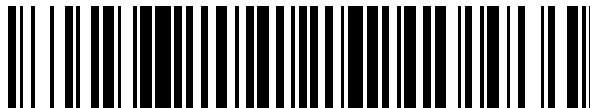


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 003**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073	(2010.01)
A61K 35/12	(2015.01)
A61K 35/50	(2015.01)
A61K 35/51	(2015.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2010 PCT/US2010/028930**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10111663**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010 E 10722837 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2411504**

54 Título: **Células de tejido de cordón umbilical humano como tratamiento para la enfermedad de alzheimer**

30 Prioridad:

26.03.2009 US 163619 P

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

07.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIHM, ANTHONY, J. y
GOSIEWSKA, ANNA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 629 003 T3

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

Células de tejido de cordón umbilical humano como tratamiento para la enfermedad de alzheimer

Descripción

5 ANTECEDENTES

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a composiciones y a kits para utilizarse en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de células. En particular, la invención proporciona composiciones y kits para utilizarse en métodos que comprenden administrar células o derivados celulares a un paciente para reducir la acumulación de proteínas de placa así como proporcionar factores de soporte para reducir la muerte de las células neuronales. La invención también proporciona composiciones y kits para utilizarse en métodos que comprenden administrar células o derivados celulares a un paciente para tratar los síntomas del Alzheimer.

15

2. Descripción de los antecedentes de la técnica

20 La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia en Norteamérica y Europa. Generalmente, la enfermedad de Alzheimer es un trastorno común y complejo caracterizado por una demencia progresiva del adulto. La enfermedad suele comenzar después de los 65 años, y el riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer aumenta con la edad. De hecho, aproximadamente el 10 por ciento de las personas mayores de 70 años tienen una pérdida significativa de la memoria y más de la mitad de estos individuos tienen Alzheimer. Se estima que la prevalencia de la demencia en personas mayores de 85 años es de aproximadamente el 25%-45%. Además, se cree que la enfermedad de Alzheimer es la cuarta causa principal de muerte en los adultos de edad avanzada.

25

30 Un número sin precedente de personas alcanzarán una edad avanzada en las próximas décadas. A menos que las industrias farmacéutica y médica desarrollen métodos eficaces para la prevención y el tratamiento, la enfermedad de Alzheimer puede alcanzar proporciones epidémicas para mediados del próximo siglo. Debido a la creciente longevidad, la aparición de la enfermedad de Alzheimer en los ancianos presenta un enorme problema médico, económico y social al que se enfrenta en la actualidad la industria del cuidado de la salud.

30

35 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad degenerativa del cerebro de la que no hay recuperación. La enfermedad ataca las células nerviosas en todas las partes de la corteza cerebral, así como algunas de las estructuras y tejidos circundantes. Por lo general, la enfermedad de Alzheimer comienza con un fallo sutil y poco reconocido de la memoria. Los síntomas tempranos de la enfermedad de Alzheimer pueden ser pasados por alto porque tales síntomas se asemejan a los signos de envejecimiento naturales. Estos síntomas incluyen la alteración de la memoria, la pérdida de concentración, la pérdida inexplicable de peso y problemas motores, incluidas ligeras dificultades para caminar. En individuos sanos, síntomas similares pueden ser el resultado de la fatiga, el dolor o la depresión, una enfermedad, la pérdida de visión o de la audición, el uso de alcohol junto con determinados medicamentos, o simplemente la incapacidad para recordar detalles complejos al mismo tiempo. Los problemas sensoriales acompañantes, tales como la pérdida auditiva y la disminución de la capacidad de lectura, así como la debilidad física general indican un corto tiempo de supervivencia. Otros síntomas incluyen confusión, escasa capacidad de juicio, alteración del lenguaje, agitación, retraimiento y alucinaciones. Algunos pacientes pueden desarrollar convulsiones, características parkinsonianas, disminución del tono muscular, mioclonía, incontinencia y mutismo. El paciente también puede presentar síntomas tales como la incapacidad para realizar tareas rutinarias, pérdida de competencias lingüísticas, incapacidad para planificar y cambios de personalidad. Con el tiempo, estos cambios se vuelven tan graves y perjudiciales que el paciente pierde toda la memoria y el funcionamiento de la mente hasta el punto de un colapso completo del sistema nervioso central (SNC) y el cese de una función circulatoria y respiratoria reguladas.

40

45

50

55 Clínicamente, la enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neuropatológica. Los signos clínicos reconocidos incluyen atrofia cortical cerebral y demencia progresiva, que pueden establecerse mediante estudios de neuroimágenes. Además, los hallazgos neuropatológicos suelen incluir placas neuríticas microscópicas de A-beta amiloide, ovillos neurofibrilares intraneuronales y angiopatía amiloide. Los estudios indican que la enfermedad de Alzheimer está asociada con la atrofia cortical cerebral, hallazgos histológicos de placas de beta-amiloide y hallazgos de ovillos neurofibrilares intraneuronales dentro de las regiones corticales del cerebro.

55

60 Los ovillos neurofibrilares son fibras enredadas, que son los restos dañados de los microtúbulos, dentro de la región cortical del cerebro, que soportan la estructura que permite el flujo de nutrientes a través de las células nerviosas (neuronas). El beta amiloide es una proteína insoluble que es un fragmento de una proteína más grande (APP). La APP misma parece ser importante en la protección de los nervios. Se ha demostrado que si la enzima involucrada en el corte de la APP en fragmentos de beta amiloide no funciona, la APP forma parches pegajosos llamados placas neuríticas, que disminuyen la función neuronal y la transmisión de señales dentro del cerebro. Generalmente, tales placas neuríticas se encuentran en el exterior de las células nerviosas rodeadas de residuos de neuronas moribundas.

65

Además, los altos niveles de beta amiloide están asociados con niveles reducidos del neurotransmisor acetilcolina. Los neurotransmisores son mensajeros químicos del cerebro que transmiten diversas señales, mensajes e información neuroquímica dentro de las diversas regiones del SNC. La acetilcolina es parte del sistema colinérgico, que es esencial para la memoria y el aprendizaje, y que es destruida progresivamente en pacientes que padecen Alzheimer. Por lo tanto, se teoriza que el beta amiloide en forma de placas neuríticas provoca una disminución del neurotransmisor, acetilcolina, lo que conduce a la evolución de la enfermedad de Alzheimer.

En la actualidad, el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer se basa en el manejo de la sintomatología de la enfermedad para la evolución de la enfermedad de cada individuo. Aunque existen fármacos para tratar la enfermedad de Alzheimer, no hay cura para la enfermedad. Los tratamientos incluyen fármacos que modifican la disponibilidad de neurotransmisores en el SNC. Por ejemplo, algunos fármacos aumentan la acetilcolina en el cerebro, tales como los inhibidores de la acetilcolinesterasa, funcionan como antagonistas del receptor de la dopamina, y antagonistas no competitivos de los receptores de NMDA. Otros fármacos se utilizan para tratar la agresión y la psicosis de los pacientes con Alzheimer.

Los tratamientos disponibles actualmente tienen efectos secundarios, incluidos náuseas, diarrea, hepatotoxicidad, calambres abdominales, úlceras, sangrado gastrointestinal, hipotensión ortostática, somnolencia, mareos, disfunción sexual e insomnio. A veces, los efectos secundarios son tan graves que el médico suspende el tratamiento.

Dadas las actuales limitaciones en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, existe la necesidad de aliviar los síntomas del Alzheimer en los individuos que sea rentable, tenga un potencial mínimo de efectos secundarios y aumente positivamente la memoria, la función cognitiva y la capacidad para llevar a cabo actividades de la vida diaria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los resultados de las pruebas del laberinto acuático de Morris en todos los grupos de tratamiento durante un día en una prueba de la plataforma visible evaluada mediante la velocidad de natación.

La Figura 2 muestra las puntuaciones de la prueba acumulativa de Gallagher para todos los grupos de tratamiento de ratas tratadas con PBS o hUTC para la adquisición de la plataforma oculta a lo largo del tiempo.

La Figura 3 muestra las mediciones de latencia para todos los grupos de tratamiento de ratas tratadas con PBS o hUTC para la adquisición de la plataforma oculta a lo largo del tiempo.

La Figura 4 son las puntuaciones de la prueba acumulativa de Gallagher en la adquisición de plataforma oculta inversa para todos los grupos de tratamiento de ratas tratadas con PBS o hUTC los días 7-9.

La Figura 5 son las mediciones de latencia en la adquisición de plataforma oculta inversa para todos los grupos de tratamiento de ratas tratadas con PBS o hUTC los días 7-9.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los problemas presentados se resuelven mediante las composiciones y los kits de las formas de realización ilustrativas descritas en el presente documento. Estas formas de realización proporcionan composiciones y kits para utilizarse en métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer, o los síntomas del Alzheimer, administrando una población de células. Sin ánimo de limitarse a ningún mecanismo de acción, los inventores creen que las células o los derivados celulares administrados a un paciente de Alzheimer reducen la prevalencia de la placa, no sólo reduciendo la evolución de la placa senil, sino también aumentando la neuroprotección. Además, los inventores creen que la administración de la célula o los derivados celulares facilita la eliminación de la placa mediante un mecanismo fagocítico. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las células, incluidas las células madre y/o las células de origen posnatal procedentes de tejido placentario o de cordón umbilical humano ("hUTC"), pueden administrarse localmente o por vía sistémica a un paciente con Alzheimer. En particular, la presente invención se refiere a la administración de hUTC o derivados de hUTC a pacientes con Alzheimer.

La invención proporciona una composición para utilizarse en la reducción de la formación de placas o la disminución de las placas en un paciente con Alzheimer, que comprende una población homogénea de células aisladas procedentes de tejido de cordón umbilical humano, en la que las células pueden obtenerse a partir de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente exento de sangre, son capaces de autorrenovarse y proliferar en cultivo, tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales durante los pasajes, y en la que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C y no producen CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 ni HLA-DR,DP,DQ.

La invención proporciona adicionalmente un kit para utilizarse en la reducción de la formación de placas o la disminución de las placas en un paciente con Alzheimer, que comprende una población homogénea de células

aisladas procedentes de tejido de cordón umbilical y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que las células pueden obtenerse a partir de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente exento de sangre, son capaces de autorrenovarse y proliferar en cultivo, tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales durante los pases, y en el que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C y no producen CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 ni HLA-DR,DP,DQ.

Las formas de realización específicas de la invención se refieren a composiciones o kits para utilizarse en el tratamiento de los signos/síntomas del Alzheimer, incluidos la alteración de la memoria, pérdida de concentración, pérdida inexplicable de peso y problemas motores, dificultades para caminar, pérdida de la audición, deterioro de la capacidad lingüística o de lectura, confusión, escasa capacidad de juicio, agitación, retraimiento, alucinaciones, convulsiones, características parkinsonianas, disminución del tono muscular, mioclonía, incontinencia, mutismo, incapacidad para realizar tareas rutinarias, incapacidad para planificar y cambios de personalidad.

En una forma de realización, la divulgación se refiere a un método para tratar a un sujeto con Alzheimer administrando una población de células en una cantidad eficaz, de manera que se trate la enfermedad de Alzheimer. En otra forma de realización, las células administradas son células de origen posnatal. En algunas formas de realización, las células de origen posnatal proceden de la placenta humana y, en otras formas de realización, las células de origen posnatal proceden del tejido de cordón umbilical. En otra forma de realización, las células administradas son células madre. En una forma de realización, las células son hUTC.

En otra forma de realización, la divulgación se refiere a un método para tratar a un sujeto con signos y/o síntomas de Alzheimer administrando una población de células en una cantidad eficaz, de manera que se traten los signos y/o síntomas del Alzheimer. En otra forma de realización, las células administradas son células de origen posnatal. En algunas formas de realización, las células de origen posnatal proceden de la placenta humana, y en otras formas de realización las células de origen posnatal proceden del tejido de cordón umbilical. En otra forma de realización, las células administradas son células madre. En una forma de realización, las células son hUTC.

En algunas formas de realización, la población de células se administra en una sola inyección. En otras formas de realización, la población de células se administra en más de una inyección. En una forma de realización, las células se administran al SNC a través de líquido cefalorraquídeo (LCR). En otra forma de realización, las células se administran localmente al SNC en la zona de formación de las placas. En otra forma de realización, las células se administran localmente a una región del cerebro implicada en la memoria y el aprendizaje, incluidas pero no limitadas a, la amígdala, el cuerpo estriado, cuerpos mamilares tales como el hipocampo y el diencéfalo, la corteza temporal, el tálamo, el hipotálamo, la corteza periférica y el neocórtex.

El sitio de administración puede ser cualquiera que el profesional sanitario determine como el más eficaz, y por lo tanto puede estar en, cerca de o lejos del sitio de formación de las placas.

La administración de las células puede ser mediante cualquier medio, incluido pero no limitado a, en el LCR, en el tejido cerebral, y similares. El suministro también puede tener lugar mediante jeringas con agujas y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo. El suministro puede incluir el uso de vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, colágeno, colágeno reticulado, ácido hialurónico, sistemas basados en polímeros sintéticos, líquidos, hidrogeles o andamiajes. Además, algunas formas de realización incluyen el uso de uno o más factores de crecimiento inyectados en paralelo, secuencialmente o formulados directamente en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En algunas formas de realización, la población de células se administra con al menos otro agente, incluido pero no limitado a, componentes de la matriz extracelular seleccionados, microtransportadores, sistemas de micropartículas que incluyen agentes antiapoptóticos, compuestos antiinflamatorios, agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, antioxidantes, y otros factores para mejorar la supervivencia celular, la proliferación y otras funciones celulares. En una forma de realización, la composición comprende adicionalmente al menos uno de los agentes o factores seleccionados del grupo que consiste en factores neurotróficos.

En algunas formas de realización, las células se tratan previamente con estimulación eléctrica antes de la administración.

En otras formas de realización, las células se modifican para que expresen uno o más genes que mejoran la supervivencia de las células neurales, la diferenciación o la actividad fagocítica de las células.

En todas las formas de realización, los derivados celulares tales como el lisado o los medios acondicionados, pueden coadministrarse con, o administrarse en lugar de, la presente población de células.

Otras formas de realización de la invención presentan composiciones y kits para utilizarse en el tratamiento de un paciente con Alzheimer, que comprenden al menos una población de células y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otras formas de realización de las composiciones y el kit pueden incluir otros agentes, factores de crecimiento y compuestos tales como agentes antiapoptóticos, compuestos antiinflamatorios, agentes

inmunosupresores o inmunomoduladores, antioxidantes y otros factores para mejorar la supervivencia celular, la proliferación y otras funciones celulares. Las composiciones farmacéuticas y los kits están diseñados y/o formulados para poner en práctica los métodos de la invención como se ha esbozado anteriormente y como se esboza más adelante.

5 Otros objetos, características y ventajas de las formas de realización ilustrativas resultarán evidentes con respecto a los dibujos y a la descripción detallada que a continuación sigue.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

10 En la siguiente descripción detallada de las formas de realización ilustrativas, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma. Estas formas de realización se describen con suficiente detalle para permitir que los expertos en la materia pongan en práctica la invención, y se entiende que pueden utilizarse otras formas de realización y que pueden realizarse cambios estructurales, mecánicos, eléctricos y químicos lógicos sin alejarse del espíritu o alcance de la invención. Para evitar detalles innecesarios para permitir a los expertos en la materia que pongan en práctica las formas de realización descritas en el presente documento, la descripción puede omitir determinada información conocida por los expertos en la materia. Por lo tanto, la siguiente descripción detallada no debe tomarse en un sentido limitativo, y el alcance de las formas de realización ilustrativas está definido únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

20 A fin de esclarecer mejor la invención, se proporcionan las siguientes definiciones.

25 Las expresiones "sitio de la placa", "placa neurítica", "lesión neural" y "sitio del daño neural" tal como se utilizan en el presente documento son intercambiables y se refieren en general a una zona del sistema nervioso central sobre la que se han acumulado las placas de amiloide o adyacente al tejido neural de un individuo, y pueden incluir pero sin limitarse al tejido conectivo y tejido vascular. Las expresiones pueden referirse adicionalmente a zonas de cualquier tejido que no están necesariamente dañadas o defectuosas, sino que son zonas en las que se desea reducir el crecimiento de placas. Las expresiones también pueden referirse a tejido nervioso que, aunque no presente formación de placas aparente, las observaciones clínicas, investigaciones previas o actuales del paciente individual indiquen la presencia de una anomalía en la función del tejido neural, observada por alteraciones de la memoria, del aprendizaje, de la función motora, de la función audiovisual, de la función lingüística, y similares.

30 Los términos "individuo", "paciente" o "sujeto", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren en general a cualquier forma de animal, incluidos los mamíferos, tales como seres humanos y monos, que son tratados con las composiciones farmacéuticas o terapéuticas o de acuerdo con los métodos descritos. El término "xenogénico" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la administración de células de un donante de una especie a un sujeto de una especie diferente.

40 Los términos "tratar" o "tratamiento" tal como se utilizan en el presente documento, se refieren en general a la mejoría o la reducción de cualquier síntoma de la enfermedad de Alzheimer, la reducción de la formación de placas y la disminución de las placas, durante un período de tiempo después de la administración de una población de células en un sujeto que padece la enfermedad de Alzheimer. La mejoría o la reducción también incluye cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como la supresión, remisión o disminución de los síntomas o hacer que la enfermedad de Alzheimer sea más tolerable para el paciente, ralentizando la velocidad de degeneración o deterioro, haciendo que el punto final de la degeneración sea menos debilitante, mejorando el bienestar físico o mental de un sujeto, o prolongando la duración de la supervivencia. El tratamiento o la mejoría de los síntomas pueden basarse en parámetros objetivos o subjetivos, incluidos los resultados de un examen físico o neurológico

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

55 La expresión "cantidad eficaz" tal como se utiliza en el presente documento se refiere en general a una concentración o cantidad de un compuesto, material o composición, tal como se describe en el presente documento, que es eficaz para conseguir un resultado biológico concreto. Tales resultados incluyen, pero no se limitan a, la mejora y/o disminución de los síntomas del Alzheimer para un paciente. Tal actividad eficaz puede conseguirse, por ejemplo, administrando las células y/o las composiciones de la presente invención a pacientes con Alzheimer. Con respecto a la población de células administrada a un paciente, una cantidad eficaz puede oscilar entre 300.000 y 2 millones de células/kg de administración local y 0,16 millones de células/kg - 10 millones de células/kg cuando se suministran por vía sistémica. Se entenderá que el número de células administradas variará en función de las características específicas de la zona de tratamiento, incluidas pero no limitadas al tamaño o al volumen/superficie total a tratar, y la proximidad del sitio de administración a la ubicación de la zona a tratar, el método de suministro, es decir, tal como el suministro al LCR frente al tratamiento intraneural, y similares.

65 La expresión "célula madre", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a células indiferenciadas definidas por la capacidad de una sola célula para autorrenovarse y para diferenciarse para producir

5 células descendientes, incluidas progenitoras autorrenovantes, progenitoras no renovantes y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* a células funcionales de diversos linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después de la administración, y para contribuir sustancialmente a la mayoría de, si no, a todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos. Las células madre pueden provenir de cualquier fuente, incluidas pero no limitadas a, fuentes fetales, tejidos posparto tales como el cordón umbilical y la placenta, y células adiposas. Las células madre pueden clasificarse según su potencial de desarrollo como totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes. Las células madre también pueden clasificarse en función de la fuente de la que se obtienen, e incluyen células madre adultas, células madre fetales y células madre posnatales.

15 La expresión "tejido fetal" se refiere a tejido procedente del feto, que en los seres humanos se refiere al período desde aproximadamente las seis semanas de desarrollo hasta el parto y "tejido extraembrionario" se refiere a tejido asociado con el embrión o el feto, pero no procedente de los mismos. Los tejidos extraembrionarios incluyen las membranas extraembrionarias (corión, amnios, saco vitelino y alantoides), el cordón umbilical y la placenta (que se forma a partir del corion y de la decidua basal de la madre).

20 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula neural" incluye las células nerviosas (es decir, neuronas, por ejemplo, neuronas uni, bi o multipolares) y sus precursoras y las células gliales (por ejemplo, macroglía tales como oligodendrocitos, células de Schwann y astrocitos, o microglía) y sus precursoras.

25 La expresión "célula progenitora", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a una célula con la capacidad para crear descendencia que está más diferenciada que ella, y aun así conserva la capacidad para reponer la reserva de progenitoras. Según esa definición, las propias células madre también son células progenitoras, ya que son las precursoras más inmediatas de las células terminalmente diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, tal como se describe con mayor detalle más adelante, puede utilizarse esta definición amplia de "células progenitoras". En un sentido más restringido, una célula progenitora se define con frecuencia como una célula que es una intermediaria en la vía de diferenciación, es decir, surge de una célula madre y es una intermediaria en la producción de un tipo de célula o subconjunto de tipos de células maduro. Este tipo de célula progenitora generalmente no es capaz de autorrenovarse. Por consiguiente, si se hace referencia a este tipo de célula en el presente documento, se la denominará "célula progenitora no renovante" o "célula precursora o progenitora intermedia".

35 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "diferenciación" se refiere generalmente al proceso por 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 aquella 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 el que, en circunstancias normales, seguirá diferenciándose a un tipo de célula o subconjunto de tipos de células específico y no podrá, en circunstancias normales, diferenciarse a un tipo de célula diferente o revertir a un tipo de célula menos diferenciado. Desdiferenciación se refiere al proceso por el cual una célula revierte 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 procede y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula sitúa a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

50 Las células utilizadas en la presente invención son células procedentes de tejido de cordón umbilical humano. Las células de la divulgación pueden incluir lo que se denomina "células posnatales" o "células de origen posnatal". Estas células pueden ser células de origen umbilical o células de origen placentario. Además, las células pueden describirse como células madre o progenitoras, empleándose esta última expresión en sentido amplio. Las expresiones "procedente de" o "de origen" se utilizan 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 hacer proliferar la población y/o producir una estirpe celular). Las manipulaciones *in vitro* de las células madre umbilicales y las características únicas de las células de origen umbilical de la presente invención se describen detalladamente más adelante. Además, "hUTC", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a células humanas de origen umbilical, y es lo mismo que células procedentes de tejido umbilical humano.

60 Una "población" o "población de células" se refiere en general a dos o más células. Puede obtenerse una población de células a partir de la misma fuente o de fuentes diferentes, por ejemplo, el mismo donante o varios donantes diferentes. Además, las células de una población no son necesariamente del mismo tipo celular. Una población de células puede incluir una mezcla de, por ejemplo, células de origen umbilical y células de origen placentario.

65 El término "aislada" tal como se utiliza en el presente documento se refiere en general a una célula que ha sido separada de su entorno natural. Este término incluye la separación física total de su entorno natural, por

ejemplo, la extracción a partir del animal donante. En formas de realización preferentes, una célula aislada no está presente en un tejido, es decir, la célula está separada o disociada de las células vecinas con las que está normalmente en contacto. Preferentemente, las células se administran como una suspensión de células. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "suspensión de células" incluye células que han sido disociadas, por ejemplo, sometiendo un trozo de tejido a trituración suave, que están en contacto con un medio.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "medio de crecimiento" se refiere en general a un medio suficiente para el cultivo de células de origen posnatal. En particular, un medio para el cultivo de las células de la invención comprende medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM). Resulta especialmente preferente el DMEM con bajo contenido de glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DMEM-LG se complementa preferentemente con suero, lo más preferentemente suero fetal bovino o suero humano. Por lo general, se añade suero fetal bovino al 15% (v/v) (por ejemplo, suero fetal bovino definido, Hyclone, Logan UT), junto con antibióticos/antimicóticos (preferentemente 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 miligramos/mililitro de estreptomina y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B, invitrogen, Carlsbad, CA), y 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis MO). En algunos casos se utilizan diferentes medios de crecimiento, o se proporcionan complementos diferentes, y éstos normalmente se indican en el texto como complementos del medio de crecimiento. En determinados medios definidos químicamente, las células pueden cultivarse sin que haya suero presente en absoluto. En tales casos, las células pueden necesitar determinados factores de crecimiento, que pueden añadirse al medio para mantener y sustentar las células. Los factores actualmente preferentes a añadir para el cultivo en medios sin suero incluyen uno o más de bFGF, EGF, IGF-I y PDGF. En formas de realización más preferentes, se añaden dos, tres o los cuatro factores a medios sin suero o definidos químicamente. En otras formas de realización, se añade LIF al medio sin suero para apoyar o mejorar el desarrollo de las células.

Un "derivado celular" se refiere a un medio acondicionado o lisado celular.

Un "medio acondicionado" es un medio en el que se ha cultivado, y a continuación eliminado, una célula o población de células específica. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado.

La expresión "cultivo celular primario" es un cultivo de células, tejidos u órganos extraídos directamente de un organismo u organismos antes del primer subcultivo.

La expresión "estirpe celular" se refiere en general a una población de células formadas por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se conoce como pase. Cuando las células se subcultivan, se dice que se les ha "sometido a pases". Una población específica de células, o una estirpe celular, a veces se denomina o se caracteriza por el número de veces que ha sido sometida a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que ha sido sometida 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 indica como 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 la población durante el periodo de pases; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo puede ser mayor que el número de pase. La proliferación de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el período entre pases depende de muchos factores, incluidos pero no limitados a la densidad de siembra, el sustrato, el medio, las condiciones de crecimiento y el tiempo entre pases.

Las expresiones "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "medio farmacéuticamente aceptable", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren en general a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que no sólo son compatibles con las células y otros agentes a administrar terapéuticamente, sino que también son adecuados, dentro del alcance del criterio médico, para utilizarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

Tal como se describe con mayor detalle en el presente documento, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para utilizarse en la presente invención incluyen líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y materiales sólidos (por ejemplo, matrices y andamiajes de células, láminas tubulares y otros materiales similares como se conoce en la técnica y como se describe con mayor detalle en el presente documento). Estos materiales semisólidos y sólidos pueden estar diseñados para resistir la degradación dentro del cuerpo (no biodegradables) o pueden estar diseñados para degradarse dentro del cuerpo (biodegradables, bioerosionables). Un material biodegradable puede además ser biorreabsorbible o bioabsorbible, es decir, puede disolverse y absorberse en los fluidos corporales (los implantes hidrosolubles son un ejemplo), o degradarse y finalmente eliminarse del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o por descomposición y eliminación a través de las vías naturales. La velocidad de biodegradación puede variar según la velocidad de liberación deseada una vez implantado en el cuerpo.

