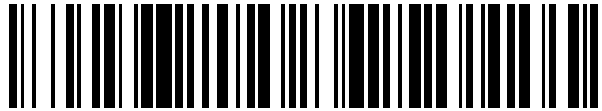


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 614**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/51 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2012 PCT/US2012/072331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13102219**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2012 E 12862921 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2798058**

54 Título: **Métodos y composiciones para la derivación clínica de células alogénicas y sus usos terapéuticos**

30 Prioridad:

30.12.2011 US 201161582070 P
26.01.2012 US 201261591211 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

PATEL, AMIT (100.0%)
1040 Chartwell Court
Salt Lake City, Utah 84103, US

72 Inventor/es:

PATEL, AMIT

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 656 614 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la derivación clínica de células alogénicas y sus usos terapéuticos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona en general con células madre y varios aspectos relacionados con las mismas. Por lo tanto, la presente invención está dirigida a los campos de la química, ciencias de la vida y la medicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha demostrado que varias poblaciones células y células madre son de valor en aplicaciones de investigación. Sin embargo, la traducción clínica de estos tipos celulares para su uso en humanos y animales en aplicaciones terapéuticas es limitada por numerosas razones, entre ellas cuestiones alogénicas.

10 RESUMEN

En un primer aspecto de la presente invención se provee una célula aislada obtenida de una capa subepitelial de un tejido de cordón umbilical de mamífero que se puede autorrenovar y expandirse en cultivo;

en donde la célula aislada expresa por lo menos tres marcadores celulares seleccionados del grupo que consiste en CD29, CD73, CD90, CD166, SSEA4, CD9, CD44, CD146 o CD105; y

15 en donde la célula aislada no expresa los marcadores celulares CD45, CD34, CD14, CD79, CD106, CD86, CD80, CD19, CD117, Stro-1 y HLA-DR.

También se provee un cultivo de células diferenciadas derivadas de la célula aislada, en donde el cultivo de las células diferenciadas incluye un tipo celular seleccionado del grupo que consiste en adipocitos, condrocitos, osteocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, miocitos y combinaciones de los mismos.

20 En un aspecto adicional, la célula aislada de la invención puede producir exosomas que expresan CD63, CD9 o ambos. Se comprenderá que el alcance de la presente incluye cultivos de células aisladas.

25 Las células de acuerdo con la invención tienen la capacidad para diferenciarse en una variedad de tipos celulares, y se considera que cualquiera de dichos tipos celulares se encuentra dentro del alcance de la presente. Los ejemplos no taxativos de dichos tipos celulares pueden incluir adipocitos, condrocitos, osteocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, miocitos y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos.

30 Se puede derivar una variedad de células y productos celulares de las células aisladas de la invención, y se considera que cualquiera dichas células y productos celulares se encuentra dentro del alcance de la presente. En un aspecto, por ejemplo, la presente invención provee un exosoma aislado derivado de las células aisladas descritas, donde dicho exosoma expresa CD63, CD9 o ambos. En otro aspecto de la invención, se provee un adipocito que se diferenció de las células aisladas de la invención. En aún otro aspecto, se provee un condrocito que se diferenció de las células aisladas de la presente invención. En un aspecto adicional, se provee un osteocito que se diferenció de las células aisladas de la presente invención; en aún otro aspecto adicional, se provee un cardiomiocito que se diferenció de las células aisladas de la presente invención. Aún más, se provee un cultivo de células diferenciadas derivadas de las células aisladas descritas incluyendo por lo menos un tipo celular seleccionado entre un adipocito, un condrocito, un osteocito o un cardiomiocito.

40 En otro aspecto, la presente invención provee un método para cultivar células madre a partir de una capa subepitelial de un cordón umbilical de mamífero. Dicho método puede incluir disecar la capa subepitelial del cordón umbilical, colocar la capa subepitelial con el lado interno hacia abajo sobre un sustrato de manera tal que el lado interno de la capa subepitelial queda en contacto con el sustrato y cultivar la capa subepitelial sobre el sustrato. El método puede incluir adicionalmente retirar explantes para la expansión de células primarias. En un aspecto, la disección de la capa subepitelial incluye además retirar la gelatina de Wharton del cordón umbilical.

45 La capa subepitelial se puede cultivar en cualquier medio que permita producir explantes a partir del mismo, y se considera que cualquier medio tal se encuentra dentro del alcance de la presente. Sin embargo, en un aspecto específico de un medio de cultivo tal puede incluir un lisado de plaquetas. En otro aspecto, el medio de cultivo puede incluir un lisado de plaquetas humano o de animales. En aún otro aspecto, el medio de cultivo puede derivar de libre de ingredientes humanos y de animales.

El sustrato utilizado para cultivar la capa subepitelial puede ser cualquier sustrato que permita derivar explantes a

5 partir del mismo. En un aspecto, el sustrato puede ser una matriz polimérica. Un ejemplo de una matriz polimérica tal es una placa de cultivo, en un aspecto específico, la placa de cultivo puede ser un plástico tratado para cultivo celular, y la capa subepitelial se puede colocar sobre el mismo sin ningún pretratamiento adicional al plástico tratado para cultivo celular. En otro aspecto, el sustrato puede ser un sustrato para cultivo celular semisólido. Cualquier tipo de sustrato semisólido que ofrezca soporte a la capa subepitelial durante el procedimiento de cultivo se considera dentro del alcance de la presente.

10 Se contemplan varias condiciones de cultivo, y se comprenderá que dichas condiciones pueden variar dependiendo del protocolo experimental y los diversos resultados deseados. En un aspecto, por ejemplo, la capa subepitelial se puede cultivar en un entorno normóxico. En otro aspecto, la capa subepitelial se puede cultivar en un entorno hipóxico. Adicionalmente, en algunos aspectos, el cultivo de la capa subepitelial y el retiro de los explantes pueden efectuarse sin utilizar ninguna enzima. Además, en algunos aspectos, el subcultivo de los explantes y/o las células que resultan de los explantes se puede efectuar sin utilizar ninguna enzima.

15 En otro aspecto de la presente divulgación, un método de tratamiento de una condición médica que responde al tratamiento con las células aisladas que se describen en la presente, puede incluir introducir dichas células en un individuo que sufre de la condición médica. Estos tratamientos celulares se pueden utilizar para tratar cualquier condición a la cual pueden proporcionar un beneficio. Los ejemplos no taxativos de dichas condiciones médicas incluyen EPOC, diabetes, isquemia, osteoartritis, daño ortopédico, daño hepático, angina refractaria crónica, disfunción eréctil, discos herniados, insuficiencia cardíaca congestiva, asma, enfisema, heridas, síndrome de radiación aguda, trastornos autoinmunitarios, lechos de órganos isquémicos, enfermedad de injerto versus huésped y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos. Adicionalmente, en otro aspecto, un método de tratamiento de una condición médica que responde al tratamiento con las células diferenciadas que se describen en la presente puede incluir introducir por lo menos un tipo celular de las células diferenciadas en un individuo que sufre de la condición médica.

25 En un aspecto adicional, se divulga un método de tratamiento de EPOC. Un método tal puede incluir administrar un agente activo eficaz para EPOC por vía intravenosa a un sujeto para suministrar el agente activo eficaz para EPOC en la mitad inferior del pulmón del sujeto, y administrar el agente activo eficaz para EPOC en una forma aerosolizada al sujeto por medio de ventilación para suministrar el agente activo eficaz para EPOC en una mitad superior del pulmón del sujeto. En un aspecto, el agente activo eficaz para EPOC incluye células madre. En aún otro aspecto, las células madre incluyen células derivadas de la capa subepitelial del cordón umbilical de mamífero como se ha descrito en la presente. En un aspecto específico, las células madre se pueden aerosolizar con un aerosol a un tamaño de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 200 micrones. Adicionalmente, los dos tipos de administración se pueden suministrar de manera sucesiva o concomitante.

35 En otro aspecto, el agente activo eficaz para EPOC puede ser un agente activo distinto de células madre. Los ejemplos no taxativos de dichos agentes activos eficaces para EPOC pueden incluir exosomas, lisados celulares, extractos de proteínas derivadas del cultivo celular y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

En la Figura 1 se muestra una imagen de un corte histológico de cordón umbilical donde se identifica la capa subepitelial de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación.

40 En las Figuras 2A-C se muestran explantes de células que migran de la capa subepitelial y la determinación del cariotipo de células de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En la Figura 3 se muestra el análisis FACS de marcadores determinantes de células expresadas por células o células madre derivadas del cordón umbilical de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

45 En las Figuras 4A-D se muestran imágenes de un análisis por RT-PCR del ARN extraído de las células o células madre derivadas del cordón umbilical y tinción inmunocitoquímica de las células de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En la Figura 5 se muestran imágenes del cultivo de células o células madre derivadas de tejido del cordón umbilical en una matriz de PRP semisólida o un lisado PL de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En las Figuras 6A-B se muestran un análisis de los tamaños de exosomas extracelulares y un SEM de los exosomas de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

50 En la Figura 6C se muestra la expresión de CD63 por los exosomas producidos a partir de células o células madre derivadas de cordón umbilical de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En las Figuras 7A-D se muestran imágenes que demuestran la diferenciación de tejido de cordón umbilical en los linajes adipogénicos de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En las Figuras 8A-D se muestran imágenes que demuestran la diferenciación de tejido de cordón umbilical en los linajes osteogénicos de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

5 En las Figuras 9A-D se muestran imágenes que demuestran la diferenciación de tejido de cordón umbilical en los linajes condrogénicos de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En las Figuras 10A-D se muestran imágenes que demuestran la diferenciación de tejido de cordón umbilical en los linajes cardiogénicos de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

10 En la Figura 11A-B se muestran los datos relativos a la isquemia crónica de miembros y la percepción del dolor en el tiempo de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En la Figura 12 se muestra una imagen de un angiograma que muestra la administración de células en el corazón de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En la Figura 13 se muestra una serie de imágenes de un angiograma que muestra la administración de células en el corazón de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

15 En la Figura 14A-D se muestran imágenes de la rodilla de una mujer de 80 años antes y después de la administración de células madre en el espacio intraarticular de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

En la Figura 15A-B se muestran datos relativos al síndrome de radiación aguda de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

20 En la Figura 16 se muestran datos relativos al síndrome de radiación aguda de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 Antes de describir la presente divulgación en la presente, se deberá comprender que esta divulgación no se limita a las estructuras, pasos de proceso o materiales particulares divulgados en la presente, sino que se extiende a las equivalencias de los mismos como podrán reconocer los especialistas en el arte relevante. También se comprenderá que la terminología utilizada en la presente tiene por objeto describir formas de realización particulares solamente, y no debe interpretarse como una limitación de la invención.

