la placenta, han generado interés como fuente alternativa de células madre. Por ejemplo, se han descrito métodos para la recuperación de células madre mediante perfusión de la placenta o recolección de sangre o tejido de cordón umbilical. Una limitación de la obtención de células madre de estos métodos ha sido un volumen inadecuado de sangre de cordón umbilical o de cantidad de células obtenidas,

así como heterogeneidad o carencia de caracterización de las poblaciones de células obtenidas a partir de esas fuentes.

En el documento US 2005/0058631 se describen células posparto derivadas de tejido placentario.

5 Una fuente fiable, bien caracterizada y abundante de poblaciones sustancialmente homogéneas de tales células que tienen la capacidad de diferenciarse en una serie de músculos esqueléticos, pericitos o linajes vasculares sería una ventaja en diversas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas para la reparación, regeneración y mejora del músculo esquelético, para la estimulación y/o soporte de la angiogénesis, y para la mejora del flujo sanguíneo posterior a un acontecimiento isquémico periférico, particularmente en pacientes con PVD.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

15 La invención proporciona células derivadas de posparto derivadas de tejido del cordón umbilical humano libre de sangre, para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene isquemia periférica, en el que las células:

son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo;
 tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un fenotipo de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular;
 20 requieren L-valina para el crecimiento;
 puede crecer en al menos aproximadamente un 5 % de oxígeno;
 tienen una expresión aumentada de interleucina 8 y de reticulón 1 en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca;
 producen CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y
 25 no producen CD45 y CD117.

La invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene isquemia periférica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y células derivadas del posparto de la invención.

30 La invención también proporciona un kit para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene isquemia periférica, comprendiendo el kit un vehículo farmacéuticamente aceptable, una población de células derivadas del posparto como se ha definido anteriormente e instrucciones para usar el kit en un método de tratamiento del paciente.

35 Un aspecto de la divulgación presenta un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad vascular periférica, comprendiendo el método administrar al paciente las células derivadas del posparto una cantidad eficaz para tratar la enfermedad vascular periférica, en el que las células derivadas del posparto se obtienen de placenta humana o tejido de cordón umbilical sustancialmente exento de sangre, en el que las células son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un fenotipo de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular; en el que las células requieren L-valina para su crecimiento y pueden crecer en al menos aproximadamente 5 % de oxígeno; en el que las células comprenden además al menos una de las siguientes características: (a) potencial para al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; (B) unión y expansión en un vaso de cultivo de tejidos recubierto o no recubierto, en el que el vaso de cultivo de tejidos recubiertos comprende un revestimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliorritina, vitronectina o fibronectina; (c) producción de al menos uno de factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso; (d) producción de al menos uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; (e) ausencia de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ, según se detecta mediante citometría de flujo; (f) expresión de un gen, que, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de la médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para al menos uno de un gen que codifica: interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento del melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C - X - C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C - X - C); factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; miembro 2 de la superfamilia de lectina de tipo C; tumor de Wilms 1; miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1; renina; receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas; clon IMAGE: 4179671 de Homo sapiens; proteína quinasa C zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; regulado negativamente en el cáncer de ovario 1; y el gen de Homo sapiens del clon DKFZp547k1113 (g) la expresión de un gen que, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se encuentra reducida para al menos uno de un gen que codifica: homeocaja 2 de estatura baja; proteína del choque térmico de 27 kDa; ligandos 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supralvalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc de DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica del cese de crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja sine oculis (Drosophila); alfa B cristalina; activador 2 asociado "disheveled" de la morfogénesis 2; proteína DKFZp586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión a plasminógeno); dominio 3 de homología con src (SH3) y rico en cisteínas; colesterol 25- hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con el enanismo 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo Frizzled 7 (Drosophila); gen

- hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquina) ; proteína 5 de la homeocaja iroquesa; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de vesículas sinápticas; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina de 36kDa; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar a receptores de citocinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ) ; homólogo 2 de la homeocaja de sine oculis (Drosophila); ; proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesícula (miobrevina) ; proteína 1 de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta 3 de crecimiento temprano; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; miembro C3 de la familia 1 de la aldo-ceto reductasa (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ) ; fibronectina 1; proencefalina; integrina, beta similar a 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C de péptido natriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222) ; similar a la proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; y/o polipéptido 1 de la subunidad VIIa de citocromo c oxidasa (músculo); similar a neuralina 1; B gen 1 de translocación celular; proteína hipotética FLJ23191; y DKFZp586L151; (h) secreción de al menos una de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES y TIMP1; y (i) ausencia de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, I309, MDC y VEGF, detectado mediante ELISA.
- 5 En una realización particular, la enfermedad vascular periférica es isquemia periférica. En ciertas realizaciones, las células se inducen *in vitro* para diferenciarse en músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o células de linaje endotelial vascular antes de la administración. En otras realizaciones, las células se manipulan genéticamente para producir un producto génico que estimula el tratamiento de la enfermedad vascular periférica.
- 10 En algunas realizaciones del método, las células se administran con al menos otro tipo celular, que puede incluir células del músculo esquelético, células progenitoras del músculo esquelético, células del músculo liso vascular, células progenitoras del músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales vasculares, células progenitoras del endotelio vascular u otras células madre multipotenciales. El otro tipo de célula puede administrarse simultáneamente o antes o después de las células derivadas del posparto.
- 15 En otras realizaciones, las células se administran con al menos otro agente, que puede ser un agente antitrombogénico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un agente proangiogénico o un agente antiapoptótico, por ejemplo. El otro agente puede administrarse simultáneamente o antes o después de las células derivadas del posparto.
- 20 Preferentemente se administran en los sitios de la isquemia periférica o proximal a los mismos, pero también se pueden administrar en sitios distales a la isquemia periférica. Pueden administrarse mediante inyección, infusión, un dispositivo implantado en el paciente o mediante implantación de una matriz o armazón que contiene las células. Las células pueden ejercer un efecto trófico, tal como proliferación, en el músculo esquelético, músculo liso vascular o endotelio vascular del paciente. Las células pueden inducir la migración de las células del músculo esquelético, las células del músculo liso vascular, las células endoteliales vasculares, las células progenitoras del músculo esquelético, los pericitos, las células progenitoras del músculo liso vascular o las células progenitoras del endotelio vascular al sitio o sitios de la enfermedad vascular periférica, tal como isquemia periférica.
- 25 Otro aspecto de la invención presenta composiciones farmacéuticas y kits para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad vascular periférica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y las células derivadas del posparto descritas anteriormente. En algunas realizaciones preferidas, las preparaciones comprenden FGF y HGF. Las composiciones farmacéuticas y los kits se diseñan y/o se formulan para practicar los métodos de la divulgación como se ha descrito anteriormente.
- 30 De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, los métodos descritos anteriormente se pueden practicar usando una preparación hecha de las células derivadas del posparto, en los que la preparación comprende un lisado celular de las células derivadas del posparto, una matriz extracelular de las células derivadas del posparto o un medio acondicionado en el que se cultivaron las células derivadas del posparto. Se prefiere que tales preparaciones comprendan FGF y HGF.
- 35 Otros aspectos de la divulgación incluyen composiciones farmacéuticas y kits que contienen preparaciones que comprenden lisados celulares, matrices extracelulares o medios acondicionados de las células derivadas del posparto.
- 40 Otras características y ventajas de la invención se entenderán con referencia a la descripción detallada y ejemplos siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el efecto del lote hUTC n.º 120304, MSC y fibroblastos sobre la proliferación de células

5 endoteliales. Las células endoteliales se sembraron en el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (10.000 células/pocillo) y hUTC lote n.º 120304, MSC o fibroblastos dentro de los insertos transwell a una densidad de 5000 células/cm² (1.650 células/inserto) en medio de cocultivo (Hayflick 80 % + EGM-2MV 20 % o Hayflick 50 % + EGM-2MV 50 %). Después de 7 días de cocultivo, las células se cosecharon y se contaron usando un instrumento de Guava. Las células endoteliales también se mantuvieron en medio EGM-2MV como control positivo. A, HUVEC. B, HCAEC. C, HIAEC.

10 La figura 2 muestra el efecto del lote hUTC n.º 120304, y anticuerpos neutralizantes sobre la proliferación de células endoteliales. Se sembraron HUVEC o HCAEC en el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (10.000 células/pocillo) y hUTC lote n.º 120304, dentro de los insertos transwell a una densidad de 5000 células/cm² (1.650 células/inserto) en medio de cocultivo (Hayflick 50 % + EGM-2MV 50 %). También se añadieron anticuerpos neutralizantes a FGF (7 µg/ml), HGF (1 µg/ml) o VEGF (1 µg/ml) en este momento. Después de 7 días de cocultivo, las células se cosecharon y se contaron usando un instrumento de Guava. Las células endoteliales también se mantuvieron en medio EGM-2MV como control positivo. Se muestran las células tratadas con factor de crecimiento solo y factor de crecimiento más anticuerpos neutralizantes. A, HUVEC. B, HCAEC.

15 La figura 3 muestra el efecto del lisado de células de hUTC lote n.º 120304 y de anticuerpos neutralizantes sobre la proliferación de HUVEC. Se sembraron HUVEC en el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (10.000 células/pocillo) en medio EGM - 2MV durante 8 horas. A continuación, se mantuvo a las células sin suero mediante incubación durante la noche en 0,5 ml de medio EGM-2MV que contenía FBS al 0,5 % y sin factores de crecimiento. Posteriormente, se añadieron FBS, lisados celulares de hUTC lote n.º 120304 recién preparados y anticuerpos neutralizantes de FGF (7 µg/ml) o HGF (1 µg/ml). Después de 4 días de cocultivo, las células se cosecharon y se contaron usando un instrumento de Guava. Barras de color gris claro, controles de medios. Barras de color gris medio, HUVEC incubadas con lisado que contiene 62,5 µg de proteína. Barras de color gris oscuro, HUVEC incubadas con lisado que contiene 125 µg de proteína.

20 La figura 4 muestra el efecto de hUTC y MSC sobre la migración de células endoteliales. Se sembraron HUVEC o HCAEC en los insertos transwell a una densidad de 5000 células/cm² (23.000 células/inserto) y hUTC lote n.º 120304 o MSC en el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (48.000 células/pocillo) en medio de cocultivo (Hayflick 50 % + EGM-2MV 50 %). Después de 7 días de cocultivo, se cosecharon las células que estaban en la parte inferior del inserto de transwell y se contaron usando un instrumento de Guava. Las células endoteliales también se mantuvieron en medio EGM-2MV como control. A, HUVEC. B, HCAEC.

25 La figura 5 muestra el efecto del lote hUTC n.º 120304, y anticuerpos neutralizantes sobre la migración de células endoteliales. Se sembraron HUVEC o HCAEC en los insertos transwell a una densidad de 5000 células/cm² (23.000 células/inserto) y hUTC lote n.º 120304 en el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (48.000 células/pocillo) en medio de cocultivo (Hayflick 50 % + EGM-2MV 50 %). También se añadieron anticuerpos neutralizantes a FGF (7 µg/ml) o HGF (1 µg/ml) en este momento. Después de 7 días de cocultivo, se cosecharon las células que estaban en la parte inferior del inserto de transwell y se contaron usando un instrumento de Guava. Las células endoteliales también se mantuvieron en medio EGM-2MV como control. A, HUVEC. B, HCAEC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se usan diversos términos. Dichos términos tendrán el significado habitual en la materia, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de forma consistente con la definición proporcionada en el presente documento.

50 Las *células madre* son células indiferenciadas definidas por la capacidad de una sola célula tanto para autorrenovarse como para diferenciarse para producir células descendientes, incluidas células progenitoras autorrenovantes, progenitoras no renovantes y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a los tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de inyectarse en blastocistos.

55 Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) *totipotenciales*; (2) *pluripotenciales*; (3) *multipotenciales*; (4) *oligopotenciales*; y (5) *unipotenciales*. Las células totipotenciales son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Las células pluripotenciales son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias. Las células multipotenciales son capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico concreto. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una descendencia que incluye HSC (autorrenovantes), progenitoras oligopotenciales limitadas a células sanguíneas, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre. Las células que son oligopotenciales son capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotenciales; Las células que son unipotenciales son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

Las células madre también se clasifican en base a la fuente de la que pueden obtenerse. Una *célula madre adulta* es, generalmente, una célula indiferenciada multipotencial que se encuentra en tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre adulta puede autorrenovarse. En circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir los tipos especializados de células del tejido del que se originaron y, posiblemente, otros tipos de tejidos. Una *célula madre embrionaria* es una célula pluripotencial de la masa celular interna de un embrión en fase de blastocisto. Una *célula madre fetal* es la que procede de tejidos o membranas fetales. Una *célula madre posparto* es una célula multipotencial o pluripotencial que procede sustancialmente de tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, a saber, la placenta y el cordón umbilical. Se ha descubierto que estas células poseen rasgos característicos de las células madre pluripotenciales, incluidos la rápida proliferación y el potencial de diferenciarse a muchos linajes celulares. Las células madre posparto pueden ser de origen sanguíneo (por ejemplo, como las obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical) o de origen no sanguíneo (por ejemplo, como las obtenidas a partir de tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y la placenta).

El tejido embrionario se define, por lo general, como tejido de origen embrionario (que en los seres humanos se refiere al período desde la fertilización hasta aproximadamente seis semanas de desarrollo). *Tejido fetal* se refiere a tejido de origen fetal, que en los seres humanos se refiere al período desde aproximadamente seis semanas de desarrollo hasta el parto. El tejido extraembrionario es el tejido asociado con, pero no procedente de, el embrión o el feto. Los tejidos extraembrionarios incluyen las membranas extraembrionarias (corion, amnios, saco vitelino y alantoides), el cordón umbilical y la placenta (que se forma a partir del corion y de la decidua basal materna).

La *diferenciación* es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula *diferenciada* es la que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término *comprometida*, cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en la que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose hasta un tipo de célula o subconjunto de tipos de células específico, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse a un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. *Desdiferenciación* se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procedía y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

En un sentido amplio, una *célula progenitora* es una célula que tiene la capacidad de crear una descendencia que está más diferenciada que ella misma y que, sin embargo, conserva la capacidad de reponer la reserva de progenitoras. Según esta definición, las propias células madre también son células progenitoras, ya que son las precursoras más inmediatas a las células terminalmente diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, tal como se describen con mayor detalle más adelante, puede utilizarse esta definición amplia de *célula progenitora*. En un sentido más estricto, una célula progenitora suele definirse como una célula que es una célula intermedia en la vía de diferenciación, es decir, que surge de una célula madre y es una célula intermedia en la producción de un tipo de célula o un subconjunto de tipos de células maduras. Este tipo de célula progenitora no es capaz, en general, de autorrenovarse. Por consiguiente, si se hace referencia a este tipo de célula en el presente documento, se denominará *célula progenitora no renovante* o *célula progenitora intermedia* o *célula precursora*.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión *se diferencia* a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico se refiere a una célula que se compromete a un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico específico, respectivamente. Entre los ejemplos de células que se diferencian a un linaje mesodérmico o dan lugar a células mesodérmicas específicas se incluyen, pero no se limitan a las mismas, células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, hemangiogénicas, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas o estromales. Entre los ejemplos de células que se diferencian al linaje ectodérmico se incluyen, pero no se limitan a las mismas, células epidérmicas, células neurogénicas y células neurogliogénicas. Entre los ejemplos de células que se diferencian al linaje endodérmico se incluyen, pero no se limitan a las mismas, células pleurigénicas, células hepatogénicas, células que dan lugar al revestimiento del intestino y células que dan lugar a células pancreogénicas y esplanogénicas.

Las células de la presente invención se denominan, generalmente, *células posparto* o *células derivadas posparto* (PPDC). En ocasiones también se pueden denominar de un modo más específico *células derivadas del cordón umbilical* (UDC) de la invención o *células derivadas de la placenta* (PDC) de la divulgación. Las PPDC de la invención son células derivadas del cordón umbilical. Además, las células pueden describirse como células madre o progenitoras, utilizándose esta última expresión en el sentido amplio. El término *derivada(s)* se utiliza para indicar que las células se han obtenido de su fuente biológica y se han cultivado o *manipulado* de otra manera *in vitro* (por ejemplo, se han cultivado en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Más adelante se describen detalladamente las manipulaciones *in vitro* de células madre de cordón umbilical y las características únicas de las células derivadas del cordón umbilical de la presente invención.

Pericitos, también conocidos en la materia como células Rouget o células murales, se refieren a las células que se

encuentran típicamente incrustadas dentro de la membrana basal vascular de los microvasos sanguíneos (Armulik A et al. (2005) Circ. Res. 97:512–23), que se cree desempeñan un papel en, entre otras cosas, la comunicación/señalización con las células endoteliales, vasoconstricción, vasodilatación, la regulación del flujo sanguíneo, la formación y desarrollo de la vasculatura sanguínea, la angiogénesis y la diferenciación endotelial y detención del crecimiento (Bergers G et al. (2005) Neuro-Oncology 7:452–64).

Se utilizan diversos términos y expresiones para describir las células en cultivo. *Cultivo celular* se refiere, en general, a células sacadas de un organismo vivo y cultivadas en condiciones controladas ("en cultivo" o "cultivadas"). Un *cultivo de células primarias* es un cultivo de células, tejidos u órganos sacados directamente de uno o más organismos antes del primer subcultivo. Las células se *expanden* en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, lo que da como resultado una población mayor de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular se mide, a veces, por la cantidad de tiempo necesario para que las células dupliquen su número. Esto se conoce como *tiempo de duplicación*.