El término "matriz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a una mezcla de materiales biodegradables y/o biorreabsorbibles que se administran con las células a un paciente. En una forma de realización, la matriz proporciona una liberación sostenida de factores neurotróficos u otros agentes utilizados junto con las células y puede proporcionar una estructura para desarrollar el crecimiento de tejido en el paciente. En otras formas de realización, la matriz proporciona simplemente un andamiaje temporal para el tejido en desarrollo. La matriz puede estar en forma de partículas (macropartículas superiores a 10 micras de diámetro o micropartículas inferiores a 10 micras de diámetro), o puede estar en forma de implante tridimensional estructuralmente estable (por ejemplo, un andamiaje). La matriz puede ser una suspensión o un hidrogel, o como alternativa, puede ser una estructura tridimensional.

El término "andamiaje", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a una estructura porosa tridimensional que proporciona una plantilla para el desarrollo celular. Un andamiaje está hecho de materiales biodegradables y/o biorreabsorbibles que se degradan con el tiempo dentro del cuerpo. El período de tiempo que tarda el andamiaje en degradarse puede estar en función del peso molecular de los materiales. Por lo tanto, un material de mayor peso molecular puede dar como resultado un andamiaje polimérico que conserva su integridad estructural durante períodos más largos de tiempo; mientras que menores pesos moleculares dan como resultado una liberación más lenta y vidas de los andamiajes más cortas. El andamiaje puede hacerse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Los ejemplos de polímeros que pueden utilizarse para formar el andamiaje incluyen polímeros naturales y sintéticos. En algunas formas de realización de la invención, el andamiaje puede estar impregnado con, recubierto con, o compuesto por una población de células, factores de crecimiento, u otros nutrientes para estimular el desarrollo celular. En algunas formas de realización preferentes, el andamiaje contiene agentes inductores del crecimiento, incluidas las neurotrofinas. Además, los agentes inductores del crecimiento pueden ser sintéticos o producidos naturalmente, y pueden ser un fragmento, derivado o análogo de un agente inductor del crecimiento.

"Factor neurotrófico" o "factor trófico" se define como una sustancia que promueve la supervivencia, el desarrollo, la proliferación y/o la maduración de una célula, o estimula el aumento de actividad de una célula.

FORMAS DE REALIZACIÓN ESPECÍFICAS

La invención proporciona una composición para utilizarse en la reducción de la formación de placas o la disminución de las placas en un paciente con Alzheimer, que comprende una población homogénea de células aisladas procedentes de tejido de cordón umbilical humano, en la que las células pueden obtenerse de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente exento de sangre, son capaces de autorrenovarse y proliferar en cultivo, tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales durante los pases, y en la que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C y no producen CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 ni HLA-DR,DP,DQ.

La invención proporciona adicionalmente un kit para utilizarse en la reducción de la formación de placas o la disminución de las placas en un paciente con Alzheimer, que comprende una población homogénea de células aisladas procedentes de tejido de cordón umbilical y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que las células pueden obtenerse de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente exento de sangre, son capaces de autorrenovarse y proliferar en cultivo, tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales durante los pases, y en que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C y no producen CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 ni HLA-DR,DP,DQ.

Para todas las formas de realización de la divulgación, se administra a un individuo con diagnóstico de Alzheimer, o que presentan síntomas de Alzheimer, una población de células en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de Alzheimer, o sus síntomas. Las formas de realización específicas de la divulgación se refieren a la administración local de una población de células para facilitar la eliminación de la placa mediante mecanismos fagocíticos y/o mecanismos endógenos activos para reducir la evolución de la formación de placas, y estimular y apoyar el crecimiento y/o la curación del tejido neural. Las células pueden ser cualquiera de las que se analizan más adelante, incluidas células madre, células de origen posnatal, células de origen umbilical o procedentes de placenta. En una forma de realización, las células son hUTC. En la memoria descriptiva que aparece más adelante se describe una explicación más detallada de las células preferentes. Algunas formas de realización se refieren a composiciones administradas al individuo, en las que la composición incluye una población de células, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden utilizarse en kits para preparar, utilizar y poner en práctica tales métodos y composiciones farmacéuticas tal como se describe y ejemplifica en el presente documento. Los kits pueden contener adicionalmente dispositivos para facilitar la administración de la población de células, tales como, por ejemplo, agujas, tubos, micropipetas, y similares. En una forma de realización, el kit comprende al menos una población de células, un constructo, y un dispositivo de inyección. Además, en algunas formas de realización, los kits pueden también estar acoplados a dispositivos de formación de imágenes que indican la colocación exacta de las células.

En una forma de realización, la población de células se administra a un individuo con diagnóstico de Alzheimer, en la que la administración se realiza a una zona de formación de placas conocida del SNC. La

enfermedad de Alzheimer puede diagnosticarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluida la medición de beta amiloide y tau, o sus precursores, fragmentos o compuestos metabólicos en el LCR. La enfermedad de Alzheimer también puede diagnosticarse mediante la medición de isoprostanos en los fluidos del individuo, incluidos orina y sangre. Otros métodos de diagnóstico pueden incluir el uso de técnicas obtención de imágenes del cerebro, por ejemplo, la resonancia magnética (RM) para examinar la atrofia cerebral, la tomografía por emisión de positrones (TÉP) para obtener imágenes de las placas y los ovillos de la enfermedad de Alzheimer, y RM funcional (RMf) para medir los niveles de oxígeno en sangre en el hipocampo o en otras áreas de memoria y/o aprendizaje del cerebro.

El tipo exacto de células que componen la población de células administradas está en función del criterio del profesional sanitario. En una forma de realización, las células administradas son células de origen posnatal. En algunas formas de realización, las células de origen posnatal proceden de tejido placentario humano, y en otras formas de realización las células de origen posnatal proceden de tejido de cordón umbilical. En otra forma de realización, las células administradas son células madre. En una forma de realización preferente, las células son hUTC. Más adelante se hace una descripción detallada de los tipos de células adecuados para la presente invención.

La población de células puede administrarse en, cerca de o lejos de una zona del cerebro donde las placas se han acumulado en el, o adyacentes al, tejido neural de un individuo. Tales zonas del cerebro pueden incluir cualquiera implicada en la memoria y el aprendizaje, incluidas pero no limitadas a, la amígdala, el cuerpo estriado, cuerpos mamilares tales como el hipocampo y el diencefalo, la corteza temporal, el tálamo, el hipotálamo, la corteza periférica y el neocórtex. El sitio de administración exacto puede ser cualquiera que el profesional sanitario determine como el más eficaz. En otra forma de realización, la población de células se administra directamente al LCR.

La administración de células puede hacerse mediante cualquier medio que el profesional sanitario determine como el más eficaz, y puede incluir el uso de un catéter, jeringa, shunt, estent, microcatéter, bomba, implantación con un dispositivo o implantación con un andamiaje. Además, la administración de células puede ser mediante suministro intranasal, suministro intravascular, inyección intracerebral e inyección intraventricular. En una forma de realización, la población de células puede administrarse en una sola inyección. En algunas formas de realización, la población de células se administra más en más de una inyección. En otra forma de realización, se utiliza una bomba para asegurar la administración lenta y continua de la población de células.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden la población de células pueden formularse como líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, andamiajes y similares). Las composiciones líquidas se formulan para la administración por cualquier vía aceptable conocida en la técnica para conseguir suministrar la población de células a los tejidos neurales diana. Por lo general, estas incluyen la inyección o infusión, ya sea de manera difusa, o dirigida al sitio de la formación de la placa neurítica. Por ejemplo, en una forma de realización, la población de células se administra por inyección estereotáxica directa, por ejemplo, aguja. La aguja puede tener cualquier tamaño que facilite el desplazamiento de las células a través del orificio hueco. La aguja puede insertarse directamente a través de un orificio en el cráneo, a través del tejido neural del cerebro al sitio neural de interés, o, como alternativa, la aguja puede utilizarse con un dispositivo que ayude a guiar la aguja hasta el sitio de tejido, tal como, por ejemplo, un alambre guía. La aguja y el dispositivo de guía pueden montarse previamente o enviarse al facultativo cualificado, el propio facultativo cualificado puede montar el dispositivo justo antes o durante el uso.

En una forma de realización alternativa, puede utilizarse un catéter portador para suministrar la población de células, y puede insertarse en un dispositivo de inserción que facilite la introducción, por ejemplo, por inyección, de las células en los sujetos. Tales dispositivos de introducción incluyen tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y fluidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En una forma de realización, las células de la invención pueden introducirse en el sujeto en un lugar deseado utilizando una micropipeta. Las células de la invención pueden insertarse en un dispositivo de inserción de este tipo, por ejemplo, una micropipeta o jeringa, en forma de solución, por ejemplo, una suspensión de células. Además, las células de la invención pueden administrarse en un canal de guía (por ejemplo, canales de guía de poliacrilonitrilo/cloruro de polivinilo (PAN/PVC)), tales como los descritos en Bunge *et al.*, J. Neurology, 1994; 241:536.

La población de células o las composiciones y/o matrices que comprenden las células pueden suministrarse al sitio mediante un microcatéter, intracateterización o mediante una minibomba. El excipiente o vehículo puede ser cualquiera de los conocidos por ser farmacéuticamente aceptable para la administración a un paciente, en particular localmente en el sitio en el que va a inducirse la diferenciación celular.

Medios acondicionados y lisados celulares

En una forma de realización, el medio acondicionado se administra al individuo además de, o en lugar de, las células. En otra forma de realización, el lisado celular se administra al individuo además de, o en lugar de, las

células. En otra forma de realización, el medio acondicionado y el lisado celular se administran al individuo además de, o en lugar de, las células.

5 El medio acondicionado procedente de las PPDC cultivadas puede utilizarse *in vitro* e *in vivo*. El uso del medio acondicionado de PPDC u otro medio acondicionado puede permitir que los factores tróficos beneficiosos secretados por las PPDC sean utilizados alogénicamente en un paciente sin introducir células intactas que podrían desencadenar el rechazo, u otras respuestas inmunitarias adversas. El medio acondicionado se prepara cultivando las células en un medio de cultivo, a continuación, eliminando las células del medio.

10 El medio acondicionado preparado a partir de la población de células de origen posnatal puede utilizarse tal cual, concentrarse adicionalmente, por ejemplo, mediante ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica, o combinarse con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. El medio acondicionado puede utilizarse *in vitro* o *in vivo*, en solitario o combinado con células vivas autólogas o singénicas, por ejemplo. El medio acondicionado, si se introduce *in vivo*, puede introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o en un lugar alejado para proporcionar el desarrollo celular o los factores tróficos necesarios a un paciente.

20 Según formas de realización de la presente divulgación, se proporciona un proceso estable y escalable para fabricar medios acondicionados de hUTC con concentración reducida de suero. En resumen, el método incluye el cultivo de hUTC en condiciones de concentración reducida de suero. Posteriormente, las hUTC se lavan y se cultivan en medio basal sin suero. Después de aproximadamente 24 horas, se recoge el medio acondicionado, se filtra y se concentra mediante el uso de una membrana con un tamaño de poro de aproximadamente 5 kDa o de peso molecular similar.

25 Las células procedentes de tejido umbilical humano (hUTC) pueden aislarse siguiendo los métodos descritos en las publicaciones de patente estadounidenses nº 2005/0054098 y nº 2005/0058631. A continuación, las células aisladas pueden cultivarse en cultivo estático siguiendo los métodos que se describen en las publicaciones de patente estadounidenses nº 2005/0054098 y nº 2005/0058631 hasta el momento en el que se prepara el medio acondicionado.

30 El medio acondicionado puede prepararse en cualquier duplicación de la población de células. En otra forma de realización, el medio acondicionado se prepara a partir de aproximadamente la duplicación de la población 20 hasta aproximadamente la duplicación de la población 44. En otra forma de realización, el medio acondicionado se prepara en aproximadamente la duplicación de la población 30.

40 El medio acondicionado se prepara aislando primero las células de un medio de cultivo convencional en el que se cultivaban las células. A continuación, las células se siembran en cultivo estático a cualquier densidad de siembra. En una forma de realización, las células se sembraron a una densidad de aproximadamente 1.000 células por cm cuadrado a aproximadamente 10.000 células por cm cuadrado. En otra forma de realización, las células se sembraron a una densidad de aproximadamente 5.000 células por cm cuadrado.

45 Después de la siembra de células, aproximadamente a 5.000 células/cm², se priva progresivamente a las células del medio de cultivo convencional que tiene un contenido de suero bovino de aproximadamente un 15% reduciendo el contenido de suero bovino en el medio en incrementos hasta que las células se cultivan sólo en medio basal. El suero bovino puede reducirse en incrementos de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 60%. En una forma de realización, el suero bovino se reduce en incrementos de aproximadamente un 50% (es decir, suero bovino al 15%, 7,5%, 3,25% y 0% en el medio). Se deja que las células se desarrollen en cada medio con concentración reducida de suero durante aproximadamente 1 a aproximadamente 3 pases. En una forma de realización, las células se cultivan en cada medio con concentración reducida de suero durante aproximadamente 2 pases. Antes de añadir el medio con concentración reducida de suero bovino final, las células se siembran a aproximadamente 10.000 células/cm². Cuando se añade a las células el medio basal (suero bovino al 0%), las células se mantienen en el medio durante no más de 24 horas.

55 A continuación, el medio acondicionado se aísla de las células y se filtra utilizando un filtro de aproximadamente 0,22 micras o similar. El filtro puede estar esterilizado o no. A continuación, el medio acondicionado filtrado se concentra utilizando un filtro con un tamaño de poro de aproximadamente 5K o un dispositivo similar. El filtrado se desecha, mientras que el medio acondicionado concentrado retenido en el filtro se recoge.

60 En otra forma de realización, las hUTC aisladas se cultivan en cultivo en perlas microtransportadoras siguiendo los métodos que se describe en la publicación de patente estadounidense nº 2008/0166328 (véanse los Ejemplos), hasta el momento en que se prepara el medio acondicionado.

65 El medio acondicionado puede prepararse en cualquier duplicación de la población de células. En otra forma de realización, el medio acondicionado se prepara a partir de aproximadamente la duplicación de la población

20 a aproximadamente la duplicación de la población 44. En otra forma de realización, el medio acondicionado se prepara en aproximadamente la duplicación de la población 30.

Después de la siembra de células, aproximadamente a 10.000 células/cm² en cultivo en perlas microtransportadoras, se añade el medio de cultivo convencional a las células y se cultivan durante aproximadamente 2 días. Posteriormente, se elimina el medio de cultivo convencional y se reemplaza con medio basal. Como alternativa, puede privarse progresivamente al cultivo en perlas microtransportadoras del medio de cultivo convencional de manera similar al cultivo estático. Cuando se añade a las células el medio basal (suero bovino al 0%), las células se mantienen en el medio durante no más de 24 horas.

A continuación, el medio acondicionado se aísla de las células y se filtra utilizando un filtro de aproximadamente 0,22 micras o similar. El filtro puede estar esterilizado o no. A continuación, el medio acondicionado filtrado se concentra utilizando un filtro con un tamaño de poro de aproximadamente 5K o un dispositivo similar. El filtrado se desecha, mientras que el medio acondicionado concentrado retenido en el filtro se recoge.

El medio acondicionado convencional, si bien tiene un alto contenido de las proteínas del tipo celular cultivado, también tiene un alto contenido de las proteínas del suero bovino presente en el medio. El medio acondicionado preparado mediante los métodos anteriormente descritos tiene concentración de proteínas humanas. Las proteínas bovinas están presentes en una cantidad que está por debajo de los límites de detección de los métodos de caracterización convencionales, tales como SDS-PAGE y la transferencia de western. Resultan ventajosas cantidades de proteína bovina por debajo de los límites de detección en el medio acondicionado debido al subsiguiente menor riesgo de transmisión de virus y enfermedades bovinas, así como el menor riesgo de reacción xenoinmunitaria.

Los lisados celulares pueden prepararse mediante cualquier medio conocido por el facultativo. En una forma de realización, se preparan lisados de células enteras, por ejemplo, rompiendo las células sin posterior separación de las fracciones celulares. En otra forma de realización, se separa una fracción de membrana celular de una fracción soluble de las células mediante métodos rutinarios conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, o métodos similares. El uso de fracciones celulares solubles *in vivo* permite que el medio intracelular beneficioso sea utilizado en un paciente sin desencadenar el rechazo o una respuesta adversa. Los métodos de lisis de células son bien conocidos en la técnica e incluyen diversos medios de rotura por congelación-descongelación, rotura osmótica, rotura mecánica, rotura enzimática (por ejemplo, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas (por ejemplo, desoxirribonucleasa y ribonucleasa)), o rotura química (detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alcohol alquilariilpoliéter (TRITON® X-100), octilfenoxipolietoxietanol (Rohm and Haas, Filadelfia, PA), BRIJ-35, un polietoxietanol lauril éter (Atlas Chemical Co., San Diego, CA), polisorbato 20 (TWEEN 20®), un monolaurato de polietoxietanol sorbitán (Rohm and Haas), lauril éter de polietileno (Rohm and Haas), y detergentes iónicos tales como, por ejemplo, dodecil sulfato sódico, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen de 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o no ramificada), o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su medio de crecimiento y, por lo tanto, contienen factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células limpias de medio, por ejemplo, en PBS u otra solución. Si se prefiere, las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones superiores a la densidad de población original. Los lisados celulares preparados a partir de poblaciones de células de origen posnatal pueden utilizarse tal cual, concentrarse adicionalmente, por ejemplo, mediante 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 proteínas farmacéuticamente útiles. En algunas formas de realización, las membranas celulares se eliminan del lisado, por ejemplo mediante centrifugación, para producir una fracción de membrana y la fracción de sobrenadante. La fracción de membrana o el sobrenadante pueden utilizarse según los métodos de la divulgación. En algunas formas de realización, los residuos celulares se eliminan mediante tratamiento con un aclarado con un detergente suave, tal como EDTA, CHAPS o un detergente zwitteriónico. Los lisados celulares pueden utilizarse *in vitro* o *in vivo*, en solitario o, por ejemplo, con células. Los lisados celulares, si se introduce *in vivo*, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o en un lugar alejado para proporcionar, por ejemplo, los factores de crecimiento celulares necesarios a un paciente.

Las cantidades y/o relaciones de proteínas pueden ajustarse mezclando el producto de PPDC de la divulgación con células o con ECM o fracción celular de uno o más de otros tipos celulares. Además, pueden incorporarse sustancias biológicamente activas tales como proteínas, factores de crecimiento y/o fármacos, en la formulación del producto de PPDC. Los ejemplos de sustancias biológicamente activas incluyen agentes antiinflamatorios y factores de crecimiento que promueven la curación y la reparación tisular. Las células pueden coadministrarse con los productos de PPDC de la divulgación.

El proceso anteriormente descrito para preparar productos de PPDC se lleva a cabo preferentemente en condiciones estériles utilizando materiales estériles.

Agentes o compuestos administrados

Las células o los derivados celulares de la presente invención pueden incubarse y/o tratarse en cualquier etapa de su preparación para la administración con varios agentes o factores. Estos agentes o factores ayudan a promover la supervivencia, el desarrollo, la diferenciación y/o la integración de las células *in vitro* y/o en el sujeto receptor. Como alternativa, los agentes o factores ayudan a reducir la formación de placas, promover la degradación de las placas, o ayudan a tratar los síntomas del Alzheimer. Para la administración de la célula, el lisado celular y el medio acondicionado, las células pueden incubarse/tratarse con los compuestos o agentes adicionales en cualquier momento durante la disección, la digestión limitada, la disociación, la colocación en placas y/o la producción de suspensiones celulares.

La administración de agentes adicionales puede comenzar antes de la administración de las células o de los derivados celulares, puede comenzar en el momento de la administración, o puede comenzar después de la administración. La administración de agentes adicionales puede tener una duración limitada (por ejemplo, puede consistir en una única administración del agente) o puede tener duración prolongada (por ejemplo, puede darse al sujeto repetidamente durante un largo período de tiempo).

En algunas formas de realización, se administran uno o más compuestos o componentes en paralelo, secuencialmente o formulados directamente con la población de células o los derivados celulares. Los ejemplos de otros componentes que pueden administrarse incluyen, pero no se limitan a: (1) otros factores neurotróficos tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar, neurotrofina-3, neurotrofina 4/5, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, hormona liberadora de tiotropina, factor de crecimiento epidérmico, anfirregulina, factor de crecimiento de transformación, factor de crecimiento insulinoide; (2) componentes de la matriz extracelular seleccionados, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma con alto contenido de plaquetas, y fármacos (como alternativa, las células de origen posnatal pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen y produzcan factores de crecimiento); (3) agentes antiapoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimeticuerpo de EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento insulinoide (IGF)-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de la caspasa); (4) compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAP quinasa, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, pemirolast, tranilast, remicade (Centocor, Inc., Malvern, PA), sirolimus, y antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (tales como tepoxalin, tolmetina y Suprafen); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) anestésicos locales; y (7) otros factores angiogénicos, fármacos angiogénicos, o factores o fármacos mioregeneradores o mioprotectores.

En una forma de realización, tales agentes o factores se administran después de haber sido administradas en los mismos las células o los derivados celulares de la invención. En algunos casos, por ejemplo, estos agentes pueden minimizar o contrarrestar los efectos perjudiciales en las células resultado de los procedimientos utilizados para preparar las células para la administración. Por ejemplo, las células pueden experimentar traumatismo y/o hipoxia celular que conducen a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) tales como el anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales libres hidroxilo. Se sabe que los ROS influyen negativamente en la función celular, muy probablemente por influir en diversas membrana y componentes intracelulares incluidos los canales iónicos, los lípidos de membrana, mecanismos de transporte tales como el transporte de intercambio ATPasa de Na/K y Na/glutamato y enzimas citosólicas tales como la glutamina sintasa. Además, los ROS provocan la peroxidación de los lípidos de membrana y, por consiguiente, pueden reducir la supervivencia de las células en los productos administrados.

Para minimizar y/o contrarrestar los efectos adversos de estos tipos de estrés oxidativo durante la preparación para la administración, las células de la presente invención pueden incubarse y/o tratarse con antioxidantes en cualquier etapa durante la preparación. Los ejemplos de tales antioxidantes incluyen los antioxidantes enzimáticos superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa y agentes que promueven la formación de glutatión, por ejemplo, N-acetil cisteína (NAC). Otros antioxidantes incluyen lazaroides, por ejemplo, U-74389G y U-83836E, que son aminoesteroides diseñados para situarse en la membrana celular e inhibir la peroxidación lipídica al tiempo que eliminan los radicales libres. Otros ejemplos de antioxidantes que pueden añadirse a los cultivos celulares y suspensiones celulares incluyen TGF, vitamina E, vitamina C, betacaroteno, y otros compuestos que eliminan los ROS, inhiben la producción de ROS y/o inhiben la peroxidación lipídica.

Las enzimas antioxidantes, tales como SOD, eliminan los ROS y evitan la reacción del superóxido con el óxido nítrico para formar el anión peroxinitrito, que ha demostrado ser tóxico para las células cultivadas. Estas enzimas pueden incubarse con las células de la invención como se ha descrito anteriormente. Otro método de introducción de estas enzimas en las preparaciones celulares de la presente invención es modificar genéticamente las células para que contengan el ácido nucleico que codifica tales enzimas. A continuación, las células genéticamente modificadas pueden producir agentes que mejoran la supervivencia, el desarrollo y la diferenciación de las células injertadas en el sujeto receptor. Por ejemplo, las células de la invención pueden transfectarse con el gen humano de la Cu/Zn superóxido dismutasa, una enzima fundamental en la desintoxicación de los radicales libres del oxígeno, lo que da como resultado que las células transfectadas expresen SOD y, por consiguiente, detoxifiquen

de manera eficaz los ROS generados durante la preparación e implantación del tejido para aumentar así la supervivencia de las células administradas.

Además, puede modificarse el entorno oxidativo de las células *in vitro* para inhibir el estrés oxidativo celular. Por ejemplo, antes de la administración, puede disminuirse la presión parcial de oxígeno en el ambiente celular desde la presión parcial de oxígeno normal, es decir, aproximadamente 150 Torr de O₂, hasta una presión parcial de oxígeno reducida, es decir, 38 Torr de O₂ (aproximadamente un 5% de O₂). Este método de disminución del estrés oxidativo puede combinarse con el tratamiento de las células con uno o más de los antioxidantes anteriormente descritos.

Pueden añadirse inhibidores de NOS, tales como gangliósidos, FK506 y ciclosporina A, a las preparaciones de células para inhibir la producción de NO, disminuyendo así la producción de peroxinitrito y sus derivados. La superóxido dismutasa es otro agente que puede disminuir los efectos adversos de la sobreproducción de NO y los efectos tóxicos en los que interviene.

Para evitar el traumatismo y sus efectos adversos asociados, por ejemplo, la peroxidación de la membrana, el daño celular inducido por radicales libres producidos por la preparación de las células de la invención para la implantación, las células de la invención pueden transfectarse con ácidos nucleicos que codifican productos génicos antiapoptóticos tales como el producto del gen bcl-2 y/o crmA. Además, las células transfectadas de la invención pueden tratarse con agentes que regulan por aumento la expresión o la función de estos productos génicos, por ejemplo, TGF1 y TGF3 que regulan por aumento la expresión de bcl-2, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Además, las células de la invención también pueden transfectarse con el ácido nucleico que codifica estos factores.

Para promover adicionalmente la supervivencia de las células de la invención en el sujeto receptor, las células pueden administrarse junto con un agente angiogénico o transfectarse con el ácido nucleico que codifica un agente angiogénico. Después de la administración, el agente angiogénico promueve la penetración de vasos sanguíneos en la población de células. Como resultado de esta penetración de vasos, las células administradas obtienen suficientes nutrientes para proliferar y sobrevivir dentro del sujeto receptor. Muchos factores de crecimiento presentan actividad angiogénica. Por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), PDGF, el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y K-FGF poseen actividad angiogénica y puede utilizarse en las composiciones o los kits para el uso de la invención para fomentar la penetración de vasos sanguíneos en las células de la invención administradas.