Definiciones

La siguiente terminología se utilizará de acuerdo con las definiciones detalladas a continuación.

30 Se deberá tener en cuenta que, tal como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "la", "el" incluyen los referentes al plural a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una o más de dichas células y la referencia "al frasco" incluye la referencia a uno o más de dichos frascos.

Según se usa en la presente, el término "célula aislada" se refiere a una célula que fue aislada de la capa subepitelial de un cordón umbilical de mamífero.

35 Según se usa en la presente, el término "sustancialmente" se refiere a la extensión o grado completo o casi completo de una acción, característica, propiedad, estado, estructura, ítem o resultado. Por ejemplo, un objeto que está "sustancialmente" incluido significará que dicho objeto está completamente incluido o casi completamente incluido. El grado exacto de desviación permitido con respecto a una totalidad absoluta dependerá, en algunos casos, del contexto específico. Sin embargo, en general la proximidad a la totalidad será tal que se obtendrá el mismo resultado global que si se hubiera logrado una totalidad absoluta y total. El uso de "sustancialmente" es igualmente aplicable cuando se usa con una connotación negativa para hacer referencia a la falta completa o casi completa de una acción, característica, propiedad, estado, estructura, ítem o resultado. Por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre de" partículas carecerá por completo de dichas partículas o carecerá casi por completo de las partículas que el efecto hubiera sido el mismo que si careciera por completo de las partículas. En otras palabras, una composición que está "sustancialmente libre de" un ingrediente o elemento en verdad puede aún contener dicho ítem siempre que no se observe un efecto mensurable del mismo.

40

45

Según se usa en la presente, el término "aproximadamente" se usa para proporcionar flexibilidad a un punto de valoración final de un rango numérico al proveer que un valor dado se puede encontrar "un poco por encima" o "un poco por debajo" del punto de valoración final.

- 5 Según se usa en la presente, se puede presentar una pluralidad de ítems, elementos estructurales, elementos de composición y/o materiales en una lista común para mayor conveniencia. Sin embargo, estas listas deben considerarse como si cada miembro de la lista se identificara individualmente como un miembro separado y único. Por consiguiente, ningún miembro individual de dicha lista debería considerarse como un equivalente de hecho de cualquier otro miembro de esa misma lista basado solamente en su presentación en un grupo común sin indicaciones hacia lo contrario.
- 10 Las concentraciones, cantidades y otros datos numéricos se pueden expresar o presentar como un formato de rangos en la presente. Se comprenderá que dicho formato de rangos se usa meramente para mayor conveniencia y brevedad y por ende debería interpretarse en un sentido flexible, no sólo incluyendo los valores numéricos explícitamente indicados como límites del rango, sino también a todos los valores o subrangos numéricos individuales comprendidos dentro de dicho rango, como si explícitamente se indicara cada valor y subrango numérico. A modo ilustrativo, se interpretará que un rango numérico de "entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5" no sólo incluye los valores indicados explícitamente de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5, sino también incluye los valores y subrangos individuales comprendidos en el rango indicado. Por consiguiente, este rango numérico incluye valores individuales tales como 2, 3 y 4 y subrangos tales como de 1-3, de 2-4 y de 3-5, etc., así como 1, 2, 3, 4 y 5, de manera individual.
- 15
- 20 Este mismo principio se aplica a rangos que solamente indican un valor numérico como un mínimo o un máximo. Aún más, dicha interpretación debería aplicarse independientemente de la amplitud del rango o de las características que se describen.

La divulgación

- 25 La presente divulgación presenta el descubrimiento novedoso de una población de células alogénicas o células madre que se puede usar para el tratamiento de un amplio rango de condiciones. Además, esta divulgación describe medios y un método novedoso para cultivar estas células, en algunos casos, sin el uso de enzimas o productos animales. Como tales, se proveen células, células madre, cultivos celulares y los métodos asociados, incluyendo métodos para aislar, cultivar, desarrollar o producir de otra manera estas células. El alcance de la presente divulgación abarca adicionalmente la investigación y los usos terapéuticos de dichas células y cultivos celulares, incluyendo los compuestos derivados de los mismos.
- 30

- 35 A modo de ejemplo, las poblaciones de células y células madre y los compuestos derivados de estas poblaciones se pueden usar en aplicaciones alogénicas para tratar un amplio rango de condiciones incluyendo, pero en un sentido no taxativo, trastornos cardíacos, ortopédicos, autoinmunes, diabetes, cardiovasculares, neurológicos, disfunción eréctil, lesiones de la médula espinal, discos herniados, isquemia crítica de miembros, hipertensión, cicatrización de heridas, úlceras, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de radiación agudo, enfermedad de injerto versus huésped, lechos de órganos isquémicos y semejantes. También se describen métodos para producir poblaciones de células y células madre y compuestos que se pueden usar en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, así como en pruebas de toxicología. Los ejemplos de compuestos derivados de estas poblaciones de células y células madre son vesículas pequeñas que contienen proteínas, ARN, micro ARN y semejantes, que son específicos de las poblaciones de células y células madre.
- 40

- 45 En un aspecto, se provee una célula aislada obtenida de una capa subepitelial de un tejido de cordón umbilical de mamífero que se puede autorrenovar y expandir en cultivo; Dicha célula tiene la capacidad para diferenciarse en un tipo celular tal como, en un aspecto, por ejemplo, en adipocitos, condrocitos, osteocitos, cardiomiocitos y semejantes. En otro aspecto, los ejemplos no taxativos de dichos tipos celulares pueden incluir adipocitos blancos, marrones o beige, condrocitos, osteocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, miocitos y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos. Otros ejemplos de dichos tipos celulares pueden incluir células progenitoras neurales, hepatocitos, células de los islotes, células progenitoras renales y semejantes.

- 50 En la Figura 1 se muestra un corte transversal de un cordón umbilical humano, donde se pueden observar la arteria umbilical (UA), las venas umbilicales (UV), la gelatina de Wharton (WJ) y la capa subepitelial (SL). Las células aisladas de la SL pueden comprender una variedad de marcadores característicos que las distinguen de la célula aislada previamente de muestras del cordón umbilical. Se deberá notar que estas células aisladas no derivan de la gelatina de Wharton, sino más bien de la SL.

- 55 Se pueden utilizar varios marcadores celulares que están presentes o ausentes en la identificación de estas células derivadas de SL y, como tales, se pueden usar para mostrar la novedad de las células aisladas. Por ejemplo, en un aspecto, la célula aislada expresa por lo menos tres marcadores celulares seleccionadas entre CD29, CD73, CD90,

- CD146, CD166, SSEA4, CD9, CD44, CD146 o CD105, y la célula aislada no expresa por lo menos tres marcadores celulares seleccionadas entre CD45, CD34, CD14, CD79, CD106, CD86, CD80, CD19, CD117, Stro-1 o HLA-DR. En otro aspecto, la célula aislada expresa por lo menos cinco marcadores celulares seleccionadas entre CD29, CD73, CD90, CD146, CD166, SSEA4, CD9, CD44, CD146 o CD105. En otro aspecto, la célula aislada expresa por lo menos ocho marcadores celulares seleccionadas entre CD29, CD73, CD90, CD146, CD166, SSEA4, CD9, CD44, CD146 o CD105. En aún otro aspecto, la célula aislada expresa por lo menos CD29, CD73, CD90, CD166, SSEA4, CD9, CD44, CD146 y CD105. En otro aspecto, la célula aislada no expresa por lo menos cinco marcadores celulares seleccionadas entre CD45, CD34, CD14, CD79, CD106, CD86, CD80, CD19, CD117, Stro-1 o HLA-DR. En otro aspecto, la célula aislada no expresa por lo menos ocho marcadores celulares seleccionadas entre CD45, CD34, CD14, CD79, CD106, CD86, CD80, CD19, CD117, Stro-1 o HLA-DR. En aún otro aspecto, la célula aislada no expresa por lo menos CD45, CD34, CD14, CD79, CD106, CD86, CD80, CD19, CD117, Stro-1 y HLA-DR. Adicionalmente, en algunos aspectos, la célula aislada puede ser positiva para SOX2, OCT4, o para ambos SOX2 y OCT4. En un aspecto adicional, la célula aislada puede producir exosomas que expresan CD63, CD9 o ambos CD63 y CD9.
- Se puede utilizar una variedad de técnicas para extraer las células aisladas de la presente divulgación de la SL y se considera que cualquier técnica tal que permita dicha extracción sin ocasionar daños significativos a las células se encuentra dentro del alcance de la presente. En un aspecto, por ejemplo, un método para cultivar células madre a partir de la SL de un cordón umbilical de mamífero puede incluir disecar la capa subepitelial del cordón umbilical. En un aspecto, por ejemplo, se puede recolectar tejido de cordón umbilical y se puede lavarla para eliminar sangre, gelatina de Wharton y cualquier otro material asociado con la SL. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, el tejido del cordón se puede lavar múltiples veces en una solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) tal como la solución amortiguadora salina de fosfato de Dulbecco (DPBS). En algunos aspectos, la PBS puede incluir un lisado de plaquetas (es decir, 10% de lisado PRP del lisado de plaquetas). Luego se puede eliminar y descartar toda la gelatina de Wharton o porción gelatinosa del cordón umbilical remanente. El tejido de cordón umbilical remanente (la SL) se puede colocar luego con el lado interior hacia abajo sobre un sustrato de manera tal que el lado interior de la SL está en contacto con el sustrato. Se puede colocar el cordón umbilical disecado completo luego de eliminar la gelatina de Wharton directamente sobre el sustrato, o el cordón umbilical disecado se puede cortar en secciones más pequeñas (por ejemplo, 1-3 mm) y estas secciones se pueden colocar directamente sobre el sustrato.
- Se contempla una variedad de sustratos sobre los cuales se puede colocar la SL. En un aspecto, por ejemplo, el sustrato puede ser un material polimérico sólido. Un ejemplo de un material polimérico sólido puede incluir una placa de cultivo celular. La placa de cultivo celular puede ser de un plástico tratado para cultivo celular como es de conocimiento en el arte. En un aspecto específico, la SL se puede colocar sobre el sustrato de la placa de cultivo celular sin ningún pretratamiento adicional del plástico tratado para cultivo celular. En otro aspecto, el sustrato puede ser un sustrato de cultivo celular semisólido. Dicho sustrato puede incluir, por ejemplo, un medio de cultivo semisólido incluyendo un agar u otro material de base gelatinosa.
- Después de colocar la SL sobre el sustrato, la SL se cultiva en un medio adecuado. En algunos aspectos, resulta preferible utilizar un medio de cultivo libre de componentes o contaminantes de origen animal y humano. A modo de ejemplo, en la Figura 2 se muestra el cultivo de células a partir de la SL. Como se puede observar en la Figura 2A, a los tres días después de plaquear la SL, las células habían comenzado a migrar. En la Figura 2B se muestran las células después de 6 días de cultivo en un medio libre de componentes animales. Aún más, en la Figura 2C se muestra el cariotipo de las células después del pasaje 12. Como ya se describió, las células derivadas de la SL tienen un único perfil de expresión de marcadores. Los datos que muestran una porción de este perfil se presentan en la Figura 3.
- El cultivo se puede cultivar luego ya sea bajo condiciones de cultivo normóxicas o hipóxicas por un período de tiempo suficiente como para establecer cultivos de células primarias, (por ejemplo, de 3-7 días en algunos casos). Una vez establecidos los cultivos de células primarias, se retira el tejido de SL y se descarta. Las células o las células madre se cultivan adicionalmente y se expanden en frascos de cultivo más grandes, bajo condiciones de cultivo ya sea normóxicas o hipóxicas. Aunque se contempla una variedad de medios de cultivo celular adecuados, en un ejemplo no limitante los medios pueden ser el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), glucosa (500-6000 mg/ml) sin rojo fenol, glutamina 1 X, NEAA 1 X y 0,1-20% de lisado PRP o lisado de plaquetas. Otro ejemplo de medios adecuados puede incluir un medio de base de DMEM bajo en glucosa sin rojo fenol, glutamina 1 X, NEAA 1 X, 1000 unidades de heparina y 20% de lisado PRP o lisado de plaquetas. En otro ejemplo, las células se pueden cultivar directamente sobre un sustrato semisólido de DMEM bajo en glucosa sin rojo fenol, glutamina 1 X, NEAA 1 X y 20% de lisado PRP o lisado de plaquetas. En un ejemplo adicional, el medio de cultivo puede incluir un medio bajo en glucosa (500-1000 mg/ml) que contiene glutamina 1 X, NEAA 1 X, 1000 unidades de heparina. En algunos aspectos, la glucosa puede comprender 1000-4000 mg/ml, y en otros aspectos la glucosa puede ser glucosa alta a 4000-6000 mg/ml. Estos medios también pueden incluir 0,1%-20% de lisado PRP o lisado de plaquetas. En aún otro ejemplo, el medio de cultivo puede ser un semisólido con la sustitución de ácido-citrato-dextrosa ACD en lugar de heparina, y que contiene un medio bajo en glucosa (500-1000 mg/ml), un medio de glucosa intermedia (1000-4000 mg/ml) o un medio alto en glucosa (4000-6000 mg/ml), y además contiene glutamina 1 X, NEAA 1 X y 0,1%-20% de lisado PRP o lisado de plaquetas. En algunos aspectos, las células se pueden