Una *línea celular* es una población de células formada mediante uno o más subcultivos de un cultivo de células primarias. Cada ronda de subcultivo se denomina *pase*. Cuando se subcultivan las células, se dice que *han sido sometidas a pases*. Una población específica de células, o una línea celular, se denomina o caracteriza a veces por el número de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a pases diez veces puede denominarse cultivo *P10*. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células a partir del tejido, se designa *P0*. Después del primer subcultivo, las células se describen como cultivo secundario (*P1* o *pase 1*). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (*P2* o *pase 2*), y así sucesivamente. Los expertos en la materia entenderán que puede haber muchas duplicaciones de población durante el período de pases; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es superior al número de pases. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo entre pases depende de muchos factores, incluidos, pero no limitados a los mismos, la densidad de siembra, el sustrato, el medio, las condiciones de crecimiento y el tiempo entre pases.

Un *medio acondicionado* es un medio en el que se ha cultivado una célula o población de células específicas y se han extraído después. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Dichos factores tróficos incluyen, entre otros, hormonas, citocinas, proteínas de la matriz extracelular (MEC), vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado.

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

Cuando se hace referencia a células de vertebrados en cultivo, el término *senescencia* (también *senescencia replicativa* o *senescencia celular*) se refiere a una propiedad atribuible a los cultivos celulares finitos; a saber, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de la población (a veces denominado *límite de Hayflick*). A pesar de que la senescencia celular se describió por primera vez utilizando células similares a fibroblastos, la mayoría de los tipos normales de células humanas que pueden hacerse crecer con éxito en cultivo experimentan senescencia celular. La longevidad *in vitro* de los diferentes tipos de células varía, pero la longevidad máxima es, por lo general, inferior a 100 duplicaciones de la población (este es el número de duplicaciones para que todas las células en el cultivo se vuelvan senescentes y, por lo tanto, que hace que el cultivo sea incapaz de dividirse). La senescencia no depende del tiempo cronológico, sino que se mide por el número de divisiones celulares, o duplicaciones de la población, que ha experimentado el cultivo. Por lo tanto, las células que se hacen quiescentes eliminando los factores de crecimiento esenciales pueden reanudar su crecimiento y división cuando se vuelven a introducir los factores de crecimiento, y, posteriormente, llevar a cabo el mismo número de duplicaciones que las células equivalentes que han crecido continuamente. Del mismo modo, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de diversos números de duplicaciones de la población y, a continuación, se descongelan y cultivan, experimentan sustancialmente el mismo número de duplicaciones que las células mantenidas sin congelar en cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; en realidad son resistentes a la muerte celular programada (apoptosis) y se han mantenido en su estado de no división durante hasta tres años. Estas células están realmente vivas y metabólicamente activas, pero no se dividen. Todavía no se ha descubierto si el estado de no división de las células senescentes es reversible con algún agente biológico, químico o vírico.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión *medio de crecimiento* se refiere a un medio suficiente para el cultivo de las células derivadas posparto. En particular, un medio de cultivo preferente actualmente para el cultivo de las células de la invención comprende medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM). Particularmente preferentemente es DMEM con bajo contenido de glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DMEM-LG está suplementado, preferentemente, con suero, lo más preferentemente suero bovino fetal o suero humano. Típicamente se añade 15 % (v/v) de suero bovino fetal (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan UT), junto con antibióticos/antimicóticos (preferentemente, 100 unidades/ml de penicilina, 100 miligramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA) y 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis MO). En algunos casos se usan diferentes medios de crecimiento, o se

proporcionan diferentes complementos, y éstos normalmente se indican en el texto como suplementos al medio de crecimiento. En ciertos medios definidos químicamente, las células pueden crecer sin nada de suero presente. En tales casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que pueden añadirse al medio para soportar y sostener las células. Los factores preferidos en el presente documento para añadir para el crecimiento en medios libres de suero incluyen uno o más de bFGF, EGF, IGF-I y PDG. En realizaciones más preferentes, dos, tres o todos los cuatro de los factores se añaden a medios libres de suero o definidos químicamente. En otras realizaciones, se añade LIF al medio libre de suero para soportar o mejorar el crecimiento de las células.

También relacionado con la presente invención, el término *condiciones normales de crecimiento*, como se usa en el presente documento, se refiere al cultivo de células a 37 °C, en una atmósfera estándar que comprende 5% de CO₂. La humedad relativa se mantiene en aproximadamente el 100 %. Aunque las condiciones anteriores son útiles para el cultivo, debe entenderse que el experto en la técnica puede modificar tales condiciones, que apreciarán las opciones disponibles en la técnica para cultivar células.

La expresión *cantidad eficaz* se refiere a una concentración o cantidad de un compuesto, material o composición, como se describe en el presente documento, que es eficaz para conseguir un resultado biológico particular. Tales resultados incluyen, pero no se limitan a los mismos, la regeneración, reparación o mejora del tejido esquelético, la mejora del flujo sanguíneo y/o la estimulación y/o el soporte de la angiogénesis en pacientes con isquemia periférica. Dicha actividad eficaz se puede lograr, por ejemplo, administrando las células y/o las composiciones de la presente invención a pacientes con isquemia periférica. Con respecto a los PPDC administrados a un paciente *in vivo*, una cantidad eficaz puede variar entre tan pocos como varios cientos o menos hasta tantos como varios millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad eficaz puede variar de 10³-10¹¹, más específicamente al menos aproximadamente 10⁴ células. Se apreciará que el número de células que se van a administrar variará dependiendo de las características específicas del trastorno que se va a tratar, incluyendo, pero sin limitaciones, el tamaño o el volumen/superficie total que se va a tratar, y la proximidad del sitio de administración a la ubicación de la región que se va a tratar, entre otros factores familiares para el biólogo médico.

Los términos *trata, que trata o tratamiento* se refieren a cualquier éxito o indicio de éxito en la atenuación o mejoría de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión, disminución de los síntomas o hacer que la lesión, patología o afección sea más tolerable para el paciente, ralentizando la tasa de degeneración o declinación, haciendo que el punto final de la degeneración sea menos debilitante, mejorando el bienestar físico o mental del sujeto, o prolongando la duración de la supervivencia. El tratamiento o mejoría de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; Incluyendo los resultados de una exploración física, exploración neurológica y/o evaluaciones psiquiátricas.

Las expresiones *período (o tiempo) eficaz* y *condiciones eficaces* se refieren a un período de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos *in vitro*), necesarias o preferentes para que un agente o composición farmacéutica consiga el resultado deseado.

Los términos *paciente* o *sujeto* se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a animales, preferentemente mamíferos, y, más preferentemente, seres humanos, que se tratan con las composiciones farmacéuticas o terapéuticas o de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Isquemia se refiere a cualquier disminución o paro en el suministro de sangre a cualquier órgano, tejido o parte del cuerpo causado por cualquier constricción u obstrucción de la vasculatura. *Episodio isquémico* o acontecimiento isquémico se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier periodo de isquemia transitorio o permanente. Isquemia periférica se refiere a cualquier disminución o paro en el suministro de sangre a cualquier órgano, tejido o parte del cuerpo, excepto el corazón, causado por cualquier constricción u obstrucción de la vasculatura. *Enfermedad vascular periférica* Se refiere a enfermedades de los vasos sanguíneos fuera del corazón y el cerebro. A menudo implica un estrechamiento de los vasos sanguíneos que llevan sangre a las extremidades y es el resultado dos tipos de trastornos de la circulación, a saber, (1) enfermedad vascular periférica funcional, que implica espasmo a corto plazo que estrecha los vasos sanguíneos; y (2) enfermedad vascular periférica orgánica que implica cambios estructurales en los vasos sanguíneos, tales como causados por inflamación o bloqueos grasos, por ejemplo.

La expresión *vehículo o medio farmacéuticamente aceptable*, que puede utilizarse de manera intercambiable con la expresión *vehículo o medio biológicamente compatible*, se refiere a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que no solo son compatibles con las células y otros agentes que se van a administrar terapéuticamente, sino que también son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otra complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Como se describe con mayor detalle en el presente documento, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para utilizarse en la presente invención incluyen materiales líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y sólidos (por ejemplo, armazones y matrices de células, láminas de tubos y otros materiales tales como se conocen en la técnica y se describen con mayor detalle en el presente documento). Los materiales semisólidos y sólidos pueden diseñarse para que resistan la degradación dentro del cuerpo (*no biodegradables*) o pueden diseñarse para que se degraden dentro del cuerpo

- (*biodegradables, bioerosionables*). Un material biodegradable puede ser además *biorreabsorbible* o *bioabsorbible*, es decir, puede disolverse y absorberse en los líquidos corporales (los implantes hidrosolubles son un ejemplo), o degradarse y, finalmente, eliminarse del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o por degradación y eliminación a través de vías naturales. La velocidad de biodegradación puede variar según la velocidad de liberación deseada una vez implantado en el cuerpo. La matriz actúa también, deseablemente, como un almacén temporal hasta que se reemplaza con músculo esquelético recién crecido, pericitos, músculo liso vascular o tejido endotelial vascular. Por lo tanto, en una realización, la matriz proporciona una liberación sostenida de los otros agentes usados junto con las células derivadas posparto y puede proporcionar una estructura para desarrollar el crecimiento de tejido en el paciente. En otras realizaciones, la matriz simplemente proporciona un almacén temporal para el tejido en desarrollo. La matriz puede estar en forma de partículas (macropartículas de más de 10 micrómetros de diámetro o micropartículas de menos de 10 micrómetros de diámetro) o puede estar en forma de un implante estructuralmente estable, tridimensional (por ejemplo, un almacén). El implante puede ser, por ejemplo, un cubo, un cilindro, un tubo, un bloque, una película, una lámina o una forma anatómica apropiada.
- En el presente documento se utilizan diversos términos y expresiones con respecto al trasplante celular o de tejido. Las expresiones *transferencia autóloga, trasplante autólogo, autoinjerto* y similares se refieren a trasplantes en los que el donante del trasplante es también el receptor del trasplante. Las expresiones *transferencia alogénica, trasplante alogénico, aloinjerto* y similares se refieren a trasplantes en los que el donante del trasplante es de la misma especie que el receptor del trasplante, pero no es el receptor. Un trasplante de células en el que las células del donante presentan coincidencia de histocompatibilidad con un receptor se denomina a veces *transferencia singénica*. Las expresiones *transferencia xenogénica, trasplante xenogénico, xenoinjerto* y similares se refieren a trasplantes en los que el donante del trasplante a menudo es de una especie diferente de la del receptor del trasplante.
- En sus diversas realizaciones descritas en el presente documento, la presente invención presenta composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de enfermedades vasculares periféricas que utilizan células progenitoras y poblaciones celulares derivadas de tejidos posparto, tejido umbilical en particular. Estos métodos y composiciones farmacéuticas están diseñados para estimular y soportar la angiogénesis, mejorar el flujo sanguíneo, regenerar, reparar y mejorar el músculo esquelético dañado por un acontecimiento isquémico periférico, y/o para proteger el músculo esquelético del daño isquémico. Las células, poblaciones de células y preparaciones que comprenden lisados celulares, medios acondicionados y similares, utilizados en las preparaciones farmacéuticas y métodos de la presente divulgación se describen con detalle en las publicaciones de patentes de Estados Unidos n.º 2005/0058631 y 2005/0054098, y también más adelante en el presente documento.
- Según los métodos descritos en el presente documento, se recupera una placenta o cordón umbilical de mamífero después o poco después de finalizar una gestación a término o una gestación prematura, por ejemplo, después de su expulsión tras el nacimiento. El tejido posparto puede transportarse desde el lugar de nacimiento a un laboratorio en un recipiente estéril, tal como un matraz, vaso de precipitados, placa de cultivo o bolsa. El recipiente puede contener una solución o medio, incluyendo, pero sin limitaciones, una solución salina, tal como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (también denominado medio esencial mínimo de Dulbecco) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier solución utilizada para el transporte de órganos utilizados para el trasplante, tal como la solución de la Universidad de Wisconsin o solución perfluoroquímica. Pueden añadirse al medio o tampón uno o más antibióticos y/o antimicóticos, tales como, pero sin limitaciones a los mismos, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina. El tejido posparto puede aclararse con una solución anticoagulante, tal como una solución que contenga heparina. Es preferente mantener el tejido a aproximadamente 4 °C-10 °C antes de extraer las PDC. Es aún más preferente no haber congelado el tejido antes de extraer las PDC.
- El aislamiento de las PDC se produce preferentemente en un ambiente aséptico. Se separa el cordón umbilical de la placenta por medios conocidos en la técnica. Como alternativa, el cordón umbilical y la placenta se utilizan sin separación. La sangre y los desechos se eliminan, preferiblemente, del tejido posparto antes del aislamiento de las PPDC. Por ejemplo, el tejido posparto puede lavarse con solución tampón, incluyendo, pero sin limitaciones, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado puede comprender también uno o más antimicóticos y/o antibióticos, tales como, pero no limitados a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.
- El tejido posparto que comprende una placenta completa o un fragmento o sección de la misma se desagrega mediante fuerza mecánica (trituration) o fuerzas de cizallamiento. En una realización preferida en el presente documento, el procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. En la materia se conocen muchas enzimas útiles para el aislamiento de células individuales a partir de matrices de tejido complejas para facilitar el crecimiento en cultivo. Las enzimas de la digestión varían desde ligeramente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) a fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina), y están disponibles comercialmente. Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles con la presente invención incluye actividades enzimáticas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serina proteasas (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa) y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, se sabe que las colagenasas son útiles para aislar varias células de tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN monocatenario y pueden minimizar el aglutinamiento celular durante el aislamiento. Los métodos preferidos implican

un tratamiento enzimático con, por ejemplo, colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa e hialuronidasa. En ciertas realizaciones, se usa una mezcla de colagenasa y la dispasa de proteasa neutra en la etapa de disociación. Realizaciones más específicas emplean la digestión en presencia de al menos una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de proteasa, dispasa y termolisina. Aún otras realizaciones emplean la digestión tanto con las actividades de las enzimas colagenasa y dispasa. También se utilizan métodos que incluyen la digestión con una actividad hialuronidasa además de las actividades de colagenasa y dispasa. El experto en la técnica apreciará que muchos de estos tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para aislar células de diversas fuentes de tejido. Por ejemplo, las mezclas de enzimas para la disociación de tejidos vendidas bajo el nombre comercial de LIBERASE (Roche, Indianapolis, IN) son adecuadas para su uso en los presentes métodos. Se conocen otras fuentes de enzimas y el experto en la materia puede obtener también dichas enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto en la técnica también está preparado para evaluar enzimas o combinaciones enzimáticas nuevas o adicionales por su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferentes tienen una duración de 0,5 horas, 1 hora, 1,5 horas o 2 horas, o más. En otras realizaciones preferentes, el tejido se incuba a 37 °C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disgregación.

En algunas formas de realización de la invención, el tejido posparto se separa en fracciones que comprenden varios aspectos del tejido, tal como aspectos neonatos, neonatos/maternos y maternos de, por ejemplo, la placenta. A continuación, las secciones separadas se disocian mediante disociación mecánica y/o enzimática según los métodos descritos en el presente documento. Las células de linaje materno o neonatal pueden identificarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante análisis del cariotipo o hibridación *in situ* para un cromosoma Y.

Pueden utilizarse células aisladas o tejido posparto a partir del que se multiplican las PDC para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a recipientes estériles para cultivo tisular recubiertos o no recubiertos con una matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, natural o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, y otras proteínas de la matriz extracelular. Las PDC se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sustentar el crecimiento de las células tales como, pero no limitados a, DMEM (con alto o bajo contenido de glucosa), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Tagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, y medio libre sin suero/medio vendido con el nombre comercial CELL-GRO-FREE (Mediatech, Inc., Herndon, VA). El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluidos, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferentemente aproximadamente al 2 %-15 % (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferentemente aproximadamente al 0,001 % (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF), factor de crecimiento factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluida L-valina; y uno o más antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solos o en combinación. El medio de cultivo comprende, preferentemente, medio de crecimiento, como se define en los ejemplos siguientes.

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. En una realización preferente, las células se cultivan a aproximadamente o a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO₂ en aire. En algunas realizaciones preferentes, las células se cultivan a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O₂ en aire, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O₂ en el aire. Las células se cultivan, preferentemente, a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, más preferentemente se cultivan a 37 °C. Las células se cultivan preferentemente en una incubadora. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las PDC se cultivan preferentemente en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína). "Bajo estrés oxidativo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a condiciones de daño mínimo o nulo por radicales libres a las células cultivadas.

Los métodos para seleccionar el medio de cultivo más apropiado, la preparación del medio y las técnicas de cultivo celular son bien conocidos en la técnica y se describen en diversas fuentes, incluidas Doyle et al., (eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston.

Después de cultivar las células aisladas o los fragmentos de tejido durante un período de tiempo suficiente, las PDC se habrán multiplicado, ya sea como resultado de la migración desde el tejido posparto o la división celular, o ambos. En algunas formas de realización de la invención, las PPDC se someten a pases, o se llevan a un recipiente de cultivo separado que contiene medio recién preparado del mismo o diferente tipo que el utilizado inicialmente, en el que la población de células puede expandirse por mitosis. Las células de la invención pueden utilizarse en cualquier momento entre el pase 0 y la senescencia. Preferentemente, las células se someten a pases entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, más preferentemente se someten a pases de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferentemente se someten a pases 10 u 11 veces. Pueden realizarse la clonación y/o subclonación para confirmar que se ha aislado una población clonal de células.