Otros factores, tales como los factores neurotróficos, que contribuyen al desarrollo neural, la formación de fibras nerviosas y el mantenimiento de las neuronas pueden añadirse a las células de la invención *in vitro* durante la preparación para la administración y/o a la propia suspensión de células para su introducción en el individuo junto con las células de la invención. Las células de la invención también pueden modificarse genéticamente para que produzcan tales factores neurotróficos, como se describe en el presente documento. El factor neurotrófico que se añade a las células de la presente invención puede seleccionarse basándose en la presencia de sus receptores en las células que van a administrarse. Por ejemplo, las células mesencefálicas poseen receptores para los siguientes factores neurotróficos: factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF), que promueve la supervivencia de, la diferenciación morfológica de, y la captación de dopamina de alta afinidad en las células mesencefálicas; factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor neurotrófico ciliar (CNTF), que previene la axotomía inducida por la degeneración de las células mesencefálicas; midkina, que promueve la supervivencia y diferenciación de las células mesencefálicas; EGF, que aumenta la supervivencia y maduración de las células mesencefálicas; factor de crecimiento insulinoide I y II e insulina; FGF ácido; FGF básico, que inducen un aumento significativo del número de células con axones, así como del grado de su red de fibras; neurotrofina-3 (NT-3) y neurotrofina 4/5 (NT-4/5); y factor de crecimiento de transformación 2 (TGF2) y factor de crecimiento de transformación 3 (TGF3).

Los factores neurotróficos que promueven la supervivencia de las células neurales pueden seleccionarse basándose en la presencia de receptores en las células. Pueden encontrarse receptores para FGF básico, BDNF, NT-3 y NT-4/5 en determinadas células neurales. Por lo tanto, en una forma de realización, las células de la invención pueden transfectarse con los ácidos nucleicos que codifican uno o más de estos factores. En otra forma de realización, pueden añadirse uno o más de estos factores a la preparación de células neurales antes de la administración. Estos factores neurotróficos mejoran la supervivencia de las células de la invención en el sujeto receptor. Del mismo modo, los factores neurotróficos que presentan especificidad para las células corticales y, por consiguiente, que pueden utilizarse para promover la supervivencia de tales células tras su injerto en un sujeto receptor, incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF), que previene, por ejemplo, la atrofia de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo axotomizado; BDNF, y NT-3 y NT-4/5.

En otra forma de realización, los factores neurotróficos descritos en el presente documento pueden utilizarse juntos o en combinación con otros compuestos, tales como neurotransmisores, para aumentar sus efectos neurotróficos. Además, se contempla que diversas combinaciones de factores neurotróficos descritos en el presente documento puedan actuar sinérgicamente y, por lo tanto, puedan utilizarse juntos para promover la supervivencia de las células de la invención administradas.

Determinados fármacos también poseen actividad neurotrófica. Los ejemplos de tales fármacos incluyen FK506 y ciclosporina A que bloquean la neurotoxicidad provocada por el glutamato que actúa en los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), por ejemplo, aumentando los niveles fosforilados de NOS. Como la NOS fosforilada inhibe su actividad catalítica, estos fármacos reducen de manera eficaz la formación de NO y previenen los efectos neurotóxicos de la NMDA en estas células. Otros fármacos que poseen actividad neurotrófica y que pueden utilizarse en la presente invención son aquellas moléculas pequeñas que se unen a las mismas proteínas de unión que FK506 y/o ciclosporina A y, por lo tanto, intervienen en efectos neuroprotectores similares. En una forma de realización, estos fármacos se administran al sujeto además de la población de células para tratar la espasticidad y/o el dolor crónico.

En una forma de realización, pueden utilizarse combinaciones de uno o más de los factores y agentes anteriormente descritos para promover la supervivencia de las células de la invención antes de o después de administrar las células en los sujetos receptores. Por ejemplo, las células de la presente invención pueden ponerse en contacto con uno o más de los agentes o factores descritos en el presente documento para promover la supervivencia de las células *in vitro* y/o *in vivo*. En otra forma de realización, las células de la invención pueden transfectarse con el ácido nucleico de uno o más de los agentes o factores descritos en el presente documento y también ponerse en contacto con uno o más de los agentes o factores descritos en el presente documento. Además, aunque muchos de los factores neurotróficos descritos en el presente documento son específicos de un tipo concreto de célula, la asociación de estos factores con una célula de ese tipo no excluye el uso de ese factor con un tipo de célula diferente.

El tratamiento de las células de la invención con los agentes o factores que se describen en el presente documento puede tener lugar simultáneamente o secuencialmente. Además, algunas formas de realización incluyen el uso de uno o más agentes o factores, ya sea inyectados en paralelo o secuencialmente con la administración de células, o formulados directamente en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En una forma de realización, las células se tratan previamente con estimulación eléctrica antes de la administración. La exposición de las hUTC a un campo eléctrico puede mejorar la reparación de los tejidos diana mediante el aumento de la proliferación y la viabilidad de las hUTC. La estimulación eléctrica también puede potenciar la secreción de factores tróficos, la expresión de proteínas de la matriz extracelular (ECM), y el prendimiento de las hUTC implantadas. Además, la estimulación eléctrica puede movilizar o inducir a las células residentes en el sitio de implante a iniciar el proceso de reparación.

Las hUTC pueden estimularse eléctricamente aplicando un campo eléctrico utilizando una sola dosis, una dosis sostenida o dosis múltiples durante diferentes periodos de tiempo. La estimulación puede realizarse antes o después de la implantación de las hUTC. Es concebible que se utilicen diferentes parámetros de estimulación eléctrica para optimizar los efectos sobre las hUTC. La estimulación eléctrica también puede aplicarse a células o a tejido cultivados en un biorreactor o entorno tridimensional.

En otro aspecto de la invención, las células o el tejido picado pueden combinarse con una fuente de microcorriente. El par de microcorriente se suministra a las células como un par galvánico de partículas de zinc y cobre (0,01 micras - 0,1 micras) como fuente de energía u otros elementos capaces de generar un microcorriente. Como alternativa, el par galvánico de cobre y zinc u otros elementos podría incorporarse en microtransportadores/andamiajes poliméricos y las células se combinarían con los microtransportadores/andamiajes para el trasplante.

Si la población de células utilizada por el médico es de células de origen posnatal, en algunos casos puede tolerarse la administración con células alogénicas, o incluso xenogénicas, ya que se ha demostrado que estas células no estimulan las PBMC alogénicas en una reacción linfocitaria mixta. Por consiguiente, se reconoce que las propias células proporcionan un efecto inmunosupresor, evitando así el rechazo por parte del hospedador de la población de células administrada. En tales casos, puede no ser necesaria la inmunosupresión farmacológica durante la terapia celular.

Sin embargo, en otros casos puede ser deseable o apropiada la inmunosupresión farmacológica en un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse suministrando las células en un dispositivo de encapsulado, tal como se ha descrito anteriormente. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria contra las células administradas son conocidos en la técnica. Como alternativa, la población de células puede modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad, como se ha mencionado anteriormente.

Además, puede determinarse la supervivencia de una población de células administrada en un paciente vivo mediante el uso de diversas técnicas de exploración, por ejemplo, la tomografía axial computarizada (TAC o TC), la resonancia magnética (RM) o la tomografía por emisión de positrones (TEP). La determinación de la supervivencia celular también puede realizarse *post mortem* eliminando el tejido neural y los tejidos circundantes, y examinándolos visualmente o con un microscopio. Como alternativa, las células pueden tratarse con tinciones que sean específicas para el tejido neural, o sus tejidos circundantes. Las células administradas también pueden

identificarse mediante la incorporación previa de colorantes indicadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, Fast Blue, micropartículas férricas, bisbenzamida o productos de genes indicadores introducidos genéticamente, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

5 En otra forma de realización, la administración de la población de células para tratar la enfermedad de Alzheimer puede asociarse con la administración de fármacos tradicionales utilizados para tratar la enfermedad de Alzheimer, o los síntomas del Alzheimer. En determinados sujetos, tales terapias de combinación pueden dar como resultado una mejoría óptima de los síntomas. Los fármacos que también pueden administrarse con la población de células incluyen cualquier fármaco utilizado para tratar los síntomas de alteración de la memoria, pérdida de concentración, pérdida de peso, problemas de la función motora, pérdida de la audición, deterioro de la capacidad lingüística o de lectura, confusión, escasa capacidad de juicio, agitación, retraimiento, alucinaciones, convulsiones, características parkinsonianas, disminución del tono muscular, mioclonía, incontinencia, mutismo y trastornos psicóticos.

10 Las formas farmacéuticas y posologías para administrar la población de células o cualquiera de las demás composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrollan de acuerdo con el buen ejercicio médico, teniendo en cuenta las condiciones del paciente individual, por ejemplo, la naturaleza y gravedad del daño o lesión neural, la edad, el sexo, el peso corporal y el estado general, y otros factores conocidos por los médicos. Por lo tanto, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica a administrar a un paciente viene determinada por estas consideraciones como se conoce en la técnica.

15 En otra forma de realización, pueden administrarse agentes que inhiben la actividad de los linfocitos T en el sujeto además de las células de la invención. Tal como se utiliza en el presente documento, un agente que inhibe la actividad de los linfocitos T se define como un agente que da como resultado la eliminación o destrucción de los linfocitos T dentro de un sujeto o que inhibe las funciones de los linfocitos T dentro del sujeto, por lo tanto, todavía pueden haber linfocitos T presentes en el sujeto, pero se encuentran en un estado no funcional, de manera que no son capaces de proliferar ni inducir ni realizar funciones efectoras, tales como la producción de citocinas, la citotoxicidad, etc. El término "linfocitos T" abarca los linfocitos T de sangre periférica maduros. El agente que inhibe la actividad de los linfocitos T también puede inhibir la actividad o la maduración de los linfocitos T inmaduros.

30 Vehículos farmacéuticamente aceptables

Además, la población de células puede administrarse en cualquier vehículo fisiológicamente compatible, tal como una solución salina tamponada. En la presente divulgación se analizan vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables, incluidos pero no limitados a, solución salina, soluciones tampón acuosas, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de tales vehículos y diluyentes es bien conocido en la técnica. Otros ejemplos incluyen medios líquidos, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), solución salina estéril, solución salina tamponada con fosfato estéril, medio de Leibovitz (L15, Invitrogen, Carlsbad, CA), dextrosa en agua estéril, y cualquier otro líquido fisiológicamente aceptable. La solución es preferentemente estéril y fluida hasta el punto de poder inyectarse fácilmente. Preferentemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se preserva de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. Las soluciones de la invención pueden prepararse utilizando un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y, en caso necesario, otros ingredientes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtración, y, a continuación, incorporando la población de células como se describe en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir preparaciones hechas a partir de células que se formulan con un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cualquiera analizado en la presente divulgación, incluidos pero no limitados a agua, solución salina (tal como la solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, polivinilpirrolidina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos 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. Los vehículos farmacéuticos adecuados para utilizarse en la presente invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17^a ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y en el documento WO 96/05309.

En una forma de realización preferente, la población de células se administra en un LCR artificial. El LCR artificial compatible con la invención incluye cualquiera que contenga la apropiada estabilidad, solubilidad y farmacocinética de los agentes para suministrarse al cerebro. Una solución LCR ejemplar incluye NaCl, KCl, CaCl₂ x 2 H₂O y MgCl₂ x 6 H₂O en las cantidades aproximadas de aproximadamente 8,66 g, 0,224 g, 0,204 g y 0,163 g, respectivamente, por cada 500 ml de ddH₂O. Otra solución LCR ejemplar incluye Na₂HPO₄ x 7 H₂O y NaH₂PO₄ x H₂O en las cantidades aproximadas de aproximadamente 0,214 g y 0,027 g, respectivamente, por cada 500 ml de ddH₂O. Otra solución LCR ejemplar incluye una relación (en mM) de aproximadamente 187,5 Na: 2,6 K: 1,1 Ca: 1,1 Mg: 0,8 P: 119 Cl: 23,3 HCO₃. En una forma de realización preferente, la solución LCR imita la concentración de electrolitos del LCR real y, por lo tanto, tiene la concentración aproximada en mM de 154 Na: 3,0 K: 1,3 Ca: 0,9 Ca: 0,9 Mg: 0,4 P: 136 Cl: 24,1 HCO₃.

También pueden prepararse células en un vehículo semisólido o sólido, e implantarse quirúrgicamente en el lugar de la formación de la placa neurítica. Se entenderá que las composiciones líquidas también pueden administrarse mediante procedimientos quirúrgicos. En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas semisólidas o sólidas pueden comprender matrices, andamiajes celulares, geles semipermeables, y similares, que pueden ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, puede ser deseable o apropiado aislar las células exógenas de su entorno, pero permitir que las células secreten y suministren moléculas biológicas (por ejemplo, factores neurotróficos) a las células circundantes. En estas formas de realización, las células pueden formularse como implantes autónomos que comprenden células de origen posnatal rodeadas de una barrera selectivamente permeable y no degradable que separa físicamente las células administradas del tejido hospedador. Tales implantes se denominan a veces "inmunoprotectores", ya que tienen la capacidad de evitar que las células inmunitarias y las macromoléculas destruyan las células administradas en ausencia de inmunosupresión inducida farmacológicamente. En otras formas de realización, se utilizan diferentes variedades de redes y geles degradables para las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, los materiales degradables particularmente adecuados incluyen cualquiera analizado en la presente divulgación, incluidos pero no limitados a, polímeros biocompatibles, tales como ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno, y similares.

En otra forma de realización, se utilizan uno o más hidrogeles para las composiciones farmacéuticas. El uno o más hidrogeles pueden incluir colágeno, atelocolágeno, constructos de fibrina, polímeros acrílicos y vinílicos hidrófilos, polisacáridos tales como alginato de calcio y óxido de polietileno. Además, el hidrogel puede estar formado a partir de poli(metacrilato de 2-hidroxiétilo), ácido poliacrílico, péptidos de autoensamblaje (por ejemplo, RAD 16), ácido polimetacrílico, poli(N-vinil-2-pirrolidinona), alcohol polivinílico y sus copolímeros entre sí y con monómeros hidrófobos tales como metacrilato de metilo, acetato de vinilo, y similares. También resultan preferentes los poliuretanos hidrófilos que contienen grandes bloques de óxido de polietileno. Otros materiales preferentes incluyen los hidrogeles que comprenden redes interpenetrantes de polímeros, que pueden formarse mediante adición o mediante polimerización por condensación, cuyos componentes pueden comprender monómeros hidrófilos e hidrófobos tales como los que acaban de enumerarse. También son adecuadas las redes degradables de formación *in situ* para utilizarse 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 estadounidense 2002/0022676 concedida a He *et al.*). Estos materiales de formación *in situ* se formulan como fluidos adecuados para la inyección, a continuación pueden inducirse para formar un hidrogel mediante diversos medios tales como el cambio de temperatura, pH y exposición a la luz *in situ* o *in vivo*.

En otras formas de realización, la composición farmacéutica comprende una matriz biocompatible hecha de polímeros biodegradables naturales, naturales modificados o sintéticos, incluidos homopolímeros, copolímeros y polímeros de bloque, así como combinaciones de los mismos. Los ejemplos de polímeros o clases de polímeros biodegradables adecuados incluyen cualquier polímero biodegradable analizado en la presente divulgación, incluidos pero no limitados a fibrina, colágeno de los tipos I, II, III, IV y V, elastina, gelatina, vitronectina, fibronectina, laminina, trombina, poliaminoácido, celulosa oxidada, tropoelastina, seda, ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos; proteínas, polinucleótidos, goma arábiga, matrices de membrana basal reconstituida, almidones, dextranos, alginatos, hialurón, quitina, quitosano, agarosa, polisacáridos, ácido hialurónico, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol, tejido descelularizado, péptidos de autoensamblaje, polipéptidos, glicosaminoglicanos, sus derivados y mezclas de los mismos. Los polímeros adecuados también incluyen polilactida (PLA) que puede estar hecha de polímeros L(+) y D(-), polihidroxibutirato, poliuretanos, polifosfacenos, copolímero de polietilenglicol-poli(lactida-co-glicólido), policianoacrilatos degradables y poliuretanos degradables. Para el ácido glicólico y el ácido láctico, puede prepararse un dímero cíclico intermedio y purificarse antes de la polimerización. Estos dímeros intermedios se denominan glicólido y lactida, respectivamente.

Otros polímeros o clases de polímeros biodegradables útiles incluyen, sin limitación, poliésteres alifáticos, polioxalatos de alquileno, policarbonatos derivados de la tirosina, poliiminocarbonatos, poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amina, poli(fumarato de propileno), polifumaratos, polidioxanonas, policarbonatos, polioxalatos, poli(alfa-hidroxiácidos), poliésteres, poliuretano, poli(éster uretano), poli(éter uretano), polianhídridos, poliacetatos, policaprolactonas, poliortoésteres, 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, copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico/polietilenglicol, copolímeros de poliuretano y ácido poliláctico, copolímeros de alfa-aminoácidos, copolímeros de alfa-aminoácidos y ácido caproico, copolímeros de alfa-bencil glutamato y polietilenglicol, copolímeros de succinato y poliglicoles, polifosfaceno, polihidroxicaproatos y mezclas de los mismos. También se contemplan sistemas binarios y ternarios.

En general, los materiales utilizados para formar una matriz están configurados idealmente de manera que tengan propiedades mecánicas que sean adecuadas para la aplicación prevista, permanezcan los suficientemente intactos hasta que el tejido haya penetrado y curado, no provoquen una respuesta inflamatoria o tóxica, se metabolizan en el cuerpo después de cumplir con su finalidad, sean fácilmente transformados en el producto final deseado a formar, demuestren una vida útil de almacenamiento aceptable, y se esterilicen fácilmente.

En otra forma de realización, la población de células se administra mediante el uso de un andamiaje. La composición, la forma y la porosidad del andamiaje pueden ser cualquiera de las descritas anteriormente. Estos biomateriales tridimensionales contienen las células vivas fijadas al andamiaje, dispersas dentro del andamiaje, o incorporadas en una matriz extracelular inmovilizada en el andamiaje. Una vez implantado en la región diana del cuerpo, estos implantes se integran en el tejido hospedador, en el que las células administradas se establecen gradualmente. Los ejemplos no limitativos de andamiajes que pueden utilizarse en la presente invención incluyen estructuras textiles, tales como tejidos, tejidos de punto, trenzas, mallas, no tejidos, tejidos de punto y tejidos de urdimbre; espumas porosas, espumas semiporosas, películas o láminas perforadas, micropartículas, perlas y esferas, y estructuras compuestas que son una combinación de las anteriores estructuras. Las mallas no tejidas pueden formarse, por ejemplo, utilizando fibras compuestas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), comercializado con el nombre comercial de suturas VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). También pueden utilizarse espumas, compuestas, por ejemplo, por copolímero de poli(epsilon-caprolactona)/ácido poliglicólico (PCL/PGA), formado mediante procesos tales como la criodesecación, o liofilizados, como se analiza en la patente estadounidense nº 6.355.699 (Bruder *et al.*). En otra forma de realización, el armazón es un fieltro, que puede estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible. El hilo se convierte en un fieltro mediante técnicas convencionales de procesamiento textil que consisten en rizado, corte, cardado y punzonado. En otra forma de realización, las células se siembran en andamiajes de espuma que pueden utilizarse como estructuras compuestas. En muchas de las formas de realización anteriormente mencionadas, el armazón puede moldearse hasta una forma útil, tal como para llenar un vacío de tejido. Además, se entenderá que la población de células puede cultivarse en dispositivos quirúrgicos o implantables preformados no degradables.

En otra forma de realización, antes de la administración, la población de células se incuba en presencia de uno o más factores, o en condiciones, que estimulan la diferenciación de las células madre. Tales factores se conocen en la técnica y el experto entenderá que la determinación de condiciones adecuadas para la diferenciación puede lograrse 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 preferentes incluyen, pero no se limitan a, factores tróficos o de crecimiento, quimiocinas, citocinas, productos celulares, agentes desmetilantes, y otros estímulos que en la actualidad se sabe o que más adelante se determine estimulan la diferenciación. Como alternativa, la composición administrada al paciente incluye una población de células con uno o más factores que estimulan la diferenciación celular, en la que la diferenciación celular se produce *in vitro* en el sitio del tejido.

Células madre y células de origen posnatal, incluidas las hUTC

La descripción del aislamiento y la caracterización de las hUTC preferentes de la invención puede encontrarse en las publicaciones de patente estadounidenses nº 2005/0032209, nº 2005/0058631 y nº 2005/0054098.

En algunas formas de realización, las células son células madre. Como se ha indicado anteriormente, las células madre son células indiferenciadas definidas por la capacidad que tiene una sola célula para autorrenovarse y para diferenciarse para producir células descendientes, incluidas progenitoras autorrenovantes, progenitoras no renovantes y células terminalmente diferenciadas.

En una forma de realización preferente, las células madre son células de origen posnatal. Para aislar las células de origen posnatal, se recupera una placenta o cordón umbilical de mamífero después de o poco después de finalizar una gestación a término o prematura, por ejemplo, tras la expulsión después del parto. El tejido posparto puede transportarse desde el lugar del parto hasta 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, incluido pero no limitado a, una solución salina tal como medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (también conocido como medio esencial mínimo de Dulbecco) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier solución utilizada para el transporte de órganos utilizada para la administración, 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 no limitados a penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina. El tejido posparto puede aclararse con una solución anticoagulante tal como una solución que contenga heparina. Resulta preferente mantener el tejido a aproximadamente 4°C-10°C antes de la extracción de las células. Es aún más preferente que el tejido no esté congelado antes de la extracción de las células.

Las células de origen posnatal se aíslan preferentemente en un ambiente aséptico. El cordón umbilical puede separarse de la placenta mediante medios conocidos en la técnica. Como alternativa, el cordón umbilical y la placenta se utilizan sin separarse. Preferentemente, la sangre y los residuos se eliminan del tejido posparto antes del aislamiento de las células de origen posnatal. Por ejemplo, el tejido posparto puede lavarse con solución tampón, incluida pero no limitada a solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado también puede comprender uno o más agentes antimicóticos y/o antibióticos, incluidos pero no limitados a penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

El tejido posparto que comprendía una placenta entera o un fragmento o sección de la misma se desagrega mediante fuerza mecánica (trituration o fuerzas de cizallamiento). El procedimiento de aislamiento también puede utilizar un proceso de digestión enzimática. Se sabe en la técnica que muchas enzimas son útiles para el aislamiento de células individuales a partir de matrices tisulares complejas para facilitar el desarrollo en cultivo. Las enzimas de digestión van desde débilmente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) hasta fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina), y están disponibles en el mercado. Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles con la presente invención incluyen actividades enzimáticas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serín-proteasas (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa), y desoxirribonucleasas. Actualmente resultan preferentes las actividades enzimáticas seleccionadas de entre metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, se sabe que las colagenasas son útiles para aislar diversas células de los tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN monocatenario y pueden minimizar la formación de agregados celulares durante el aislamiento. Los métodos preferentes implican el tratamiento enzimático, por ejemplo con colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa y hialuronidasa. En determinadas formas de realización, en la etapa de disociación se utiliza una mezcla de colagenasa y la proteasa neutra dispasa. Las formas de realización más específicas emplean la digestión en presencia de al menos una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades proteasa, dispasa y termolisina. Otras formas de realización más emplean la digestión con actividades enzimáticas tanto colagenasa como dispasa. También se utilizan métodos que incluyen la digestión con una actividad hialuronidasa además de las actividades colagenasa y dispasa. El experto entenderá que muchos de tales tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para el aislamiento de células a partir de diversas fuentes de tejido. Por ejemplo, las mezclas de enzimas para la disociación de tejido comercializadas con el nombre comercial LIBERASE™ (Roche, Indianapolis, IN) son adecuadas para utilizarse en los presentes métodos. Se conocen otras fuentes de enzimas, y el experto también puede obtener tales enzimas directamente a partir de sus fuentes naturales. El experto también está bien preparado para evaluar enzimas nuevas o adicionales o combinaciones de enzimas por su utilidad para el aislamiento de las células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferentes tienen una duración de 0,5, 1, 1,5 o 2 horas o más. En otras formas de realización preferentes, el tejido se incuba a 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disociación.

En algunas formas de realización de la divulgación, el tejido posparto se separa en secciones que comprenden diversos aspectos del tejido, tales como los aspectos neonatal, neonatal/materno y materno de la placenta, por ejemplo. 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 neonatal o materno pueden identificarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante análisis del cariotipo o hibridación *in situ* para la detección de un cromosoma Y.

Los métodos para la selección del 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 diversos 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 células de origen posnatal se habrán multiplicado, ya sea como resultado de la migración desde el tejido posparto o de la división celular, o de ambos. En algunas formas de realización de la divulgación, las células de origen posnatal se someten a pases o se llevan a un recipiente de cultivo separado que contiene medio recién preparado que contiene el mismo medio o un tipo de medio diferente al utilizado inicialmente, en el que la población de células puede hacerse proliferar 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. Puede realizarse la clonación y/o subclonación para confirmar que se ha aislado una población clonal de células.

En algunos aspectos de la divulgación, los diferentes tipos de células presentes en el tejido posparto se fraccionan en subpoblaciones a partir de las que pueden aislarse las células de origen posnatal. El fraccionamiento o la selección pueden llevarse a cabo mediante técnicas convencionales de separación de células, incluidas pero no limitadas al tratamiento enzimático para disociar el tejido posparto en sus células componentes, seguido de clonación y selección de tipos de células específicos, incluidos pero no limitados a la selección basada en marcadores morfológicos y/o bioquímicos; cultivo selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de las células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación contracorriente); separación a gravedad unitaria; distribución a contracorriente; electroforesis; y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se describen técnicas adecuadas de selección clonal y separación de células en Freshney, 1994, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, 3ª ed., Wiley-Liss, Inc., Nueva York.