derivar, subcultivar y/o someter a pasajes usando TrypLE. En otro aspecto, las células se pueden derivar, subcultivar y/o someter a pasajes sin el uso de TrypLE o cualquier otra enzima.

En la Figura 4 se muestran los datos relacionados con varias características genéticas de las células aisladas del tejido SL. En la Figura 4A se muestra que las células SL aisladas (calle 1) son positivas para SOX2 y OCT4, y son negativas para NANOG en comparación con las células control (Ctrl). En la Figura 4B se muestra una imagen teñida con DAPI de células SL cultivadas que demuestran que dichas células son positivas para CD44. En la Figura 4C se muestra una imagen teñida con DAPI de células SL cultivadas que demuestran que dichas células son positivas para CD90. En la Figura 4D se muestra una imagen teñida con DAPI de células SL cultivadas que demuestran que dichas células son positivas para CD146.

En un aspecto, las células SL se pueden cultivar a partir de un cordón umbilical de mamífero sobre un sustrato semisólido de lisado PRP o de lisado de plaquetas. Dichas células se pueden cultivar directamente sobre un frasco de cultivo tisular recubierto con plástico como se describió en otra parte en la presente. Después de un tiempo suficiente en cualquiera de los entornos de cultivo normóxicos o hipóxicos, se cambia el medio y se agrega el medio semisólido de lisado PRP o lisado de plaquetas recién preparado al frasco de cultivo. El frasco se continúa cultivando en un entorno de cultivo ya sea normóxicos o hipóxicos. Al día siguiente el medio se vuelve una matriz semisólida de lisado PRP o de lisado de plaquetas. Las células se pueden continuar cultivando en esta matriz hasta el momento del uso. En las Figuras 5A y B se muestran células SL que crecen en un gel semisólido de PRPL o PL, a un aumento de 10X y 40X. En un aspecto específico, los ingredientes para un cultivo semisólido pueden incluir factores de crecimiento para el cultivo celular expandido de diferenciación. Los ejemplos no taxativos pueden incluir FGF, VEGF, FNDC5, 5-azacitidina, TGF-Betal, TGF Beta2, insulina, ITS, IGF y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos.

En algunos casos, la confirmación alogénica de células SL, ya sean diferenciadas o no diferenciadas, puede ser muy beneficiosa, en particular para los usos terapéuticos de las células. En estos casos, se pueden conducir reacciones mixtas de linfocitos con las células para confirmar las propiedades alogénicas de las células. En determinados aspectos, una célula derivada como se describe en la presente no causa una respuesta mixta de linfocitos o proliferación de células T.

En determinados aspectos, una célula derivada como se describe en la presente se puede modificar de manera recombinante para expresar uno o más genes y/o proteínas. Según una técnica, se puede incorporar uno o más genes en un vector de expresión. Los abordajes para suministrar un gen en la célula pueden incluir, sin limitaciones, vectores virales, incluyendo retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adeno-asociados, lentivirus, poxivirus, alfavirus, virus del Herpes simplex 1, plásmidos bacterianos, eucariotas recombinantes y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos. El ADN del plásmido se puede suministrar desnudo o con la ayuda de exosomas, liposomas catiónicos o derivatizados (conjugados con anticuerpos), conjugados de polilisina, gramicidina S, envolturas virales artificiales, otros vehículos intracelulares, así como la inyección directa de los genes. En algunos aspectos, se pueden usar métodos de administración de genes no virales tales como, por ejemplo, un vector basado en una región unida al andamiaje/matriz (S/MAR).

Además, en algunos aspectos, las células SL aisladas se pueden usar para producir una población de exosomas. Estas poblaciones de exosomas se pueden utilizar en una variedad de usos de investigación y terapéuticos. En un aspecto, por ejemplo, las células se cultivan como se describe en un entorno de cultivo ya sea normóxico o hipóxico y los sobrenadantes se recolectan en cada cambio de medio. A continuación, los exosomas se pueden purificar a partir de los sobrenadantes usando un protocolo de purificación apropiado. Un ejemplo no taxativo de un protocolo tal es el sistema de aislamiento ExoQuick de SYSTEMBIO. Los exosomas purificados se pueden utilizar para la manipulación, el direccionamiento y el uso terapéutico adicionales. Los exosomas específicos de las SL células son positivos para la expresión de CD63. En la Figura 6A se muestra un análisis del tamaño de los exosomas obtenidos como ya se describió, y en la Figura 6B se muestra una imagen por microscopio electrónico de un muestreo de exosomas. Adicionalmente, en la Figura 6C se muestra la expresión de exosomas CD63 producidos a partir de células o células madre derivadas de cordón umbilical.

En algunos aspectos, las células aisladas y los cultivos celulares se pueden utilizar tal como están tras su aislamiento del tejido SL. En otros aspectos, las células aisladas se pueden diferenciar en otros tipos celulares. Se debe tener en cuenta que cualquier tipo celular útil que se puede derivar a partir de las células aisladas del tejido SL se considera dentro del alcance de la presente. Los ejemplos no taxativos de dichos tipos celulares incluyen adipocitos, condrocitos, osteocitos, cardiomiocitos y semejantes. La diferenciación se puede inducir mediante exposición de las células a sustancias químicas, factores de crecimiento, sobrenadantes, compuestos sintéticos o naturales, o cualquier otro agente capaz de transformar las células. En un aspecto, por ejemplo, las células aisladas se pueden diferenciar en adipocitos, según se muestra en la Figura 7.

Se considera que cualquier técnica de diferenciación de células SL en adipocitos se encuentra dentro del alcance de la presente. Un ejemplo no taxativo usado para la diferenciación adipogénica incluye células SL cultivadas en la presencia del medio de diferenciación adipogénica StemPro (Life Technologies). En la Figura 7A se muestran

5 células SL diferenciadas que son positivas para los marcadores adipogénicos FABP4, LPL y PPAR γ (calle 1). En el caso de la diferenciación adipogénica, la confirmación se determinó mediante tinción con Aceite Rojo O e inmunocitoquímica FABP4. En la Figura 7B se muestra una imagen de células teñidas con DAPI que muestran los marcadores FABP4. En la Figura 7C se muestran células no teñidas y en la Figura 7D se muestra la tinción con Aceite Rojo O que muestra el almacenamiento de las grasas en las células.

10 En el caso de una diferenciación osteogénica de las células SL, una técnica no taxativa permite cultivar dichas células en la presencia del medio de diferenciación osteogénica StemPro (Life Technologies). Según se muestra en la Figura 8A, por ejemplo, las células SL diferenciadas son positivas para los marcadores osteogénicos OP, ON y AP (calle 1). En la diferenciación osteogénica, la confirmación se determinó mediante tinción con rojo de alizarina e inmunocitoquímica con osteocalcina. En la Figura 8B se muestra una imagen de células teñidas con DAPI donde se muestra la presencia de osteocalcina. En la Figura 8C se muestran células no teñidas y en la Figura 8D se muestra una imagen de células teñidas con rojo de alizarina que demuestra la presencia de deposiciones de calcio en las células.

15 En el caso de una diferenciación condrogénica de las células SL, una técnica no taxativa permite cultivar células SL en la presencia del medio de diferenciación condrogénica StemPro (Life Technologies). Según se muestra en la Figura 9A, las células SL diferenciadas son positivas para los marcadores condrogénicos Colágeno 2A, A6 y BG (calle 1). En la diferenciación condrogénica, la confirmación se determinó mediante la tinción de Von Kossa. En la Figura 9B se muestra la tinción con azul de Alscia de un pélet de condrocitos.