En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos de células presentes en el tejido posparto se fraccionan en subpoblaciones a partir de las que pueden aislarse las PPDC. La fracción o selección puede lograrse utilizando técnicas estándar de separación de células incluídas, pero no sin limitaciones, tratamiento enzimático para disociar el tejido posparto en sus células componentes, seguido de clonación y selección de tipos específicos de células, por ejemplo, pero sin limitaciones, la selección en base a marcadores morfológicos y/o bioquímicos; crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación en base a la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; decantación centrífuga (centrifugación contracorriente); separación por gravedad unitaria; distribución en contracorriente; electroforesis; y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Para una revisión de las técnicas de selección clonal y separación celular, véase Freshney, 1994, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, 3ª Ed., Wiley-Liss, Inc., New York.

El medio de cultivo se cambia según sea necesario, por ejemplo, mediante aspiración cuidadosa del medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y la reposición con medio recién preparado. Se continúa incubando hasta que se acumula un número o densidad suficiente de células en la placa. Las secciones de tejido explantado original pueden sacarse y las células restantes se digirieron con tripsina utilizando técnicas convencionales o utilizando un rascador de células. Después de la tripsinización, se recogen las células, se llevan a un medio recién preparado y se incuban como se ha indicado anteriormente. En algunas formas de realización, el medio se cambia al menos una vez aproximadamente 24 horas después de la tripsinización para eliminar las células flotantes. Se considera que las células que permanecen en el cultivo son PPDC.

Las PPDC pueden crioconservarse. Por consiguiente, en una realización preferida descrita con mayor detalle a continuación, las PPDC para la transferencia autóloga (para la madre o el niño) pueden derivarse de tejidos posparto apropiados después del nacimiento de un niño, y, después, crioconservarse para estar disponibles en caso de que sean más tarde necesarios para el trasplante.

Las PPDC pueden caracterizarse, por ejemplo, por sus características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo de duplicación, pases hasta la senescencia), mediante análisis del cariotipo (por ejemplo, linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos), perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices génicas; reacción en 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, ensayo de coagulación de plasma o análisis de medio acondicionado de PDC, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), reacción linfocitaria mixta (por ejemplo, como medida de la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica alogénicas (PBMC), y/u otros métodos conocidos en la técnica.

Los ejemplos de PPDC de la divulgación derivadas de tejido placentario se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se les asignaron números de registro ATCC de la siguiente manera: (1) la denominación de cepa PLA 071003 (P8) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó el número de registro PTA-6074; (2) la denominación de cepa PLA 071003 (P11) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó el número de registro PTA-6075; y (3) la denominación de cepa PLA 071003 (P16) se depositó el 16 de junio de 2004 y se le asignó el número de registro PTA-6079. Los ejemplos de PPDC de la invención derivadas de tejido de cordón umbilical se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 10 de junio de 2004 y se les asignaron los números de registro en la ATCC de la siguiente manera: (1) a la denominación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el número de registro PTA-6067; y (2) a la denominación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el número de registro PTA- 6068.

En diversas realizaciones, las PPDC poseen una o más de las siguientes características de crecimiento (1) que requieren L-valina para el crecimiento en cultivo; (2) son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno desde aproximadamente 5 % hasta al menos aproximadamente 20 % (3) tienen el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de alcanzar la senescencia; y (4) se unen y se expanden en un recipiente de cultivo de tejidos recubierto o no recubierto, en el que el recipiente de cultivo de tejidos recubiertos comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

En ciertas realizaciones, las PPDC poseen un cariotipo normal, que se mantiene a medida que las células se someten a pases. El cariotipo es particularmente útil para identificar y distinguir células neonatales de las células maternas derivadas de placenta. Los métodos para la realización cariotipo están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica.

En otras realizaciones, las PPDC pueden caracterizarse por la producción de ciertas proteínas, incluyendo (1) producción de al menos uno de factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso; y (2) producción de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C, según se detecta por citometría de flujo. En otras realizaciones, las PPDC pueden caracterizarse por falta de producción de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117,

CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ, como se detecta por citometría de flujo. Son particularmente preferidas las células que producen al menos dos factores tisulares, vimentina y alfa-actina de músculo liso. Son particularmente preferidas las células que producen las tres proteínas de factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso.

5 En otras realizaciones, las PPDC pueden caracterizarse por la expresión génica, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para un gen que codifica al menos una de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento del melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C - X - C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C - X - C); factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; miembro 2 de la superfamilia de lectina de tipo C; tumor de Wilms 1; miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasa 1; renina; receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas; clon IMAGE: 4179671 de Homo sapiens; proteína quinasa C zeta; proteína hipotética DKFZp564F013; regulado negativamente en el cáncer de ovario 1; y el gen de Homo sapiens del clon DKFZp547k1113.

15 En aún otras realizaciones, las PPDC pueden caracterizarse por la expresión génica, que en relación con una célula humana que es fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de la médula ósea de cresta ilíaca, se reduce para un gen que codifica al menos uno de: homeocaja 2 de estatura baja; proteína del choque térmico de 27 kDa; ligandos 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supralvalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc de DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica del cese de crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja sine oculis (Drosophila); alfa B cristalina; activador 2 asociado "disheveled" de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión a plasminógeno); dominio 3 de homología con src (SH3) y rico en cisteínas; colesterol 25- hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con el enanismo 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procólágeno C-endopeptidasa; homólogo Frizzled 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquina) ; proteína 5 de la homeocaja iroquesa; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de vesículas sinápticas; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina de 36kDa; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar a receptores de citocinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; c-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ) ; homólogo 2 de la homeocaja de sine oculis (Drosophila); ; proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesícula (miobrevina) ; proteína 1 de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta 3 de crecimiento temprano; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; miembro C3 de la familia 1 de la aldo-ceto reductasa (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II) ; biglicano; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ) ; fibronectina 1; proencefalina; integrina, beta similar a 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C de péptido natriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222) ; similar a la proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; y/o polipéptido 1 de la subunidad VIIa de citocromo c oxidasa (músculo).

45 En otras realizaciones, las PPDC de la divulgación pueden caracterizarse por la secreción de al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES y TIMP1. En algunas realizaciones, las PPDC pueden caracterizarse por la falta de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, I309, MDC y VEGF, según se detecta mediante ELISA.

50 En algunas realizaciones preferidas, las PPDC se obtienen de tejido de cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo, requieren L-valina para crecimiento, pueden crecer en al menos aproximadamente 5 % de oxígeno, y comprenden al menos una de las siguientes características: potencial para al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; unión y expansión en un recipiente de cultivo de tejidos recubierto o no recubierto que comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina; producción de vimentina y alfa-actina de músculo liso; producción de CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y expresión de un gen, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de la médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para un gen que codifica la interleucina 8 y el reticulón 1. En algunas realizaciones, tales PPDC no producen CD45 y CD117. Las PPDC como se describen en este párrafo pueden usarse en métodos para tratar a un paciente que tiene enfermedad vascular periférica, pueden usarse en composiciones farmacéuticas para tratar enfermedad vascular periférica, por ejemplo, en los que dichas composiciones comprenden las células que tienen estas características y un vehículo farmacéuticamente aceptable y se pueden usar en kits para fabricar, usar y practicar tales métodos y composiciones farmacéuticas como se describen e ilustran en el presente documento. Además, las PPDC como se describen en este párrafo pueden usarse para generar medios de cultivo celular acondicionados o para preparar preparaciones tales como extractos celulares y fracciones subcelulares que se pueden usar para preparar, usar y practicar tales métodos y composiciones farmacéuticas como se describen e ilustran en el presente documento.

65 En realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más de las características de crecimiento, producción de

marcador/proteína de superficie, expresión génica o de secreción de sustancias mencionadas anteriormente. Son más preferidas las células que comprenden, tres, cuatro, cinco o más de las características. Son aún más preferentes las PPDC que comprenden seis, siete, u ocho o más de las características. Son aún más preferentes las células que comprenden todas las características anteriores.

5 Entre las células que se prefieren actualmente para su uso con la invención en varios de sus aspectos son células posparto que tienen las características descritas anteriormente y, más particularmente, aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con pases, y, además, en las que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-A, B, C, en los que las células producen las proteínas inmunológicamente detectables que corresponden a los marcadores enumerados. Aún más preferidas son las células que, además de las anteriores, no producen proteínas que correspondan a ninguno de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, según se detecta mediante citometría de flujo.

15 Ciertas células que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de líneas que conducen a diversos fenotipos son inestables y, por lo tanto, pueden diferenciarse espontáneamente. Células actualmente preferidas para su uso con la invención son aquellas que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo, a lo largo de mioblasto, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, líneas endoteliales hemangiogénicas, angiogénicas, vasculogénicas o vasculares. Las células preferidas, cuando se cultivan en medio de crecimiento, son sustancialmente estables con respecto a los marcadores de células producidos sobre su superficie, y con respecto al patrón de expresión de diversos genes, por ejemplo, como se determina usando una prueba de diagnóstico médico comercializada bajo el nombre comercial GENECHIP (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Las células siguen siendo sustancialmente constantes, por ejemplo, en sus características de marcador superficial con los pases y a través de múltiples duplicaciones de poblaciones.

25 Otro aspecto proporcionado por la invención caracteriza el uso de poblaciones de PPDC, descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la población de células es heterogénea. Una población de células heterogénea de la invención puede comprender al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 95 % de PPDC de la invención. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender además citoblastos u otras células progenitoras, tales como mioblastos u otras células progenitoras de músculo, hemangioblastos o células precursoras de vasos sanguíneos; o pueden comprender además células de músculo esquelético completamente diferenciadas, células de músculo liso, pericitos o células endoteliales de vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente solo PPDC (preferentemente al menos aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más PPDC). La población de células homogénea de la divulgación puede comprender células derivadas de cordón umbilical o de placenta. Las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical homogéneas están, preferentemente, libres de células de linaje materno. Las poblaciones de células derivadas de placenta homogéneas pueden ser de linaje neonatal o materno. La homogeneidad de una población de células puede lograrse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo) o por expansión clónica según procedimientos conocidos. Así, poblaciones de PPDC homogéneas preferidas pueden comprender una línea celular clonal de células derivadas posparto. Tales poblaciones son particularmente útiles cuando se ha aislado un clon de célula con funcionalidad altamente deseable.

45 También se proporciona en el presente documento el uso de poblaciones de células incubadas en presencia de uno o más factores, o en condiciones, que estimulan la diferenciación de células madre a lo largo de una vía muscular vascular, endotelial vascular, pericito o músculo esquelético. Tales factores son conocidos en la técnica y el experto en la técnica apreciará que la determinación de las condiciones adecuadas para la diferenciación se puede conseguir mediante experimentación rutinaria. La optimización de tales condiciones puede lograrse mediante diseño y análisis experimental estadístico, por ejemplo, la metodología de superficie de respuesta permite la optimización simultánea de múltiples variables, por ejemplo en un cultivo biológico. Los factores actualmente preferidos incluyen, pero sin limitaciones, factores de crecimiento o tróficos, quimiocinas, citocinas, productos celulares, agentes desmetilantes y otros estímulos que se sabe o se determina posteriormente que estimulan la diferenciación, por ejemplo, de células madre a lo largo de elementos angiogénicos, hemangiogénicos, vasculogénicos, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o linajes endoteliales vasculares.

55 Las PPDC también pueden modificarse genéticamente para producir productos génicos terapéuticamente útiles, para producir agentes angiogénicos para facilitar o sostener la formación o crecimiento adicional de vasos sanguíneos, o para producir factores para reclutar células progenitoras endoteliales en el área de daño isquémico. Las células progenitoras endoteliales facilitan la vasculogénesis y el flujo sanguíneo, particularmente después de un acontecimiento isquémico (Urbich C y Dimmeler S (2004) Circ. Res. 95: 343-53). Los factores que juegan un papel en el reclutamiento de células endoteliales incluyen, pero no se limitan a, VEGF, factor 1 derivado del estroma (SDF-1), eritropoyetina (EPO), G-CSF, estatinas, estrógeno, PPAR γ , CXCR4, FGF y HGF. La modificación genética puede llevarse a cabo usando cualquiera de una variedad de vectores que incluyen, pero no se limitan a, vectores virales integrantes, por ejemplo, vector de retrovirus o vectores de virus adenoasociados; vectores replicantes no integrantes, por ejemplo, vectores del virus del papiloma, vectores de SV40, vectores adenovirales; o vectores virales con replicación defectuosa. Otros procedimientos de introducción de ADN en células incluyen el uso de

liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o por inyección de ADN directa.

Las células huésped se transforman o transfectan, preferentemente, con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos de control de la expresión apropiados tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador de selección. Cualquier promotor puede usarse para accionar la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan a, un promotor del CMV/potenciador, SV 40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o promotor del gen elastina. En algunas realizaciones, los elementos de control usados para controlar la expresión del gen de interés pueden permitir la expresión regulada del gen de manera que el producto se sintetice solo cuando se necesite *in vivo*. Si se desea expresión transitoria, se usan promotores constitutivos preferentemente en un vector no integrante y/o de replicación defectuosa. Como alternativa, podrían usarse promotores inducibles para accionar la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados a metalotioneína y proteínas de choque térmico.

Tras la introducción del ADN exógeno, puede permitirse que las células manipuladas crezcan en medios enriquecidos y luego cambiarlas 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 crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en las líneas celulares. Este procedimiento puede usarse de forma ventajosa para modificar mediante ingeniería las líneas celulares que expresan el producto génico.

Las células de la invención pueden manipularse genéticamente para "inactivar" o "silenciar" la expresión de factores que promueven la inflamación o rechazo en el sitio del implante. Técnicas de modulación negativa para la reducción de los niveles de expresión de genes diana o niveles de actividad de productos de genes diana se tratan más adelante. Modulación negativa", como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción en el nivel y/o actividad del producto de gen diana con respecto al nivel y/o actividad del producto del gen diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo para una célula de músculo esquelético, célula de músculo liso vascular, pericito, célula endotelial vascular, célula neural, o células progenitoras de los mismos, puede reducirse o inactivarse usando varias técnicas que incluyen, por ejemplo, inhibición de la expresión por inactivación del gen usando la técnica de recombinación de homólogos. Normalmente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' para esa región) se interrumpe por un marcador de selección positivo, por ejemplo, neo, que previene la producción de ARNm normal del gen diana y que produce la inactivación del gen. Un gen también puede inactivarse creando una deleción en parte de un gen, o delecionando el gen entero. Usando una construcción con dos regiones de homología con el gen diana que están muy alejadas en el genoma, las secuencias que intervienen en las dos regiones pueden delecionarse (Mombaerts et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084-3087). También pueden usarse antisentido, ADNzimas, ribozimas, ARN interferente pequeño (ARNip) y otras moléculas tales que inhiben la expresión del gen diana para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, se ha mostrado que moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de complejos del gen mayor de histocompatibilidad (HLA) son las más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Todavía además, pueden utilizarse moléculas de triple hélice en la reducción del nivel de actividad del gen diana. Estas técnicas se describen con detalle en L.G. Davis et al. (eds), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, CN.

En otros aspectos, la divulgación utiliza lisados celulares y fracciones solubles de células preparadas a partir de PPDC o poblaciones celulares heterogéneas u homogéneas que comprenden PPDC, así como PPDC o poblaciones de las mismas que se han modificado genéticamente o que se han estimulado para diferenciarse a lo largo de una vía del músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o del endotelio vascular. Tales lisados y fracciones de los mismos tienen muchas utilidades. El uso de tales fracciones solubles del lisado de PPDC (es decir, sustancialmente libres de membranas) *in vivo*, por ejemplo, permite que el medio intracelular beneficioso se use alogénicamente en un paciente sin introducir una cantidad apreciable de las proteínas de la superficie celular que lo más probablemente provoquen el rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. Los procedimientos de lisado de células son muy conocidos en la técnica e incluyen diversos medios de rotura mecánica, rotura enzimática o rotura química, o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su medio de crecimiento, y así contener factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células lavadas libres de medio en, por ejemplo, PBS u otra disolución. Las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones superiores a la densidad de población original, si se prefiere.

En una realización se preparan lisados de células completas, por ejemplo, rompiendo células sin posterior separación de las fracciones celulares. En otra realización, una fracción de membrana celular se separa de una fracción soluble de las células por procedimientos rutinarios conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, o procedimientos similares.

Los lisados celulares o fracciones solubles de células preparadas a partir de las poblaciones de células derivadas del posparto pueden usarse como tales, adicionalmente concentrarse por, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo,

composiciones de proteína farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares o fracciones de los mismos pueden usarse *in vitro* o *in vivo*, solos o, por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. Los lisados, si se introducen *in vivo*, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o remotamente para proporcionar, por ejemplo, factores de crecimiento celular necesarios para un paciente.