El medio de cultivo se cambia según sea necesario, por ejemplo, aspirando cuidadosamente el medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y volviéndolo a abastecer de medio recién preparado. Se sigue incubando hasta

que se acumula en la placa un número o densidad suficiente de células. Las secciones de tejido explantado original pueden eliminarse y las células restantes tripsinizarse mediante técnicas convencionales o con un rascador de células. Después de la tripsinización, las células se recogen, se llevan a un medio recién preparado y se incuban como 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 células de origen posnatal.

Las células de origen posnatal pueden crioconservarse. Por consiguiente, en una forma de realización preferente que se describe con mayor detalle más adelante, las células de origen posnatal para la transferencia autóloga (ya sea para la madre o el bebé) pueden proceder de tejidos posparto apropiados tras el nacimiento de un bebé, a continuación crioconservarse de manera que estén disponibles en caso de que más adelante se necesiten para la administración.

Las células de origen posnatal pueden caracterizarse, por ejemplo, mediante sus características de desarrollo (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo de duplicación, pases hasta la senescencia), un análisis del cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos), perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices 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, mediante ensayo de coagulación de plasma o análisis del 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 PBMC) y/u otros métodos conocidos en la técnica.

Los ejemplos de células de origen posnatal procedentes de tejido placentario se depositaron en la Colección americana de cultivos tipo (ATCC, Manassas, VA) y se les asignó los números de registro ATCC del siguiente modo: (1) la cepa con denominación PLA 071003 (P8) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó el nº de registro PTA-6074; (2) la cepa con denominación PLA 071003 (P11) se depositó el 15 de junio de 2004 y se le asignó el nº de registro PTA-6075; y (3) la cepa con denominación PLA 071003 (P16) se depositó el 16 de junio de 2004 y se le asignó el nº de registro PTA-6079. Los ejemplos de células de origen posnatal procedentes 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 ATCC del siguiente modo: (1) a la cepa con denominación UMB 022803 (P7) se le asignó el nº de registro PTA-6067; y (2) a la cepa con denominación UMB 022803 (P17) se le asignó el nº de registro PTA-6068.

En diversas formas de realización, las células de origen posnatal poseen una o más de las siguientes características de desarrollo (1) necesitan L-valina para desarrollarse en cultivo; (2) son capaces de desarrollarse en atmósferas que contienen una cantidad de oxígeno de aproximadamente un 5% a al menos aproximadamente un 20%; (3) tienen el potencial de experimentar al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de llegar a la senescencia; y (4) se fijan y proliferan en un recipiente para cultivo tisular recubierto o no recubierto, en el que el recipiente para cultivo tisular recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

En determinadas formas de realización, las células de origen posnatal tienen un cariotipo normal, que se mantiene a medida que las células se someten a pases. El cariotipado es particularmente útil para identificar y distinguir las células neonatales de las maternas de origen placentario. Los expertos en la materia conocen y disponen de métodos de cariotipado.

En otras formas de realización, las células de origen posnatal pueden caracterizarse por la producción de determinadas proteínas, incluidas (1) la producción de al menos uno de entre factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso; y (2) la 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, detectada mediante citometría de flujo. En otras formas de realización, las células de origen posnatal pueden caracterizarse por la 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, detectada mediante citometría de flujo. Resultan particularmente preferentes las células que producen al menos dos de entre factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso. Resultan más preferentes las células que producen las tres proteínas factor tisular, vimentina y alfa actina de músculo liso.

En otras formas de realización, las células de origen posnatal pueden caracterizarse por la expresión de genes, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para un gen que codifica al menos uno de entre interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; miembro 2 de la superfamilia de lectinas tipo C; tumor de Wilms 1; miembro A2 de la familia de aldehído deshidrogenasas 1; renina; receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada; clon IMAGE:4179671 de *Homo sapiens*; proteína quinasa C zeta; proteína hipotética

DKFZp564F013; regulada por disminución en el cáncer de ovario 1; y el gen de *Homo sapiens* del clon DKFZp547k1113.

5 En otras formas de realización, las células de origen posnatal pueden caracterizarse por la expresión de genes, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está reducida para un gen que codifica al menos uno de: caja homeótica de la baja estatura 2; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1); elastina (estenosis aórtica supralvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); caja homeótica de mesénquima 2 (caja homeótica específica de la detención del crecimiento); homólogo 1 de la caja homeótica de "sine oculis" (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador de la morfogénesis 2 asociado a "disheveled"; 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 3 relacionado con el enanismo; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de "frizzled" (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquión); proteína 5 de la caja homeótica de "iroquois"; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de vesícula sináptica; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 tipo receptor de citocinas; canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de la caja homeótica de "sine oculis" (*Drosophila*); proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contienen EGF; respuesta de crecimiento precoz 3; caja homeótica de "distal-less" 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF); inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*, clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor del péptido natriurético tipo C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido natriurético atrial tipo C); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; y polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo).

30 En otras formas de realización, las células de origen posnatal pueden caracterizarse por la secreción de al menos una de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES y TIMP1. En algunas formas de realización, las células de origen posnatal pueden caracterizarse por la falta de secreción de al menos una de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1b, I309, MDC y VEGF, detectada mediante ELISA.

35 En algunas formas de realización preferentes, las células de origen posnatal proceden de tejido de cordón umbilical sustancialmente exento de sangre, son capaces de autorrenovarse y proliferar en cultivo, necesitan L-valina para desarrollarse, pueden desarrollarse en al menos aproximadamente un 5% de oxígeno, y comprenden al menos una de las siguientes características: potencial de experimentar al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; fijación y proliferación en un recipiente para cultivo tisular 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 mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, está aumentada para un gen que codifica la interleucina 8 y el reticulón 1. En algunas formas de realización, tales células de origen posnatal no producen CD45 ni CD117.

45 En formas de realización preferentes, la célula comprende dos o más de las características de desarrollo, producción de marcadores proteicos/de superficie, expresión génica o secreción de sustancias, anteriormente enumeradas. Resultan más preferentes las células que comprenden tres, cuatro, cinco o más de las características. Resultan aún más preferentes las células de origen posnatal que comprenden seis, siete, ocho o más de las características. Actualmente resultan aún más preferentes las células que comprenden todas las características anteriores.

50 Entre las células que resultan actualmente preferentes para utilizarse con la invención en varios de sus aspectos se encuentran las células posnatales que tienen las características descritas anteriormente y, más concretamente, aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales durante los 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 las que las células producen las proteínas detectables mediante pruebas inmunológicas que corresponden a los marcadores enumerados. Resultan aún más preferentes aquellas células que además de lo anteriormente indicado no producen proteínas correspondientes a ninguno de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR,DP,DQ, detectado mediante citometría de flujo.

55 Determinadas células que tienen el potencial de diferenciarse en estirpes que conducen a diversos fenotipos son inestables y, por lo tanto, pueden diferenciarse espontáneamente. Actualmente resultan preferentes para utilizarse con la invención las células que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo en las estirpes de mioblasto, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, hemangiogénica, angiogénica, vasculogénica o del

5 endotelio vascular. Las células preferentes, cuando se desarrollan en medio de crecimiento, son sustancialmente estables con respecto a los marcadores celulares producidos en su superficie, y con respecto al patrón de expresión de diversos genes, por ejemplo como se determina mediante una prueba diagnóstica médica comercializada con el nombre comercial de GENECHIP (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Las células permanecen sustancialmente constantes, por ejemplo en cuanto a sus características de marcadores de superficie a lo largo de los pases, durante múltiples duplicaciones de la población.

10 Otro aspecto de la invención caracteriza el uso de poblaciones de las células de origen posnatal descritas anteriormente. En algunas formas de realización de la divulgación, la población de células es heterogénea. Una población heterogénea de células de la divulgación puede comprender al menos aproximadamente un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de células de origen posnatal de la invención. Las poblaciones heterogéneas de células de la divulgación pueden comprender adicionalmente células madre u otras células progenitoras, tales como mioblastos u otras células progenitoras del músculo, hemangioblastos, o células precursoras de los vasos sanguíneos, o pueden comprender adicionalmente células neurales completamente diferenciadas. En algunas formas de realización, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo células de origen posnatal (preferentemente al menos aproximadamente un 96%, 97%, 98%, 99% o más de células de origen posnatal). La población homogénea de células de la divulgación puede comprender células de origen umbilical o placentario. Las poblaciones homogéneas de células de origen umbilical están preferentemente exentas de células del linaje materno. Las poblaciones homogéneas de células de origen placentario pueden ser de linaje neonatal o materno. La homogeneidad de una población de células puede conseguirse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo) o por expansión clonal según métodos conocidos. Por lo tanto, las poblaciones homogéneas de células de origen posnatal preferentes pueden comprender una estirpe celular clonal de las células de origen posnatal. Tales poblaciones son particularmente útiles cuando se ha aislado un clon de células con funcionalidad sumamente deseable.

30 En una forma de realización, las células son células de origen posnatal que se administran como células indiferenciadas, es decir, tal como se cultivaron en el medio de crecimiento. Como alternativa, las células de origen posnatal pueden administrarse tras la exposición en cultivo a condiciones que estimulan la diferenciación hacia un tejido neural deseado.

En una forma de realización preferente, las células son hUTC.

35 Además, la población de células puede incluir más de un tipo de célula. De hecho, algunas formas de realización incluyen la administración de células que rodean y sustentan a la célula neural tal como el tejido vascular.

Células genéticamente modificadas

40 Las células utilizadas en la invención también pueden modificarse genéticamente para que produzcan productos génicos terapéuticamente útiles, para que produzcan agentes que faciliten o apoyen la supervivencia del tejido neural, la diferenciación, la actividad fagocítica, o para que produzcan factores que atraigan células progenitoras a la zona de las placas neuríticas.

45 La modificación genética puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de diversos vectores, incluidos pero no limitados a, vectores virales de integración, por ejemplo, vector retroviral o vectores virales adenoasociados; vectores de replicación no integrativos, por ejemplo, vectores papiloma virus, vectores SV40, vectores adenovirales; o vectores virales de replicación defectuosa. Otros métodos de introducción de ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas, o por inyección directa de ADN.

50 Por ejemplo, las células pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen y/o secreten una molécula extraña (por ejemplo, una molécula heteróloga normalmente no fabricada por la célula) o para que modifiquen la producción de una molécula para tratar el dolor crónico. Tales moléculas pueden ser producidas por las células tras la introducción de moléculas heterólogas de ácido nucleico mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica.

55 En una forma de realización, las células de la invención pueden modificarse para que expresen el receptor de un neurotransmisor. En otra forma de realización, las células de la invención se modifican para que produzcan un neurotransmisor. En otra forma de realización, las células de la invención se modifican para que produzcan un fragmento de un neurotransmisor, incluido pero no limitado a, un fragmento del extremo C' terminal o del extremo N' terminal. En otra forma de realización, una molécula extraña potencia la capacidad neuroregeneradora de las células administradas, ayuda a restablecer la comunicación neurosensorial de las interneuronas GABA, y/o ayuda a restablecer el equilibrio de neurotransmisores excitadores/inhibidores en el sujeto.

65 En otra forma de realización, las células se modifican por ingeniería genética para que expresen y/o secreten moléculas extrañas que promuevan el éxito de la administración (por ejemplo, mediante modulación por

disminución de una respuesta inmunitaria en el sujeto), y/o promuevan la supervivencia o la función de las células administradas. Las moléculas ejemplares incluyen, por ejemplo, un factor neurotrófico o un agente neuroprotector.

5 En otra forma de realización, pueden introducirse células modificadas o no modificadas junto con otros tipos de células modificadas genéticamente para que desempeñen una función útil. Por ejemplo, con el fin de estimular el desarrollo de las neuronas, las células pueden administrarse junto con otras células que secretan o que se han modificado para que secreten, por ejemplo, un factor neurotrófico. Los ejemplos de células que funcionan como transportadoras de transgenes a un sujeto incluyen fibroblastos, células cromafines suprarrenales, astrocitos y mioblastos. Tales células, por ejemplo los fibroblastos y las células gliales, también pueden utilizarse para suministrar retrovirus que contienen genes tales como el gen de la timidina quinasa del herpes simple, cuyos productos génicos son dianas para otros agentes o fármacos terapéuticos tales como ganciclovir contra las células diana.

15 Las células hospedadoras pueden transformarse o transfectarse con ADN controlado por, o en asociación operativa con, uno o más elementos apropiados de control de la expresión tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable. Puede utilizarse cualquier promotor para activar la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan al promotor/potenciador CMV, SV 40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o promotor del gen de la elastina. En algunas formas de realización, los elementos de control utilizados para controlar la expresión del gen de interés pueden permitir la expresión regulada del gen de manera que el producto se sintetice sólo cuando sea necesario *in vivo*. Si se desea la expresión transitoria, se utilizan preferentemente promotores constitutivos en un vector no integrativo y/o de replicación defectuosa. Como alternativa, podrían utilizarse promotores inducibles para activar la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, los asociados con la metalotioneína y proteínas de choque térmico.

25 Después de introducir el ADN extraño, puede dejarse a las células manipuladas desarrollarse en medio enriquecido y, a continuación, cambiarlas a medio selectivo. El marcador seleccionable en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y que se desarrollen para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y hacerse proliferar hasta generar estirpes celulares. Este método puede utilizarse ventajosamente para diseñar estirpes celulares que expresen el producto génico.

35 Las células de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para que presenten una expresión anulada o atenuada de factores que promueven la inflamación o el rechazo en el sitio de implante. Más adelante se analizan técnicas de modulación negativa para la reducción de los niveles de expresión del gen diana o de los niveles de actividad del producto del gen diana. "Modulación negativa", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una reducción del nivel y/o de la actividad del producto de un gen diana con respecto al nivel y/o a la actividad del producto del gen diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen natural de una célula neural, o células progenitoras de la misma, puede reducirse o anularse mediante varias técnicas, incluida por ejemplo la inhibición de la expresión activando el gen mediante la técnica de recombinación homóloga. Por lo general, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' respecto a esa región) es interrumpido por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, lo que evita la producción de ARNm normal a partir del gen diana y que da como resultado la inactivación del gen. Un gen también puede inactivarse creando una deleción en parte de un gen, o delecionando todo el gen. Mediante el uso de un constructo con dos regiones de homología con el gen diana que estén muy separadas en el genoma, pueden deleccionarse las secuencias intercaladas entre las dos regiones como describen Mombaerts *et al.*, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 88:3084-3087. También pueden utilizarse moléculas antisentido, ADNzimas, ribozimas, ARN de interferencia pequeño (ARNip) y otras moléculas de este tipo que inhiben la expresión del gen diana, para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de los complejos principales de histocompatibilidad (HLA) han demostrado ser las más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Aún más, pueden utilizarse moléculas de triple hélice para reducir el nivel de actividad del gen diana. Estas técnicas se describen detalladamente en L.G. Davis *et al.* (eds.), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, CN.

55 Cultivo celular

Las células aisladas pueden utilizarse para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a recipientes estériles de cultivo tisular no recubiertos o recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (natural, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular. Las células se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sustentar el desarrollo de las células tal como, pero no limitado a, DMEM (con alto o bajo contenido de glucosa), Advanced DMEM, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 y medio sin suero/sin proteínas comercializado con el nombre comercial CELL-GRO-FREE (Mediatech, Inc Tallo., Herndon, VA). El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluidos, por ejemplo, suero fetal bovino (FBS), preferentemente aproximadamente un 2%-15% (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS); beta-mercaptoetanol

(BME o 2-ME), preferentemente aproximadamente un 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento 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, tal como penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solos o en combinación. El medio de cultivo comprende preferentemente medio de crecimiento.

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad que permita el desarrollo celular. En una forma de realización preferente, las células se cultivan a una concentración de aproximadamente un 0 a aproximadamente un 5 por ciento en volumen de CO₂ en el aire. En algunas formas de realización preferentes, las células se cultivan a una concentración de aproximadamente un 2 por ciento a aproximadamente un 25 por ciento de O₂ en el aire, preferentemente de aproximadamente un 5 por ciento a aproximadamente un 20 por ciento de O₂ en el aire. Las células se cultivan preferentemente a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C y 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 estar en agitación, por ejemplo, utilizando un biorreactor. En algunas formas de realización, las células se cultivan en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, vitamina C, catalasa, vitamina E, N-acetilcisteína). "Bajo estrés oxidativo" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a condiciones de nulo o mínimo daño por radicales libres a las células cultivadas.

Se pondrá de manifiesto a partir de lo anteriormente indicado que se ha proporcionado una invención con ventajas significativas. Aunque la invención se muestra sólo en unas pocas de sus formas, no está limitada sino que admite diversos cambios y modificaciones sin alejarse del espíritu de la misma. Dentro del espíritu de la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

hUTC en un modelo de infusión de amiloide de la enfermedad de Alzheimer

El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de las hUTC en un modelo de infusión de amiloide de la enfermedad de Alzheimer (EA). Se evaluó el efecto de la administración de hUTC sobre la memoria, el depósito de amiloide y otros indicativos de la eficacia en el cerebro después de la inyección de la proteína amiloide. La infusión intracerebroventricular de beta-amiloide (Abeta) en rata puede imitar aspectos de la EA. Se utiliza la lipoproteína de alta densidad (HDL), un transportador plasmático normal de Abeta, para atenuar la agregación de Abeta que da lugar a la toxicidad dependiente de Abeta y a los déficits cognitivos. El modelo de infusión *in vivo* en rata es un método útil y rentable para explorar nuevos tratamientos para la EA.

I. Materiales y métodos

Se implantó a ratas Sprague Dawley una cánula y un dispositivo de suministro. Se infundió a los cerebros de los animales proteína amiloide recombinante (grupo experimental) o solución salina tamponada con fosfato (control simulado) durante dos semanas. Se suspendieron las infusiones, y se dejó que los animales se recuperasen durante una semana. Las células se prepararon a 100.000 células/μl, y se trató a los animales con una sola inyección a través de una cánula ICV, de 2 μl de solución de 100.000 células/μl o de 5 μl de solución de 100.000 células/μl.

En total, había cinco grupos de tratamiento:

El grupo 1 recibió una proteína inerte durante dos semanas y, a continuación, recibió una única inyección de vehículo celular (solución salina) ("control simulado").

El grupo 2 se trató con proteína inerte durante dos semanas y, a continuación, una sola inyección de 500.000 hUTC.

El grupo 3 se trató con amiloide beta recombinante durante dos semanas y, a continuación, vehículo celular (solución salina).

El grupo 4 se trató con amiloide beta recombinante y, a continuación, una sola inyección de 200.000 células de ensayo.

El grupo 5 se trató con amiloide beta recombinante y, a continuación, una sola inyección de 500.000 células de ensayo.

Se dejó que los animales se recuperasen de los procedimientos y se evaluaron mediante la prueba del laberinto acuático de Morris utilizando un tanque de 2 metros de diámetro a una temperatura del agua de 26°C, como describen Winkler *et al.*, Neurobiol Aging., 1994; 15(5): 601-607. Se colocaron señales fijas distales alrededor

de las paredes de la habitación, y no había señales proximales ni móviles presentes ya que las ratas no podían ver al investigador durante los ensayos. Antes de la primera prueba de cada día, se colocaba a los animales en la plataforma durante 60 segundos para verificar la orientación espacial. Se sacaba a los animales de la plataforma, y se cubrían las cabezas con un paño hasta colocarlos en una posición de inicio aleatoria, frente a la pared del tanque. Se entrenó a los animales primero durante un día y medio en una prueba de la plataforma visible (4 ensayos por bloque, un bloque por la mañana y otro bloque por la tarde; 3 bloques en total). A continuación, se ensayó la adquisición de la plataforma oculta durante los siguientes cinco días (4 ensayos de natación por bloque, dos bloques al día). A continuación, se sometió a los animales a un ensayo de prueba. Para realizar el ensayo de prueba, se saca la plataforma del tanque y se coloca a la rata en el tanque durante 20 segundos. Se somete a prueba la memoria a largo plazo mediante tres días de adquisición en una posición de la plataforma oculta inversa (4 ensayos por bloque, dos bloques al día). Esta memoria de trabajo se sometió a prueba cambiando las posiciones de la plataforma los días 6 y 7 de la prueba. Tras el último bloque de adquisición, hubo otro ensayo de prueba. Las longitudes de la trayectoria y la adquisición se determinaron con el sistema de video de detección de movimiento y el software de imágenes VHS HVS Image Ltd. (Buckingham, Reino Unido).

Se sacrificó a todos los animales 10 semanas después del inicio de la infusión de amiloide (7 semanas después de la infusión de hUTC). Se anestesió a los animales con pentobarbital sódico y se realizó una perfusión cardiaca con tampón que contenía inhibidores de proteasas. Se recogieron los tejidos para la histología. Los cerebros se separaron sagitalmente, y se congeló un hemisferio para la inmunohistoquímica, mientras que el otro se fijó por inmersión en PFA al 4% seguido de la inclusión en cera de parafina.

II. Resultados

El día 1, todos los grupos de tratamiento mostraron un rendimiento similar evaluado mediante la velocidad de natación. Las velocidades de natación variaron de 0,21 a 0,31 metros por segundo con medias entre 0,24 y 0,26. Estos resultados indicaron que no hubo grandes deficiencias motoras a causa de los procedimientos de implante. (Figura 1).

Las pruebas de adquisición de la plataforma oculta entre los días 2 a 6 también mostraron un rendimiento uniforme en todos los grupos de tratamiento con velocidades de natación con una media entre 0,25 y 0,30 metros por segundo. Las mediciones de latencia, que es el tiempo que tarda la rata en encontrar la plataforma, y las puntuaciones en la prueba acumulativa de Gallagher mostraron mediciones uniformes entre los grupos de tratamiento entre los días 2 y 5 (Figuras 2 y 3).

Los días 5 y 6, las puntuaciones acumulativas de Gallagher estaban elevadas en los animales del Grupo 3 (amiloide con vehículo celular) en comparación con el control negativo (Grupo 1 y 2; vehículo con vehículo o vehículo con hUTC), así como las cohortes tratadas con células (Grupos 4 y 5) (Figura 3). Estas diferencias se mantuvieron hasta el día 9 del estudio y alcanzaron significación estadística para los días 8 y 9. Las puntuaciones del Grupo 3 fueron significativamente más altas que las de los grupos 1, 2 y 5 (Figura 4). De forma análoga para las mediciones de latencia, aunque todos los grupos habían reducido la latencia con el tiempo, el Grupo 3 tuvo una puntuación significativamente más alta que los demás controles y cohortes tratadas (Figura 5).

En resumen, los resultados muestran que el tratamiento con amiloide fue eficaz e indujo una lesión, el tratamiento celular en los animales sin lesión no provocó ninguna respuesta negativa y el tratamiento celular puede reducir la lesión causada por la proteína amiloide administrada localmente.

EJEMPLO 2

hUTC en un modelo genético de enfermedad de Alzheimer

El objetivo de este estudio es determinar la eficacia de las hUTC en un modelo genético de enfermedad de Alzheimer.

I. Materiales y métodos

Se utilizarán modelos de roedor que portan genes delecionados o añadidos que pueden imitar el fenotipo de la enfermedad de Alzheimer. Estos animales pueden portar mutaciones simples o múltiples que inducirán la acumulación y la deposición de proteínas en el cerebro que conducirán a la modificación y la posible acumulación de varias proteínas en el cerebro tales como amiloide y tau que se acumulan en el cerebro de los pacientes con EA. Los ejemplos de estos modelos incluyen, pero no se limitan a, ratones transgénicos dobles APP+PS1, animales con desactivación del gen de la presenilina (ratones transgénicos ApoE). La acumulación de estas proteínas conduce a la muerte celular y a la disfunción cognitiva. Las hUTC pueden administrarse por inyección directa en el cerebro o por inyección sistémica. Las pruebas funcionales tales como el rendimiento en el laberinto acuático o pruebas similares pueden evaluar la patología y la eficacia de las células. Las células pueden administrarse mediante una sola inyección o después de múltiples inyecciones. Estas pueden ser con o sin tratamiento farmacológico inmunosupresor. Se evaluará a los animales durante varias semanas después de la inyección de células para

evaluar claramente la magnitud y la duración de la eficacia de las células. Se evaluará a estos animales mediante histología después de la necropsia. Pueden recogerse tejidos para evaluar la acumulación de amiloide y la presencia de ovillos neurofibrilares. También pueden realizarse evaluaciones típicas de viabilidad y muerte celular con pruebas tales como la tinción TUNEL.

5

II. Resultados

EL experimento se analizará mediante ANOVA. El tratamiento con hUTC es eficaz si hay una mejora significativa en las pruebas funcionales en comparación con los controles. Esto puede establecerse en un único momento o en múltiples momentos. Los resultados histológicos pueden mostrar menor prevalencia de amiloide u ovillos neurofibrilares en los animales tratados con células en comparación con el control. Esto puede ser en solitario u observarse junto con una menor prevalencia de células que presentan indicadores clave de muerte celular necrótica o apoptótica tal como TUNEL, núcleos picnóticos o caspasas activas. Estos marcadores pueden sugerir que los animales tratados con células pueden tener una reducción de la patología.

15

EJEMPLO 3

Aislamiento de células

Se obtuvieron cordón umbilical y placenta posparto tras el parto de una gestación a término o prematura. Se recolectaron células de cinco donantes distintas de tejido de cordón umbilical y placentario. Se ensayaron diferentes métodos de aislamiento celular para determinar su capacidad para producir células con: 1) el potencial de diferenciarse a células con diferentes fenotipos, una característica común de las células madre, o 2) el potencial de proporcionar factores tróficos fundamentales útiles para otras células y tejidos.

25

Aislamiento de células umbilicales. Se obtuvieron cordones umbilicales del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Los tejidos se obtuvieron después de partos normales. Los protocolos de aislamiento de células se realizaron asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar la sangre y los residuos, el cordón se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de penicilina a 100 unidades/ml y estreptomycin a 100 miligramos/mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro (Invitrogen Carlsbad, CA). A continuación, los tejidos se disociaron mecánicamente en placas de cultivo tisular de 150 cm² en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM con bajo contenido de glucosa o DMEM con alto contenido de glucosa; Invitrogen), hasta que el tejido se picó hasta una pulpa fina. Los tejidos picados se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo).