20 En el caso de una diferenciación cardiogénica de las células SL, una técnica no taxativa permite cultivar células en la presencia de DMEM bajo en glucosa sin rojo fenol, glutamina 1 X, NEAA 1 X y 10% de lisado PRP o lisado de plaquetas con 5-AZA-2'-desoxicitidina 5-10 mM. Según se muestra en la Figura 10A, las células SL diferenciadas son positivas para los marcadores cardiogénicos MYF5, CNX43 y ACTIN (calle 1). En la diferenciación cardiogénica, la confirmación se determinó mediante tinción para ANP, tropomiosina y troponina 1. En la Figura 10B se muestra una imagen de células teñidas con DAPI donde se demuestra la presencia de Troponina 1. En la Figura 10C se muestra una imagen de células teñidas con DAPI donde se demuestra la presencia de tropomiosina. En la Figura 25 10D se muestra una imagen fusionada de las imágenes de las Figuras 10B y 10C.

30 En aún otro aspecto, se provee un método de tratamiento de una condición médica. En algunas formas de realización, dicho método puede incluir introducir las células que se describen en la presente en un individuo que sufre de la condición médica. Las células se pueden administrar a varias dosis tales como, sin limitaciones, entre aproximadamente 500.000 y aproximadamente 1.000.000.000 de células por dosis. En algunos aspectos, el rango de dosificación de células se puede calcular basado en el peso del sujeto. En determinados aspectos, el rango de células se calcula basado en el uso terapéutico o el tejido blanco o el método de administración. Los ejemplos no taxativos de condiciones médicas pueden incluir EPOC, diabetes, isquemia, osteoartritis, daño ortopédico, daño hepático, angina refractaria crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, asma, enfisema, heridas, disfunción eréctil, lesiones de la médula espinal, discos herniados, síndrome de radiación aguda, neurológicos trastornos, enfermedad 35 de injerto versus huésped, trastornos autoinmunitarios, insuficiencia renal, trastornos autoinmunitarios y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos. El tratamiento puede incluir introducir células en una región del sujeto donde la condición médica pueda ser tratada. Las células se pueden administrar por vía intramuscular, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, quirúrgica, intratecal, intraperitoneal, intranasal, oral, tópica, rectal, vaginal, por aspiración y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos. Adicionalmente, en un aspecto, las células SL no diferenciadas se pueden administrar al sujeto para tratar la condición médica. En otro aspecto, las células SL diferenciadas se pueden administrar al sujeto para tratar la condición médica.

40 Las células madre también se pueden suministrar en un individuo de acuerdo con una administración retrógrada o anterógrada. A modo de ejemplo, las células se pueden introducir en un órgano de un individuo mediante una administración retrógrada de las células en el órgano. Los ejemplos no taxativos de dichos órganos pueden incluir el corazón, el hígado, un riñón, el cerebro, páncreas y semejantes.

45 Adicionalmente, en algunos aspectos las células SL se pueden lisar y el lisado se pueden usar para el tratamiento. En otros aspectos, se puede usar el sobrenadante del proceso de cultivo para el tratamiento. Un ejemplo de dicho tratamiento con un sobrenadante incluye el suministro de exosomas. Los exosomas se pueden administrar al individuo por medio de una administración aerosolizada, una administración IV o cualquier otra técnica de administración eficaz. Los exosomas también se pueden usar para tratar individuos con heridas abiertas, úlceras, quemaduras y semejantes.

50 En un aspecto adicional, se provee un método de tratamiento de EPOC. Un método tal puede incluir administrar un agente activo eficaz para EPOC por vía intravenosa a un paciente para suministrar el agente activo eficaz para EPOC en la mitad inferior del pulmón del paciente, y además administrar el agente activo eficaz para EPOC en una forma aerosolizada al paciente por medio de ventilación para suministrar el agente activo eficaz para EPOC en una mitad superior del pulmón del paciente. En algunas formas de realización, la administración puede ser concomitante. En otros aspectos, la administración puede ser sucesiva. En algunos aspectos, el agente eficaz para EPOC 55

5 suministrado por vía intravenosa puede ser diferente del agente eficaz para EPOC suministrado en la forma de un aerosol, en tanto en otros aspectos dicho mismo agente eficaz para EPOC se puede utilizar en ambas administraciones. En algunos casos puede ser beneficioso para el paciente estar en posición sentada durante la administración del agente activo eficaz para EPOC. En un aspecto, el agente activo eficaz para EPOC incluye células madre. En otro aspecto, las células madre incluyen las células que se describen en la presente. En otro aspecto, el agente activo puede ser un agente farmacéutico o un agente biológico. Otros ejemplos no taxativos de agentes activos eficaces para EPOC pueden incluir exosomas, lisados celulares, extractos de proteínas, extractos de proteínas derivadas del cultivo celular y semejantes, incluyendo combinaciones de los mismos.

10 Se puede utilizar una variedad de condiciones para aerosolizar células. En un aspecto, por ejemplo, las células se pueden suspender en 1-5 ml de salina y aerosolizar a una presión de 3-100 psi durante 1-15 minutos, o hasta que las células comienzan a romperse y/o morir.

15 Se puede utilizar cualquier forma de aerosol para suministrar las células madre en los pulmones siempre que las células madre se puedan administrar sustancialmente sin daños. En algunos casos, puede ser beneficioso aerosolizar las células madre por medio de un aerosol capaz de aerosolizar partículas de los tamaños blanco. Por ejemplo, en un aspecto, se puede usar un aerosol que aerosolice a un tamaño de partícula de entre aproximadamente 2 micrones y aproximadamente 50 micrones. En otro aspecto, se puede usar un aerosol que aerosolice a un tamaño de partícula de entre aproximadamente 4 micrones y aproximadamente 30 micrones. En aún otro aspecto, se puede usar un aerosol que aerosolice a un tamaño de partícula de entre aproximadamente 6 micrones y aproximadamente 20 micrones. En aún otro aspecto, se puede usar un aerosol que aerosolice a un tamaño de partícula de entre aproximadamente 6 micrones y aproximadamente 200 micrones.

25 En otro ejemplo, las técnicas de la presente se pueden utilizar en el tratamiento del síndrome de radiación aguda. El síndrome de radiación aguda puede resultar todo un desafío para tratar, siendo la supervivencia dependiente de la dosis de radiación y el subsiguiente cuidado clínico para mediar en infecciones letales, que incluyen proporcionar un soporte para la expansión de células madre residentes. Las técnicas tradicionales emplean un tratamiento con factores de crecimiento o el trasplante de células madre hematopoyéticas. Las células madre de acuerdo con los aspectos de la presente divulgación se pueden usar según modelos de trasplante alogénicos sin necesidad de compatibilización de HLA entre el donante y el huésped. Se ha demostrado que las células son hipoinmunogénicas y que no son reconocidas por el sistema inmunológico, aún después de múltiples inyecciones. Estas células madre secretan varias moléculas bioactivas, tales como los factores de crecimiento hematopoyéticos que incluyen IL6, IL11, LIF SCF y el ligando Fly3 y las moléculas inmunomoduladoras tales como TGFB1, prostaglandina E2, indolamina 2,3-dioxigenasa.

35 Dichas células cultivadas facilitan un mecanismo protector que combate la cascada inflamatoria además de brindar soporte a la detoxificación después de una exposición a la radiación. Además, estas células liberan factores tróficos y actividad moduladora del nicho de HSC para rescatar la hematopoyesis y la actividad endógenas. Estos datos sugieren que estas células sirven como un tratamiento rápido y eficaz en la primera línea de defensa para combatir una insuficiencia hematopoyética inducida por radiación. Además, estas células se pueden usar para tratar una enfermedad de injerto versus huésped severa o resistente a esteroides.

Ejemplos

Ejemplo 1: Composición para cultivar: células o células madre de cordón umbilical para uso clínico.

40 Composición del medio 1
 DMEM-bajo en glucosa-sin fenol
 glutamina 1 X
 NEAA 1 X
 10% de lisado PRP o lisado de plaquetas

45 1000 unidades de heparina
 Composición del medio 2
 DMEM-bajo en glucosa-sin fenol
 glutamina 1 X

NEAA 1 X

10% de lisado PRP liofilizado o lisado de plaquetas en comprimidos

1000 unidades de heparina

Composición del medio 3

5 DMEM-bajo en glucosa-sin fenol

glutamina 1 X

NEAA 1 X

10% de lisado PRP o lisado de plaquetas

ACD

10 **Ejemplo 2: Cultivo de células o células madre de cordón umbilical para uso clínico.**

15 Se obtiene tejido de cordón umbilical y se efectúan pruebas de la sangre materna por la presencia de enfermedades infecciosas antes de derivar las poblaciones de células y células madre. Se lava 10 veces un trozo de 1 cm del cordón en una solución de DPBS que contiene 10% de lisado PRP o lisado de plaquetas. Luego se abre el cordón umbilical en sentido longitudinal para exponer el interior del cordón umbilical. Se retira todo el tejido que pueda originar células endoteliales. El cordón umbilical se coloca luego directamente en una placa de cultivo celular que contiene la Composición de medio 1 con el interior del cordón umbilical en contacto con el plástico y se cultiva en entornos de cultivo ya sea normóxicos o hipóxicos.

20 El tercer día se reemplaza el medio por Composición de medio 1 recién preparado y se cultiva hasta el día siete, momento en el cual se retiran los explantes para la expansión de células primarias. Las células son alimentadas cada día por medio hasta que se pueden cosechar aproximadamente 500.000-1.000.000 células y expandirlas adicionalmente. Cabe señalar que el medio usado será la Composición de medio 1 a menos que específicamente se indique de otra manera.

Ejemplo 3: Pasaje enzimático de células o células madre de cordón umbilical para uso clínico.

25 Se puede utilizar TrypLE para subcultivar las células. El medio se retira del frasco del Ejemplo 2 y las células se lavan tres veces con DPBS. Luego se agrega TrypLE y las células son transferidas a una incubadora a 37 °C durante 3-5 minutos. La reacción enzimática se detiene con la adición de un volumen igual de medio de cultivo/expansión. A continuación, las células se centrifugan a 400 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante y las células se lavan 3 veces si serán subcultivadas o 10 veces se utilizarán con fines terapéuticos.