5 En una realización adicional, las PPDC pueden cultivarse *in vitro* para producir productos biológicos con alto rendimiento. Las PPDC que producen naturalmente un producto biológico particular de interés (por ejemplo, un factor trófico) como que se ha manipulado genéticamente para producir un producto biológico tal, puede expandirse clonalmente usando las técnicas de cultivo descritas en el presente documento. Como alternativa, las células
10 pueden expandirse en un medio que induce la diferenciación a un linaje de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelial vascular. En cada caso, los productos biológicos producidos por la célula y secretados en el medio pueden aislarse fácilmente del medio acondicionado usando técnicas de separación estándar, por ejemplo, tales como precipitación diferencial de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por filtración en gel, electroforesis y HPLC, por nombrar algunos. Puede usarse un "biorreactor" para aprovechar el
15 procedimiento de flujo para la alimentación, por ejemplo, un cultivo tridimensional *in vitro*. Esencialmente, como medio fresco que se pasa a través del cultivo tridimensional, el producto biológico se lava del cultivo y puede entonces aislarse del flujo de salida, como antes.

20 Como alternativa, un producto biológico de interés puede permanecer dentro de la célula y, así su recogida puede requerir que las células se lisen, como se ha descrito anteriormente. El producto biológico puede entonces purificarse usando una cualquiera o más de las técnicas enumeradas anteriormente.

25 En otras realizaciones, la divulgación utiliza medio acondicionado de PPDC cultivadas para su uso *in vitro* e *in vivo* como se describe más adelante. El uso del medio acondicionado de PPDC permite que los beneficiosos factores tróficos secretados por las PPDC se usen alogénicamente en un paciente sin introducir células intactas que podrían provocar el rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. El medio acondicionado se prepara cultivando células en un medio de cultivo, luego sacando las células del medio.

30 El medio acondicionado preparado a partir de las poblaciones de células derivadas del posparto puede usarse como tales, adicionalmente concentrarse por, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo, composiciones de proteína farmacéuticamente útiles. El medio acondicionado puede usarse *in vitro* o *in vivo*, solo o combinado con células
35 vivas autólogas o singénicas, por ejemplo. El medio acondicionado, si se introducen *in vivo*, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o remotamente para proporcionar, por ejemplo, factores de crecimiento celular o tróficos necesarios para un paciente.

40 En otra realización, una matriz extracelular (ECM) producida cultivando las PPDC sobre sustratos líquidos, sólidos o semisólidos se prepara, se recoge y se utiliza como una alternativa a implantar células vivas en un sujeto en necesidad de reparación o sustitución de tejido. Las PPDC se cultivan *in vitro*, sobre una estructura tridimensional como se describe en cualquier parte en el presente documento, en condiciones tales que se secrete una cantidad deseada de ECM sobre la estructura. Las células que comprenden el nuevo tejido se eliminan y la ECM se procesa para uso posterior, por ejemplo, como una preparación inyectable. Para realizar esto, las células sobre la estructura se destruyen y cualquier residuo celular se elimina de la estructura. Este proceso puede llevarse a cabo de varias
45 formas diferentes. Por ejemplo, el tejido vivo puede ultracongelarse en nitrógeno líquido sin un crioprotector, o el tejido puede sumergirse en agua destilada estéril de manera que las células exploten en respuesta a la presión osmótica.

50 Una vez se han destruido las células, las membranas celulares pueden romperse y el residuo celular se elimina mediante tratamiento con un aclarado de detergente suave, tal como EDTA, CHAPS o un detergente de ión bipolar. Como alternativo, el tejido puede digerirse enzimáticamente y/o extraerse con reactivos que descomponen las membranas celulares y permiten la eliminación de contenidos celulares. Entre los ejemplos de tales enzimas se incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas. Entre los ejemplos de detergentes se incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alquilaril poliéter alcohol (TRITON X-100), octilfenoxi polietoxi-etanol (Rohm y Haas, Filadelfia, Pa.), BRIJ-35, un lauril éter de polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, Ca.), polisorbato 20 (TWEEN 20), un monolaureato de sorbitano de polietoxietanol (Rohm and Haas, Filadelfia, Pa.), polietileno lauril éter (Rohm and Haas, Filadelfia, Pa.); y detergentes iónicos tales como dodecilsulfato de sodio, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen de 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o sin ramificar.

60 El conjunto de ECM puede llevarse a cabo en una variedad de formas, dependiendo al menos en parte de si el nuevo tejido se ha formado sobre una estructura tridimensional que es biodegradable o no biodegradable, como en el caso de metales. Por ejemplo, si la estructura es no biodegradable, la ECM puede eliminarse sometiendo la estructura a sonicación, chorros de agua a alta presión, raspado mecánico o tratamiento suave con detergentes o
65 enzimas, o cualquier combinación de los anteriores.

Si la estructura es biodegradable, la ECM puede recogerse, por ejemplo, dejando que la estructura se degrade o disuelva en solución. Como alternativa, si la estructura biodegradable está compuesta por un material que puede inyectarse él mismo junto con la ECM, la estructura y la ECM pueden procesarse en conjunto para la posterior inyección. Como alternativa, la ECM puede eliminarse de la estructura biodegradable por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente para la recogida de ECM de una estructura no biodegradable. Todos los procedimientos de recogida se diseñan preferentemente de manera que no desnaturalicen la ECM.

Después de recogerse, la ECM puede procesarse adicionalmente. Por ejemplo, la ECM puede homogeneizarse a partículas finas usando técnicas muy conocidas en la técnica, tales como por sonicación, de manera que pueda pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes de la ECM también pueden reticularse, si se desea, por irradiación gamma. Preferentemente, la ECM puede irradiarse entre 0, 25 y 2 mega-radianes para esterilizar y reticular la ECM. Es posible la reticulación química usando agentes que son tóxicos, tales como glutaraldehído, pero generalmente no se prefiere.

Las cantidades y/o relaciones de proteínas, tales como los diversos tipos de colágeno presentes en la ECM, pueden ajustarse mezclando la ECM producida por las células de la divulgación con ECM de uno o varios de otros tipos de células. Además, sustancias biológicamente activas, tales como proteínas, factores de crecimiento y/o fármacos, pueden incorporarse en la ECM. Sustancias biológicamente activas a modo de ejemplo incluyen factores tisulares de crecimiento, tales como TGF-beta, y similares, que promueven la curación y reparación de tejido en el sitio de la inyección. Tales agentes adicionales pueden utilizarse en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en el presente documento, por ejemplo, con lisados de células completas, fracciones celulares solubles, o componentes y productos purificados adicionalmente producidos por las PPDC.

En otro aspecto, en el presente documento se divulgan composiciones farmacéuticas que utilizan PPDC, poblaciones de PPDC, componentes y productos de PPDC en diversos métodos para el tratamiento de lesiones o daños causados por un episodio isquémico periférico. Ciertas realizaciones abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas (PPDC solas o mezcladas con otros tipos celulares). Otras realizaciones abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares de PPDC (por ejemplo, lisados celulares, fracciones de células solubles, medio acondicionado, ECM, o componentes de cualquiera de los anteriores) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por PPDC o por modificación genética, medio acondicionado del cultivo de PPDC). En cualquier caso, la composición farmacéutica puede comprender además otros agentes activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores miotróficos o fármacos miorregerativos o mioprotectores como se conocen en la técnica.

Ejemplos de otros componentes que se pueden añadir a las composiciones farmacéuticas de PPDC incluyen, pero no se limitan a: (1) otros fármacos miobeneficiosos o mioprotectores, o fármacos angiobeneficiosos o angioprotectores; (2) componentes seleccionados de la matriz extracelular, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos (como alternativa, las PPDC pueden modificarse genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes antiapoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimeticuerpo de EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) -I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasa); (4) compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de MAP cinasas p38, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 y IL-1, Pemirolast, Tranilast, Remicade (Centocor, Inc., Malvern, Pa.), sirolimus y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (tales como tepoxalina, tolmetina y suprafen); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) antioxidantes, tales como probucol, vitaminas C y E, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; (6) anestésicos locales; y (7) otros factores angiogénicos tales como Agrin, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, NEGF-1, NEGF-2, PDGF, GDF, IGF1, IGF2, EGF y FGF; y, (8) factores que funcionan en el reclutamiento e incorporación de células progenitoras endoteliales en tejido isquémico, tales como VEGF, SDF-1, EPO, G-CSF, estatinas, estrógeno, PPARγ y CXCR4, por nombrar solo unos pocos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden PPDC, componentes o productos de los mismos, incluidas las preparaciones hechas de PPDC, formuladas con un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina (tal como solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, polivinilpirrolidona, hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácido graso e hidroximetilcelulosa. Tales preparaciones pueden esterilizarse, y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y colorantes. En la técnica se conocen transportadores farmacéuticos adecuados para su uso en la presente invención y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17a ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y el documento WO 96/05309.

Típicamente, pero no exclusivamente, las composiciones farmacéuticas que comprenden componentes o productos de PPDC, pero no células vivas, se formulan como líquidos (o como comprimidos sólidos, cápsulas y similares, cuando es apropiada la administración oral). Estas pueden formularse para la administración por cualquier vía aceptable conocida en la técnica para lograr la administración de fármacos y moléculas biológicas en el músculo

esquelético, músculo liso vascular, pericito o tejido endotelial vascular diana, incluyendo, pero sin limitarse a, las vías oral, nasal oftálmica y parenteral, incluyendo intravenosa. Entre las vías particulares de administración parenteral se incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intracisternal o mediante jeringas con agujas o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas de PPDC se formulan típicamente como líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, armazones similares, según sea apropiado para la ingeniería de tejido muscular vascular o esquelético). Las composiciones líquidas se formulan para la administración por cualquier vía aceptable conocida en la técnica para conseguir la administración de células vivas a los tejidos vasculares o del músculo esquelético diana. Típicamente, incluyen inyección o infusión, ya sea de una manera difusa, o dirigida al sitio de lesión, daño o alteración isquémica periférica, mediante una vía de administración que incluye, pero no se limita a, administración intramuscular, intravenosa o intraarterial mediante jeringas con agujas y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

15 Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas en un vehículo semisólido o sólido se formulan típicamente para implantación quirúrgica en el sitio de lesión, daño o alteración isquémica. Se apreciará que las composiciones líquidas también se pueden administrar mediante procedimientos quirúrgicos. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas semisólidas o sólidas pueden comprender geles semipermeables, matrices, armazones celulares y similares, que pueden ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede ser deseable o apropiado secuestrar las células exógenas de su entorno, pero permitir que las células segregan y suministren moléculas biológicas (por ejemplo, factores miotróficos, factores angiogénicos o factores de reclutamiento de células progenitoras endoteliales) al músculo esquelético circundante o a las células vasculares. En estas realizaciones, las células pueden formularse como implantes autónomos que comprenden PPDC vivas o población de células que comprenden PPDC rodeadas por una barrera no degradable, selectivamente permeable que separa físicamente las células trasplantadas del tejido huésped. Tales implantes se denominan a veces "inmunoprotectores", ya que tienen la capacidad de impedir que las células inmunitarias y macromoléculas maten las células trasplantadas en ausencia de inmunosupresión farmacológicamente inducida (para una revisión de tales dispositivos y métodos, véase, por ejemplo, P.A. Tresco et al., (2000) *Adv. Drug Delivery Rev.* 42:3–27).

30 En otras realizaciones, se utilizan diferentes variedades de geles y redes degradables para las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, los materiales degradables particularmente adecuados para formulaciones de liberación sostenida incluyen polímeros biocompatibles, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-ácido coglicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y similares. La estructura, selección y uso de polímeros degradables en vehículos de administración de fármacos se han revisado en varias publicaciones, incluyendo, A. Domb et al., 1992, *Polymers for Advanced Technologies* 3:279–292.

40 En otras realizaciones, puede ser deseable o apropiado liberar las células sobre o en un armazón o matriz biodegradable, preferiblemente biorreabsorbible o bioabsorbible. Estos biomateriales típicamente tridimensionales contienen las células vivas unidas al armazón, dispersadas dentro del armazón o incorporadas en una matriz extracelular atrapada en el armazón. Una vez implantados en la región diana del cuerpo, estos implantes se integran con el tejido huésped, donde las células trasplantadas se establecen gradualmente (véase, por ejemplo, Tresco, PA, *et al.* (2000) citado anteriormente; véase también Hutmacher, DW (2001) *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 12:107–174).

45 La matriz biocompatible puede estar compuesta por polímeros biodegradables naturales, modificados naturales o sintéticos, incluyendo homopolímeros, copolímeros y polímeros de bloques, así como combinaciones de los mismos. Se observa que un polímero se denomina generalmente basado en el monómero del que se sintetiza.

50 Ejemplos de polímeros biodegradables adecuados o clases de polímeros incluyen fibrina, colágeno, elastina, gelatina, vitronectina, fibronectina, laminina, trombina, poli (aminoácido), celulosa oxidada, tropoelastina, seda, ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos; proteínas, polinucleótidos, matrices de membrana basal reconstituidas, almidones, dextranos, alginatos, hialurón, quitina, quitosano, agarosa, polisacáridos, ácido hialurónico, poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), polietilenglicol, tejido descelularizado, péptidos autoensamblados, polipéptidos, glucosaminoglicanos, sus derivados y mezclas de los mismos. Tanto para el ácido glicólico como para el ácido láctico, se prepara típicamente un dímero cíclico intermedio y se purifica antes de la polimerización. Estos dímeros intermedios se denominan glicolida y lactida, respectivamente. Otros polímeros biodegradables útiles o clases de polímeros incluyen, sin limitación, poliésteres alifáticos, poli (alquileo oxalatos), policarbonatos derivados de tirosina, poliiminocarbonatos, poliortoésteres, polioxiéteres, poliamidoésteres, polioxiéteres que contienen grupos amina, poli(propileno fumarato), polidioxanonas, policarbonatos, polioxalatos, poli (alfa-hidroxiácidos), poli (ésteres), poliuretano, poli (éster uretano), poli (éter uretano), polianhídridos, poliacetatos, policaprolactonas, poli (ortoésteres), poliaminoácidos, poliamidas y mezclas y copolímeros de los mismos. Los polímeros biodegradables útiles adicionales incluyen, sin limitación, estereopolímeros de ácido L- y D-láctico, copolímeros de bis (para-carboxifenoxi) propano y ácido sebácico, copolímeros de ácido sebácico, copolímeros de caprolactona, poli (ácido láctico)/poli (ácido glicólico)/polietilenglicol, copolímeros de poliuretano y poli (ácido láctico), copolímeros de alfa-aminoácidos, copolímeros de alfa-aminoácidos y ácido caproico, copolímeros de alfa-bencil

glutamato y polietilenglicol, copolímeros de succinato y poli (glicoles), polifosfazeno, poli (hidroxialcanoatos) y mezclas de los mismos. También se contemplan sistemas binarios y ternarios.

5 En general, un polímero biodegradable adecuado para su uso como matriz está deseablemente configurado de modo que tiene propiedades mecánicas que son adecuadas para la aplicación prevista, permanece suficientemente intacta hasta que el tejido ha crecido y cicatrizado, no invoca una respuesta inflamatoria o tóxica, se metaboliza en el cuerpo después de cumplir con su propósito, se transforma fácilmente en el producto final deseado que se va a formar, demuestra una vida útil aceptable y se esteriliza fácilmente.

10 En un aspecto de la invención, el polímero biocompatible usado para formar la matriz está en forma de un hidrogel. En general, los hidrogeles son materiales poliméricos reticulados que pueden absorber más del 20 % de su peso en agua manteniendo una estructura tridimensional distinta. Esta definición incluye polímeros reticulados secos que se hinchan en ambientes acuosos, así como materiales hinchados con agua. Una serie de polímeros hidrófilos pueden ser reticulados para producir hidrogeles, sea el polímero de origen biológico, semisintético o totalmente sintético. El hidrogel puede producirse a partir de un material polimérico sintético. Tales polímeros sintéticos se pueden adaptar a una gama de propiedades y una uniformidad predecible de lote a lote, y representan una fuente fiable de material que generalmente está libre de problemas de inmunogenicidad. Las matrices pueden incluir hidrogeles formados a partir de péptidos autoensamblables, como los que se tratan en las patentes de Estados Unidos n.º 5.670.483 y 5.955.343, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2002/0160471, la solicitud de PCT n.º WO02/062969.

20 Las propiedades que hacen que los hidrogeles sean valiosos en aplicaciones de administración de fármacos incluyen el grado de hinchamiento en equilibrio, la cinética de sorción, la permeabilidad del soluto y sus características de presentación in vivo. La permeabilidad a los compuestos depende en parte del grado de hinchamiento o del contenido de agua y de la velocidad de biodegradación. Dado que la resistencia mecánica de un gel disminuye en proporción directa con el grado de hinchamiento, también está dentro de la contemplación de la presente invención que el hidrogel pueda unirse a un sustrato de manera que el sistema compuesto mejore la resistencia mecánica. En algunas realizaciones, el hidrogel puede impregnarse dentro de un sustrato poroso, con el fin de obtener la resistencia mecánica del sustrato, junto con las propiedades de suministro útiles del hidrogel.

30 Ejemplos no limitantes de armazón o matriz (a veces denominados colectivamente como "estructura") que se pueden usar en la presente invención incluyen estructuras textiles tales como tejidos, tejidos, trenzas, mallas, tejidos no tejidos y tejidos deformados; espumas porosas, espumas semiporosas, películas o láminas perforadas, micropartículas, perlas y esferas y estructuras compuestas que son una combinación de las estructuras anteriores. Las esteras no tejidas pueden formarse, por ejemplo, utilizando fibras compuestas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), comercializados bajo el nombre comercial suturas VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). También se pueden usar espumas, compuestas, por ejemplo, de copolímero de poli (épsilon-caprolactona)/ácido poli (ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como secado por congelación o liofilización, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.355.699. También se pueden usar hidrogeles tales como péptidos autoensamblables (por ejemplo, RAD16). Las redes degradables de formación in situ también adecuadas para su uso en la invención (véase, por ejemplo, Anseth, KS et al. (2002) J. Controlled Release 78:199–209; Wang, D. et al., (2003) Biomaterials 24:3969–3980; la publicación de patente de Estados Unidos 2002/0022676 to He et al.). Estos materiales formadores in situ se formulan como fluidos adecuados para inyección, y luego se pueden inducir a formar un hidrogel por diversos medios tales como cambio de temperatura, pH y exposición a la luz *in situ* o *in vivo*.