35

A continuación, el tejido se digirió en medio DMEM con bajo contenido de glucosa o DMEM con alto contenido de glucosa, que contenía cada uno penicilina a 100 unidades/mililitro, estreptomycin a 100 miligramos/mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro y las enzimas de digestión. En algunos experimentos se utilizó una mezcla de enzimas de colagenasa y dispasa ("C:D") (colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 unidades/mililitro; y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro, en DMEM con bajo contenido de glucosa). En otros experimentos se utilizó una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:D:H") (C:D:H = colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro; y hialuronidasa (Sigma), 5 unidades/mililitro, en DMEM con bajo contenido de glucosa). Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las enzimas de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Enviro, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

45

Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Invitrogen), suero fetal bovino al 15 por ciento (v/v) (FBS; suero fetal bovino definido; lote n° AND18475; Hyclone, Logan, UT), 2-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), penicilina a 100 unidades por mililitro, estreptomycin a 100 microgramos por mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos por mililitro; (cada una de Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión de células se filtró a través de un filtro para cribas celulares BD FALCON de nailon de 70 micras (BD Biosciences, San Jose, CA). Se hicieron pasar por el filtro un aclarado de 5 mililitros adicionales que comprendía medio de crecimiento. A continuación, se hizo pasar la suspensión de células por un filtro para cribas celulares de nailon de 40 micras (BD Biosciences, San Jose, CA), seguido de un aclarado de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

55

El filtrado se resuspendió en medio de crecimiento (volumen total de 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento recién preparado. Este proceso se repitió dos veces más.

60

Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento recién preparado. Se determinó el número de células viables mediante tinción con azul de tripano. A continuación, las células se cultivaron en condiciones normales.

Las células aisladas a partir de los tejidos de cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T-75 recubiertos con gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento. Después de dos días,

65

se aspiraron de los matraces el medio gastado y las células no adheridas. Las células adherentes se lavaron con PBS tres veces para eliminar los residuos y las células de origen sanguíneo. A continuación, se volvió a abastecer a las células de medio de crecimiento y se dejó que se desarrollaran hasta la confluencia (aproximadamente 10 días desde el pase 0) hasta el pase 1. En los pases subsiguientes (del pase 1 al 2, etc.), las células alcanzaron la subconfluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pases subsiguientes, las células se sembraron a 5.000 células/cm². Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con un 5 por ciento de dióxido de carbono a 37°C.

Las células se aislaron de los tejidos de cordón umbilical en medio DMEM con bajo contenido de glucosa con LIBERASE™ (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3™; Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) y hialuronidasa (5 unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue como se ha descrito anteriormente para otras digestiones con proteasa, sin embargo, se utilizó la mezcla LIBERASE™/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C:D o C:D:H. La digestión del tejido con LIBERASE™ dio como resultado el aislamiento de poblaciones de células a partir de los tejidos posparto que proliferaron fácilmente.

Se compararon los procedimientos para el aislamiento de células a partir de cordón umbilical utilizando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión incluían: i) colagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla de colagenasa:dispasa (C:D); v) mezcla de colagenasa:hialuronidasa (C:H); vi) mezcla de dispasa:hialuronidasa (D:H); y vii) mezcla de colagenasa:dispasa:hialuronidasa (C:D:H). Se observaron las diferencias en el aislamiento de las células mediante estas diferentes condiciones de digestión enzimática (Tabla 3-1).

Se realizaron otras tentativas para aislar conjuntos de células a partir de cordón umbilical mediante diferentes enfoques. En un caso, se cortó en rodajas cordón umbilical y se lavó con medio de crecimiento para sacar los coágulos de sangre y el material gelatinoso. Se recogió la mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de crecimiento y se centrifugó a 150 x g. El sedimento se resuspendió y se sembró en matraces recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. A partir de estos experimentos, se aisló una población de células que proliferó rápidamente.

También se han aislado células a partir de muestras de sangre de cordón umbilical obtenido del NDRI. El protocolo de aislamiento utilizado fue el de la solicitud de patente internacional WO 2003/025149 de Ho *et al.* (Ho, T.W., *et al.*, "Cell Populations Which Co-Express CD49C and CD90," solicitud n° PCT/US02/29971). Se mezclaron muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre de cordón umbilical (NDRI, Filadelfia PA) con tampón de lisis (cloruro de amonio 155 milimolar esterilizado por filtración, bicarbonato potásico 10 milimolar, EDTA 0,1 milimolar tamponado a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron en una relación 1:20 de sangre de cordón umbilical y tampón de lisis. La suspensión de células resultante se agitó en vórtex durante 5 segundos y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 x g). El sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contenía suero fetal bovino al 10 por ciento (Hyclone, Logan UT), glutamina 4 milimolar (Mediatech, Herndon, VA), penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro (Gibco, Carlsbad, CA). Se centrifugaron las células resuspendidas (10 minutos a 200 x g), se aspiró el sobrenadante, y el sedimento celular se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en matraces T75 (Corning, NY), en matraces T75 recubiertos con laminina, o en matraces T175 recubiertos de fibronectina (ambos de Becton Dickinson, Bedford, MA).

Para determinar si las poblaciones de células podían aislarse en diferentes condiciones y proliferar en diversas condiciones inmediatamente después del aislamiento, se digirieron las células en medio de crecimiento con o sin 2-mercaptoetanol al 0,001 por ciento (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), utilizando la combinación de enzimas de C:D:H, según los procedimientos proporcionados anteriormente. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro. En todas las condiciones ensayadas las células se fijaron y proliferaron bien entre el pase 0 y 1 (Tabla 3-2). Las células en las condiciones 5-8 y 13-16 se demostraron proliferar bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se crioconservaron.

La combinación de C:D:H proporcionó el mejor rendimiento celular después del aislamiento, y las células generadas proliferaron durante muchas más generaciones en cultivo que en las demás condiciones (Tabla 3-1). No se logró una población de células que pudiese proliferar utilizando colagenasa o hialuronidasa en solitario. No se realizó ningún intento para determinar si este resultado es específico de la colagenasa que se ensayó.

Tabla 3-1: Aislamiento de células a partir de tejido de cordón umbilical utilizando diversas combinaciones de enzimas

	Digestión enzimática	Células aisladas	Proliferación celular
5	Colagenasa	X	X
	Dispasa	+ (> 10 h)	+
	Hialuronidasa	X	X
	Colagenasa:Dispasa	++ (< 3 h)	++
	Colagenasa:Hialuronidasa	++ (< 3 h)	+
	Dispasa:Hialuronidasa	+ (> 10 h)	+
10	Colagenasa:Dispasa:Hialuronidasa	+++ (< 3 h)	+++
	Leyenda: + = buena, ++ = muy buena, +++ = excelente, X = sin éxito		

Las células se fijaron y proliferaron bien entre el pase 0 y 1 en todas las condiciones ensayadas para la digestión enzimática y el desarrollo (Tabla 3-2). Las células en las condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se crioconservaron. Todas las células se crioconservaron para su posterior análisis.

Tabla 3-2: Aislamiento y proliferación en cultivo de células posnatales en diversas condiciones:

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

Las células nucleadas se fijaron y se desarrollaron rápidamente. Estas células se analizaron mediante citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas mediante digestión enzimática.

Las preparaciones contenían eritrocitos y plaquetas. No se fijaron ni dividieron células nucleadas durante las primeras 3 semanas. El medio se cambió 3 semanas después de la siembra y no se observó que se fijara ni desarrollara ninguna célula.

Las poblaciones de células podían aislarse a partir de tejido umbilical de manera eficaz utilizando la combinación de enzimas colagenasa (una metaloproteasa), dispasa (proteasa neutra) y hialuronidasa (enzima mucolítica que descompone el ácido hialurónico). También puede utilizarse LIBERASE™, que es una mezcla de colagenasa y una proteasa neutra. También se utilizó Blendzyme 3™, que es colagenasa (4 unidades Wunsch/gramo) y termolisina (1714 unidades de caseína/gramo) junto con hialuronidasa para aislar las células. Estas células proliferaron fácilmente durante muchos pases cuando se cultivaron en medio de proliferación en plástico recubierto con gelatina.

Las células también se aislaron de sangre residual de los cordones umbilicales, pero no de sangre del cordón umbilical. La presencia de células en los coágulos de sangre retirados por lavado del tejido, que se adhieren y se desarrollan en las condiciones utilizadas, puede deberse a células liberadas durante el proceso de disección.

EJEMPLO 4

Características de desarrollo de las células de origen posnatal

Se comparó el potencial de proliferación celular de las células de origen posnatal con otras poblaciones de células madre aisladas. El proceso de proliferación celular hasta la senescencia se denomina límite de Hayflick (Hayflick L., The longevity of cultured human cells. J. Am. Geriatr. Soc. 22(1): 1-12, 1974; Hayflick L., The strategy of senescence. Gerontologist 14(1): 37-45, 1974).

I. Materiales y métodos

Recubrimiento con gelatina de los matraces. Se recubrieron matraces de plástico de cultivo tisular añadiendo 20 mililitros de gelatina al 2% (p/v) (Tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a un matraz T75 (Corning Inc., Corning, NY) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de gelatina, se añadieron 10 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y, a continuación, se aspiraron.

Comparación del potencial de proliferación de las células de origen posnatal con otras poblaciones de células. Para la comparación del potencial de proliferación se utilizaron las siguientes poblaciones de células; i) células madre mesenquimales (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células de origen adiposo (patente estadounidense nº 6.555.374 B1; solicitud de patente estadounidense US20040058412); iii) fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote nº 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); y iv) células de origen umbilical. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. Para los pases subsiguientes, los cultivos celulares se trataron del siguiente modo. Después de la tripsinización, se realizó el recuento de células viables después de la tinción con azul de tripano. Se combinó la suspensión de células (50 microlitros) con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). Se estimó el número de células viables con un hemocitómetro.

Después del recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en 25 mililitros de medio de crecimiento recién preparado. Las células se cultivaron en atmósfera normal (dióxido de carbono al 5 por ciento (v/v)) a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia, se sometieron a pases; este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron la senescencia.

En cada pase, las células se tripsinizaban y se realizaba el recuento. Se calcularon el rendimiento de células viables, las duplicaciones de la población [$\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$], y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de la población). Con el fin de determinar de la proliferación celular óptima, se determinó el rendimiento celular total por pase multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de proliferación para cada pase (es decir, factor de proliferación = células finales/células iniciales).

Potencial de proliferación de los bancos de células a baja densidad. También se ensayó el potencial de proliferación de las células guardadas en el pase 10. Se utilizó un conjunto de condiciones diferente. Se ensayaron fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote nº 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD), células de origen umbilical y células de origen placentario. Estas poblaciones de células se habían guardado en el pase 10 con antelación, después de haber sido cultivadas a 5.000 células/cm² en cada pase hasta ese momento. Se determinó el efecto de la densidad celular sobre las poblaciones de células después de la descongelación de las células en el pase 10. Las células se descongelaron en condiciones normales, se realizó el recuento utilizando tinción con azul de tripano. A continuación, las células descongeladas se sembraron a 1.000 células/cm² en medio de crecimiento. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas normales a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces a la semana. Las células se sometían a pases a medida que alcanzaban aproximadamente el 85% de confluencia. Las células se sometieron a pases posteriormente hasta la senescencia, es decir, hasta que no pudieron proliferar más. Las células se tripsinizaron y se realizó el recuento en cada pase. Se calcularon el rendimiento celular, la duplicación de la población [$\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de la población). El rendimiento celular total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de proliferación para cada pase (es decir, factor de proliferación = células finales/ células iniciales).

Proliferación de las células de origen posnatal a baja densidad a partir de la siembra de células iniciales. El potencial de proliferación de los cultivos de células de origen posnatal recién aisladas en condiciones de siembra a baja densidad celular se ensayó en otro experimento. Se aislaron células de origen umbilical y de origen placentario como se describe en un ejemplo anterior. Las células se sembraron a 1.000 células/cm² y se sometieron a pases como se ha descrito anteriormente, hasta la senescencia. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas normales a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se sometían a pases a medida que alcanzaban aproximadamente el 85% de confluencia. En cada pase, las células se tripsinizaban y se realizaba el recuento utilizando tinción con azul de tripano. Se calcularon el rendimiento celular, la duplicación de la población [$\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de la población) para cada pase. El rendimiento celular total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de proliferación para cada pase (es decir, factor de proliferación = células finales/células iniciales). Las células se cultivaron en matraces recubiertos con gelatina y no recubiertos con gelatina.

Proliferación de las células en condiciones de cultivo en baja concentración de oxígeno. Se ha demostrado que las condiciones de cultivo celular en baja concentración de O₂ pueden mejorar la proliferación celular en determinadas circunstancias (Csete, Marie; Doyle, John; Wold, Barbara J.; McKay, Ron; Studer, Lorenz. Low oxygen culturing of central nervous system progenitor cells. US20040005704). Con el fin de determinar si la proliferación celular de las células de origen umbilical podría mejorarse modificando las condiciones de cultivo

celular, se desarrollaron cultivos de células de origen posnatal en condiciones de baja concentración de oxígeno. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en medio de crecimiento en matraces recubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente en condiciones atmosféricas normales hasta el pase 5, momento en el que se transfirieron a condiciones de cultivo en baja concentración de oxígeno (O₂ al 5%).

Otras condiciones de cultivo. En otros experimentos, las células se hicieron proliferar en placas no recubiertas, recubiertas con colágeno, recubiertas con fibronectina, recubiertas con laminina y recubiertas con matrigel. Los cultivos demostraron proliferar bien en estas diferentes matrices.

II. Resultados

Comparación del potencial de proliferación de las células de origen posnatal con otras poblaciones de células. Las células de origen umbilical y de origen placentario proliferaron durante más de 40 pases, generando rendimientos celulares de > 1E17 células en 60 días. Por el contrario, las MSC y los fibroblastos alcanzaron la senescencia después de < 25 días y < 60 días, respectivamente. Aunque tanto las células de origen adiposo como las células del epiplón proliferaron durante casi 60 días, generaron rendimientos celulares totales de 4.5E12 y 4.24E13, respectivamente. Por lo tanto, cuando se sembraron a 5.000 células/cm² en las condiciones experimentales utilizadas, las células de origen posnatal proliferaron mucho mejor que los demás tipos de células cultivadas en las mismas condiciones (Tabla 4-1).

Tabla 4-1: Características de desarrollo para diferentes poblaciones de células cultivadas hasta la senescencia

Tipo de célula	senescencia	Duplicaciones totales de la población	Rendimiento (células totales)
MSC	24 d	8	4.72 E7
Célula de origen adiposo	57 d	24	4.5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2.82 E13
Umbilical	65 d	42	6.15 E17
Placentaria	80 d	46	2.4 E19

Aumento del potencial de los bancos de células a baja densidad. Las células de origen umbilical, de origen placentario y los fibroblastos proliferaron durante más de 10 pases, generando rendimientos celulares de > 1E11 células en 60 días (Tabla 4-2). Después de 60 días en estas condiciones, los fibroblastos alcanzaron la senescencia; mientras que las poblaciones de células de origen umbilical y de origen placentario alcanzaron la senescencia después de 80 días, llevando a cabo > 50 y > 40 duplicaciones de la población, respectivamente.

Tabla 4-2: Características de desarrollo para diferentes poblaciones de células mediante proliferación a baja densidad desde el pase 10 hasta la senescencia

Tipo de célula (nº de pase)	Senescencia	Duplicaciones totales de la población	Rendimiento (células totales)
Fibroblasto (P10)	80 días	43,68	2.59 E11
Umbilical (P10)	80 días	53,6	1.25 E14
Placentaria	60 días	32,96	6.09 E12

Proliferación de las células en condiciones de cultivo en baja concentración de oxígeno. Las células proliferaron bien en las condiciones de concentración reducida de oxígeno, sin embargo, el cultivo en condiciones de baja concentración de oxígeno no parece tener un efecto significativo sobre la proliferación celular de las células de origen posnatal. Las condiciones atmosféricas normales ya han demostrado su eficacia para el desarrollo de un número suficiente de células, y no es necesario el cultivo en baja concentración de oxígeno para el desarrollo de las células de origen posnatal.

Resumen. Las actuales condiciones de proliferación celular de las células aisladas de origen posnatal en desarrollo a densidades de aproximadamente 5.000 células/cm², en medio de crecimiento en matraces no recubiertos o recubiertos con gelatina, en condiciones normales de oxígeno atmosférico, son suficientes para generar un gran número de células en el pase 11. Además, los datos sugieren que las células pueden hacerse proliferar fácilmente utilizando condiciones de cultivo a menor densidad (por ejemplo 1.000 células/cm²). La proliferación de células de origen posnatal en condiciones de baja concentración de oxígeno también facilita la proliferación celular, aunque todavía no se ha observado una mejora incremental del potencial de proliferación celular cuando se utilizan estas condiciones para el desarrollo. En la actualidad, resulta preferente el cultivo de las células de origen posnatal en condiciones atmosféricas normales para generar grandes conjuntos de células. Sin embargo, cuando se modifican las condiciones de cultivo, la proliferación de células de origen posnatal puede modificarse igualmente. Puede utilizarse esta estrategia para mejorar la capacidad de proliferación y diferenciación de estas poblaciones de células.

En las condiciones utilizadas, aunque el potencial de proliferación de las MSC y las células de origen adiposo es limitado, las células de origen posnatal proliferan fácilmente en gran cantidad.

EJEMPLO 5

5

Desarrollo de células de origen posnatal en medio que contiene D-valina

Se ha descrito que puede utilizarse un medio que contenga D-valina en lugar de la isoforma L-valina normal para inhibir selectivamente el desarrollo de células similares a fibroblastos en cultivo (Hongpaisan, Inhibition of proliferation of contaminating fibroblasts by D-valine in cultures of smooth muscle cells from human myometrium. Cell Biol Int. 2000; 24:1-7; Sordillo *et al.*, Culture of bovine mammary epithelial cells in D-valine modified medium: selective removal of contaminating fibroblasts. Cell Biol. Int. Rep.1988; 12:355-64). Se realizaron experimentos para determinar si las células de origen posnatal podrían desarrollarse en un medio que contiene D-valina.

III. Materiales y métodos

Se sembraron células de origen placentario (P3), células de origen umbilical (P5) y fibroblastos (P9) a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas se eliminó el medio y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se reemplazó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (pedido extraordinario, Gibco), suero fetal bovino dializado al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT), beta-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), penicilina a 50 unidades/mililitro y estreptomycin a 50 miligramos/mililitro (Gibco)).

IV. Resultados

Las células de origen placentario, las células de origen umbilical y los fibroblastos sembrados en el medio que contenía D-valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medio de crecimiento que contenía suero dializado. Los fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando de tamaño y cambiando de forma. Todas las células murieron y, finalmente, se desprendieron de la superficie del matraz después de cuatro semanas. Por lo tanto, se puede concluir que las células de origen posnatal necesitan L-valina para desarrollarse y para mantener la viabilidad a largo plazo. Preferentemente, la L-valina no se elimina del medio de crecimiento para las células de origen posnatal.

EJEMPLO 6

35

Análisis del cariotipo de las PPDC

Las estirpes celulares utilizadas en terapia celular son preferentemente homogéneas y carecen de cualquier tipo de célula contaminante. Las células humanas utilizadas en terapia celular deben tener un número normal (46) de cromosomas con estructura normal. Para identificar las estirpes placentaria y de cordón umbilical de las células de origen posnatal que son homogéneas y que carecen de células de origen tisular no posparto, se analizaron los cariotipos de muestras celulares.

V. Materiales y métodos

45

Se cultivaron PPDC de tejido posparto de un neonato varón en medio de crecimiento. Se seleccionó tejido posparto de un neonato varón (X,Y) para poder distinguir entre las células de origen neonatal y las células de origen materno (X,X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y proliferaron hasta el 80% de confluencia. Un matraz T25 que contenía las células se llenó hasta el cuello con medio de crecimiento. Las muestras se enviaron a un laboratorio de citogenética clínica por mensajería (se estima que el tiempo de transporte de un laboratorio al otro es de una hora). El análisis cromosómico fue realizado por el Centro de Genética Humana y Molecular de la Escuela de Medicina de Nueva Jersey, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase, cuando los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células en metafase contadas, cinco se analizaron en busca de un número de cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra celular se caracterizaba como homogénea si se observaban dos cariotipos. Una muestra celular se caracterizaba como heterogénea si se observaban más de dos cariotipos. Se realizó el recuento de células en metafase adicionales y se analizaron cuando se identificaba un número de cariotipo heterogéneo (cuatro).

VI. Resultados

60

El personal del laboratorio de citogenética interpretó que todas las muestras celulares enviadas para el análisis cromosómico tenían una apariencia normal. Tres de las dieciséis estirpes celulares analizadas presentaron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) que indicaba la presencia de células procedentes de ambos orígenes neonatal y materno (Tabla 6-1). Las células procedentes del tejido Placenta-N se aislaron del aspecto neonatal de la placenta. En el pase cero, esta estirpe celular parecía ser homogénea XY. Sin embargo, en el pase nueve, la estirpe celular

65

era heterogénea (XX/XY), lo que indica una presencia no detectada previamente de células de origen materno. Cada una de las muestras celulares se caracterizó como homogénea. (Tabla 6-1).

Tabla 6-1. Resultados del cariotipo de las PPDC.

Tejido	Pase	Células en metafase contadas	Células en metafase analizadas	Número de cariotipos	Cariotipo ISCN
Placenta	22	20	5	2	46,XX
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Placenta	2	20	5	2	46, XX
Umbilical	3	20	5	2	46, XX
Placenta-N	0	20	5	2	46, XY
Placenta-V	0	20	5	2	46, XY
Placenta-M	0	21	5	4	46, XY[18]/ 46,XX[3]
Placenta-M	4	20	5	2	46,XX
Placenta-N	9	25	5	4	46, XY[5]/ 46,XX[20]
Placenta-N C1	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C3	1	20	6	4	46, XY[2]/ 46,XX[18]
Placenta-N C4	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C15	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C20	1	20	5	2	46, XY
Placenta-N C22	1	20	5	2	46, XY

Leyenda: N- lado neonatal; V- zona de las vellosidades; M- lado materno; C- clon

Resumen. El análisis cromosómico identificó las PPDC de origen placentario y de origen umbilical cuyos cariotipos parecían normales tal como interpretó un laboratorio de citogenética clínica. El análisis del cariotipo también identificó estirpes celulares carentes de células maternas, determinado por un cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 7

Evaluación mediante citometría de flujo de marcadores de superficie de células humanas de origen posnatal

Puede utilizarse la caracterización de proteínas de superficie celular o "marcadores" mediante citometría de flujo para determinar la identidad de una estirpe celular. La coherencia de la expresión puede determinarse a partir de múltiples donantes, y en las células expuestas a diferentes condiciones de procesamiento y cultivo. Las estirpes de células posparto aisladas a partir de cordón umbilical se caracterizaron mediante citometría de flujo, lo que proporcionó un perfil para la identificación de estas estirpes celulares.

VII. Materiales y métodos

Medios y recipientes de cultivo. Las células se cultivaron en medio de crecimiento, en matraces de cultivo tisular T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta la confluencia. Las superficies de cultivo de los matraces se recubrieron con gelatina incubando gelatina al 2% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Tinción con anticuerpos. Las células adherentes de los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, MO) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1x10⁷ por mililitro. Según las especificaciones del fabricante, se añadió el anticuerpo contra el marcador de superficie celular de interés (véase más adelante) a 100 microlitros de suspensión de células y la mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo.

Análisis de citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Anticuerpos contra marcadores de superficie celular. Se utilizaron los siguientes anticuerpos contra marcadores de superficie celular.

Tabla 7-1: Anticuerpos utilizados en la caracterización de los marcadores de superficie celular de las UDC.

5

10

15

20

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

25

Comparación de las células de origen placentario y de origen umbilical. Se compararon las células de origen placentario con las células de origen umbilical en el pase 8.

Comparación entre pases. Las células de origen placentario y de origen umbilical se analizaron en los pases 8, 15 y 20.

30

Comparación entre donantes. Para comparar las diferencias entre donantes, se compararon entre sí las células de origen placentario de diferentes donantes, y se compararon entre sí las células de origen umbilical de diferentes donantes.

35

Comparación del recubrimiento de superficie. Se compararon las células de origen placentario cultivadas en matraces recubiertos con gelatina con las células de origen placentario cultivadas en matraces no recubiertos. Se compararon las células de origen umbilical cultivadas en matraces recubiertos con gelatina con las células de origen umbilical cultivadas en matraces no recubiertos.

40

Comparación de las enzimas de digestión. Se compararon cuatro tratamientos utilizados para el aislamiento y la preparación de las células. Se compararon las células procedentes de tejido posparto mediante tratamiento con 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispasa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispasa.

45

Comparación entre capas placentarias. Se compararon las células aisladas a partir del aspecto materno del tejido placentario con las células aisladas a partir de la región de las vellosidades del tejido placentario y las células aisladas a partir del aspecto fetal neonatal de la placenta.

50

Se compararon las células de origen placentario con las células de origen umbilical. Las células de origen placentario y de origen umbilical analizadas mediante citometría de flujo fueron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, indicado por el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la expresión detectable de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por los valores de fluorescencia comparables a los del control IgG. Se contabilizaron las variaciones de los valores de fluorescencia de las curvas positivas. La media (es decir, CD13) y el rango (es decir, CD90) de las curvas positivas mostraron cierta variación, pero las curvas parecían normales, lo que confirma una población homogénea. Ambas curvas presentaron individualmente valores superiores a los del control IgG.

60

Comparación entre pases de las células de origen placentario. Todas las células de origen placentario en los pases 8, 15 y 20 analizadas mediante citometría de flujo fueron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como refleja el aumento del valor de fluorescencia con respecto al control IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, que tenían valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

65

Comparación entre pases de las células de origen umbilical. Todas las células de origen umbilical en el pase 8, 15 y 20 analizadas mediante citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y

HLA-A,B,C, indicado por el aumento de la fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, indicado por valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

5 **Comparación entre donantes de las células de origen placentario.** Cada una de las células de origen placentario aisladas a partir de distintos donantes analizadas mediante citometría de flujo expresó CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, con un aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Las células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indica el valor de fluorescencia coherente con el control IgG.