30 **Ejemplo 4: Pasaje no enzimático de células o células madre de cordón umbilical para uso clínico.**

35 Para un abordaje no enzimático, se puede usar un gel semisólido para retirar las células del frasco de cultivo tisular. Las células se cultivan en un medio de cultivo/expansión normal. Un día antes del subcultivo, se agrega medio semisólido ACD, DMEM-bajo en glucosa-sin fenol, glutamina 1 X, NEAA 1 X, 10% de lisado PRP o lisado de plaquetas, a las células. Las células se cultivan durante la noche ya sea en un entorno normóxico o en un entorno hipóxico. Al día siguiente se forma un gel semisólido sobre las células. Para retirar las células de la placa, se golpea suavemente el lado de la placa hasta que el gel semisólido se desprende de la base. Luego se puede retirar la capa semisólida y las células se situarán dentro del gel semisólido. Si se requiere un subcultivo adicional, el gel semisólido es transferido a frascos o bolsas de cultivo celular adicionales para otra expansión. Si las células no serán expandidas adicionalmente, la capa semisólida que contiene las células se puede aplicar directamente con fines terapéuticos.

Ejemplo 5: Uso terapéutico de células o células madre de cordón umbilical en el tratamiento de isquemia crítica de miembros

45 Los pacientes calificaron para su inclusión si tenían una isquemia crítica de miembros crónica, incluyendo dolor en reposo (clase Rutherford 4) o pérdida de tejido leve a moderada (Rutherford 5) y si no eran candidatos para cirugía o una revascularización endovascular. Los parámetros hemodinámicos incluyeron uno de los siguientes: presión en tobillos < 50 mm de Hg o ABI < 0,4; presión en dedos del pie < 40 mm de Hg o TBI < 0,4; o TcPO₂ < 20 mm de Hg

en aire ambiente.

5 Los criterios de exclusión incluyeron una necrosis extensa del miembro índice haciendo que una amputación fuera inevitable (clase Rutherford 6); oclusión no corregida de la arteria ilíaca ipsilateral con respecto al miembro índice; ausencia de señal Doppler en el miembro índice (ABI = 0); creatinina sérica $\geq 2,0$ mg/dl; infección activa que requiere antibióticos; forma maligna activa; o cualquier trastorno hematológico que impidió la cosecha de médula ósea.

Todos los pacientes tenían ≥ 18 años de edad y pudieron proporcionar un consentimiento informado. Todos los pacientes enrolados fueron sometidos a un examen por cáncer preoperatorio y a exámenes oftalmológicos por retinopatía proliferativa.

10 Las células se produjeron como se describió en los Ejemplos 1-4. El cirujano vascular preparó y aplicó 40 inyecciones intramusculares de alícuotas de 1 ml de células o de células madre derivadas del cordón umbilical en ubicaciones identificadas previamente a lo largo del miembro isquémico usando ultrasonido como guía. Los procedimientos se llevaron a cabo bajo anestesia local y sedación consciente.

15 Los pacientes fueron evaluados a las 1, 4, 8, 12 y 26 semanas después del procedimiento. Los resultados clínicos incluyeron estado de amputación, clasificación de Rutherford de isquemia miembros y dolor determinado según una escala análoga visual (VAS). Las amputaciones importantes se definieron como aquellas realizadas por encima del tobillo. Los resultados hemodinámicos se evaluaron según el índice de tobillo-brazo (ABI). También se realizó un monitoreo de laboratorio de hematología y química de la sangre. Se realizó un examen oftalmológico de retina al nivel basal y a las 12 semanas en pacientes diabéticos para evaluar la retinopatía proliferativa. Los resultados se muestran en las Figuras 11A y 11B. La inyección solo representa el suministro de las células madre, en tanto el control era una solución salina sin células madre.

Ejemplo 6: Uso terapéutico de células o células madre de cordón umbilical en el tratamiento de angina refractaria crónica y/o insuficiencia cardíaca congestiva.

25 Se enrolaron pacientes con angina de clase III-IV de la Sociedad Cardiovascular Canadiense [Canadian Cardiovascular Society] (CCS) a pesar de una terapia médica o quirúrgica máxima que no eran elegibles para una revascularización percutánea o quirúrgica adicional (basado en la anatomía coronaria) y que presentaban evidencia de isquemia reversible en una tomografía computada de emisión de un solo fotón (SPECT) con ejercicio.

30 Las células se produjeron como se describió en los Ejemplos 1-4. Se canuló la vena femoral con una vaina French 7, se colocó un catéter French 6 en el seno coronario y se colocó un alambre de guía hidrofílico de 0,035 mm en la vena interventricular o lateral seguido por colocación de un balón periférico en la porción media del seno coronario para permitir un suministro no selectivo de células. (Cook Medical, Indiana, EEUU). El balón se infló a una presión muy baja (1 a 2 atm) durante 10 minutos produciendo un estancamiento del flujo. Se inyectaron 50 ml de células (50.000.000-400.000.000) manualmente a través del balón a una velocidad de 10 ml por minuto. El tiempo promedio total del procedimiento de suministro de células era de 30 minutos. En la Figura 12 se muestra un angiograma que indica el suministro de células en el corazón usando una técnica retrógrada.

35 La evaluación de selección basal de los pacientes incluyó una evaluación clínica, electrocardiograma (ECG), evaluación de laboratorio (recuento sanguíneo completo, química de la sangre, índice de sedimentación de eritrocitos, niveles en suero de creatina quinasa y troponina T). Los pacientes mantuvieron un registro de la frecuencia diaria de angina durante tres semanas, y la severidad de la angina se calificó de acuerdo con la clase CCS al nivel basal, 3, 12 y 24 meses. Dentro de las dos semanas antes de la terapia celular, se evaluó la capacidad de ejercicio usando ergometría en bicicleta junto con imágenes SPECT para evaluar la isquemia del miocardio y la función ventricular izquierda (LV).

Ejemplo 7: Estudio de seguridad de la insuficiencia cardíaca

45 Diez pacientes, 5 isquémicos y 5 no isquémicos, recibieron un suministro retrógrado de células en el corazón como se describió en el Ejemplo 6. En la Figura 13 se muestran imágenes según intervalos de tiempo de dicho suministro retrógrado. La evaluación de selección basal de los pacientes incluyó una evaluación clínica, electrocardiograma (ECG), evaluación de laboratorio (recuento sanguíneo completo, química de la sangre, índice de sedimentación de eritrocitos, niveles en suero de creatina quinasa y troponina T). Los pacientes recibieron evaluaciones de seguimiento a los 1, 3, 6 y 12 meses. En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados en el tiempo para pacientes isquémicos y no isquémicos.

Tabla 1

Isquémico	Nivel basal	1 mes	3 meses
Troponina	0,03	0,02	0,02
BNP	543	320	178
% de EF	26	33	38
6 m.w.	255	260	344
VO ₂ Máx	14	15	17
EA/EAS	0/0	1/0	1/0

Tabla 2

No isquémico	Nivel basal	1 mes	3 meses
Troponina	0,03	0,03	0,02
BNP	655	389	156
% de EF	22	34	39
6 m.w.	227	235	312
VO ₂ Máx	13	15	19
EA/EAS	0/0	0/0	1/0

5 Ejemplo 8: Uso terapéutico de células o células madre de cordón umbilical en la diabetes

Las células se producen como se describió en los Ejemplos 1-4. Las dosis terapéuticas pueden ser de 50.000.000-400.000.000. Las células se suministran por acceso arterial en la arteria celíaca y/o SMA, para así administrar las células en la cabeza y/o la cola del páncreas mediante la técnica de infusión del Ejemplo 9: Uso terapéutico de células o células madre de cordón umbilical para el tratamiento de EPOC/asma/enfisema.

10 En este estudio se utilizaron los siguientes criterios de inclusión para los sujetos. Se incluyeron individuos que tienen:

- EPOC moderada o severa con una relación FEV1/FVC posbroncodilatador < 0,7
- el sujeto debe tener un valor predicho de % de FEV1 posbroncodilatador ≥ 30%
- fumador actual o ex-fumador, con un historial de consumo de cigarrillos de > 20 paquetes-años

15 Se excluyeron del estudio los sujetos que presentan uno o más de los siguientes ítems:

- diagnóstico de asma u otra enfermedad pulmonar clínicamente relevante distinta de EPOC (por ejemplo, enfermedades pulmón restrictivas, sarcoidosis, tuberculosis, fibrosis pulmonar idiopática, bronquiectasia o cáncer de pulmón)
- diagnóstico de deficiencia de α-antitripsina

20 - masa corporal mayor que 150 kg o menos de 40 kg

- sujeto con una infección activa
 - sujeto que tuvo una exacerbación significativa de EPOC o que ha requerido ventilación mecánica dentro de las 4 semanas anteriores a la selección
 - insuficiencia cardíaca no controlada, fibrilación auricular
- 5
- rehabilitación cardiopulmonar iniciada dentro de los 3 meses anteriores a la selección
 - sujeto con evidencia de forma maligna activa o historia previa de forma maligna active que no ha estado en remisión por al menos 5 años
 - sujeto con una esperanza de vida < 6 meses

10 Las células se producen como se describió en los Ejemplos 1-4. Las dosis terapéuticas pueden ser de 50.000.000-400.000.000 células. Las células se administran, al sujeto sentado derecho, de manera simultánea por medio de un suministro aerosolizado que permanecerá en la mitad superior del pulmón gracias a la perfusión por ventilación fisiológica y se administra por vía intravenosa en la mitad inferior del pulmón, gracias a la perfusión por ventilación fisiológica de una persona sentada derecha. Se utiliza esta técnica combinada debido al hecho que cualquiera de las administraciones solas no proporciona suficientes elementos biológicos a todo el volumen pulmonar.

15 Se dividieron 20 sujetos de prueba en 4 grupos y se les administró el tratamiento según el siguiente esquema:

5 sujetos en el Grupo 1 recibieron placebo: inyección de salina

5 sujetos en el Grupo 2 recibieron una administración IV: 200M de células

5 sujetos en el Grupo 3 recibieron una administración inhalada: 200M de células

5 sujetos en el Grupo 4 recibieron una administración IV e inhalada: 100M/100M de células

20 Los resultados obtenidos de estos grupos tratados sin células, con células IV solamente, con células inhaladas solamente y ambas con células IV e inhaladas se muestran en la Tabla 3.