45 En otra realización, la estructura es un fieltro, que puede estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PCL, PLA, PGA, o ácido hialurónico. El hilo se convierte en un fieltro mediante técnicas convencionales de procesamiento textil que consisten en prensado, corte, cardado y punzonado. En otra forma de realización, las células se siembran sobre regiones estructurales de espuma que pueden ser estructuras compuestas.

50 En muchas de las realizaciones mencionadas anteriormente, la estructura puede moldearse en una forma útil, tal como la de un vaso sanguíneo. Además, se apreciará que las PPDC pueden cultivarse en dispositivos quirúrgicos o implantables preformados, no degradables, por ejemplo de una manera correspondiente a la utilizada para preparar bobinas endovasculares de GDC que contienen fibroblastos, por ejemplo (Marx, WF et al., (2001) Am. J. Neuroradiol. 22:323–333).

60 La matriz, armazón o dispositivo se puede tratar antes de inocular las células de la invención con el fin de potenciar la fijación celular. Por ejemplo, antes de la inoculación, podrían tratarse matrices de nailon con ácido acético 0,1 molar e incubarse en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nailon. Podría tratarse poliestireno de manera similar utilizando ácido sulfúrico. Las superficies externas de la estructura también pueden modificarse para mejorar la fijación o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como mediante el recubrimiento por plasma de la estructura o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, sulfato de dermatán, sulfato de queratina), materiales genéticos tales como citocinas y factores de crecimiento, una matriz celular y/u otros materiales, incluyendo pero sin limitarse a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas

vegetales, entre otros, factores que afectan a la supervivencia y diferenciación celular.

Las estructuras que contienen PPDC se preparan según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar libremente en un recipiente de cultivo a una subconfluencia o confluencia, se levantan del cultivo y se inoculan sobre la estructura. Además, pueden añadirse al medio de cultivo factores de crecimiento antes de, durante o después de la inoculación de las células para activar la diferenciación y la formación de tejido, si se desea. Como alternativa, pueden modificarse las estructuras de manera que se potencie el crecimiento de las células sobre las mismas o de manera que se reduzca el riesgo de rechazo del implante. Por lo tanto, pueden añadirse a la estructura uno o más compuestos biológicamente activos, incluidos pero no limitados a, compuestos antiinflamatorios, inmunosupresores o factores de crecimiento, para su liberación local.

Las PPDC, o poblaciones de células que comprenden PPDC, pueden usarse de diversas maneras para estimular y/o sostener la angiogénesis, especialmente en pacientes con enfermedad vascular periférica. Estas utilidades abarcan métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

En una realización de la divulgación, como se ha expuesto anteriormente, las PPDC pueden cultivarse *in vitro* para producir productos biológicos que son producidos naturalmente por las células o producidos por las células cuando se induce la diferenciación en músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o linajes endoteliales vasculares, o producidos por las células mediante modificación genética. Por ejemplo, se descubrió que TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC e IL-8 se secretaban a partir de células derivadas de cordón umbilical cultivadas en medio de crecimiento. Por ejemplo, se descubrió que TIMP1, TPO, KGF, HGF, HBEGF, BDNF, MIP1a, MCP-1, RANTES, TARC, Eotaxina, e IL-8 se secretaban a partir de PPDC derivadas de placenta cultivadas en medio de crecimiento (véanse los ejemplos). Además, las PPDC pueden producir factores para el reclutamiento de células progenitoras endoteliales tales como VEGF, SDF-1, EPO, G-CSF, estatinas, estrógeno, PPARy y CXCR4 y pueden ser secretados en el medio de crecimiento. Otros factores tróficos, aún no detectados o no examinados, de uso en la reparación y regeneración vascular o de músculo esquelético, es probable que sean producidos por las PPDC y posiblemente secretados en el medio.

A este respecto, otra realización de la divulgación presenta el uso de PPDC para la producción de medio acondicionado, ya sea a partir de PPDC indiferenciadas o de PPDC incubadas en condiciones que estimulan la diferenciación en un músculo esquelético o linaje vascular. Tales medios acondicionados se contemplan para su uso en cultivo *in vitro* o *ex vivo* de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o células precursoras de endotelio vascular, o *in vivo* para soportar células transplantadas que comprenden poblaciones homogéneas de PPDC o poblaciones heterogéneas que comprenden PPDC y músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o progenitores endoteliales vasculares, o para reclutar células progenitoras endoteliales al sitio de lesión isquémica, por ejemplo.

En otra realización, las PPDC se usan ventajosamente en cocultivos *in vitro* para proporcionar soporte trófico a otras células, en particular, células de músculo esquelético, células progenitoras de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales vasculares o células progenitoras de endotelio vascular. En algunas realizaciones preferidas, el soporte trófico es la proliferación de las células. Para el cocultivo, puede ser deseable que las PPDC y las otras células deseadas se cocultiven en condiciones en las que los dos tipos de células estén en contacto. Esto puede conseguirse, por ejemplo, sembrando las células como una población heterogénea de células en un medio de cultivo o sobre un sustrato de cultivo adecuado. Como alternativa, las PPDC pueden cultivarse primero hasta la confluencia y emplearse como sustrato para el segundo tipo de célula deseada en cultivo. En esta última forma de realización, las células pueden estar además físicamente separadas, por ejemplo, por una membrana o un dispositivo similar, de manera que el otro tipo de célula pueda sacarse y utilizarse por separado después del período de cocultivo. El uso de las PPDC en cocultivo para promover la expansión y diferenciación de otros tipos de células puede hallar aplicabilidad en áreas clínicas/terapéuticas y de investigación. Por ejemplo, puede utilizarse el cocultivo de PDC para facilitar el crecimiento y la diferenciación de células de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericitos o células endoteliales vasculares en cultivo, con fines de investigación básica o para su uso en ensayos de selección de fármacos, por ejemplo. El cocultivo de PDC también puede utilizarse para la expansión *ex vivo* de células de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericitos o progenitores endoteliales vasculares para su administración posterior con fines terapéuticos. Por ejemplo, las células de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericitos o progenitoras endoteliales vasculares pueden recolectarse de un individuo, expandirse *ex vivo* en cocultivo con las PPDC, a continuación devolverse a ese individuo (transferencia autóloga) o a otro individuo (transferencia singénica o alogénica). En estas formas de realización, se entenderá que, después de la expansión *ex vivo*, la población mixta de células que comprende las PPDC y las células de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericitos o progenitoras endoteliales vasculares podría administrarse a un paciente que necesite tratamiento. Como alternativa, en situaciones en las que resulta apropiada o deseable la transferencia autóloga, las poblaciones de células cocultivadas pueden separarse físicamente en cultivo, lo que permite sacar las células autólogas de de músculo esquelético, músculo liso vascular o progenitoras endoteliales vasculares para administrarse al paciente.

Como se describe en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2005/0058631, 2005/0054098 and 2005/0058630, se ha demostrado que las PPDC se trasplantan con eficacia en el cuerpo y que mejoran el flujo

sanguíneo y reducen la necrosis tisular en un modelo animal aceptado. Estos resultados apoyan una forma de realización preferente de la invención, junto con los descubrimientos expuestos en la presente invención, soportan realizaciones preferidas de la invención, en las que las P.D. se usan en la terapia celular para tratar la lesión o daño terapéutico reparando o regenerando músculo esquelético y/o tejido vascular en una enfermedad vascular periférica o mejorando el flujo sanguíneo o estimulando y/o soportando la angiogénesis en un paciente con enfermedad vascular periférica. En una realización, las PPDC se trasplantan a una localización objetivo en el cuerpo, especialmente en o proximal a la localización del episodio isquémico, donde las PPDC pueden diferenciarse en uno o más de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular, las PPDC pueden proporcionar soporte trófico para células de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, pericito o progenitores de células endoteliales vasculares y/o células de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, pericitos o células endoteliales vasculares *in situ*, las PPDC pueden producir factores para reclutar células progenitoras endoteliales al sitio de la lesión isquémica, o las PPDC pueden ejercer un efecto beneficioso de dos o más formas, entre otras. Las PPDC secretan factores tróficos incluyendo, pero sin limitaciones, GFGFm, IL-6, IL-8, HGF, IGF-1, TPO y similares. Las PPDC pueden ayudar en el reclutamiento de células progenitoras vasculares, tales como angioblastos, para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Las PPDC pueden ejercer efectos tróficos en el cuerpo del paciente al que se administran. Por ejemplo, las PPDC pueden ejercer efectos tróficos sobre las células del músculo esquelético, las células del músculo liso vascular, las células endoteliales vasculares, los pericitos o las células progenitoras de los mismos. En algunas realizaciones preferidas, el efecto trófico es la proliferación de las células. Las PPDC también pueden inducir migración de células en el cuerpo del paciente al que se administran. Dicha migración puede facilitar la reparación, regeneración y tratamiento de la enfermedad vascular periférica tal como la isquemia periférica. Por ejemplo, las PPDC administradas en o cerca de un sitio de enfermedad vascular periférica pueden inducir migración de células al sitio de enfermedad vascular periférica con el fin de reparar, regenerar o tratar de otro modo el tejido enfermo y sus alrededores. Las PPDC administradas de este modo pueden inducir migración de las células del músculo esquelético, las células del músculo liso vascular, las células endoteliales vasculares, los pericitos o las células progenitoras de los mismos. En realizaciones preferidas, las PPDC inducen la migración de las células endoteliales vasculares y/o las células progenitoras del endotelio vascular al sitio, o al menos cerca del sitio de la enfermedad vascular periférica. En algunas realizaciones, la migración es inducida o soportada por FGF y/o HGF, preferiblemente FGF y HGF expresados por las PPDC. Las preparaciones hechas a partir de PPDC, incluyendo lisados celulares, fracciones subcelulares, y similares, también pueden usarse para tratar la enfermedad vascular periférica. Tales preparaciones se pueden formular con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como las descritas y e ilustradas en el presente documento y se administran a pacientes en cantidades eficaces para tratar la enfermedad vascular periférica. En realizaciones preferidas, las preparaciones preparadas a partir de PPDC comprenden FGF y HGF.

Realizaciones específicas de la invención están dirigidas a la reparación directa, regeneración, reemplazo o el soporte de la reparación, regeneración o reemplazo de vasos sanguíneos para el tratamiento de lesión o daño isquémico periférico.

Las PPDC pueden administrarse solas (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. Como se ha descrito anteriormente, las PPDC pueden administrarse tal como se formulan en una preparación farmacéutica con una matriz o armazón, o con vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables. Cuando se administran PPDC con otras células, pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente con las otras células (antes o después de las otras células). Las células que pueden administrarse conjuntamente con PPDC incluyen, pero sin limitación, miocitos, células de músculo esquelético, células progenitoras de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales vasculares o células progenitoras de endotelio vascular y/u otras células madre multipotenciales. Las células de diferentes tipos se pueden mezclar con las PPDC inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse conjuntamente durante un período de tiempo previo a la administración.

Los PPDC pueden administrarse con otros fármacos beneficiosos o moléculas biológicas, u otros agentes activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores angiogénicos o fármacos miorregerativos o mioprotectores como se conoce en la técnica. Cuando se administran PPDC con otros agentes, pueden administrarse conjuntamente en una sola composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (antes o después de la administración de los otros agentes). Los otros agentes pueden ser parte de un régimen de tratamiento que comienza antes del trasplante y continúa a lo largo del curso de la recuperación, o puede iniciarse en el momento del trasplante, o incluso después del trasplante, como un médico experto en la técnica considere apropiado.

Ejemplos de otros componentes que se pueden administrar con PPDC incluyen, pero no se limitan a: (1) otros factores angiogénicos, fármacos angiogénicos o factores o fármacos miorregeradores; (2) componentes seleccionados de la matriz extracelular, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos (como alternativa, las PPDC pueden modificarse genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes antiapoptóticos (por ejemplo,

- eritropoyetina (EPO) , mimeticuerpo de EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) -I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasa) ; (4) compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de MAP cinasas p38, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 y IL-1, Pemirolast, Tranilast, Remicade (Centocor, Inc., Malvern, Pa.) , sirolimus y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (tales como tepoxalina, tolmetina y suprafen); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) tales como probucol, vitaminas C y E, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína y (6) anestésicos locales, por nombrar solo unos pocos.
- 10 En una realización, los PPDC se administran como células indiferenciadas, es decir, como cultivos en medio de crecimiento. En una realización de la divulgación, las PPDC pueden administrarse después de la exposición en cultivo a condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo deseado de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular.
- 15 Las células de la invención pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, introducirse (por ejemplo, por medio de un catéter, jeringa, derivación, endoprótesis vascular, microcatéter o bomba) o administrarse de otra manera directa o indirectamente al sitio de lesión, daño o alteración isquémica. Las vías de administración de las células de la invención o composiciones de las mismas incluyen, pero no se limitan a las vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratecal, intracisternal o mediante jeringas con agujas y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.
- 20 Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en un lugar preciso del cuerpo es por lo general un medio adecuado de administración. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas, pueden administrarse a través de la sangre, o directamente en el tejido muscular afectado (por ejemplo, a través de una zona difusamente afectada, como sería el caso de la lesión isquémica difusa). La migración de las PPDC puede ser guiada por señales químicas, factores de crecimiento o calpainas.
- 25 Las células o composiciones derivadas del posparto y/o matrices que comprenden las células derivadas del posparto pueden liberarse en el sitio a través de un micro catéter, intracateterización o mediante una mini bomba. El vehículo excipiente o portador puede ser cualquiera de los que se sabe que son farmacéuticamente aceptables para la administración a un paciente, particularmente localmente en el sitio en el que debe inducirse la diferenciación celular. Ejemplos incluyen medios líquidos, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), solución salina estéril, solución salina estéril tamponada con fosfato, medio Leibovitz (L15, Invitrogen, Carlsbad, CA), dextrosa en agua estéril y cualquier otro líquido fisiológicamente aceptable.
- 30 Las formas y regímenes de dosificación para administrar PPDC o cualquiera de las otras composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrollan de acuerdo con una buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición del paciente individual, por ejemplo, la naturaleza y extensión de la lesión o daño del acontecimiento isquémico periférico, la edad, el sexo, el peso corporal y la afección médica general, y otros factores conocidos por los médicos. Por tanto, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica a administrar a un paciente se determina por estas consideraciones como se conoce en la técnica.
- 35 Se ha demostrado que las PPDC no estimulan PBMC alogénicas en una reacción mixta de linfocitos. Por consiguiente, el trasplante con PPDC alogénicas, o incluso xenogénicas, puede ser tolerado en algunos casos. En algunas realizaciones, las propias PPDC proporcionan un efecto inmunosupresor, evitando así el rechazo del huésped de las PPDC trasplantadas. En tales casos, la inmunosupresión farmacológica durante la terapia celular puede no ser necesaria.
- 40 Sin embargo, en otros casos puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede realizarse suministrando las células en un dispositivo encapsulado, como se ha descrito anteriormente. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunológica a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, las PPDC pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad, como se ha mencionado anteriormente.
- 45 Puede determinarse la supervivencia de las PPDC trasplantadas en un paciente vivo mediante el uso de diversas técnicas de exploración, por ejemplo, exploraciones mediante tomografía axial computarizada (TAC o TC), resonancia magnética (RM) o tomografía por emisión de positrones (TEP). La determinación de la supervivencia del trasplante también puede realizarse *post mortem* extrayendo el tejido de músculo esquelético o vascular, y examinándolo visualmente o con un microscopio. Como alternativa, las células pueden tratarse con tinciones que sean específicas para las células de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, pericitos o células endoteliales vasculares. Las células trasplantadas también pueden identificarse mediante la incorporación previa de colorantes indicadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, Fast Blue, bisbenzamida, micropartículas férricas, o productos génicos indicadores introducidos genéticamente, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.
- 50
- 55
- 60
- 65

En otro aspecto, la divulgación proporciona kits que utilizan las PPDC, poblaciones de PPDC, componentes y productos de las PPDC en diversos métodos para estimular y/o sostener la angiogénesis, para mejorar el flujo sanguíneo, para regenerar, reparar y mejorar el músculo esquelético lesionado o dañado por un acontecimiento isquémico periférico, como se ha descrito anteriormente. Cuando se usan para el tratamiento de daños o lesiones causadas por un acontecimiento isquémico u otro tratamiento programado, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, incluyendo al menos PPDC y un vehículo farmacéuticamente aceptable (líquido, semisólido o sólido). Los kits pueden incluir opcionalmente un medio de administración de las células, por ejemplo mediante inyección. Los kits pueden incluir adicionalmente instrucciones para el uso de las células. Los kits preparados para su uso en hospitales de campaña, tal como para uso militar, pueden incluir suministros para todo el procedimiento, incluidos los armazones tisulares, las suturas quirúrgicas, y similares, en los que las células se utilizarán junto con la reparación de lesiones agudas. Los kits para ensayos y métodos *in vitro* como se describen en el presente documento pueden contener uno o más de entre (1) las PPDC o componentes o productos de las PPDC, (2) reactivos para poner en práctica el método *in vitro*, (3) otras células o poblaciones de células, cuando proceda, e (4) instrucciones para llevar a cabo el método *in vitro*.