10 **Comparación entre donantes de las células de origen umbilical.** Cada una de las células de origen umbilical aisladas a partir de distintos donantes analizadas mediante citometría de flujo fue positiva para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ con valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

15 **Efecto del recubrimiento de superficie con gelatina sobre las células de origen placentario.** Todas las células de origen placentario que proliferaron en matraces no recubiertos o recubiertos con gelatina, analizadas mediante citometría de flujo, expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, que se refleja en el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ indicado por valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

20 **Efecto del recubrimiento de superficie con gelatina sobre las células de origen umbilical.** Todas las células de origen umbilical que proliferaron en matraces no recubiertos y recubiertos con gelatina, analizadas mediante citometría de flujo, fueron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, con un aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ, con valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

25 **Evaluación del efecto del procedimiento de digestión enzimática utilizado para la preparación y el aislamiento de las células sobre el perfil de los marcadores de superficie celular.** Todas las células de origen placentario aisladas utilizando diversas enzimas de digestión analizadas mediante citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como indica el aumento de los valores de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indican los valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

30 **Comparación entre capas placentarias.** Las células procedentes de las capas materna, de las vellosidades, y neonatal de la placenta, respectivamente, analizadas mediante citometría de flujo fueron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, como indica el aumento del valor de fluorescencia con respecto al control IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ como indican los valores de fluorescencia coherentes con el control IgG.

35 **Resumen.** El análisis de las células posnatales de origen placentario y de origen umbilical mediante citometría de flujo ha acreditado la identidad de estas estirpes celulares. Las células posnatales de origen placentario y de origen umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-A,B,C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR,DP,DQ. Esta identidad se mantenía constante entre las variaciones de las variables incluidas el donante, el pase, el recubrimiento de superficie del recipiente de cultivo, las enzimas de digestión y la capa placentaria. Se observaron ciertas variaciones en las medias y los rangos de la curva del histograma del valor de fluorescencia individual, pero todas las curvas positivas en todas las condiciones ensayadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia superiores a los del control IgG, lo que confirma que las células comprenden una población homogénea que presenta expresión positiva de los marcadores.

40 **EJEMPLO 8**

45 **Análisis de las células mediante matriz de oligonucleótidos**

50 Se utilizaron matrices de oligonucleótidos para comparar los perfiles de expresión génica de las células de origen umbilical y de origen placentario con fibroblastos, células madre mesenquimales humanas y otra estirpe celular procedente de médula ósea humana. Este análisis proporcionó una caracterización de las células de origen posnatal e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

55 **IX. Materiales y métodos**

60 **Aislamiento y cultivo de células**

Células procedentes de tejido posparto. Se obtuvieron cordones umbilicales y placentas humanas del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) procedentes de partos normales a término con el consentimiento de la paciente. Se recibieron los tejidos y las células se aislaron como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en medio de crecimiento en matraces de plástico de cultivo tisular recubiertos con gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%.

Fibroblastos. Se adquirieron fibroblastos dérmicos humanos de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; número de lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas estirpes se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero fetal bovino al 10% (v/v) (Hyclone) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen)). Las células se cultivaron en plástico convencional tratado para cultivo tisular.

Células madre mesenquimales humanas (hMSC). Se adquirieron hMSC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; lotes nº 2F1655, nº 2F1656 y nº 2F1657) y se cultivaron según las especificaciones del fabricante en medio MSCGM (Cambrex). Las células se cultivaron en plástico convencional para cultivo tisular a 37°C con CO₂ al 5%.

Células de médula ósea de cresta iliaca humana (ICBM). Se recibió médula ósea de cresta iliaca humana del NDRI con el consentimiento del paciente. La médula se procesó según el método descrito por Ho, *et al.* (WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM y EDTA 0,1 mM, pH 7,2) en una relación de 1 parte de médula ósea y 20 partes de tampón de lisis. La suspensión de células se agitó en vórtex, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo alfa (Invitrogen) complementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) y glutamina 4 mM. Las células se centrifugaron de nuevo y el sedimento celular se resuspendió en medio recién preparado. Se realizó el recuento de células mononucleares viables mediante exclusión con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de plástico para cultivo tisular a 5 x 10⁴ células/cm². Las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% en condiciones normales de O₂ atmosférico o de O₂ al 5%. Las células se cultivaron durante 5 días sin cambio de medio. El medio y las células no adherentes se eliminaron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

Aislamiento de ARNm y análisis GENECHIP. Los cultivos de células en crecimiento activo se eliminaron de los matraces con un raspador de células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS recién preparado y se centrifugaron de nuevo. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. Se extrajo el ARNm celular y se transcribió a ADNc. A continuación, el ADNc se transcribió a ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con las matrices de oligonucleótidos GENECHIP HG-U133A de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA). La hibridación y la recogida de datos se realizaron según las especificaciones del fabricante. Los análisis de datos se realizaron con el programa informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Tusher, V.G. *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 5116-5121). Las licencias para el software de análisis están disponibles en la Oficina de Licencias Tecnológicas de la Universidad de Stanford, y se dispone de más información en la Universidad de Stanford; Tusher, V.G. *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 5116-5121.

II. Resultados

En este estudio se analizaron catorce poblaciones de células diferentes. Las células junto con la información sobre el pase, el sustrato de cultivo y los medios de cultivo aparecen en la Tabla 8-1.

Tabla 8-1. Células analizadas mediante estudio de micromatrices. Las estirpes celulares aparecen ordenadas por sus códigos de identificación junto con el pase en el momento del análisis, el sustrato de crecimiento celular y los medios de crecimiento.

	Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, □IME
	Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, □IME
	Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, □IME
	Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, FBS al 15%. □IME
	Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, □IME
	Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, FBS al 15%, □IME
	ICBM (070203) (O ₂ al 5%)	3	Plástico	MEM, FBS al 10%
	ICBM (062703) (conc. norm. de O ₂)	5	Plástico	MEM, FBS al 10%
	ICBM (062703) (O ₂ al 5%)	5	Plástico	MEM, FBS al 10%
	hMSC (lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
	hMSC (lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
	hMSC (lote 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
	Fibroblasto h. (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%
	Fibroblasto h. (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, FBS al 10%

Los datos se evaluaron mediante el análisis de componentes principales con el programa SAM como se ha descrito anteriormente. El análisis puso de manifiesto 290 genes que se expresaban en diferentes cantidades relativas en las células ensayadas. Este análisis proporcionó comparaciones relativas entre las poblaciones.

5 La tabla 8-2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclidianas se basaron en la comparación de las células basándose en los 290 genes con expresión diferencial entre los tipos de células. La distancia euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

10 **Tabla 8-2.** Distancias euclidianas para los pares de células. La distancia euclidiana se calculó para los tipos de células utilizando los 290 genes con expresión diferencial entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclidiana.

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

25 Las Tablas 8-3, 8-4 y 8-5 muestran la expresión de genes aumentada en las células de origen placentario (Tabla 8-3), aumentada en las células procedentes de tejido umbilical (Tabla 8-4) y reducida en las células de origen umbilical y de origen placentario (Tabla 8-5).

30 **Tabla 8-3.** Genes con expresión aumentada específicamente en las células de origen placentario en comparación con las demás estirpes celulares ensayadas.

Genes con expresión aumentada en las células de origen placentario		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI
209732_at	Lectina de tipo C (dependiente del calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro 2 de la superfamilia (inducida por activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor de Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	Familia de aldehído deshidrogenasas 1, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	Receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina)	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parcial	AF070642
202178_at	Proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	Proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	Regulada por disminución en el cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113)	AI246730

50 **Tabla 8-4.** Genes con expresión aumentada específicamente en células de origen umbilical en comparación con las demás estirpes celulares ensayadas.

Genes con expresión aumentada en las células de origen umbilical		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI
202859_x_at	Interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	Interleucina 8	AF043337
210222_s_at	Reticulón 1	BC000314
204470_at	Ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento de melonoma)	NM_001511
206336_at	Ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica para granulocitos)	NM_002993
207850_at	Ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C)	NM_002090
203485_at	Reticulón 1	NM_021136
202644_s_at	Factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa	NM_006290

Tabla 8-5. Genes con expresión disminuida en las células de origen umbilical y de origen placentario en comparación con las demás estirpes celulares ensayadas.

Genes con expresión disminuida en las células de origen umbilical y placentario		
ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de registro del NCBI
210135_s_at	Caja homeótica de la baja estatura 2	AF022654.1
205824_at	Proteína 2 de choque térmico de 27 kDa	NM_001541.1
209687_at	Ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)	U19495.1
203666_at	Ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)	NM_000609.1
212670_at	Elastina (estenosis aórtica supralvalvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	Caja homeótica de mesénquima 2 (caja homeótica específica de la detención del crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	Homólogo 1 de la caja homeótica de "sine oculis" (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
209283_at	Cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	Activador de la morfogénesis 2 asociado a "disheveled"	BF513244
213488_at	Proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	Similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	Tetranectina (proteína de unión a plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	Dominio 3 de homología con src (SH3) y rico en cisteínas	NM_003149.1
200921_s_at	Gen de translocación de linfocitos B, antiproliferativa	NM_001731.1
206932_at	Colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	Factor de transcripción 3 relacionado con el enanismo	AA541630
219747_at	Proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	Receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
202465_at	Potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa	NM_002593.2
203706_s_at	Homólogo 7 de "frizzled" (<i>Drosophila</i>)	NM_003507.1
212736_at	Gen hipotético BC008967	BE299456
214587_at	Colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	Tenascina C (hexabraquión)	NM_002160.1
210239_at	Proteína 5 de la caja homeótica de "iroquois"	U90304.1
203903_s_at	Hefaestina	NM_014799.1
205816_at	Integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	Glicoproteína 2 de vesícula sináptica	NM_014849.1
213909_at	ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	Factor 1 tipo receptor de citocinas	NM_004750.1
204401_at	Canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia/baja, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1

(continuación)

	216331_at	Integrina, alfa 7	AK022548.1
	209663_s_at	Integrina, alfa 7	AF072132.1
5	213125_at	Proteína DKFZP586L	AW007573
	202133_at	Coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
	206511_s_at	Homólogo 2 de la caja homeótica de "sine oculis" (<i>Drosophila</i>)	NM_016932.1
10	213435_at	Proteína KIAA1034	AB028957.1
	206115_at	Respuesta de crecimiento precoz 3	NM_004430.1
	213707_s_at	Caja homeótica de "distal-less" 5	NM_005221.3
	218181_s_at	Proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
15	209160_at	Familia 1 de aldo-ceto reductasas, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II)	AB018580.1
	213905_x_at	Biglicano	AA845258
	201261_x_at	Biglicano	BC002416.1
	202132_at	Coactivador de la transcripción con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
20	214701_s_at	Fibronectina 1	AJ276395.1
	213791_at	Proencefalina	NM_006211.1
	205422_s_at	Integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición tipo EGF)	NM_004791.1
25	214927_at	Inserto de longitud completa de ARNm de <i>Homo sapiens</i> , clon de ADNc EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
	206070_s_at	EphA3	AF213459.1
	212805_at	Proteína KIAA0367	AB002365.1
	219789_at	Receptor del péptido natriurético tipo C/guanilato ciclasa C (receptor del péptido natriurético atrial tipo C)	AI628360
30	219054_at	Proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
	213429_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
35	204929_s_at	Proteína 5 de membrana asociada a vesículas (miobrevina)	NM_006634.1
	201843_s_at	Proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contienen EGF	NM_004105.2
	221478_at	Similar a proteína 3 de interacción con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa	AL132665.1
40	201792_at	Proteína 1 de unión a AE	NM_001129.2
	204570_at	Polipéptido 1 de la subunidad VIIa de la citocromo c oxidasa (músculo)	NM_001864.1
	201621_at	Neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
45	202718_at	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento insulinoide, 36 kDa	NM_000597.1

Las Tablas 8-6, 8-7 y 8-8 muestran la expresión de genes aumentada en los fibroblastos humanos (Tabla 8-6), las células ICBM (Tabla 8-7) y las MSC (Tabla 8-8).

Tabla 8-6. Genes con expresión aumentada en los fibroblastos en comparación con las demás estirpes celulares ensayadas.

Genes con expresión aumentada en los fibroblastos	
55	fosfatasa de doble especificidad 2
	proteína KIAA0527
	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23224 fis, clon ADSU02206
60	dineína, citoplasmática, polipéptido intermedio 1
	anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G)
	inhibina, beta A (activina A, activina AB, polipéptido alfa)
	ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función supuesta)
	proteína KIAA1053
65	proteína asociada a microtúbulos 1A
	proteína con dedos de zinc 41
	proteína HSPC019

(continuación)

	ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23564 fis, clon LNG10773
5	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	proteína LIM (similar a enigma de unión a proteína quinasa C de rata)
	inhibidor del potenciador del gen del polipéptido de cadena ligera kappa en los linfocitos B, proteína asociada a complejo quinasa
	proteína hipotética FLJ22004
10	secuencia de ARNm humano (clon CTG-A4)
	EST, Moderadamente similares al factor 2 de tipo receptor de citocinas; precursor del receptor de citocinas CRL2 [<i>Homo sapiens</i>]
	factor de crecimiento transformante, beta 2
	proteína hipotética MGC29643
15	antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2

Tabla 8-7. Genes con expresión aumentada en las células procedentes de ICBM en comparación con las demás estirpes celulares ensayadas.

Genes con expresión aumentada en las células ICBM	
	• proteína con repeticiones de anquirina cardiaca
	• MHC clase I, región ORF
	• integrina, alfa 10
20	• proteína hipotética FLJ22362
25	• UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
	• proteína inducida por interferón 44
	• caja SRY (región Y determinante del sexo)-9 (displasia campomélica, inversión sexual autosómica)
	• proteína-1 asociada a queratina 1
	• tipo hipocalcina 1
30	• jagged 1 (síndrome de Alagille)
	• proteoglicano 1, gránulo secretor

Tabla 8-8. Genes con expresión aumentada en las células MSC en comparación con las demás estirpes celulares ensayadas.

Genes con expresión aumentada en las células MSC	
	• interleucina 26
	• maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
40	• subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
	• homólogo del oncogén viral de osteosarcoma murino v-fos FBJ
	• proteína hipotética DC42
	• subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
45	• homólogo B del oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ
	• proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT1
	• secuencia transformante derivada de estirpe celular MCF.2
	• canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
	• homeoproteína clase paired de cartílago 1
50	• ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
	• ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
	• protooncogén jun B
	• LLC de linfocitos B/linfoma 6 (proteína con dedos de zinc 51)
	• proteína con dedos de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

55 **Resumen.** El presente estudio se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células posnatales procedentes de cordón umbilical y de placenta. Este análisis incluyó células procedentes de tres cordones umbilicales diferentes y de tres placentas diferentes. El estudio también incluyó dos estirpes diferentes de fibroblastos dérmicos, tres estirpes de células madre mesenquimales y tres estirpes celulares de médula ósea de cresta ilíaca. El ARNm que fue expresado por estas células se analizó en una matriz de oligonucleótidos GENECHIP que contenía sondas oligonucleotídicas para 22.000 genes.

60 El análisis puso de manifiesto que los transcritos de 290 genes estaban presentes en diferentes cantidades en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen diez genes con expresión aumentada específicamente en las células de origen placentario y siete genes con expresión aumentada específicamente en las células procedentes de tejido umbilical. Se descubrió que cincuenta y cuatro genes tenían niveles de expresión específicamente más bajos en placenta y en cordón umbilical.

La expresión de los genes seleccionados se ha confirmado mediante PCR, como se muestra en el Ejemplo 7. Las células de origen posnatal en general y las células de origen umbilical, en particular, tienen distintos perfiles de expresión génica, por ejemplo, en comparación con otras células humanas, tales como las células procedentes de médula ósea y los fibroblastos ensayados en el presente documento.

5

EJEMPLO 9

Marcadores celulares en las células de origen posnatal

Se compararon los perfiles de expresión génica de las células procedentes de placenta y cordón umbilical humanos con los de células procedentes de otras fuentes utilizando un GENECHIP de Affymetrix. Se identificaron seis genes "firma": receptor 1 de LDL oxidada, interleucina 8 (IL-8), renina, reticulón, ligando 3 del receptor de quimiocinas (ligando 3 de CXC) y proteína 2 quimiotáctica para granulocitos (GCP-2). Estos genes "firma" se expresaron a niveles relativamente altos en las células de origen umbilical.

15

Los procedimientos descritos en este ejemplo se llevaron cabo para verificar los datos de las micromatrices y comparar los datos para la expresión génica y de proteínas, así como para establecer una serie de ensayos fiables para la detección de identificadores únicos para las células de origen posnatal.

20

X. Materiales y métodos

Células. Se cultivaron células de origen placentario (tres aislados, incluido un aislado predominantemente neonatal (como se determina mediante análisis del cariotipo), células de origen umbilical (cuatro aislados), y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatales y adultos) en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos con gelatina. Se cultivaron células madre mesenquimales (MSC) en medio Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit (MSCGM; Cambrex, Walkerville, MD).

25

Para los experimentos de IL-8, las células en nitrógeno líquido se descongelaron y se sembraron en matraces recubiertos con gelatina a 5.000 células/cm², se cultivaron durante 48 horas en medio de crecimiento y, a continuación, se cultivaron adicionalmente durante 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero [DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomina (50 microgramos/mililitro) (Gibco) y albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. A continuación, se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los residuos celulares. Los sobrenadantes se congelaron a -80°C hasta el análisis ELISA.

30

35

Cultivo celular para el ensayo ELISA. Se cultivaron células procedentes de placenta y de cordón umbilical humanos, así como fibroblastos humanos procedentes de prepucio neonatal humano, en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos con gelatina. Las células se congelaron en el paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 ml. Después de centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se realizó el recuento. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² que contenía 15 mililitros de medio de crecimiento a 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El medio de privación de suero se recogió al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20°C.

40

45

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

50

Ensayo ELISA. La cantidad de IL-8 secretada por las células al medio de privación de suero se analizó mediante ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se llevaron a cabo según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

55

Aislamiento de ARN total. Se extrajo ARN de fibroblastos y células de origen posnatal confluentes, o para determinar la expresión de IL-8, a partir de células tratadas como se ha descrito anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante (RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA). El ARN se extrajo según las instrucciones del fabricante (RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a tratamiento con ADNasa (2,7 unidades/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. El ARN también se extrajo de cordón umbilical humano. Se suspendió tejido (30 miligramos) en 700 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente y la extracción de ARN transcurrió según las especificaciones del fabricante. El ARN se extrajo con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C.

60

65

Transcripción inversa. El ARN se sometió a transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

5 Los genes que se determinó, mediante una micromatriz de ADNc, estaban regulados de manera exclusiva en las células posnatales (genes firma - incluidos receptor de LDL oxidada, interleucina 8, renina y reticulón), se investigaron adicionalmente mediante PCR en tiempo real y convencional.

10 **PCR en tiempo real.** La PCR se realizó sobre muestras de ADNc utilizando productos de expresión génica que se comercializan con el nombre comercial de productos de expresión génica ASSAYS-ON-DEMAND (Applied Biosystems). Se mezclaron receptor de LDL oxidada (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulón (Hs00382515); ligando 3 de CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH con ADNc y TaqMan™ Universal PCR Master Mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) utilizando un sistema de detección de 7.000 secuencias con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los datos PCR se analizaron según las especificaciones del fabricante (boletín del usuario nº 2 de Applied Biosystems para el sistema "ABI PRISM 7700 Sequence Detection System").

20 **PCR convencional.** La PCR convencional se realizó con un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. La PCR se realizó utilizando 2 microlitros de solución de ADNc (1x Taq polimerasa (nombre comercial AMPLITAQ GOLD) tampón de reacción de PCR Universal Mix (Applied Biosystems) y desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. La amplificación se optimizó para cada juego de cebadores. Para IL-8, ligando 3 de CXC y reticulón (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para receptor de LDL oxidada y GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores utilizados para la amplificación aparecen en la Tabla 9-1. La concentración de cebador en la reacción de PCR final fue de 1 micromolar a excepción de la GAPDH que fue de 0,5 micromolar. Los cebadores para GAPDH fueron los mismos que para la PCR en tiempo real, salvo que no se añadió la sonda TaqMan™ del fabricante a la reacción de PCR final. Las muestras se separaron en gel de agarosa al 2% (p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes se captaron en película 667 (Universal Twinpack, VWR International, South Plainfield, NJ), con una cámara POLAROID con distancia focal fija (VWR International, South Plainfield, NJ).

35 **Tabla 9-1: Cebadores utilizados**

Nombre del cebador	Cebadores
Receptor de LDL oxidada	S: 5'- GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO:1) A: 5'-AGAATGGAAAACCTGGAATAGG -3' (SEQ ID NO:2)
Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC -3' (SEQ ID NO:3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG -3' (SEQ ID NO:4)
Reticulón	S: 5'- TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO:5) A: 5'- AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO:6)
Interleucina 8	S: 5'- TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO:7) A: 5'-CTTCAAAAATTCTCCACAACC- 3' (SEQ ID NO:8)
Ligando 3 de quimiocina (CXC)	S: 5'- CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:9) A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC -3' (SEQ ID NO: 10)

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

60 Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA), y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para tener acceso a los antígenos intracelulares. Cuando el epítomo de interés se encontraba situado en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitía el Triton X-100 en todas las etapas del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítomos. Además, en los casos en los que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó suero de burro al 3%

(v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el proceso. A continuación, se aplicaron a los cultivos los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpos primarios se eliminaron y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían el bloque, junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o de cabra anti-IgG de conejo - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o de burro anti-IgG de cabra - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). A continuación, los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia utilizando un filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representaba la señal de fluorescencia sobre la tinción control donde se siguió todo el procedimiento esbozado anteriormente con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario (sin control 1°). Se capturaron imágenes representativas con una cámara de vídeo digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se obtuvo utilizando solamente un filtro de emisión a la vez. A continuación, se prepararon los montajes en capas con el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Preparación de células para el análisis FACS. Las células adherentes de los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron, y resuspendieron con FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 /mililitro. Se llevaron alícuotas de cien microlitros a tubos cónicos. Las células teñidas para los antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadió a las alícuotas el anticuerpo según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo sobrante. Las células que necesitaban un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de FBS al 3%. Se añadió el anticuerpo secundario según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo secundario sobrante. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 ml de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 de LDL oxidada (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GRO α (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 kappa de ratón (P-4685 y M-5284; Sigma), y anticuerpo de burro contra IgG de cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech).

Análisis FACS. El análisis de citometría de flujo se realizó con un FACScalibur™ (Becton Dickinson San Jose, CA).

XI. Resultados

Los resultados de la PCR en tiempo real para los genes "firma" seleccionados realizada en ADNc de células procedentes de cordón umbilical humano, fibroblastos adultos y neonatales, y células madre mesenquimales (MSC) indican que la expresión de reticulón y del receptor de LDL oxidada fue mayor en las células de origen umbilical en comparación con otras células. Los datos obtenidos a partir de la PCR en tiempo real se analizaron mediante el método $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ligando 3 de CXC y GCP-2 entre las células posnatales y los controles. Los resultados de la PCR en tiempo real se confirmaron mediante PCR convencional. La secuenciación de los productos de PCR validó adicionalmente estas observaciones. No se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de ligando 3 de CXC entre las células posnatales y los controles utilizando los cebadores para ligando 3 de CXC de PCR convencional que aparecen en la Tabla 9-1.

La expresión de la citocina IL-8 en células posnatales fue elevada tanto en las células de origen posnatal cultivadas en medio de crecimiento como las privadas de suero. Todos los datos de PCR en tiempo real fueron validados con PCR convencional y mediante la secuenciación de los productos de PCR.

Después del desarrollo en medio sin suero, se examinaron los medios acondicionados para detectar la presencia de IL-8. Las mayores cantidades de IL-8 se detectaron en los medios en los que se habían cultivado las células umbilicales y algunos aislados de células de origen placentario (Tabla 9-2). No se detectó IL-8 en el medio en el que se habían cultivado los fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 9-2: Expresión proteica de IL-8 medida mediante ELISA

Tipo de célula	IL-8
Fibroblastos humanos	ND
Aislado de placenta 1	ND
Aislado de UMBC 1	2.058,42±144,67
Aislado de placenta 2	ND
Aislado de UMBC 2	2.368,86±22,73
Aislado de placenta 3 (concentración normal de O ₂)	17,27±8,63
Aislado de placenta 3 (baja concentración de O ₂ , sin BME)	264,92±9,88
Resultados del ensayo ELISA para la interleucina 8 (IL-8) realizados en células de origen placentario y umbilical, así como fibroblastos de piel humana. Los valores se presentan como picogramos/millón de células, n = 2, e.e.m.	
ND: no detectado	

Las células de origen placentario también se examinaron para detectar la expresión del receptor de LDL oxidada, GCP-2 y GROalfa mediante análisis FACS. Las células fueron positivas para GCP-2. No se detectaron receptor de LDL oxidada ni GRO mediante este método.

También se ensayaron células de origen placentario para detectar la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), células procedentes de la placenta humana se fijaron con paraformaldehído al 4% y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: factor de von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, alfa actina de músculo liso y vimentina. Las células mostraron tinción positiva tanto para alfa actina de músculo liso como para vimentina. Este patrón se conservó hasta el pase 11. Sólo unas pocas células (< 5%) en el pase 0 mostraron tinción positiva para citoqueratina 18.

Se ensayaron células procedentes del cordón umbilical humano en el pase 0 para detectar la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: factor de von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, alfa actina de músculo liso y vimentina. Las células de origen umbilical fueron positivas para alfa actina de músculo liso y vimentina, siendo el patrón de tinción constante hasta el pase 11.

Las células de origen placentario en el pase 11 también se investigaron mediante inmunocitoquímica para detectar la producción de GROalfa y GCP-2. Las células de origen placentario fueron positivas para GCP-2, pero no se detectó producción de GROalfa mediante este método.