Con respecto a la aerosolización, las células se prepararon como ya se describió, suspendidas en 1-5 ml de salina y se aerosolizaron a una presión de 30 psi durante 8-10 minutos

Tabla 3

	Grupo placebo 1	Grupo IV 2	Grupo inhalado 3	Grupo IV e inhalado 4
FEV1/FVC, pre	0,5560,15	0,4960,08	0,5160,10	0,4760,07
FEV1/FVC, post	0,5260,13	0,5360,12	0,5760,11	0,6660,05
O ₂ l/min, pre	3,061,0	2,861,2	3,261,0	2,861,2
O ₂ l/min, post	3,261,2	2,461,4	2,561,2	2,061,0
MAP/CE	2	0	0	0

25 **Ejemplo 10: Uso terapéutico de células o células madre de cordón umbilical en el tratamiento de la cicatrización de heridas**

Las células se producen como se describió en los Ejemplos 1-4. En este ejemplo las dosis terapéuticas pueden ser de 50.000.000-400.000.000 células. Las células se administran en la mediante inyección y/o aerosolizadas en un vehículo PL con adición de calcio y trombina líquidos.

30 **Ejemplo 11: Uso terapéutico de células o células madre de cordón umbilical en aplicaciones ortopédicas**

5 Las células se producen como se describió en los Ejemplos 1-4. En este ejemplo las dosis terapéuticas pueden ser de 50.000.000-400.000.000 células. Las células se inyectan directamente, utilizando ultrasonido como guía, en el espacio intraarticular/articulación con o sin una técnica de microfractura. Estas células también se pueden administrar con vehículo de PRPL o PL además de calcio/trombina líquido. A modo de ejemplo, en las Figuras 14A y 14B se muestran imágenes de la rodilla de una mujer de 80 años antes del procedimiento de suministro. En las Figuras 14C y 14D se muestran imágenes de la misma rodilla de la misma mujer de 80 años a los 3 meses después del trasplante. Cabe señalar que se observa más espacio intraarticular en el paciente en las imágenes de postransplante.

10 **Ejemplo 12: Uso terapéutico de células o células madre de cordón umbilical en aplicaciones para el síndrome de radiación aguda en ratones**

15 Se usaron ratones C57BL/6J hembra como población receptora. Se aislaron células madre de cordón umbilical como se describió previamente, pero en este caso se aislaron de ratones. Los ratones C57BL/6J hembra recibieron TBI usando una fuente de radiación Cs-137. La irradiación letal se aplicó usando 9,5 Gy. Los ratones recibieron los trasplantes por vía intravenosa dentro de las 8 horas de postirradiación. La evaluación de los recuentos de sangre periférica de los animales tratados con células madre reveló una recuperación similar de leucocitos y trombocitos que lo observado en los receptores tratados con HSC. (Véase las Figuras 15A-B). A los siete meses después del trasplante los receptores estaban bien hematológicamente con una distribución normal de las poblaciones de células de sangre periférica. (Véase la Tabla 4).

Tabla 4: Población de células de sangre periférica en ratones transplantados

Linfocitos	Neutrófilos	Monocitos	Eosinófilos
72% +/- 3	2196 +/- 3	5% +/- 2	2% +/- 1

20 **Ejemplo 13: Uso terapéutico de células o células madre de cordón umbilical en aplicaciones para el síndrome de radiación aguda en humanos**

25 A fin de determinar si las células de la capa subepitelial de cordón umbilical derivadas de humanos tenían el mismo efecto que en el Ejemplo 12, se repitió el mismo experimento usando células derivadas de humanos como material donante y ratones nod/scid nulos para gamma(c) como receptor. Los animales fueron tratados como se describió previamente y se transplantaron por vía IV a las 6, 12 y 24 horas después de la irradiación corporal total (TBI). A los 6 meses de postransplante todos los ratones control (n:::30) que no habían recibido células después de la TBI habían muerto. En la Figura 16 se muestra la supervivencia de los ratones que recibieron las células humanas 6, 12 y 24 horas después de la TBI.

30

REIVINDICACIONES

- 1.Una célula aislada obtenida de una capa subepitelial de un tejido de cordón umbilical de mamífero que se puede autorrenovar y expandir en cultivo;
- 5 en donde la célula aislada expresa por lo menos tres marcadores celulares seleccionados del grupo que consiste en CD29, CD73, CD90, CD166, SSEA4, CD9, CD44, CD146 o CD105; y
- en donde la célula aislada no expresa los marcadores celulares CD45, CD34, CD14, CD79, CD106, CD86, CD80, CD19, CD117, Stro-1 y HLA-DR.
- 2.La célula aislada de la reivindicación 1, en donde la célula aislada expresa CD29, CD73, CD90, CD166, SSEA4, CD9, CD44, CD146 y CD105.
- 10 3.La célula aislada de la reivindicación 1, en donde la célula aislada es positiva para SOX2 o en donde la célula aislada es positiva para OCT4 o en donde la célula aislada es positiva para SOX2 y OCT4.
- 4.La célula aislada de la reivindicación 1, en donde la célula aislada produce exosomas que expresan CD63, CD9 o CD63 y CD9.
- 15 5.La célula aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se ha diferenciado en un adipocito o que se ha diferenciado en un condrocito o que se ha diferenciado en un osteocito o que se ha diferenciado en un cardiomiocito.
- 6.La célula aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se ha expandido en un cultivo celular.
- 7.Un exosoma aislado derivado de la célula aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el exosoma expresa CD63, CD9 o CD63 y CD9.
- 20 8.Un cultivo de células diferenciadas derivadas de la célula aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cultivo de las células diferenciadas incluye un tipo celular seleccionado del grupo que consiste en adipocitos, condrocitos, osteocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, miocitos y combinaciones de los mismos.
- 9.Un método para cultivar células madre a partir de una capa subepitelial de un cordón umbilical de mamífero, que comprende:
- disecar la capa subepitelial del cordón umbilical;
- 25 colocar la capa subepitelial disecada con el lado interior hacia abajo sobre un sustrato de manera tal que el lado interior de la capa subepitelial está en contacto con el sustrato;
- cultivar la capa subepitelial sobre el sustrato; y
- retirar explantes para la expansión de células primarias.
- 30 10.El método de la reivindicación 9, en donde la disección de la capa subepitelial incluye además retirar la gelatina de Wharton del cordón umbilical.
- 11.El método de la reivindicación 9, en donde la capa subepitelial se cultiva en un medio de cultivo que comprende un lisado de plaquetas.
- 35 12.El método de la reivindicación 9, en donde el sustrato es una placa de cultivo y en donde dicha placa de cultivo es un plástico tratado para cultivo celular y la capa subepitelial se coloca sobre el mismo sin ningún pretratamiento adicional del plástico tratado para cultivo celular.
- 13.El método de la reivindicación 9, en donde el cultivo de la capa subepitelial y la eliminación de los explantes se efectúan sin el uso de ninguna enzima.
- 14.El método de la reivindicación 9, que además comprende subcultivar los explantes o que además comprende subcultivar los explantes y en donde dicho subcultivo se realiza sin el uso de ninguna enzima.