El ejemplo siguiente describe la invención con mayor detalle. Este ejemplo pretende ilustrar adicionalmente, no limitar, aspectos de la invención descritos en el presente documento.

Ejemplo 1

Eficacia de las células posparto derivadas de cordón umbilical en el modelo murino de isquemia periférica de la pata trasera

Materiales y métodos

Cultivo y aislamiento de células umbilicales. Se prepararon células derivadas de cordón umbilical (UDC) como se describe las publicaciones de patentes de Estados Unidos 2005/0058631 o 2005/0054098. Las células se cultivaron hasta el pase 10 u 11 (aproximadamente 20 - 25 veces duplicaciones de población) y después se conservaron criogénicamente.

Grupos de tratamiento del modelo de Isquemia:

1. PBS, control negativo
 2. Plásmido de expresión para el factor de crecimiento endotelial vascular (pVEGF), control positivo
 3. Células de la línea celular n.º 1, 5x10⁵ células totales
 4. Células de la línea celular n.º 1, 1 x 10⁶ células totales
 5. Células de la línea celular n.º 2, 1 x 10⁶ células totales
 6. Células de la línea celular n.º 1, cultivadas, 1 x 10⁶ células totales
- Línea celular 1: U120304 p10,
Línea celular 2: U072804A p11

Preparación de la muestra para la inyección. Las células se descongelaron inmediatamente antes de la inyección (grupos 3-5), o se cultivaron durante 24-30 horas (grupo 6). Se contaron las células y se determinó la viabilidad mediante tinción con azul tripán y contando con un hemocitómetro. Se resuspendió toda la dosis de células o plásmido (100 µg) en 100 µl de PBS y se cargó en una jeringuilla de tuberculina de 300 µl con una aguja de calibre 27 para inyección en los ratones.

Cirugía. El día 0, se indujo quirúrgicamente isquemia aguda del miembro posterior en ratones atímicos, desnudos por ligación unilateral y escisión de la arteria iliofemorol izquierda. Los ratones se dividieron en 6 grupos de al menos n = 8 para tratamiento con UDC o controles. Los ratones fueron asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento para los grupos 1-5. Debido a que el grupo 6 se añadió tarde en el estudio, no se produjo aleatorización. Además, los conflictos de programación impidieron la realización de microCT/PET simultáneamente con el estudio original. Este análisis se realizó sobre un grupo de 8 animales adicionales (4 de control y 4 células cultivadas 1) inscritos después de la finalización del estudio de 21 días.

Inyecciones celulares. Un día después de la cirugía, los ratones fueron anestesiados para el análisis de imagen por Doppler láser de la región plantar. Mientras que los ratones estaban todavía bajo anestesia, las células se inyectaron en 5 sitios en el miembro izquierdo (isquémico): (1) 20 µl en el tibial anterior; (2) 2 x 20 µl en gastrocnemio; y (3) 2 x 20 µl en el recto femoral del haz de cuádriceps.

Análisis. Se realizaron imágenes por láser Doppler los días 1, 4, 8, 14 y 21. A los 21 días, se sacrificaron los ratones y se extirparon los músculos tibiales anteriores (TA), gastrocnemio y cuádriceps y se criofijaron para seccionar finamente y tinción inmunohistoquímica con anticuerpo CD31. El análisis MicroCT/PET utilizando gas fluorometano para determinar el estado de perfusión de los músculos se realizó a los 8 días. Se sacrificó a estos ratones inmediatamente después y se procesaron los músculos de los miembros posteriores para la inmunohistoquímica CD31 en secciones delgadas criofijadas.

Criterios de exclusión. Los ratones que presentaban una necrosis grave del dedo del pie el día 1 después de la cirugía se excluyeron del estudio antes de las inyecciones. También se excluyó a los ratones en cualquier momento del estudio debido a necrosis severa (por ejemplo, necrosis total del pie) o si experimentaron pérdida de peso intensa exhibieron signos de dolor extremo.

Resultados

El objetivo de estos experimentos fue determinar si las UDC protegían los tejidos de la lesión en un molde de roedor de isquemia en la extremidad trasera. Este modelo se realizó creando una lesión en el flujo sanguíneo femoral e inyectando células en el área aproximadamente 24 horas después de la lesión. Los resultados se evaluaron estimando la perfusión de los miembros de estos animales y comparándola con el miembro contralateral que no resultó lesionado. Los tejidos también se recogieron de estos animales al final del estudio para evaluar la vasculatura y la lesión en los animales. Este estudio también se realizó con células humanas en ratones desnudos para evitar el rechazo xenógeno de las células implantadas.

Los resultados presentados en la figura 1 muestran que las CDU conferían un beneficio a los ratones, ya que se mejoró la perfusión en los animales tratados con las células cultivadas los días 4 y 8, mientras que el flujo sanguíneo también mejoró en los animales tratados con las células 120304 descongeladas Inmediatamente antes de la inyección el día 8. Las células 072804A no mostraron beneficio en ningún momento, lo que sugiere una diferencia entre estos dos lotes de células. Generalmente, los animales mostraron mejoras a lo largo del tiempo, lo que indica que esta cepa de animales tiene cierto grado de capacidad de reparación nativa. Estos animales también eran relativamente jóvenes, lo que puede ser un factor en sus capacidades regenerativas innatas.

Los músculos TA se recogieron al final del estudio, y las secciones se probaron con un anticuerpo anti CD31 para detectar las células endoteliales vasculares. Los resultados representativos se muestran en la figura 2. Los resultados muestran que los animales de control de PBS presentaron una necrosis macroscópica y una vasculatura limitada en la extremidad isquémica (por ejemplo ratón 26 y 43) mientras que los miembros tratados con UDC mostraron niveles relativos más altos de tinción CD31 y niveles reducidos de necrosis. Los resultados también sugieren que los animales tratados con UDC cultivadas mostraron una vasculatura mejorada en comparación con los controles (control de PBS y, en algunos casos, la extremidad normal (no lesionada)). Se observó un aumento de la tinción de CD 31 en la extremidad isquémica pero tratada en comparación con la extremidad normal. Los animales tratados con el plásmido VEGF y Umb072804A mostraron resultados similares a los del control con PBS.

Sumario

Estos resultados proporcionan evidencia de que las células derivadas del cordón umbilical pueden ser efectivas para mejorar el flujo sanguíneo y para reducir la necrosis tisular en un modelo de isquemia de extremidad posterior de roedor. El estudio incluyó dos lotes diferentes de células umbilicales que se descongelaron inmediatamente antes de la inyección, y los resultados sugirieron que podrían existir diferencias entre los lotes. Las células que parecían tener cierta actividad también se cultivaron durante aproximadamente 48 horas antes de la inyección y se incluyeron en otro grupo de tratamiento. Estas células parecen ser las más efectivas y esto sugiere que el cultivo cambia el perfil de actividad de las células. Los resultados de la histología también proporcionan pruebas de que el tratamiento puede proporcionar efectos protectores. Los resultados no proporcionan suficiente información con respecto al mecanismo por el cual las UDC ejercen sus efectos. Sin pretender quedar ligado a teoría o mecanismo de acción particular alguno, se cree que las células pueden ejercer su efecto estimulando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos o protegiendo el tejido muscular de la progresión del daño, por ejemplo, mediante la protección frente a la apoptosis o reclutamiento de agentes activos endógenos. Se necesitan estudios adicionales para investigar el mecanismo de acción preciso.

Referencias

1) Rehman, J. et al. (2004) Circulation 109:1292–1298

Ejemplo 2

Ensayo de formación de red endotelial

La angiogénesis, o formación de nueva vasculatura, es necesaria para el crecimiento de nuevo tejido. La inducción de la angiogénesis es un objetivo terapéutico importante en muchos estados patológicos. Para identificar la potencial actividad angiogénica de las células derivadas de posparto en ensayos *in vitro* se siguió un método bien establecido de siembra de células endoteliales sobre una placa de cultivo recubierta con un sustrato de cultivo de células biológicas con el nombre comercial MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA), un extracto de membrana basal (Nicosia y Ottinetti (1990) *In vitro Cell Dev. Biol.* 26(2): 119-28). El tratamiento de las células endoteliales en MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) con factores angiogénicos estimulará a las células para formar una red que es similar a los capilares. Este es un ensayo *in vitro* común para el ensayo de estimuladores e

inhibidores de la formación de vasos sanguíneos (Ito et al. (1996) Int. J. Cancer 67(1):148–52). Los experimentos hicieron uso de un sistema de cocultivo con las células derivadas del posparto sembradas en insertos de pocillo de cultivo. Estos insertos permeables permiten el intercambio pasivo de componentes de los medios entre el endotelio y los medios de cultivo derivados del posparto.

5

Materiales v métodos

Cultivo celular

10 **Células derivadas de tejido posparto.** Se recibieron placentas y cordones umbilicales humanos y se aislaron las células como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Las células se cultivaron en medio de crecimiento (medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 15 % (v/v) (Hyclone, Logan UT), 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomycin (Invitrogen), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO)) en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ %. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban entre los pases 4 y 12.

15

Se digirieron con tripsina células de posparto en crecimiento activo, se contaron y se sembraron en insertos de cultivo tisular de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a razón de 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento a 37 °C en condiciones de crecimiento estándar.

20

Células madre mesenquimatosas humanas (hMSC). Se adquirieron hMSC de Cambrex (Walkersville, MD) y se cultivaron en MSCGM (Cambrex). Los cultivos se incubaron en condiciones de crecimiento estándar.

25

Se digirieron con tripsina las MSC en crecimiento activo y se contaron y se sembraron en insertos de cultivo tisular de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a razón de 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento en condiciones de crecimiento estándar.

30

Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Se obtuvieron HUVEC de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separados, en medios para células endoteliales EGM o EBM (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico de cultivo tisular convencional en condiciones de crecimiento estándar. Las células utilizadas en el ensayo se encontraban entre los pases 4 y 10.

35

Células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC). Se obtuvieron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Estas células también se mantuvieron en cultivos separados, en formulaciones de medios EGM o EBM. Las células se cultivaron sobre plástico de cultivo tisular convencional en condiciones de crecimiento estándar. Las células utilizadas para los experimentos se encontraban entre los pases 4 y 8.

40

Ensayos de formación de red endotelial (MATRIGEL). Se recubrieron placas de cultivo con MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) según las especificaciones del fabricante. En resumen, se descongeló MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) a 4 °C y se alicuotaron aproximadamente 250 microlitros y se distribuyeron uniformemente en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos enfriada (Corning). A continuación, la placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos para permitir que el material solidificara. Se digirieron con tripsina los cultivos de células endoteliales en crecimiento activo y se realizó el recuento. Las células se lavaron dos veces en medios de crecimiento con FBS al 2 %, seguido de centrifugación, resuspensión y aspiración del sobrenadante. Las células se sembraron en los pocillos recubiertos a razón de 20.000 células por pocillo en aproximadamente 0,5 mililitros de Medio de crecimiento con FBS al 2 % (v/v). A continuación, las células se incubaron durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células se asentaran.

45

A continuación, los cultivos de células endoteliales se trataron con bFGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o con VEGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) para que hiciera de control positivo para la respuesta de las células endoteliales. Se añadieron insertos Transwell sembrados con células derivadas de la placenta a pocillos apropiados con medio de crecimiento con FBS al 2 % en la cámara del inserto. Los cultivos se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante aproximadamente 24 horas. La placa de pocillos se sacó de la incubadora y se tomaron imágenes de los cultivos de células endoteliales con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

55

60 **Resultados**

En un sistema de cocultivo con células derivadas de la placenta, las células derivadas de cordón umbilical, HUVEC, forman redes de células (datos no mostrados). Las células HUVEC forman redes de células limitadas en experimentos de cocultivo con hMSC y con bFGF 10 nanomolar (no mostrado). Las células HUVEC sin ningún tratamiento mostraron muy poca o nula formación de redes (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las células derivadas de posparto liberan factores angiogénicos que estimulan las HUVEC.

65

En un sistema de cocultivo con células derivadas de la placenta, las células derivadas de cordón umbilical, CAEC, forman redes de células (datos no mostrados).

5 En la Tabla 2-1 se muestran los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células derivadas de posparto en medio de crecimiento. Se sembraron células derivadas de posparto sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 37°C en oxígeno atmosférico durante 48 horas en los insertos y, a continuación, se cambiaron a un medio con FBS al 2 % y se devolvieron a 37 °C durante 24 horas. Se extrajo el medio, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80 °C, y se analizó mediante el ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son los promedios de las mediciones por duplicado. Los resultados demuestran que las células derivadas de posparto no liberan niveles detectables de factor de crecimiento plaquetario bb (PDGF-bb) ni factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF). Las células sí liberan cantidades mensurables de inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Tabla 2-1. Posibles factores angiogénicos liberados a partir de células derivadas de posparto

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGFBB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	91655,3	175,5	< 2,0	275,5	3,0	58,3	7,5	644,6	< 1,2
Plac (P11)	1592832,4	28,1	< 2,0	1273,1	193,3	5960,3	34,8	12361,1	1,7
Cord. Umb. (P4)	81831,7	< 9,8	< 2,0	365,9	14,1	200,2	5,8	< 4,0	< 1,2
Medio solo	< 9,8	25,1	< 2,0	< 6,4	< 2,0	< 3,2	< 5,4	< 4,0	< 1,2

20 Las células derivadas de posparto se cultivaron en 24 horas en medios con FBS al 2 % en oxígeno atmosférico. El medio se extrajo y se ensayó mediante ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son las concentraciones en los medios presentadas en picogramos por mililitro de los medios de cultivo. Plac: células derivadas de placenta; cord. umb.: células derivadas de cordón umbilical.

25 En la Tabla 2-2 se muestran los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células derivadas de posparto. Se sembraron células derivadas de posparto sobre insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en medio de crecimiento 5 % en oxígeno durante 48 horas en los insertos y, a continuación, se cambiaron a un medio con FBS al 2 % y se devolvieron a incubación con 5 % de O2 durante 24 horas. Se extrajo el medio, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80 °C, y se analizó mediante el ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son los promedios de las mediciones por duplicado. Los resultados demuestran que las células derivadas de posparto no liberan niveles detectables de factor de crecimiento plaquetario bb (PDGF-BB) ni factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF). Las células sí liberan cantidades mensurables de inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Tabla 2-2. Posibles factores angiogénicos liberados a partir de células derivadas de posparto.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF-BB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEG (pg/ml)	HB-EGF (pg/ml)
Plac (P4)	72972,5	253,6	< 2,0	743,1	2,5	30,2	15,1	1495,1	< 1,2
Plac (P11)	458023,1	55,1	< 2,0	2562,2	114,2	2138,0	295,1	7521,3	1,8
Cord. Umb. (P4)	50244,7	< 9,8	< 2,0	403,3	10,7	156,8	5,7	< 4,0	< 1,2
Medio solo	< 9,8	25,1	< 2,0	< 6,4	< 2,0	< 3,2	< 5,4	< 4,0	< 1,2

40 Las células derivadas de posparto se cultivaron en 24 horas en medios con FBS al 2 % en 5 % de oxígeno. El medio se extrajo y se ensayó mediante ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis por duplicado. Los valores son las concentraciones en los medios presentadas en picogramos por mililitro de los medios de cultivo. Plac: células derivadas de placenta; cord. umb.: células derivadas de cordón umbilical.

45

Sumario.

Los resultados demuestran que las células derivadas de posparto pueden estimular tanto las células de vena umbilical humana como las endoteliales de arteria coronaria para que formen redes en un ensayo MATRIGEL *in vitro* (BD Discovery Labware, Bedford, MA). Este efecto es similar al observado con factores angiogénicos conocidos en este sistema de ensayo. Estos resultados sugieren que las células derivadas del posparto son útiles para estimular la angiogénesis *in vivo*.

Ejemplo 3**Efecto si hUTC sobre la proliferación y migración *in vitro* de células endoteliales**

Se llevaron a cabo estudios para determinar los efectos de las células derivadas del tejido umbilical humano (hUTC) sobre la proliferación y migración de las células endoteliales *in vitro*. Estos efectos se examinaron cocultivando hUTC y células endoteliales e incubando cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con lisados de hUTC. Los resultados presentados aquí muestran que las hUTC inducen incrementos en la proliferación y migración de las células endoteliales. Además, los datos sugieren que estos efectos están mediados, en parte, por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

Materiales y métodos**Cultivo celular**

El lote n.º 120304 de células derivadas de tejido umbilical humanas crioconservadas se descongeló en el pase 8-9 y se sembró en matraces recubiertos con gelatina y se cultivó en medio de crecimiento Hayflick (DMEM – bajo contenido en glucosa [Gibco, número de catálogo 11885-084], 15 % v/v de suero bovino fetal [FBS, Hyclone, número de catálogo SH30070.03], 0,001% v/v de beta-mercaptoetanol [Sigma, número de catálogo M7154] y 50 U/ml de penicilina y 50 microgramos/ml de estreptomina [Gibco, 3810 - 74 - 0]). Para los estudios detallados en el presente documento, las células utilizadas fueron en el pase 10 u 11. Se obtuvieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, número de catálogo C2517A), células endoteliales de la arteria coronaria humana (HCAEC, número de catálogo CC2585) y células endoteliales de la arteria ilíaca humana (HIAEC, número de catálogo CC2545) de Cambrex y se cultivaron en medio de crecimiento endotelial (EGM-2MV, número de catálogo 3202) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. También se adquirieron células madre mesenquimatosas humanas (MSC, número de catálogo PT-2501) de Cambrex y se mantuvieron en medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (MSCGM, número de catálogo PT-3001) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los fibroblastos dérmicos humanos (CCD9) eran de ATCC y se mantuvieron en medio DMEM/F12 que contenía FBS al 10% y penicilina-estreptomina 1U/ml.