La producción de GROalfa, GCP-2, receptor 1 de LDL oxidada y reticulón (NOGO-A) en las células de origen umbilical en el pase 11 se investigó mediante inmunocitoquímica. Las células de origen umbilical fueron positivas para GCP-2, pero no se detectó producción de GROalfa mediante este método. Además, las células fueron positivas para NOGO-A.

Resumen. Se ha establecido la concordancia entre los niveles de expresión génica medida mediante micromatriz y PCR (tanto en tiempo real como convencional) para cuatro genes: receptor 1 de LDL oxidada, renina, reticulón e IL-8. La expresión de estos genes estaba regulada de manera diferencial a nivel de ARNm en las células de origen posnatal, estando la IL-8 también regulada de manera diferencial a nivel de proteínas. No se detectó presencia de receptor de LDL oxidada a nivel de proteínas mediante análisis FACS en las células procedentes de la placenta. La expresión diferencial de GCP-2 y ligando 3 de CXC no se confirmó a nivel de ARNm; sin embargo, se detectó GCP-2 a nivel de proteínas mediante análisis FACS en las células de origen placentario. Aunque este resultado no respalda los datos obtenidos originariamente a partir del experimento de micromatrices, esto puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

Inmediatamente después del aislamiento (pase 0), las células procedentes de la placenta humana mostraron tinción positiva para alfa actina de músculo liso y para vimentina. Este patrón también se observó en las células en el pase 11. Estos resultados sugieren que la expresión de vimentina y de alfa actina del músculo liso puede conservarse en las células durante los pases, al menos en el medio de crecimiento utilizado en el presente documento.

Se ensayaron células procedentes del cordón umbilical humano en el pase 0 para detectar la expresión de alfa actina de músculo liso y vimentina, y fueron positivas para ambas. El patrón de tinción se conservó hasta el pase 11.

En conclusión, los datos del ARNm completo verifican al menos parcialmente los datos obtenidos de los experimentos con micromatrices.

EJEMPLO 10

Caracterización inmunohistoquímica de los fenotipos de las PPDC

Se analizaron mediante inmunohistoquímica los fenotipos de las células presentes en el tejido posparto humano (placenta y cordón umbilical).

XII. Materiales y métodos

Preparación de tejidos. Se recolectó tejido placentario y de cordón umbilical humano y se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v) durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (véase la Tabla 10-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, generada contra conejo; Sigma; o 1:300, generada contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa actina de músculo liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (CD34 humano Clase III; 1:100; DAKO Cytomation, Carpinteria, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores: anti-GROalfa humana-PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-GCP-2 humana (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-receptor 1 de LDL oxidada humano (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGO-A humana (1:100; Santa Cruz Biotech). Las muestras fijadas se recortaron con un bisturí y se colocaron dentro de compuesto de inclusión OCT (Tissue-Tek PTU; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. A continuación, se cortaron los bloques congelados (10 micras de espesor) utilizando un criostato convencional (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para la tinción.

Inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica se realizó como en estudios anteriores (por ejemplo, Messina, *et al.* (2003) *Exper. Neurol.* 184: 816-829). Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para tener acceso a los antígenos intracelulares. En los casos en los que el epítomo de interés se encontraba en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitía el Triton en todas las etapas del procedimiento con el fin de evitar la pérdida de epítomos. Además, en los casos en los que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el procedimiento. A continuación, se aplicaron a las secciones los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpo primario, y los cultivos se lavaron con PBS antes de aplicar las soluciones de anticuerpo secundario (1 hora a temperatura ambiente) que contenían el bloque junto con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o de cabra anti-IgG de conejo-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o de burro anti-IgG de cabra-FITC (1:150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicó DAPI 10 micromolar (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia utilizando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva estaba representada por la señal de fluorescencia sobre la tinción control. Se capturaron imágenes representativas con una cámara de vídeo digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con triple tinción, cada imagen se obtuvo utilizando solamente un filtro de emisión a la vez. A continuación, se prepararon los montajes en capas con el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Tabla 10-1: Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

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

XIII. Resultados

Caracterización de cordón umbilical. Se expresaron los marcadores vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 en un subconjunto de las células presentes en el cordón umbilical (datos no mostrados). En particular, la expresión de vWF y CD34 se limitaba a los vasos sanguíneos dentro del cordón. Las células CD34+ estaban en la capa más interna (lado del lumen). Se descubrió expresión de vimentina en toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón. La SMA se limitaba a la matriz y a las paredes exteriores de la arteria y la vena, pero no se encontraba

dentro de los propios vasos. Se observaron CK18 y desmina dentro de los vasos solamente, limitándose la desmina a las capas intermedia y exterior.

5 **Caracterización de la placenta.** Se observaron vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34, todos ellos dentro de la placenta y específicos de la zona.

Expresión tisular de GROalfa, GCP-2, ox-LDL R1 y NOGO-A. No se observó ninguno de estos marcadores dentro del tejido de cordón umbilical ni placentario (datos no mostrados).

10 **Resumen.** Se expresan vimentina, desmina, alfa actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD34 en las células que están dentro del cordón umbilical y la placenta humana. Basándose en estudios de caracterización *in vitro* que muestran que sólo se expresan vimentina y alfa actina de músculo liso, los datos sugieren que el actual proceso de aislamiento de células de origen posnatal recolecta una subpoblación de células o que las células aisladas cambian su expresión de marcadores para expresar vimentina y alfa actina de músculo liso.

EJEMPLO 11

Secreción de factores tróficos por las células de origen posnatal

20 Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de PPDC procedentes de placenta y de cordón umbilical. Se seleccionaron factores con actividad angiogénica (es decir, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen *et al.* (1997) Ciba Found. Symp. 212:215-26), proteína 1 quimiotáctica para monocitos (MCP-1) (Salcedo *et al.* (2000) Blood 96; 34-40), interleucina 8 (IL-8) (Li *et al.* (2003). J. Immunol. 170:3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Hughes *et al.* (2004). Ann. Thorac. Surg. 77:812-8), inhibidor tisular de las metaloproteinasas de la matriz 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFbb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor 1 alfa derivado de células del estroma (SDF-1alfa), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng *et al.* (2003) Dev. Biol. 258:319-33), interleucina 6 (IL-6), proteína 2 quimiotáctica para granulocitos (GCP-2), factor de crecimiento de transformación beta 2 (TGF beta 2) o actividad de quimiocina (proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1alfa), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1beta), quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), RANTES (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación), I309, quimiocina regulada por el timo y por activación (TARC), eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-8).

XIV. Materiales y métodos

40 **Cultivo celular.** Se cultivaron PPDC procedentes de la placenta y de cordón umbilical, así como fibroblastos humanos procedentes de prepucio neonatal humano, en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos con gelatina. Las células se crioconservaron en el pase 11 y se almacenan en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, se añadió medio de crecimiento a las células, seguido de transferencia a un tubo de centrífuga de 15 ml y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 4 mililitros de medio de crecimiento, y se realizó el recuento de células. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T75 que contenían cada uno 15 ml de medio de crecimiento, y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio sin suero (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco), albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (Sigma), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomycin (50 microgramos/mililitro, Gibco)) durante 8 horas. Se recogió el medio sin suero acondicionado al final de la incubación mediante centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20°C.

50 Para estimar el número de células en cada matraz, se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se desprendieron con 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de la tripsina se inhibió añadiendo 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 1 mililitro de medio de crecimiento. El número de células se estimó con un hemocitómetro.

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

60 **Ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT.** Las quimiocinas (MIP1alfa, MIP1beta, MCP-1, RANTES, I309, TARC, eotaxina, MDC, IL-8), BDNF, y los factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGFbb, TPO, HB-EGF) se midieron utilizando matrices de proteinoma REFLECTOR (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteinoma son ensayos ELISA de tipo sándwich multiplexados para la medición cuantitativa de entre dos y dieciséis proteínas por pocillo. Las matrices se producen aplicando un patrón 2 x 2, 3 x 3 o 4 x 4 de

cuatro a dieciséis anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento ELISA tipo sándwich, se obtiene una imagen de toda la placa para captar la señal quimioluminiscente generada en cada aplicación dentro de cada pocillo de la placa. La señal generada en cada aplicación es proporcional a la cantidad de proteína diana en la muestra o patrón original.

XV. Resultados

Ensayo ELISA. MCP-1 e IL-6 fueron secretados por las PPDC procedentes de cordón umbilical y por los fibroblastos dérmicos (Tabla 11-1). SDF-1alfa y GCP-2 fueron secretados por los fibroblastos. GCP-2 e IL-8 fueron secretados por las PPDC procedentes de cordón umbilical. No se detectó TGF-beta2 de ninguno de los tipos celulares mediante ELISA.

Tabla 11-1. Resultados del ELISA: detección de factores tróficos

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1alfa	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
Fibroblasto	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Umbilical (022803)	1.150±74	4.234±289	ND	ND	160±11	2.058±145	ND
Umbilical (071003)	2.794±84	1.356±43	ND	ND	2.184±98	2.369±23	ND

Leyenda: ND: no detectado, +/- e.e.m.

Ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT. TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MiP1beta, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC e IL-8 fueron secretados a partir de las PPDC procedentes de cordón umbilical (Tablas 11-2 y 11-3). No se detectaron Ang2, VEGF ni PDGFbb.

Tabla 11-2. Resultados del ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19.306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
U1	57.718,4	ND	ND	1.240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
U3	21.850,0	ND	ND	1.134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

Leyenda: hFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC procedentes de cordón umbilical (022803)), U3 (PPDC procedentes de cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

Tabla 11-3. Resultados del ensayo ELISA multiplexado SEARCHLIGHT

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxina	MDC	IL-8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
U1	ND	8,0	1.694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51.930,1
U3	ND	5,2	2.018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10.515,9

Leyenda: hFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC procedentes de cordón umbilical (022803)), U3 (PPDC procedentes de cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

Resumen. Las células de origen umbilical secretan varios actores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, tales como HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, tales como BDNF e IL-6, tienen un papel importante en la regeneración o la protección neural.

EJEMPLO 12

Immunología *in vitro*

Se evaluaron *in vitro* estirpes de células posnatales para determinar sus características inmunitarias en un intento por predecir la respuesta inmunitaria, de haberla, que inducirían estas células tras la administración *in vivo*. Se ensayaron estirpes de células posparto mediante citometría de flujo para detectar la expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas son expresadas por las células presentadoras de antígenos (APC) y son necesarias para la estimulación directa de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Filadelfia, p. 171). Las estirpes celulares también se analizaron mediante citometría de flujo para detectar la expresión de HLA-G (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Filadelfia, p. 171), CD178 (Coumans, *et al.*, (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196) y PD-L2 (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Filadelfia, p. 171; Brown, *et al.* (2003) The Journal of Immunology 170, 1257-1266). Se cree que la expresión de estas proteínas por las células que residen en los tejidos placentarios interviene en el estado inmunoprivilegiado de los tejidos placentarios *in utero*. Para predecir el grado de inducción de una respuesta inmunitaria *in vivo* por parte de las estirpes celulares procedentes de cordón umbilical posparto, se ensayaron las estirpes celulares en una reacción linfocitaria mixta (MLR) unidireccional.

XVI. Materiales y métodos

Cultivo celular. Las células se cultivaron en medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), suero fetal bovino (FBS) al 15% (v/v); (Hyclone, Logan, UT), beta-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomina (Gibco, Carlsbad, CA)) hasta la confluencia en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con gelatina al 2% (Sigma, St. Louis, MO).

Tinción con anticuerpos. Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se añadió anticuerpo (Tabla 12-1) a cien microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en quinientos microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo con un instrumento FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 12-1. Anticuerpos

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

Reacción linfocitaria mixta. Se enviaron sobre hielo seco al CTBR (Senneville, Quebec) viales criopreservados de PPDC procedentes de cordón umbilical del pase 10 etiquetadas como estirpe celular A y PPDC procedentes de placenta del pase 11 etiquetadas como estirpe celular B, para llevar a cabo una reacción linfocitaria mixta utilizando CTBR SOP n° CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios varones y mujeres. Se trataron con mitomicina C PBMC alogénicas estimuladoras (donante), PBMC autólogas y estirpes celulares de origen posnatal. Se añadieron células estimuladoras tratadas con mitomicina C y autólogas a las PBMC respondedoras (receptor) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió a cada muestra [³H]-timidina y se cultivaron durante 18 horas. Después de la recolección de las células, se extrajo el ADN marcado radiactivamente, y se midió la incorporación de [³H]-timidina con un contador de centelleo.

El índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) se calculó como la proliferación media del receptor más el donante alogénico tratado con mitomicina C dividido por la proliferación inicial del receptor. El índice de estimulación de las células de origen posnatal se calculó como la proliferación media del receptor más la estirpe celular de origen posnatal tratada con mitomicina C dividido por la proliferación inicial del receptor.

II. Resultados

Reacción linfocitaria mixta - Placenta. Se examinó a siete donantes de sangre humanos voluntarios para identificar un único donante alogénico que presentase una fuerte respuesta de proliferación en una reacción linfocitaria mixta con los otros seis donantes de sangre. Este donante se seleccionó como donante control positivo alogénico. Los seis donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. Las estirpes celulares de origen placentario y donante control positivo alogénico se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción linfocitaria mixta con los seis receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 12-2). El índice de estimulación medio varió entre 1,3 (placa 2) y 3 (placa 1) y los controles positivos donante alogénico variaron entre 46,25 (placa 2) y 279 (placa 1) (Tabla 12-3).

Tabla 12-2. Datos de la reacción linfocitaria mixta - estirpe celular B (placenta)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DPM para el ensayo de proliferación									
ID de placa: Placa 1									
Número de análisis	Sistema de cultivo	Repeticiones			Media	DE	CV		
		1	2	3					
IM03-7769	Valor inicial de la proliferación del receptor	79	119	138	112,0	30,12	26,9		
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	241	272	175	229,3	49,54	21,6		
	Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	23.971	22.352	20.921	22.414,7	1.525,97	6,8		
	MLR con estirpe celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	664	559	1.090	771,0	281,21	36,5		
SI (donante)					200				
SI (estirpe celular)					7				
IM03-7770	Valor inicial de la proliferación del receptor	206	134	262	200,7	64,17	32,0		
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1091	602	524	739,0	307,33	41,6		
	Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	45.005	43.729	44.071	44.268,3	660,49	1,5		
	MLR con estirpe celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	533	2.582	2.376	1.830,3	1.128,24	61,6		
SI (donante)					221				
SI (estirpe celular)					9				
IM03-7771	Valor inicial de la proliferación del receptor	157	87	128	124,0	35,17	28,4		
	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	293	138	508	313,0	185,81	59,4		
	Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	24.497	34.348	31.388	30.077,7	5.054,53	16,8		
	MLR con estirpe celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	601	643	a	622,0	29,70	4,8		

(continuación)

5	SI (donante)						243			
	SI (estirpe celular)						5			
10	IM03-7772	Valor inicial de la proliferación del receptor	56	98	51		68,3	25,81	37,8	
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	133	120	213		155,3	50,36	32,4	
15		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	14.222	20.076	22.168		18.822,0	4.118,75	21,9	
		MLR con estirpe celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a		a	a	a	
20	SI (donante)						275			
	SI (estirpe celular)						a			
25	IM03-7768 (donante alogénico)	Valor inicial de la proliferación del receptor	84	242	208		178,0	83,16	46,7	
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	361	617	304		427,3	166,71	39,0	
30	Estirpe celular tipo B	Valor inicial de la proliferación del receptor	126	124	143		131,0	10,44	8,0	
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	822	1075	487		794,7	294,95	37,1	
35	ID de placa: Placa 2									
40	Número de análisis	Sistema de cultivo	Repeticiones				Media	DE	CV	
				1	2	3				
			Valor inicial de la proliferación del receptor	908	181	330		473,0	384,02	81,2
45			Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	269	405	572		415,3	151,76	36,5
	Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	29.151	28.691	28.315		28.719,0	418,70	1,5		
	MLR con estirpe celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	567	732	905		734,7	169,02	23,0		
50	SI (donante)						61			
	SI (estirpe celular)						2			
55	IM03-7774	Valor inicial de la proliferación del receptor	893	1.376	185		818,0	599,03	73,2	
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	261	381	568		403,3	154,71	38,4	
60		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	53.101	42.839	48.283		48.074,3	5.134,18	10,7	
		MLR con estirpe celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	515	789	294		532,7	247,97	46,6	
	SI (donante)						59			
65	SI (estirpe celular)						1			

(continuación)

5	IM03-7775	Valor inicial de la proliferación del receptor	1.272	300	544	705,3	505,69	71,7
10		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	232	199	484	305,0	155,89	51,1
15		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	23.554	10.523	28.965	21.014,0	9.479,74	45,1
		MLR con estirpe celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	768	924	563	751,7	181,05	24,1
	SI (donante)					30		
	SI (estirpe celular)					1		
20	IM03-7776	Valor inicial de la proliferación del receptor	1530	137	1046	904,3	707,22	78,2
25		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	420	218	394	344,0	109,89	31,9
30		Donante alogénico de MLR IM03-7768 (tratadas con mitomicina C)	28.893	32.493	34.746	32.044,0	2.952,22	9,2
		MLR con estirpe celular (célula tipo B tratada con mitomicina C)	a	a	a	a	a	a
	SI (donante)					35		
	SI (estirpe celular)					a		

Tabla 12-3. Índice de estimulación medio de células de la placenta y un donante alogénico en una reacción linfocitaria mixta con seis receptores alogénicos individuales.

	Receptor	Placenta
Placa 1 (receptores 1-3)	279	3
Placa 2 (receptores 4-6)	46,25	1,3

Reacción linfocitaria mixta - Cordón umbilical. Se examinó a seis donantes de sangre humanos voluntarios para identificar un único donante alogénico que presentara una fuerte respuesta de proliferación en una reacción linfocitaria mixta con los otros cinco donantes de sangre. Este donante se seleccionó como donante control positivo alogénico. Los cinco donantes de sangre restantes se seleccionaron como receptores. Las estirpes celulares de origen umbilical y donante control positivo alogénico se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción linfocitaria mixta con los cinco receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 12-4). El índice de estimulación medio varió entre 6,5 (placa 1) y 9 (placa 2) y los controles positivos donante alogénico variaron entre 42,75 (placa 1) y 70 (placa 2) (Tabla 12-5).

Tabla 12-4. Datos de la reacción linfocitaria mixta - estirpe celular A (cordón umbilical)

DPM para el ensayo de proliferación ID de placa: Placa 1							
Número de análisis	Sistema de cultivo	Repeticiones			Media	DE	CV
		1	2	3			
55	Valor inicial de la proliferación del receptor	1.074	406	391	623,7	390,07	62,5
60	Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	672	510	1.402	861,3	475,19	55,2
65	Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	43.777	48.391	38.231	43.466,3	5.087,12	11,7
	MLR con estirpe celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2.914	5.622	6.109	4.881,7	1.721,36	35,3

(continuación)

5	SI (donante)					70		
	SI (estirpe celular)					8		
10	IM04-2479	Valor inicial de la proliferación del receptor	530	508	527	521,7	11,93	2,3
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	701	567	1.111	793,0	283,43	35,7
15		Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	25.593	24.732	22.707	24.344,0	1.481,61	6,1
		MLR con estirpe celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	5.086	3.932	1.497	3.505,0	1.832,21	52,3
	SI (donante)					47		
	SI (estirpe celular)					7		
20	IM04-2480	Valor inicial de la proliferación del receptor	1.192	854	1.330	1.125,3	244,90	21,8
25		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	2.963	993	2.197	2.051,0	993,08	48,4
		Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	25.416	29.721	23.757	26.298,0	3.078,27	11,7
30		MLR con estirpe celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2.596	5.076	3.426	3.699,3	1.262,39	34,1
	SI (donante)					23		
	SI (estirpe celular)					3		
35	IM04-2481	Valor inicial de la proliferación del receptor	695	451	555	567,0	122,44	21,6
40		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	738	1.252	464	818,0	400,04	48,9
		Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	13.177	24.885	15.444	17.835,3	6.209,52	34,8
45		MLR con estirpe celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	4.495	3.671	4.674	4.280,0	534,95	12,5
	SI (donante)					31		
	SI (estirpe celular)					8		
ID de placa: Placa 2								
50	Número de análisis	Sistema de cultivo	Repeticiones			Media	DE	CV
			1	2	3			
55	IM04-2482	Valor inicial de la proliferación del receptor	432	533	274	413,0	130,54	31,6
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1.459	633	598	896,7	487,31	54,3
60		Donante alogénico de MLR IM04-2477 (tratadas con mitomicina C)	24.286	30.823	31.346	28.818,3	3.933,82	13,7
		MLR con estirpe celular (célula tipo A tratada con mitomicina C)	2.762	1.502	6.723	3.662,3	2.724,46	74,4
	SI (donante)					70		
	SI (estirpe celular)					9		

65

(continuación)

5	IM04-2477 (donante alogénico)	Valor inicial de la proliferación del receptor	312	419	349	360,0	54,34	15,1
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	567	604	374	515,0	123,50	24,0
10	Estirpe celular tipo A	Valor inicial de la proliferación del receptor	5.101	3.735	2.973	3.936,3	1.078,19	27,4
		Control de autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina)	1.924	4.570	2.153	2.882,3	1.466,04	50,9

Tabla 12-5. Índice de estimulación medio de células de origen umbilical y un donante alogénico en una reacción linfocitaria mixta con cinco receptores alogénicos individuales.

	Receptor	Cordón umbilical
Placa 1 (receptores 1-4)	42,75	6,5
Placa 2 (receptor 5)	70	9

Marcadores de células presentadoras de antígenos - Placenta. Los histogramas de células de origen placentario analizados mediante citometría de flujo muestran expresión negativa de HLA-DR,DP,DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como indica el valor de fluorescencia coherente con el control IgG, lo que indica que las estirpes celulares de origen placentario carecen las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente las PBMC alogénicas (por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺).

Marcadores inmunomoduladores - Células de origen placentario. Los histogramas de células de origen placentario analizados mediante citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, como indica el aumento del valor de fluorescencia con respecto al control IgG, y expresión negativa de CD178 y HLA-G, como indica el valor de fluorescencia coherente con el control IgG (datos no mostrados).

Marcadores de células presentadoras de antígenos - Células de origen umbilical. Los histogramas de las células de origen umbilical analizados mediante citometría de flujo muestran expresión negativa de HLA-DR,DP,DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como indica el valor de fluorescencia coherente con el control IgG, lo que indica que las estirpes celulares de origen umbilical carecen de las moléculas de superficie celular necesarias para estimular directamente las PBMC alogénicas (por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺).

Marcadores inmunomoduladores - Células de origen umbilical. Los histogramas de las células de origen umbilical analizados mediante citometría de flujo muestran expresión positiva de PD-L2, como indica el aumento del valor de fluorescencia con respecto al control IgG, y expresión negativa de CD178 y HLA-G, como indica el valor de fluorescencia coherente con el control IgG.

Resumen. En las reacciones linfocitarias mixtas llevadas a cabo con estirpes celulares de origen placentario, el índice de estimulación medio varió entre 1,3 y 3, y el de los controles positivos alogénicos varió entre 46,25 y 279. En las reacciones linfocitarias mixtas llevadas a cabo con estirpes celulares de origen umbilical, el índice de estimulación medio varió entre 6,5 y 9, y el de los controles positivos alogénicos varió entre 42,75 y 70. Las estirpes celulares de origen placentario y umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas estimuladoras HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, según se mide mediante citometría de flujo. Las estirpes celulares de origen placentario y umbilical fueron negativas para la expresión de las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178 y positivas para la expresión de PD-L2, según se mide mediante citometría de flujo. Las PBMC de donante alogénico contienen células presentadoras de antígenos que expresan HLA-DP,DR,DQ, CD80, CD86 y B7-H2, permitiendo así la estimulación de las PBMC alogénicas (por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes). La ausencia de moléculas de superficie de células presentadoras de antígenos en las células de origen placentario y umbilical necesarias para la estimulación directa de las PBMC alogénicas (por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes) y la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, puede explicar el bajo índice de estimulación que presentan estas células en una MLR en comparación con los controles alogénicos.

EJEMPLO 13

Ensayo de coagulación de plasma

Las células útiles para el tratamiento pueden inyectarse por vía sistémica para determinadas aplicaciones en las que las células son capaces de dirigirse al sitio de acción. Es importante que las células inyectadas no provoquen trombosis, ya que esta puede ser fatal. El factor tisular, una glicoproteína procoagulante unida a membrana, es el iniciador de la cascada de coagulación extrínseca, que es la vía de la coagulación predominante *in*

vivo. El factor tisular también desempeña un papel importante en la formación de vasos embrionarios, por ejemplo, en la formación de la pared vascular primaria (Brody *et al.* (2002) *Exp. Nephrol.* 10:299-306). Para determinar el potencial de las PPDC para iniciar la coagulación, se evaluaron PPDC procedentes de cordón umbilical para detectar la expresión de factor tisular y su capacidad para iniciar la coagulación del plasma.

5

XVII. Materiales y métodos

Factor tisular humano. Se reconstituyó factor tisular humano (SIMPLASTIN, Organon Teknika Corporation, Durham, NC), con 20 mililitros de agua destilada. La solución de reserva se sometió a dilución en serie (1:2) en ocho tubos. Se descongeló plasma humano normal (George King Bio-Medical, Overland Park, KS) a 37°C en un baño de agua y, a continuación, se almacenó en hielo antes de utilizarse. Se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos 100 microlitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 microlitros de SIMPLASTIN diluido, 30 microlitros de cloruro cálcico 0,1 molar y 100 microlitros de plasma humano normal. Un pocillo de control negativo no recibió SIMPLASTIN. La placa se colocó inmediatamente en un lector de microplacas con temperatura controlada y se midió la absorbancia a 405 nanómetros a intervalos de 40 segundos durante 30 minutos.

10

15

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

20

25

30

Tinción con anticuerpos. Las células se lavaron en PBS y se desprendieron del matraz con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recolectaron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Se añadió el anticuerpo a 100 microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante. Las células se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS, a continuación se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 100 microlitros de FBS al 3% y se añadió el anticuerpo secundario según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo secundario no unido. Las células lavadas se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo.

35

40

Análisis de citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA).