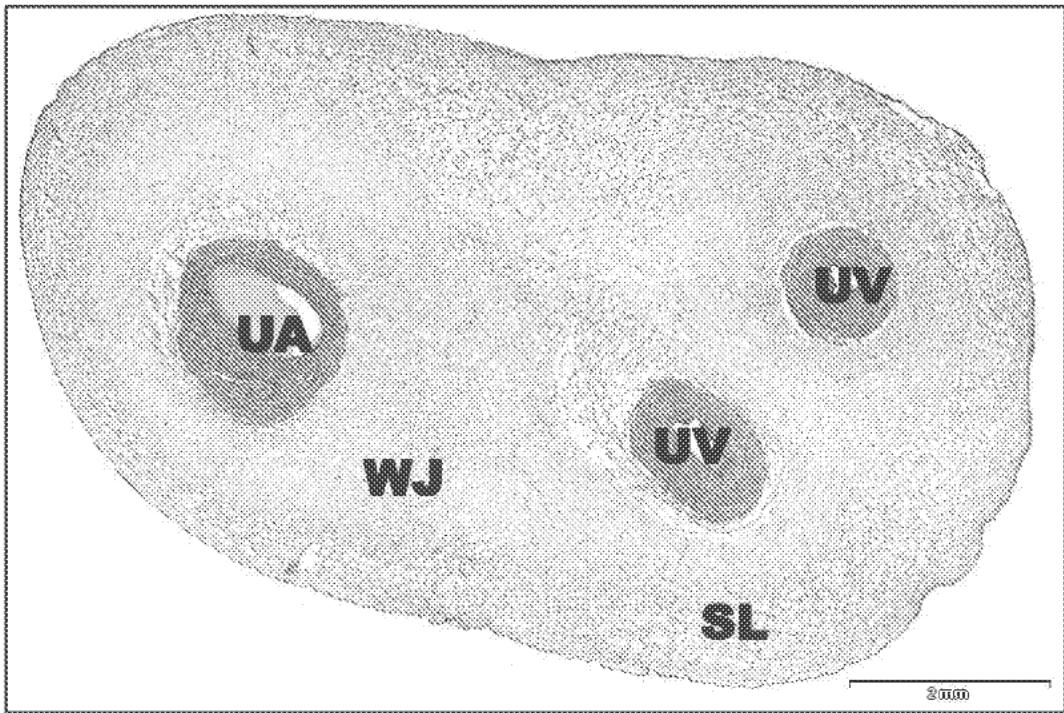


FIG. 1

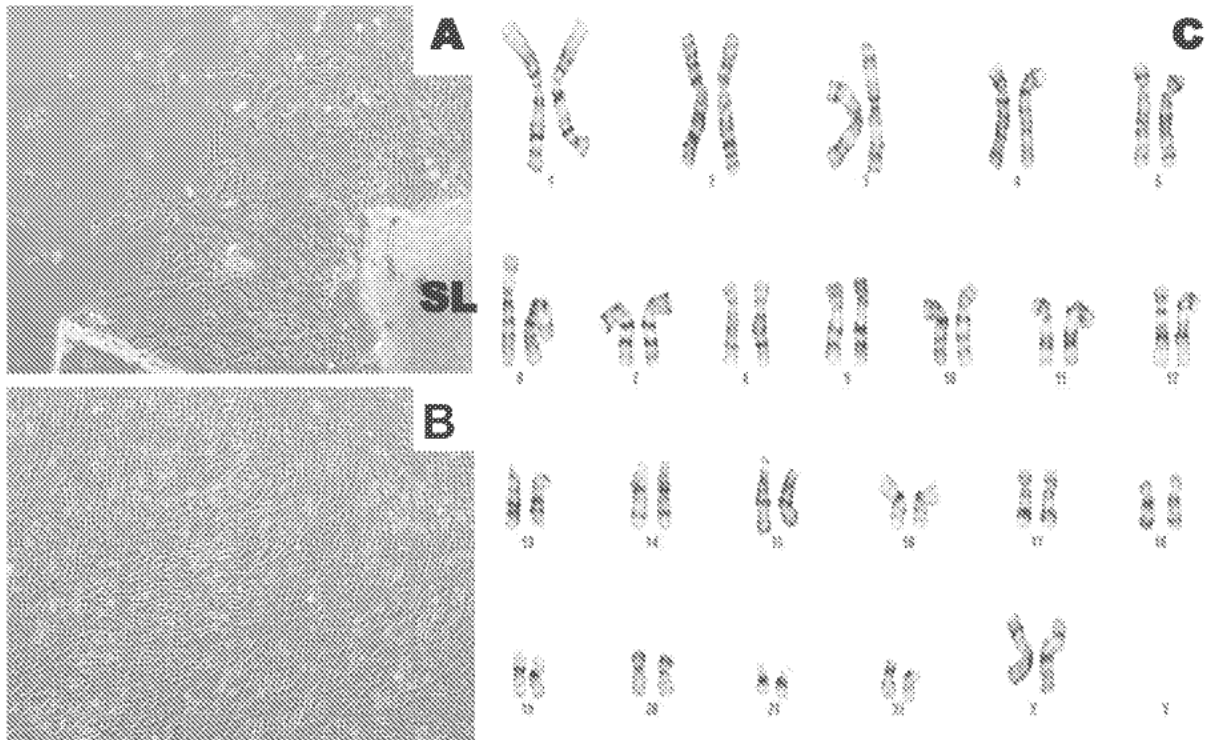


FIG. 2A-C

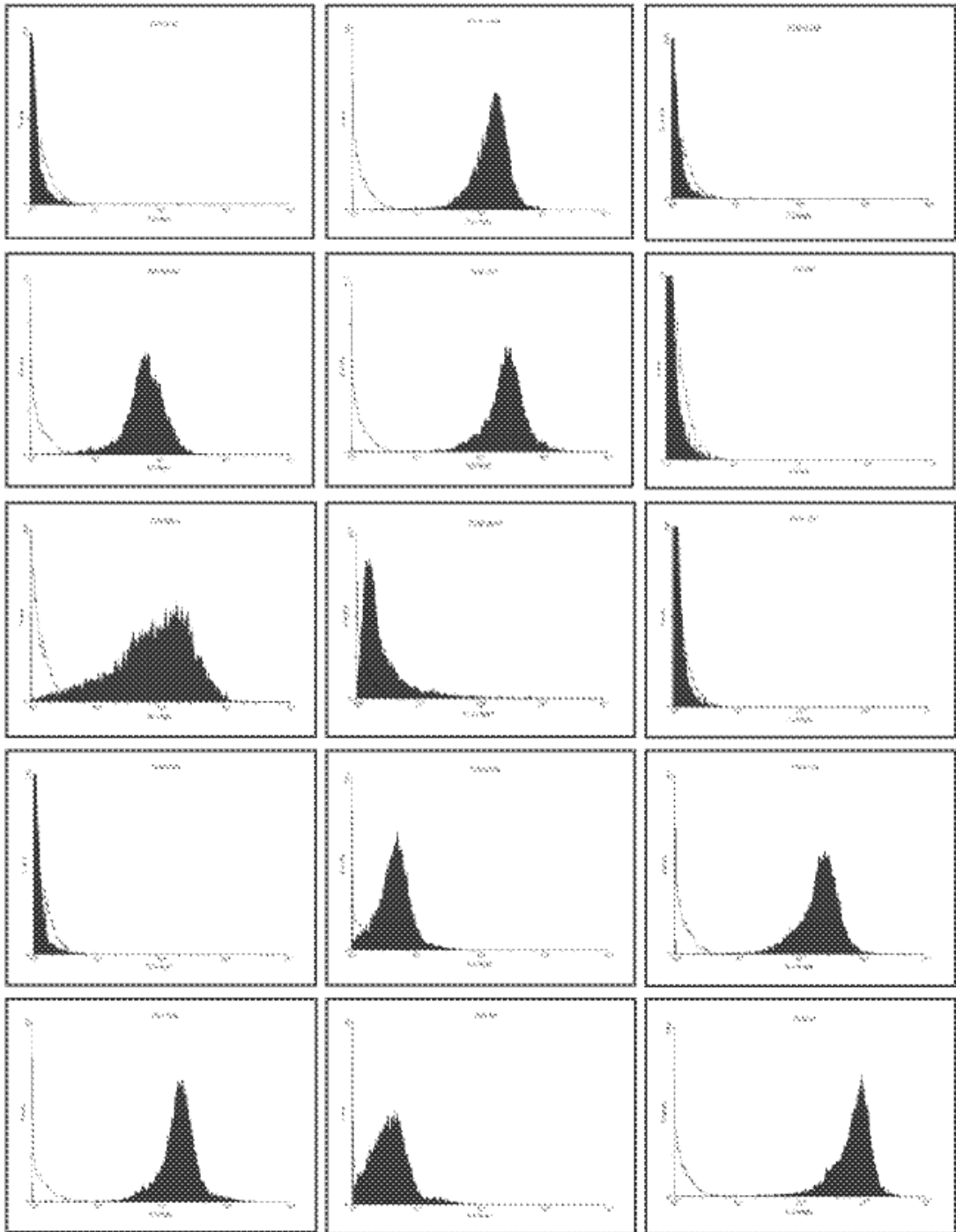


FIG. 3

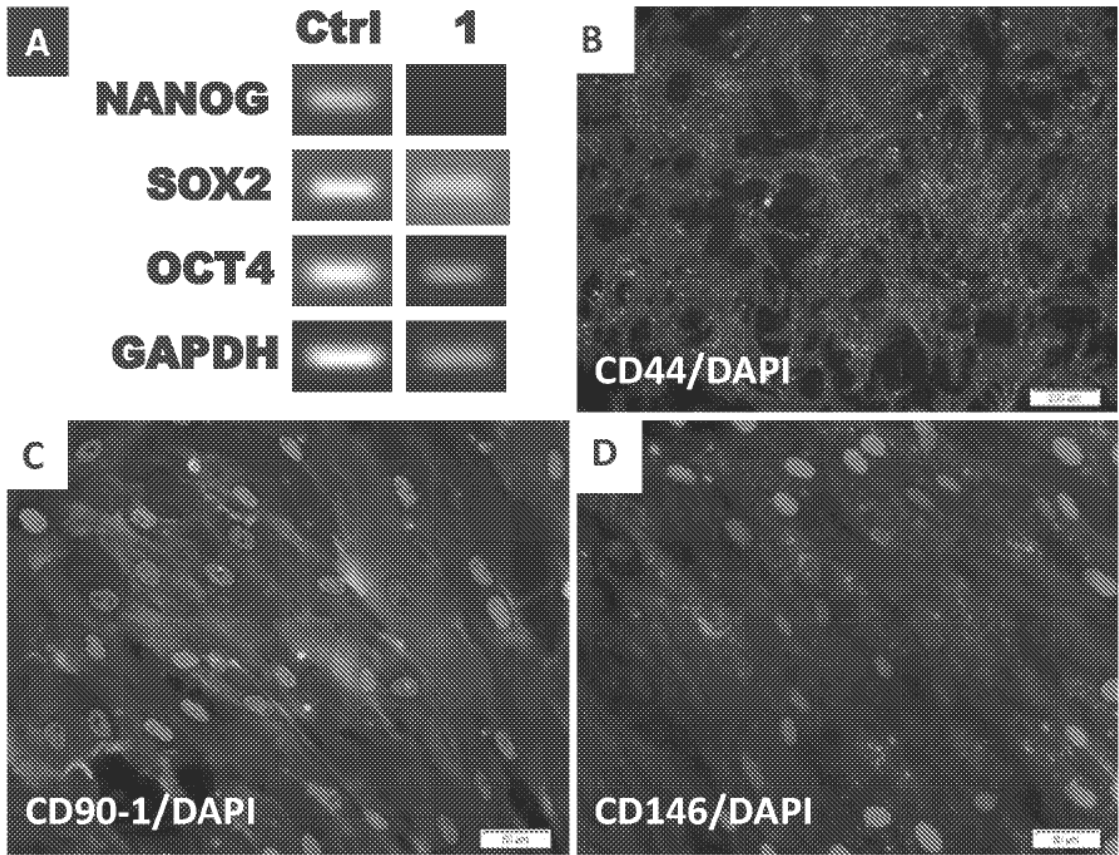


FIG. 4A-D

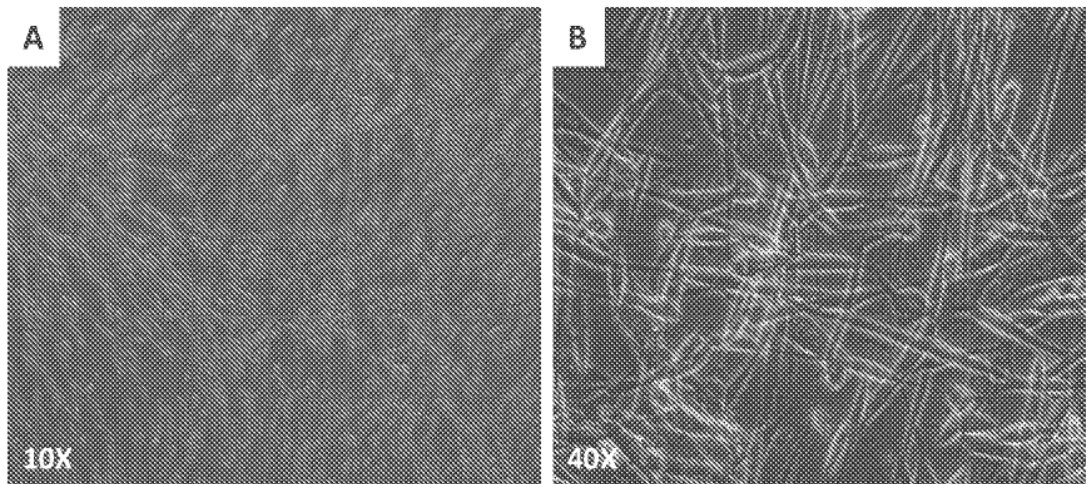


FIG. 5A-B