Para el pase rutinario, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen, número de catálogo 14190) y se separaron por tripsinización (0,25 % de tripsina-EDTA, Invitrogen, número de catálogo 25200-056). Las células se contaron usando un instrumento de Guava (Guava Technologies, Hayward, CA) y se sembraron a una densidad de 5000 células/cm². Las células se pasaron de forma rutinaria 3-4 veces a la semana.

Factores de crecimiento y anticuerpos

El factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (bFGF, número de catálogo 100-18B) y el factor de crecimiento de hepatocitos humanos recombinantes (HGF, número de catálogo 100-39) eran de Peprotech y el factor de crecimiento endotelial vascular humano recombinante (VEGF, número de catálogo 293-VE) de R y D Systems. Se adquirieron anticuerpos contra bFGF (número de catálogo ab11937), HGF (número de catálogo ab10678) y VEGF (número de catálogo ab9570) de Abcam (Cambridge, MA).

Preparación del lisado celular

Los lisados celulares se prepararon a partir de granulados celulares congelados de hUTC n.º 120304 de anteriores crecimientos. Brevemente, el lote n.º 120304 de hUTC se cultivó durante 4 días, se cosechó mediante tripsinización y se sedimentó por centrifugación. A continuación, las células se lavaron con PBS 3 veces y se resuspendieron en PBS a 1×10^7 células/ml. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de suspensiones en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml siliconados estériles y se centrifugaron a 300 rpm durante 5 minutos. Se aspiró el PBS y se almacenaron gránulos de células a -80 °C hasta su uso.

Para preparar los lisados celulares, los tubos que contenían los sedimentos celulares se sumergieron en nitrógeno líquido (LN2) durante 60 segundos y luego se sumergieron inmediatamente en un baño de agua a 37 °C durante 60 segundos o hasta que se descongelaron, pero no más de 3 minutos. Esta etapa se repitió 3 veces. Después de esta etapa, las muestras congeladas-descongeladas se centrifugaron a 13000 rcf a 4 °C durante 10 minutos y luego se colocaron sobre hielo. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se transfirió a un tubo estéril nuevo siliconado de

1,5 ml. La etapa de centrifugación se repitió 3 veces y el sobrenadante resultante se reunió. La concentración de proteína se determinó usando el protocolo de microensayo del kit de ensayo de proteína Quickstart Bradford (Bio-rad, número de catálogo 500-0201). Para estudiar el efecto del lisado celular sobre la proliferación de HUVEC.

5 Medición de la proliferación celular

Las células se recogieron y se sembraron en placas directamente en la formulación de medio indicada a una concentración de 5000 células/cm². Para experimentos de cocultivo, se usaron transwells de 24 pocillos (número de catálogo Corning 3413) con células endoteliales colocadas en el fondo del pocillo (10.000 células/pocillo) y hUTC, MSC o fibroblastos encerrados dentro de los insertos transwell (1650 células/Insertos transwell). En los periodos de tiempo indicados, los insertos que contenían hUTC, MSC o fibroblastos se eliminaron y se desecharon. Las células endoteliales se cosecharon añadiendo 90 µl de tripsina a cada pocillo. Las células se liberaron pipeteando hacia arriba y hacia abajo y luego se transfirieron a una placa de 96 pocillos limpia. La tripsina se inhibió mediante la adición de 90 µl de medio. Las células se tiñeron por adición de 20 µl de solución de tinción (18 µl de medio + 1 µl de Reactivo Flex de Guayaba Viacount + 1 µl de DMSO) y se cuantificaron usando un instrumento de Guayaba (Guava Technologies, Hayward, CA).

Para estudios sobre el efecto del lisado celular de hUTC n.º 120304 sobre la proliferación de HUVEC, se sembraron HUVEC en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo en medio EGM-2MV durante 8 h. A continuación, se mantuvo a las células sin suero mediante incubación durante la noche en 0,5 ml de medio EGM-2MV que contenía FBS al 0,5 % y sin factores de crecimiento. Posteriormente, se añadieron FBS, lisados celulares de hUTC lote n.º 120304 que contenían 62,5 µg o 125 µg de proteína recién preparados y anticuerpos neutralizantes de FGF (7 µg/ml) o HGF (1 µg/ml). Después de 4 días de cocultivo, las células se cosecharon y se contaron usando un instrumento de Guava.

Para estudios sobre los mecanismos potenciales del aumento mediado por hUTC de la proliferación de células endoteliales, se incluyeron anticuerpos neutralizantes de FGF (7 µg/ml), HGF (1 µg/ml) y VEGF (1 µg/ml) en cocultivos de HUVEC Y HCAEC con hUTC. Los anticuerpos se añadieron al medio de cultivo celular cuando las células se sembraron en placas inicialmente. Después de 7 días de cocultivo, las células se cosecharon y se contaron usando un instrumento de Guava.

Evaluación de la migración celular

Para la medición de la migración celular, se utilizó un transwell de 6 pocillos (número de catálogo Corning 3428). Las células se sembraron directamente en la formulación de medio indicada a una concentración de 5000 células/cm². Las células endoteliales se sembraron dentro de los insertos de transwell (23.000 células/inserto de transwell) y el lote n.º. 120304 de hUTC o las MSC se sembraron en placas en el fondo del pocillo (48.000 células/pocillo). La migración se evaluó después de 7 días de cocultivo contando el número de células en la parte inferior del transwell. En resumen, los transwells se transfirieron a un pocillo limpio y se lavaron una vez con PBS. Las células de la parte inferior del pocillo se cosecharon añadiendo tripsina al fondo del pocillo. La tripsina fue inhibida por la adición de medios de crecimiento completos y de células recogidas mediante centrifugación. A continuación, las células se resuspendieron en 25 µl de medio y 20 µl de este se usaron para obtener recuentos de células usando un instrumento de Guava.

Para estudios sobre los mecanismos potenciales del aumento mediado por hUTC en la migración de células endoteliales, se incluyeron anticuerpos neutralizantes de FGF (7 µg/ml) y HGF (1 µg/ml) en cocultivos de HUVEC y HCAEC con el lote n.º 120304 de hUTC. Los anticuerpos se añadieron al medio de cultivo celular cuando las células se sembraron en placas inicialmente. Después de 7 días de cocultivo, se cosecharon las células que estaban en la parte inferior del inserto de transwell y se contaron usando un instrumento de Guava.

Resultados

Efecto de hUTC sobre la proliferación de células endoteliales

Se utilizó un sistema de cocultivo para estudiar los efectos de hUTC sobre la proliferación de células endoteliales. Esto se realizó usando un conjunto de transwell con células endoteliales sembradas en el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos y hUTC sembradas en placas dentro de los insertos transwell. En estos experimentos se usaron dos formulaciones de medios diferentes (composición de medios detallada en Materiales y Métodos): Hayflick 80 % + EGM-2MV 20 % (H80) o Hayflick 50 % + EGM-2MV 50 % (H50). Después de 6 o 7 días de cocultivo, se retiraron los insertos de transwell, se recogieron células endoteliales mediante tripsinización y se contaron usando el instrumento de Guava.

El efecto del lote hUTC n.1 120304 sobre la proliferación de células endoteliales cultivadas en H80 en comparación con H50 se muestra en la Figura 1. La proliferación de HUVEC mantenidos en H50 fue mayor que los mantenidos en H80 (Figura 1A), mientras que HCAEC y HIAEC mostraron un crecimiento similar en estos cocultivo medios formulaciones (Figura 1B y Figura 1C). En ambas formulaciones de medios, el cocultivo de células endoteliales con

el lote # 120304 de hUTC dio lugar a aumentos significativos en el número de células después de 7 días. Todos los estudios de cocultivo posteriores de hUTC y células endoteliales se realizaron en la formulación de medio Hayflick 50% + EGM-2MV 50% (H50).

- 5 Las MSC y los fibroblastos también se probaron en cocultivos con células endoteliales para determinar si otros tipos de células tienen la capacidad de influir en la proliferación de células endoteliales. Como se muestra en la Figura 1A, no hubo diferencias en la proliferación de HUVEC en medios de cocultivo (H50 o H80) y los que fueron cocultivadas con MSC o con fibroblastos. Lo mismo ocurrió con los HCAEC (Figura 1B) y los HIAEC (Figura 1C) donde el cocultivo con el lote n.º 120304 de hUTC dio como resultado una proliferación celular aumentada mientras que no se observaron diferencias entre las células en medio de cocultivo (H50 o H80) que se cocultivaron con MSC.

15 Para investigar los mecanismos potenciales del aumento mediado por hUTC en la proliferación de células endoteliales, se incluyeron anticuerpos neutralizantes de FGF (7 µg/ml), HGF (1 µg/ml) y VEGF (1 µg/ml) en cocultivos de HUVEC y HCAEC con hUTC. Los resultados en las figuras 2A y 2B muestran que tanto en HUVEC como en HCAEC, la adición de anticuerpos neutralizantes a FGF y HGF redujo el aumento en el número de células inducido por el lote n.º 120304 de hUTC. A las concentraciones que se utilizaron para estos estudios, estos anticuerpos neutralizantes bloquearon la proliferación de HUVEC inducida por los factores de crecimiento (Figura 2A). Es interesante observar que un anticuerpo neutralizante de VEGF no tuvo un efecto significativo sobre la proliferación celular inducida por cocultivo de ambos HUVEC (Figura 2A) y HCAEC (Figura 2B) con hUTC lote n.º 20 120304. En estudios separados, la proliferación del lote n.º 120304 de hUTC no se vio afectada por la adición de anticuerpos neutralizantes a FGF y VEGF al medio de cultivo (datos no mostrados).

Efecto del lisado celular de hUTC n.º 120304 sobre la proliferación de HUVEC

- 25 También se realizaron estudios para determinar el efecto del lisado celular sobre la proliferación de HUVEC. Las HUVEC se sembraron en placas de 24 pocillos en medio EGM-2MV durante 8 h a una densidad de 5000 células/cm². A continuación, se mantuvo a las células sin suero mediante incubación durante la noche en 0,5 ml de medio EGM-2MV que contenía suero bovino fetal (FBS) al 0,5 % y sin factores de crecimiento. Después de la incubación, se añadieron concentraciones variables de lisado celular de hUTC # 120304 recién preparado. En algunos casos, también se incluyeron FGF, HGF y anticuerpos neutralizantes. Después de 4 días de cocultivo, las HUVEC se cosecharon y se contaron usando un instrumento de Guava.

35 La Figura 3 muestra que la adición de lisados celulares condujo a un aumento en el número de células HUVEC en comparación con las células mantenidas sin suero (0,5 % de FBS) y el aumento en el número de células fue proporcional a la cantidad de lisado celular añadido. La menor concentración de lisado celular utilizado (62,5 µg/ml) dio como resultado un número de células comparable a las células incubadas en condiciones óptimas de medio (10% de FBS). Además, la adición de un anticuerpo neutralizante a FGF o HGF moderó el aumento en el número de células inducido por las 2 concentraciones diferentes de lisado celular. Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos en cocultivos de HUVEC con hUTC lote n.º 120304.

40

Efecto de hUTC sobre la migración de células endoteliales

- 45 La migración de las células endoteliales se evaluó determinando el número de células que se han movido a través de una membrana transwell (tamaño de poro = 8 micrómetros). Las células respondedoras, células endoteliales, se sembraron en insertos transwell de 6 pocillos y se colocaron hUTC en el fondo del pocillo. Después de un período de cocultivo, las células que estaban en la parte inferior del transwell fueron cosechadas y contadas. La Figura 4A muestra la migración de HUVEC que fueron cocultivadas con hUTC y MSC. El lote n.º 120304 de hUTC indujo el movimiento de HUVEC a la parte inferior del transwell mientras que los MSC no lo hicieron (Figura 4A). El mismo resultado se observó con HCAEC donde cocultivo con hUTC lote # 120304 dio lugar a más células migrando a través del transwell en relación con el control de medios (Figura 4B).

50 El efecto del lote hUTC n.º 120304 sobre el comportamiento migratorio de HUVEC y HCAEC se ensayó adicionalmente con el uso de anticuerpos neutralizantes de FGF y HGF. Como se muestra en la Figura 5A, estos anticuerpos redujeron la migración de HUVEC inducida por el lote n.º 120304 de hUTC. En cocultivos de HCAEC con hUTC lote # 120304, un anticuerpo neutralizante a HGF bloqueó hUTC lote # 120304 mediada por el aumento de la migración celular mientras que un anticuerpo neutralizante a FGF no (Figura 5B).

Sumario

- 60 Los resultados descritos en el presente documento describen los efectos de los hUTC sobre el comportamiento proliferativo y migratorio de las células endoteliales *In vitro*. Los estudios se realizaron utilizando cocultivos del lote # 120304 de hUTC y células endoteliales o incubación directa de células endoteliales con lisado celular preparado a partir del lote n.º 120304 de hUTC.

- 65 Para estudios de proliferación, se probaron los efectos del lote n.º 120304 de hUTC y se usaron tres tipos de células endoteliales de diferentes lechos vasculares como células respondedoras. El cocultivo con hUTC resultó en una

proliferación mejorada de células endoteliales. El cocultivo con MSC o fibroblastos dio como resultado números de células comparables a los controles de los medios. La respuesta proliferativa de HUVEC al lote # 120304 de hUTC se amortiguó mediante la adición de anticuerpos neutralizantes a FGF y HGF, pero no por neutralización del anticuerpo contra VEGF. Esto implica que la inducción de proliferación por el lote n.º 120304 de hUTC está mediada por FGF y HGF. Vale la pena señalar que la incubación de HUVEC con lisado de lote n.º 120304 de hUTC reflejó el efecto observado con cocultivos.

La migración se cuantificó contando el número de células que estaban en la parte inferior de un transwell y tanto HUVEC y HCAEC fueron utilizados como células respondedoras. A diferencia de los estudios con proliferación, las respuestas migratorias de estas células son ligeramente diferentes. El lote n.º 120304 de hUTC indujo la migración de HUVEC y HCAEC. MSC no indujo la migración de HUVEC sugiriendo especificidad de esta respuesta a hUTC. Los anticuerpos contra FGF y HGF negaron el efecto del lote hUTC n.º 120304 sobre la migración de HUVEC mientras que sólo el anticuerpo contra HGF afectó a la migración de HCAEC sugiriendo diferencias entre los dos tipos de células endoteliales.

En resumen, los datos muestran que los hUTC inducen proliferación y migración de células endoteliales *In vitro*. El uso de anticuerpos neutralizantes implica tanto FGF como HGF en estos efectos observados. Sin embargo, también pueden estar implicados otros factores en el comportamiento proliferativo y migratorio de las células endoteliales.