XVIII. Resultados

45

El análisis de citometría de flujo puso de manifiesto que las células posnatales de origen umbilical son menos activas en la estimulación de la coagulación plasmática que las células J-82. Aunque un ensayo de coagulación de plasma demostró que el factor tisular presente en las células de origen umbilical era activo, la coagulación llevó más tiempo que con las células J-82, como pone de manifiesto un mayor tiempo hasta la mitad de la absorbancia máxima ($T_{1/2}$ hasta máx.; Tabla 13-1). El $T_{1/2}$ hasta máx. es inversamente proporcional al número de células J-82. Las células de origen umbilical disminuyeron la velocidad de coagulación como se indica mediante el $T_{1/2}$ hasta máx. Se observó coagulación con células tanto de pase temprano (P5) como tardío (P18). La preincubación de las células umbilicales con CNTO 859, un anticuerpo contra el factor tisular, inhibía la reacción de coagulación, lo que establece que el factor tisular era responsable de la coagulación.

50

55

Tabla 13-1. Efecto del factor tisular humano (Simplastin®) y las células de origen umbilical (Umb) sobre la coagulación plasmática. Como unidad de medida se utilizó el tiempo hasta la mitad de la absorbancia máxima ($T_{1/2}$ hasta máx.) en la meseta en segundos.

60

65

Patrón (dilución de Simplastin®)	T½ hasta máx. (segundos)
1:2	61
1:4	107
1:8	147
1:16	174
1:32	266
1:64	317
1:128	378
0 (control negativo)	1.188
Células J-82	
100.000	122
50.000	172
25.000	275
Umb P5	
50.000	833
Umb P18	
50.000	443

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

EJEMPLO 14

Medios de crioconservación para las células de origen posnatal

El objetivo de este estudio era determinar un medio de crioconservación adecuado para la crioconservación de células de origen posnatal.

XIX. Materiales y métodos

Las células de origen placentario cultivadas en medio de crecimiento (DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Carlsbad CA), suero fetal bovino al 15% (v/v) (nº de cat. SH30070.03, Hyclone, Logan, UT), beta-mercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO), 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 microgramos/mililitro de estreptomycin (Gibco)), en un matraz T75 recubierto con gelatina se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco) y se tripsinizaron utilizando 1 mililitro de tripsina/EDTA (Gibco). La tripsinización se detuvo añadiendo 10 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 1 mililitro de medio de crecimiento. Se extrajo una alícuota de suspensión de células, 60 microlitros, y se añadió a 60 microlitros de azul de tripano (Sigma). El número de células viables se estimó con un hemocitómetro. La suspensión de células se dividió en cuatro alícuotas iguales, cada una de ellas con 88×10^4 células. La suspensión de células se centrifugó y se resuspendió en 1 mililitro de cada uno de los medios que aparecen a continuación, y se transfirieron a crioviales (Nalgene).

- 1) Medio de crecimiento + DMSO al 10% (v/v) (Hybrimax, Sigma, St. Louis, MO).
- 2) Medio de congelación celular con DMSO, con metilcelulosa, sin suero (C6295, Sigma, St. Louis, MO).
- 3) Medio de congelación celular sin suero (C2639, Sigma, St. Louis, MO).
- 4) Medio de congelación celular con glicerol (C6039, Sigma, St. Louis, MO).

Las células se enfriaron a aproximadamente 1°C/min durante la noche en un congelador de -80°C utilizando un recipiente de congelación "Mr Frosty" según las instrucciones del fabricante (Nalgene, Rochester, NY). Los viales de células se transfirieron a nitrógeno líquido durante 2 días antes de descongelarlos rápidamente en un baño de agua a 37°C. Las células se añadieron a 10 mililitros de medio de crecimiento y se centrifugaron antes de la estimación del número de células y la viabilidad, al igual que antes. Las células se sembraron en matraces recubiertos con gelatina a 5.000 células/cm² para determinar si las células se fijaban y proliferaban.

XX. Resultados

Se calculó, mediante tinción con azul de tripano, que la viabilidad inicial de las células a crioconservar era del 100%.

Hubo una reducción proporcional del número de células con viabilidad para C6295 debido a la lisis celular. Las células viables crioconservadas en las cuatro soluciones se fijaron, se dividieron y produjeron una monocapa confluyente en el plazo de 3 días. No hubo diferencia apreciable en la tasa de crecimiento estimada.

Resumen. La crioconservación de células es un procedimiento disponible para la preparación de un banco de células o un producto celular. Se compararon cuatro mezclas de crioconservación para determinar su capacidad para proteger las células humanas de origen placentario frente al daño por congelación. El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (v/v) es el medio preferente de entre los comparados para la crioconservación de células de origen placentario.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kihm, Anthony J. Gosiewska, Anna

<120> hUTC COMO TRATAMIENTO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

<130> 026038.0231PLUS

<140> 61/163.619

<141> 26-03-2009

<150>

<151>

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 1

gagaaatcca aagagcaaat gg 22

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 2

agaatggaaa actggaatag g 21

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 3

tctcgtatgc ttcgattcc 20

5
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

10
 <400> 4
 gaattctcgg aatctctgtt g 21

15
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20
 <400> 5
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

25
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 6
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22

35
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 7
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20

45
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

55
 <400> 8
 ctcaaaaac ttctccaca cc 22

60
 <210> 9
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

65
 <400> 9
 cccacgccac gctctcc 17

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

5

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

10

<400> 10
tcctgtcagt tgggtctcc 19

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para utilizarse en la reducción de la formación de placas o la disminución de las placas en un paciente con Alzheimer, que comprende una población homogénea de células aisladas procedentes de tejido de cordón umbilical humano, en la que las células pueden obtenerse de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente exento de sangre, son capaces de autorrenovarse y proliferar en cultivo, tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales durante los pases, y en la que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C y no producen CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 ni HLA-DR,DP,DQ.
- 10 2. Composición para utilizarse según la reivindicación 1, en la que el uso comprende la administración de las células aisladas procedentes de tejido de cordón umbilical humano localmente a un sitio de la placa neurítica.
- 15 3. Composición para utilizarse según la reivindicación 1, en la que el uso comprende la administración de las células aisladas procedentes de tejido de cordón umbilical humano al líquido cefalorraquídeo.
- 20 4. Composición para utilizarse según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la población de células procedentes de tejido de cordón umbilical humano se tratan previamente con estimulación eléctrica.
- 25 5. Composición para utilizarse según la reivindicación 1, en la que las células procedentes de tejido de cordón umbilical humano están modificadas genéticamente para que produzcan productos génicos terapéuticamente útiles o para que produzcan agentes para mejorar la supervivencia de las células neurales, la diferenciación o la actividad fagocítica de las células.
- 30 6. Composición para utilizarse según la reivindicación 1, en la que las células procedentes de tejido de cordón umbilical humano están modificadas genéticamente para que produzcan productos génicos terapéuticamente útiles o para que produzcan agentes para aumentar la degradación de las placas de amiloide, o prevenir la formación de las placas de amiloide.
- 35 7. Composición para utilizarse según la reivindicación 1, en la que la composición comprende adicionalmente uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en componentes de la matriz extracelular, microtransportadores, sistemas de micropartículas, agentes antiapoptóticos, compuestos antiinflamatorios, inmunosupresores, inmunomoduladores y antioxidantes.
- 40 8. Composición para utilizarse según la reivindicación 1, en la que la composición comprende adicionalmente factores neurotróficos.
- 45 9. Composición para utilizarse según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende adicionalmente vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 50 10. Composición para utilizarse según la reivindicación 9, en la que los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables están seleccionados del grupo que consiste en: solución salina, soluciones tampón acuosas, hidrogeles, matrices, andamiajes, disolventes, líquido cefalorraquídeo artificial, composición de medios de dispersión y una mezcla de los mismos.
- 55 11. Kit para utilizarse en la reducción de la formación de placas o la disminución de las placas en un paciente con Alzheimer, que comprende una población homogénea de células aisladas procedentes de tejido de cordón umbilical y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que las células pueden obtenerse a partir de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente exento de sangre, son capaces de autorrenovarse y proliferar en cultivo, tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales durante los pases, y en el que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C y no producen CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 ni HLA-DR,DP,DQ.
- 60 12. Kit para utilizarse según la reivindicación 11, en el que los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables están seleccionados del grupo que consiste en: solución salina, soluciones tampón acuosas, hidrogeles, matrices, andamiajes, disolventes, líquido cefalorraquídeo artificial, composición de medios de dispersión, y una mezcla de los mismos.

60

65

Día 1 Entrenamiento visible

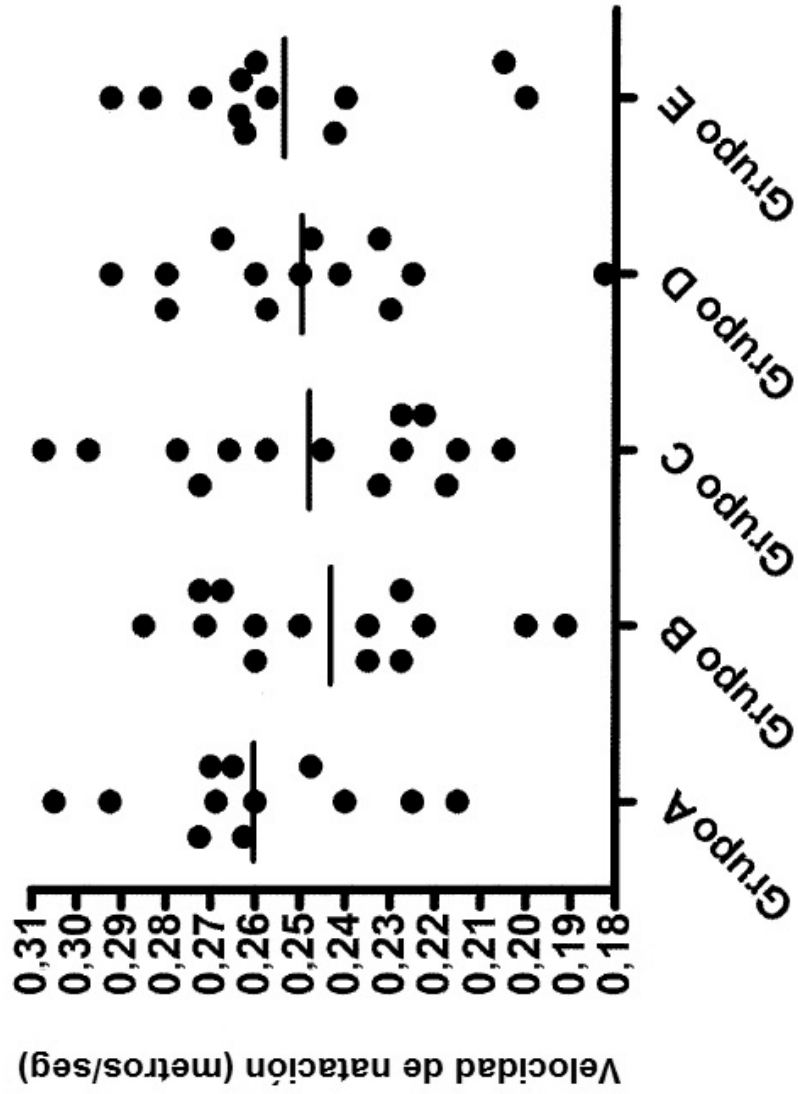


Figura 1

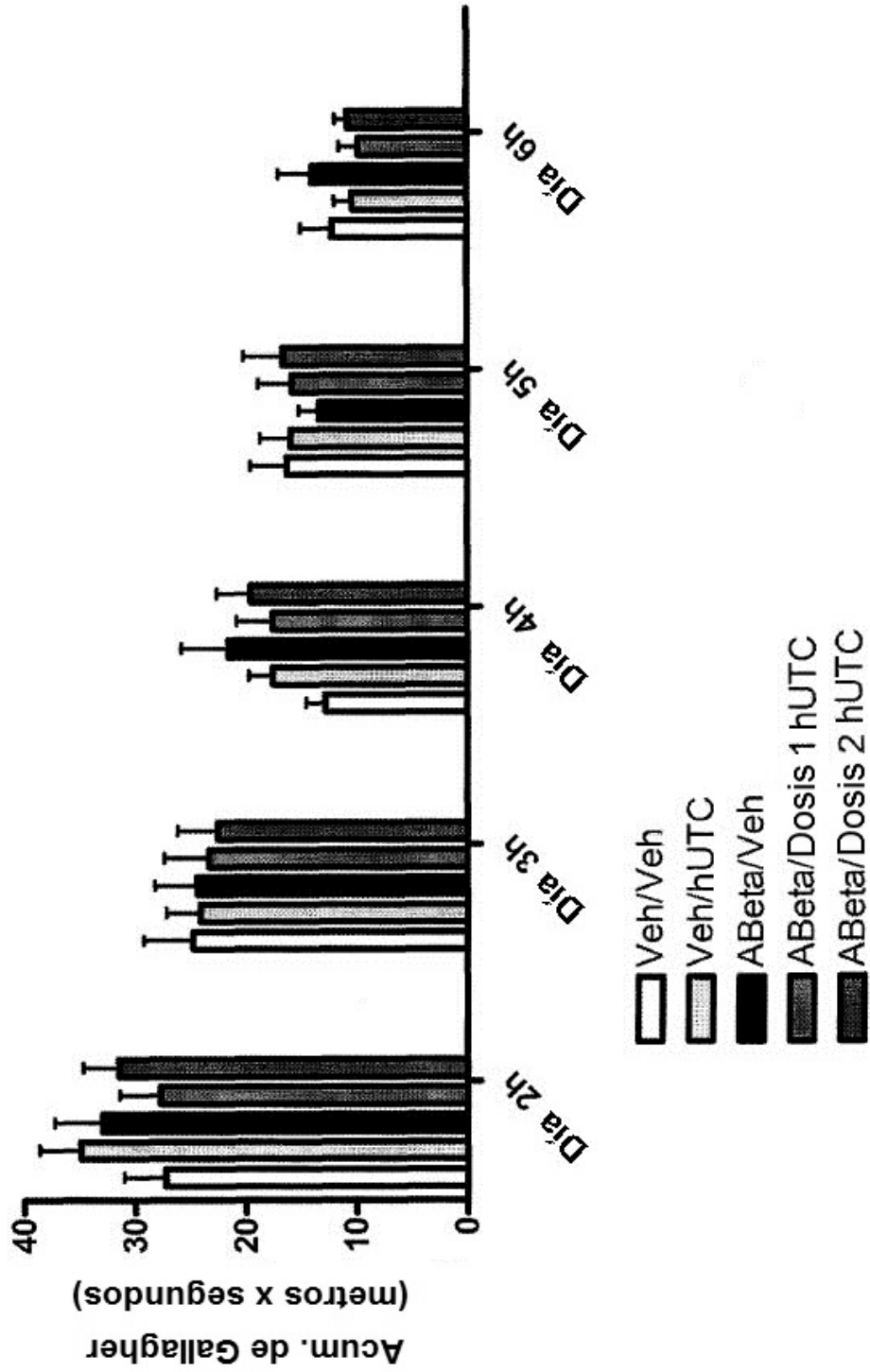


Figura 2

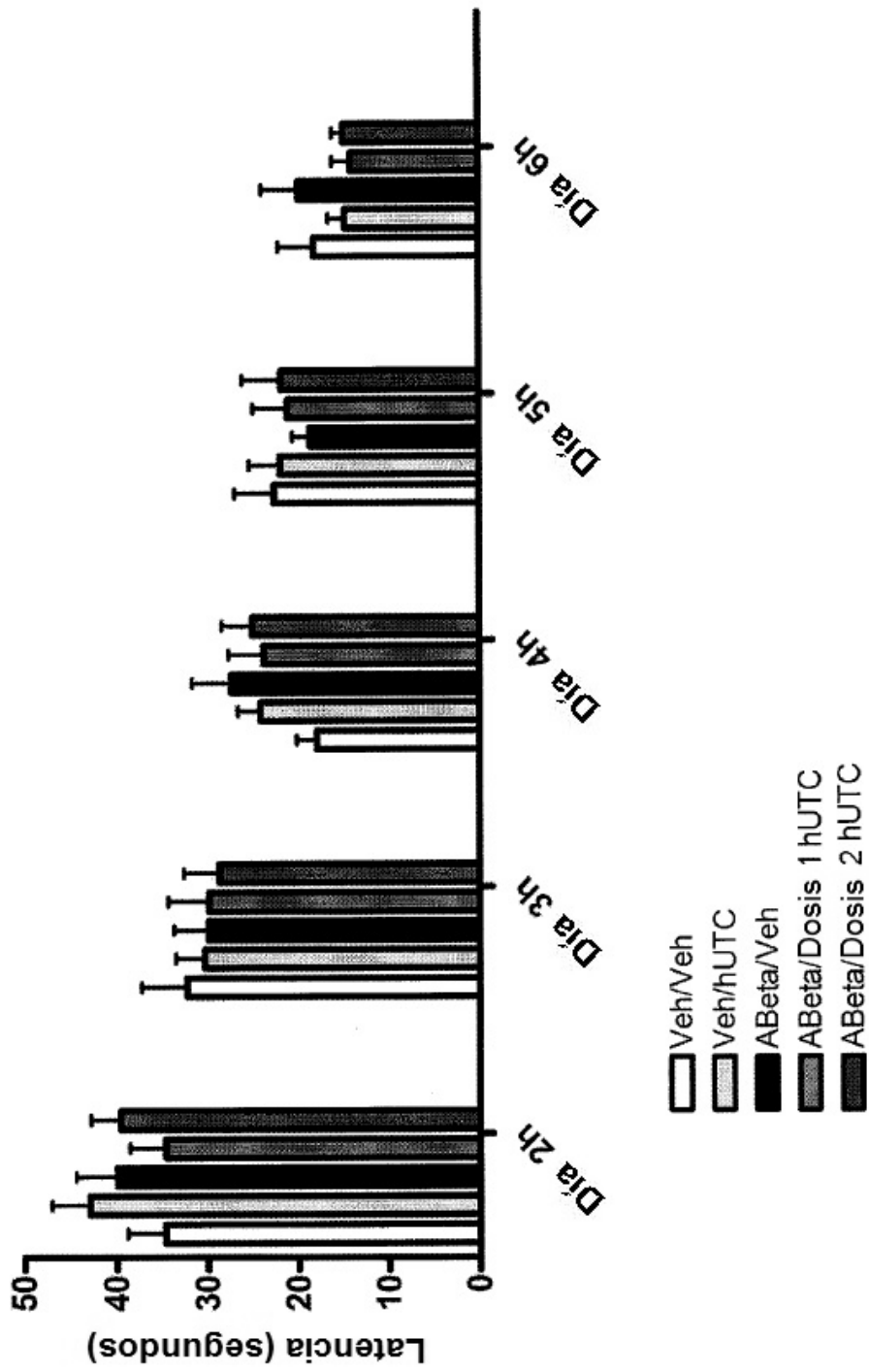


Figura 3

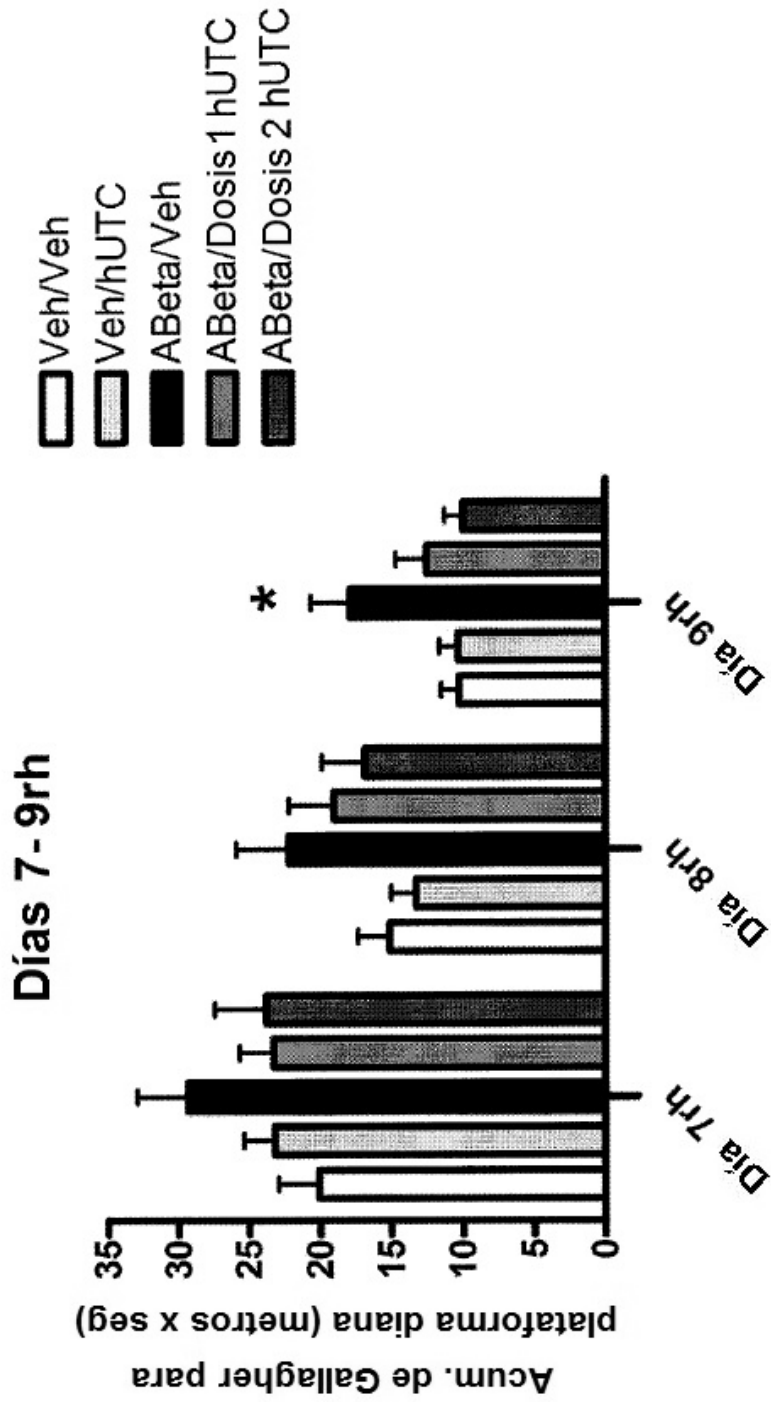


Figura 4

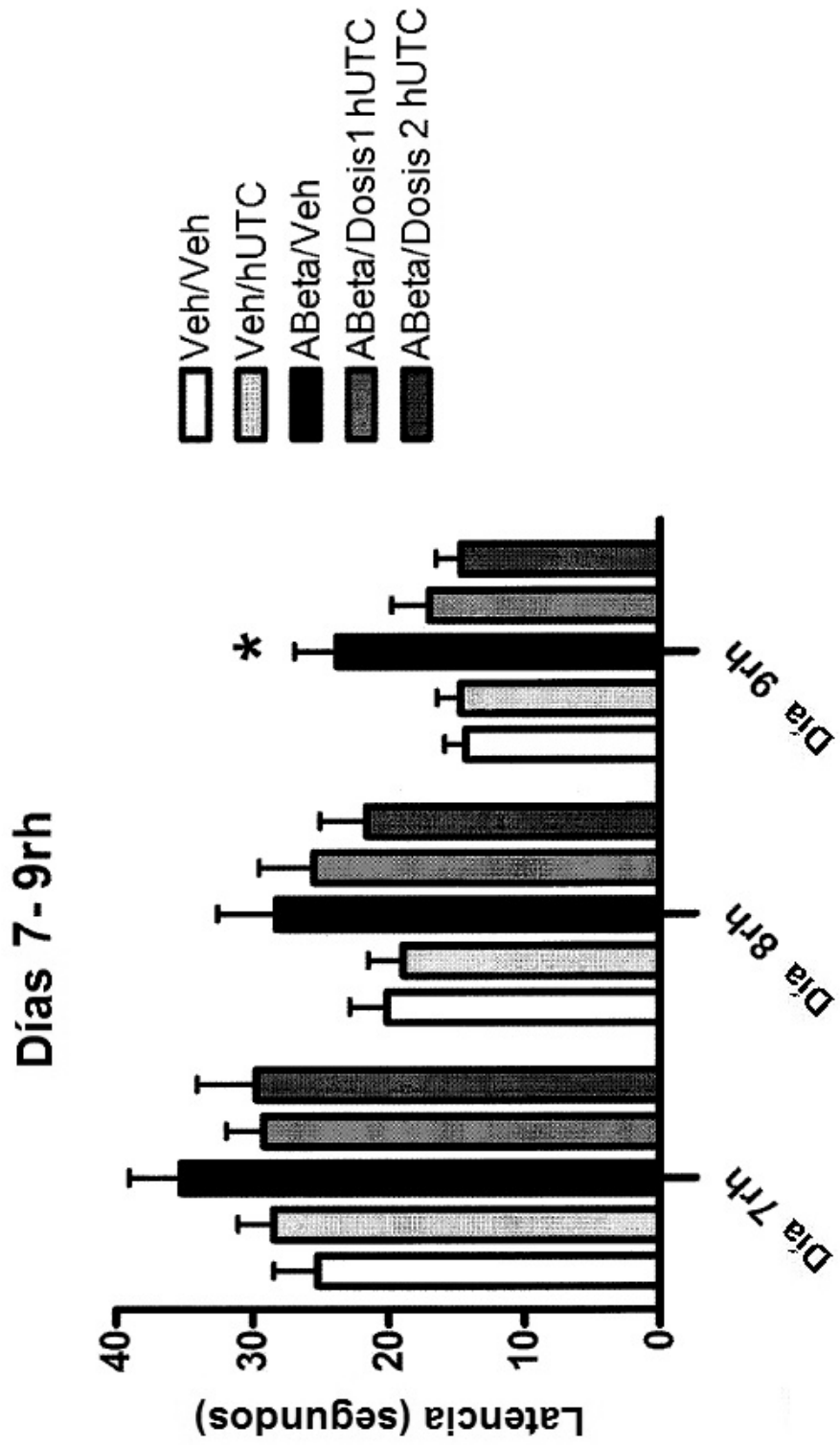


Figura 5