La presente invención no se limita a las realizaciones descritas e ilustradas anteriormente. Se puede variar y modificar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

1. Células derivadas del posparto derivadas de tejido del cordón umbilical humano libre de sangre, para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene isquemia periférica, en el que las células:
- 5 son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo;
 tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un fenotipo de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular;
 requieren L-valina para el crecimiento;
- 10 pueden crecer en al menos aproximadamente un 5 % de oxígeno;
 tienen una expresión aumentada de interleucina 8 y de reticulón 1 en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca;
 producen CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y
 no producen CD45 y CD117.
- 15 2. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que las células se manipulan genéticamente para producir un producto génico que promueve el tratamiento de la isquemia periférica.
- 20 3. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que el tratamiento comprende administrar las células con al menos otro tipo celular.
4. Las células para el uso de la reivindicación 3, en las que el otro tipo de célula es una célula de músculo esquelético, célula progenitora de músculo esquelético, célula de músculo liso vascular, célula progenitora de músculo liso vascular, pericito, célula endotelial vascular, célula progenitora de endotelio vascular u otra célula madre multipotencial.
- 25 5. Las células para el uso de la reivindicación 3, en las que al menos otro tipo celular se administra simultáneamente con, o antes o después, las células derivadas del posparto.
- 30 6. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que el tratamiento comprende administrar las células con al menos otro agente.
7. Las células para el uso de la reivindicación 6, en las que el agente es un agente antitrombogénico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un agente proangiogénico o un agente antiapoptótico.
- 35 8. Las células para el uso de la reivindicación 6, en las que el agente se administra simultáneamente con, o antes o después, las células derivadas del posparto.
- 40 9. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que el tratamiento comprende administrar las células en los sitios de la isquemia periférica.
10. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que el tratamiento comprende administrar las células derivadas del posparto mediante inyección, infusión, un dispositivo implantado en el paciente o mediante implantación de una matriz o armazón que contiene las células.
- 45 11. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que las células ejercen un efecto trófico sobre el músculo esquelético del paciente.
- 50 12. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que las células ejercen un efecto trófico sobre el músculo liso vascular del paciente.
13. Las células para el uso de la reivindicación 12, en las que el efecto trófico es la proliferación de las células del músculo liso vascular.
- 55 14. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que las células ejercen un efecto trófico sobre el endotelio vascular del paciente.
15. Las células para el uso de la reivindicación 14, en las que el efecto trófico es la proliferación de las células del endotelio vascular.
- 60 16. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las células inducen la migración de células endoteliales vasculares, células progenitoras de endotelio vascular, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular y/o pericitos a los sitios de la isquemia periférica.
- 65 17. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene isquemia periférica, que

comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y células derivadas del posparto según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

- 5 **18.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, que comprende al menos otro tipo celular.
- 19.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 18, en las que el otro tipo de célula es una célula de músculo esquelético, célula progenitora de músculo esquelético, célula de músculo liso vascular, célula progenitora de músculo liso vascular, pericito, célula endotelial vascular, célula progenitora de endotelio vascular u otra célula madre multipotencial.
- 10 **20.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, que comprende al menos otro agente.
- 21.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 20, en las que el agente es un agente antitrombogénico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador o un agente antiapoptótico.
- 15 **22.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, formulada para administración mediante inyección o infusión.
- 23.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en la que las células están encapsuladas dentro de un dispositivo implantable.
- 20 **24.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en la que las células están encapsuladas contenidas dentro de una matriz o armazón.
- 25 **25.** Un kit para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene isquemia periférica, comprendiendo el kit un vehículo farmacéuticamente aceptable, una población de células derivadas del posparto como se define en la reivindicación 1 e instrucciones para usar el kit en un método de tratamiento del paciente.
- 30 **26.** El kit para el uso de la reivindicación 25, que comprende además al menos un reactivo e instrucciones para cultivar las células derivadas del posparto.
- 27.** El kit para el uso de la reivindicación 25, que comprende además una población de al menos otro tipo celular.
- 35 **28.** El kit para el uso de la reivindicación 25, que comprende además al menos otro agente para tratar la isquemia periférica.
- 29.** El kit para el uso de la reivindicación 25, en el que las células inducen migración de las células progenitoras del endotelio vascular a los sitios de la isquemia periférica.
- 40

45

50

55

60

65

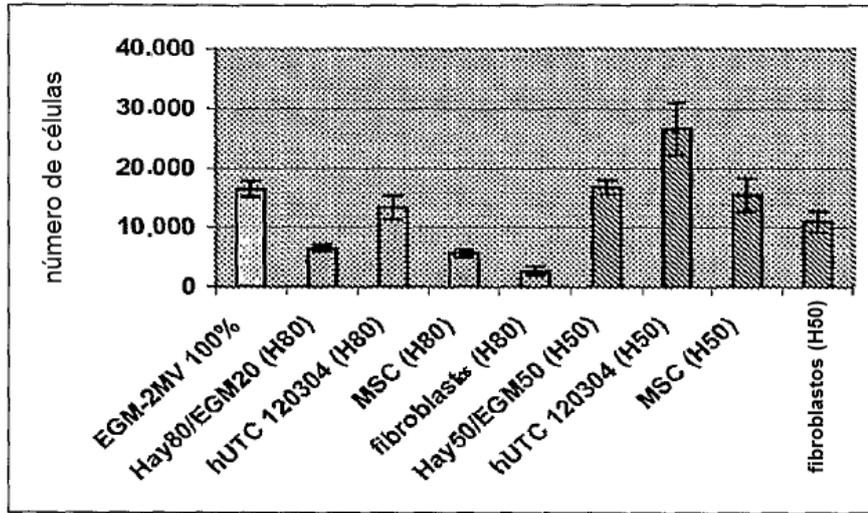


Figura 1a

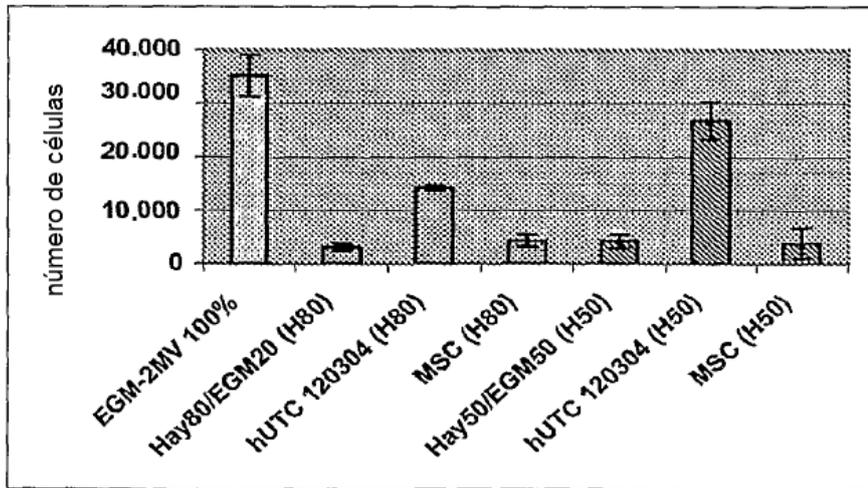


Figura 1b

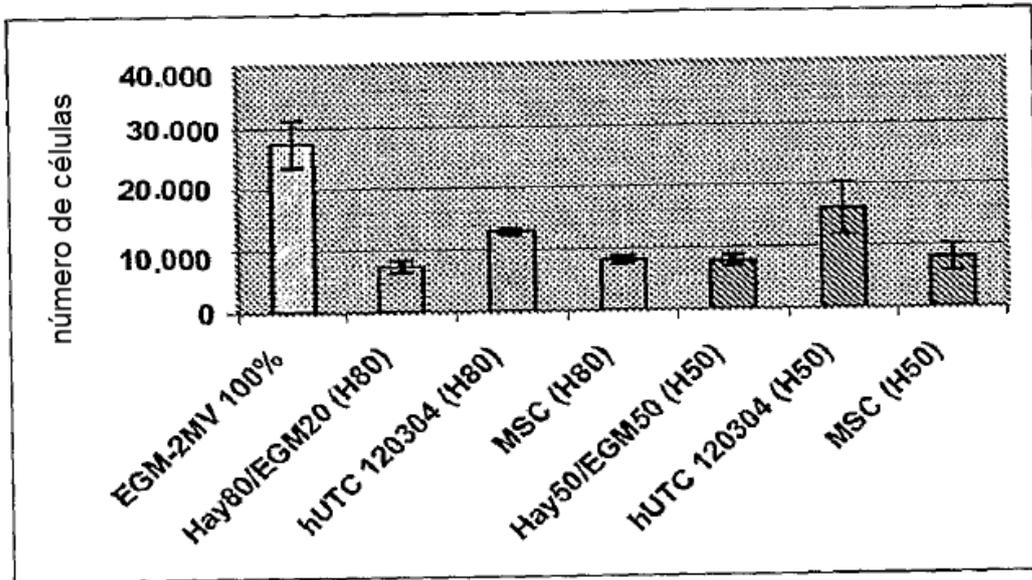


Figura 1c

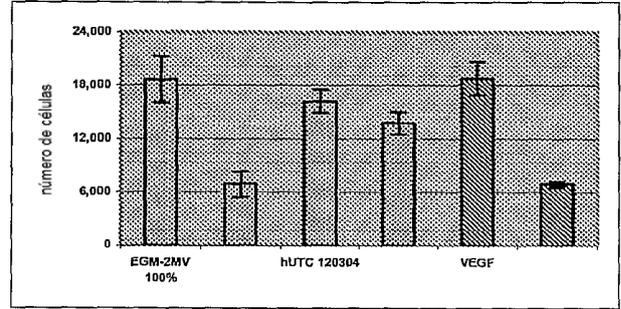
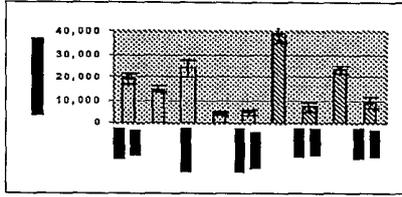


Figura 2a

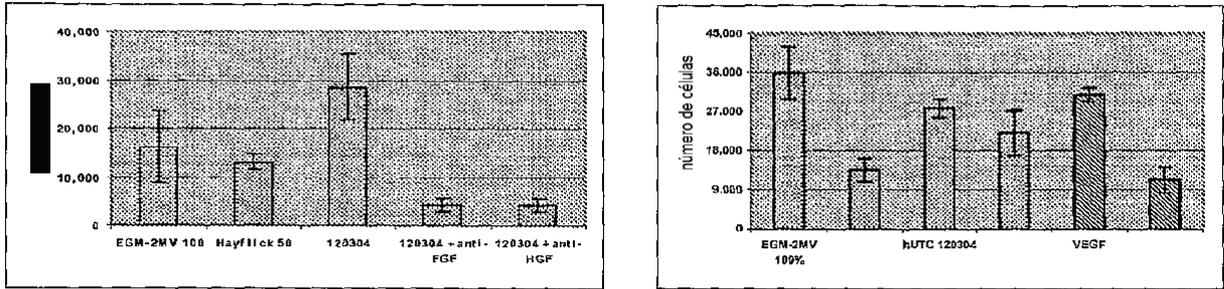


Figura 2b

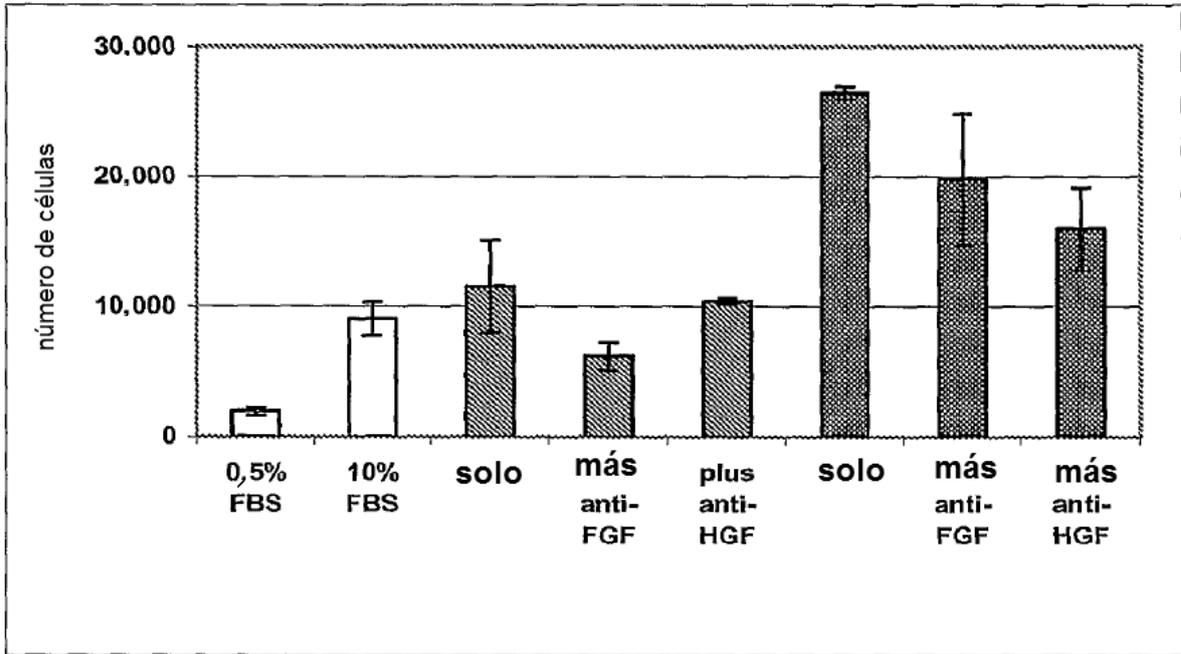


Figura 3

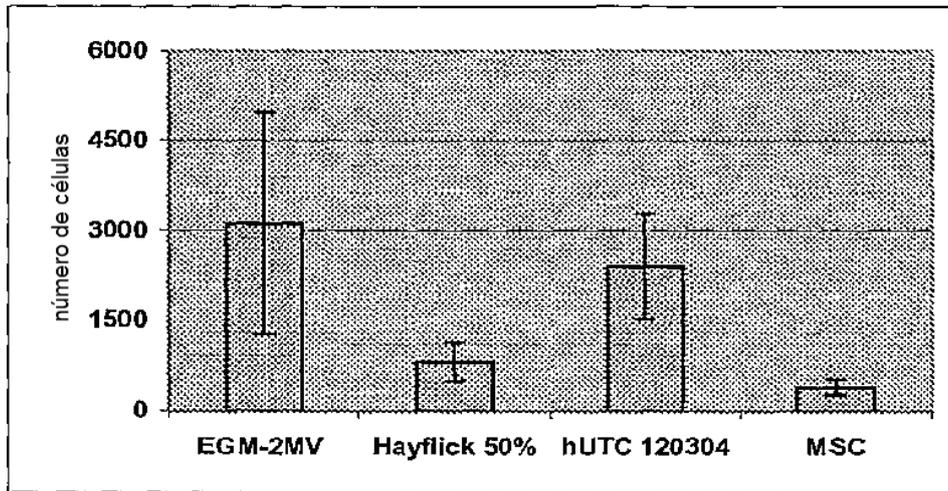


Figura 4a

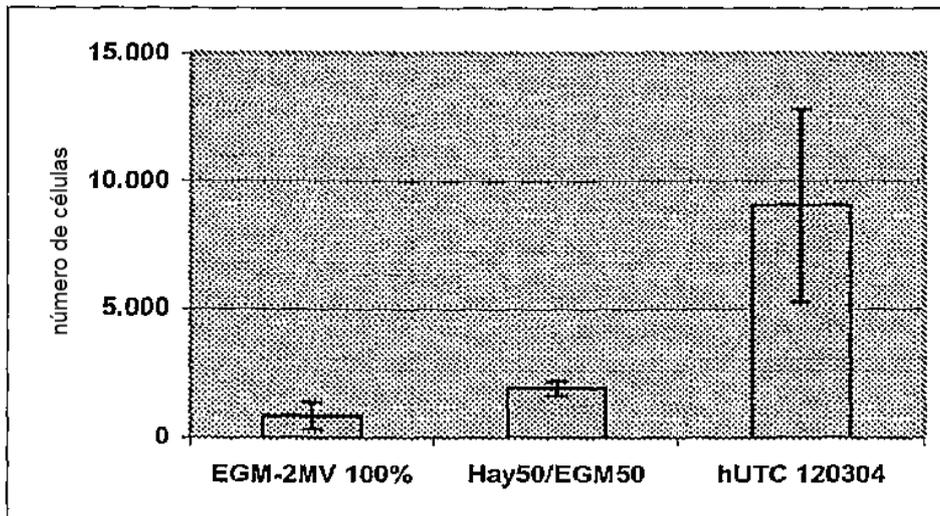


Figura 4b

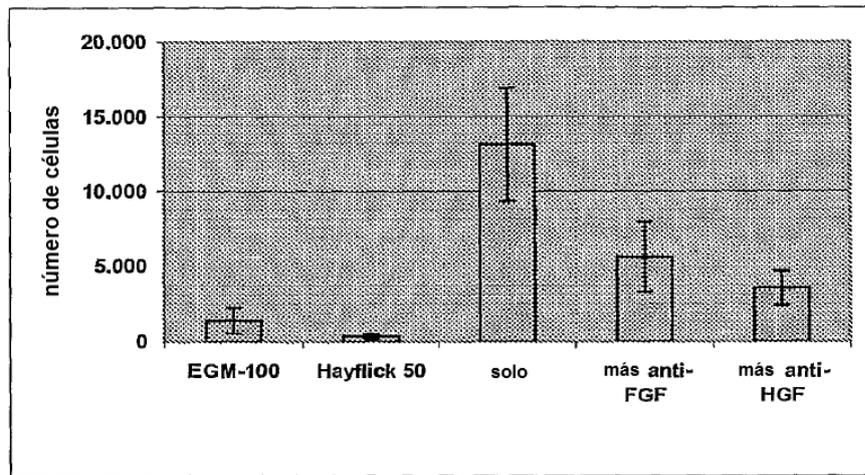


Figura 5a

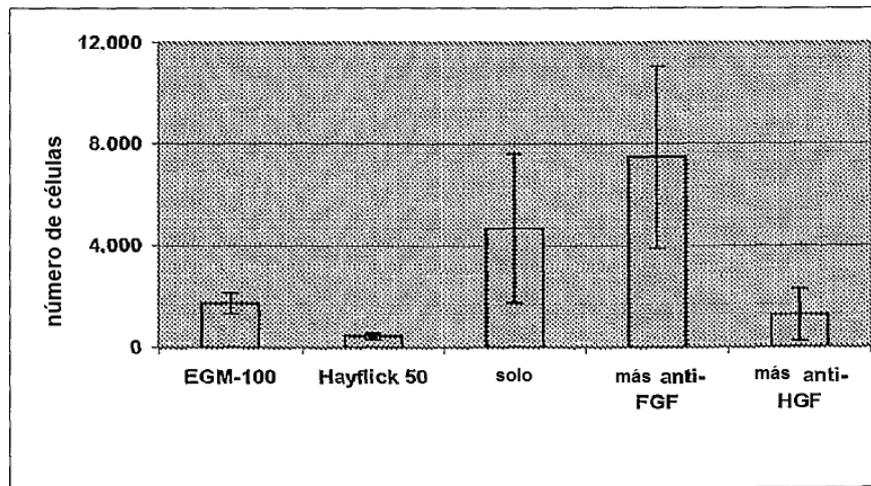


Figura 5b