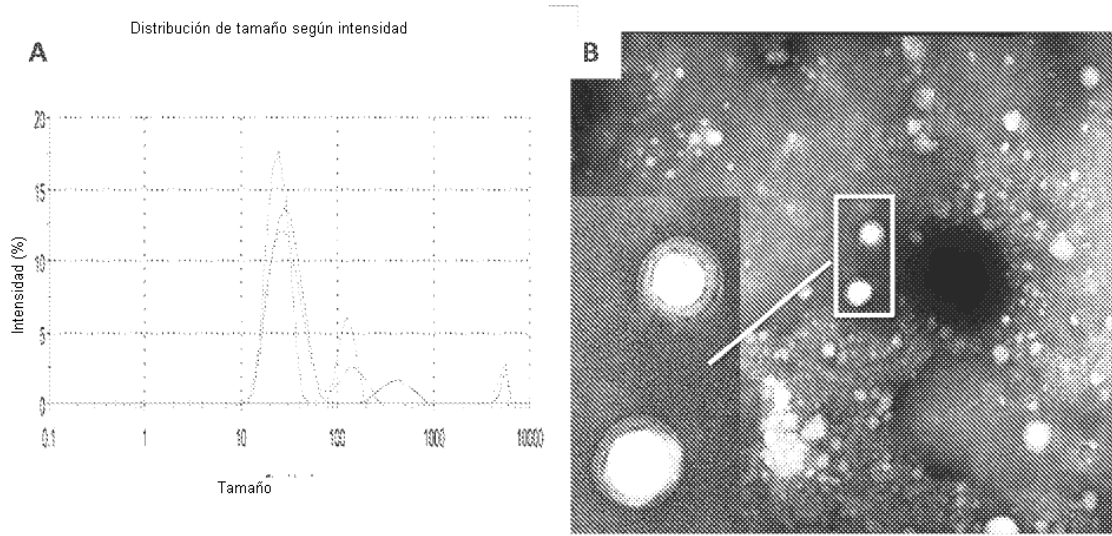


FIG. 6A-B

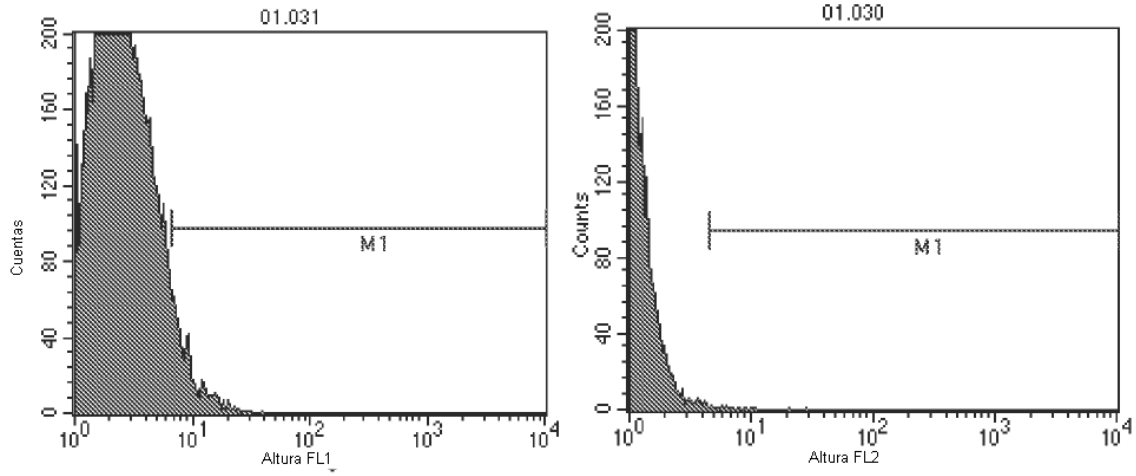


FIG. 6C

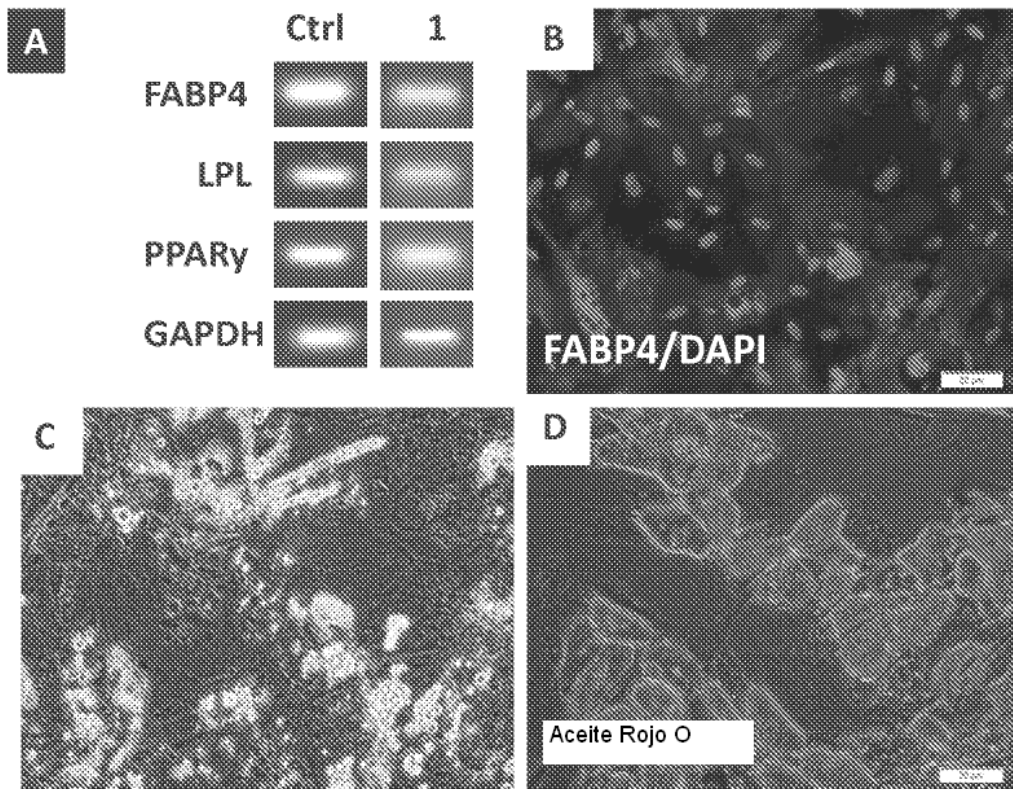


FIG. 7A-D

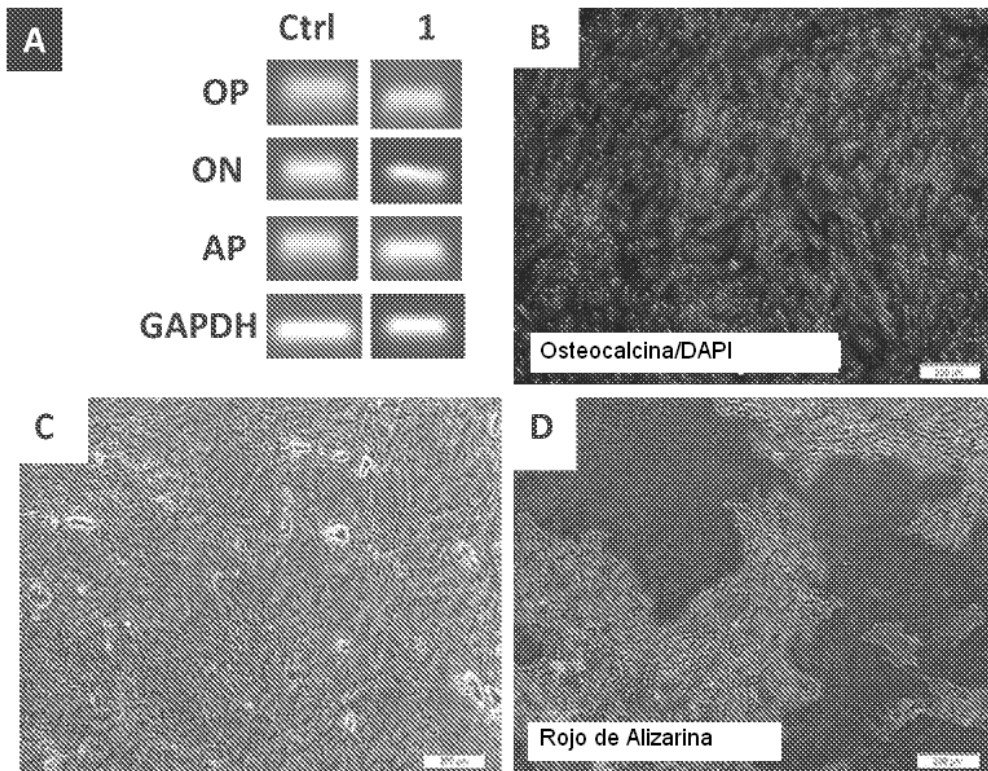


FIG. 8A-D

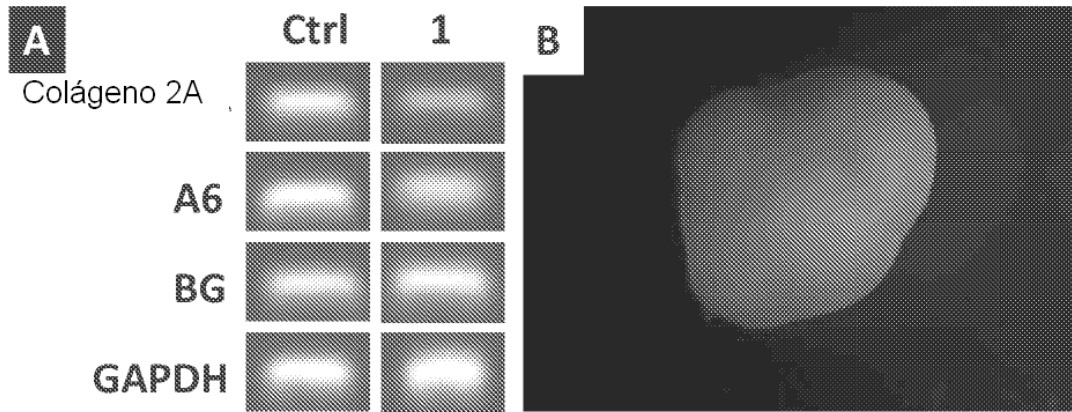


FIG. 9A-B

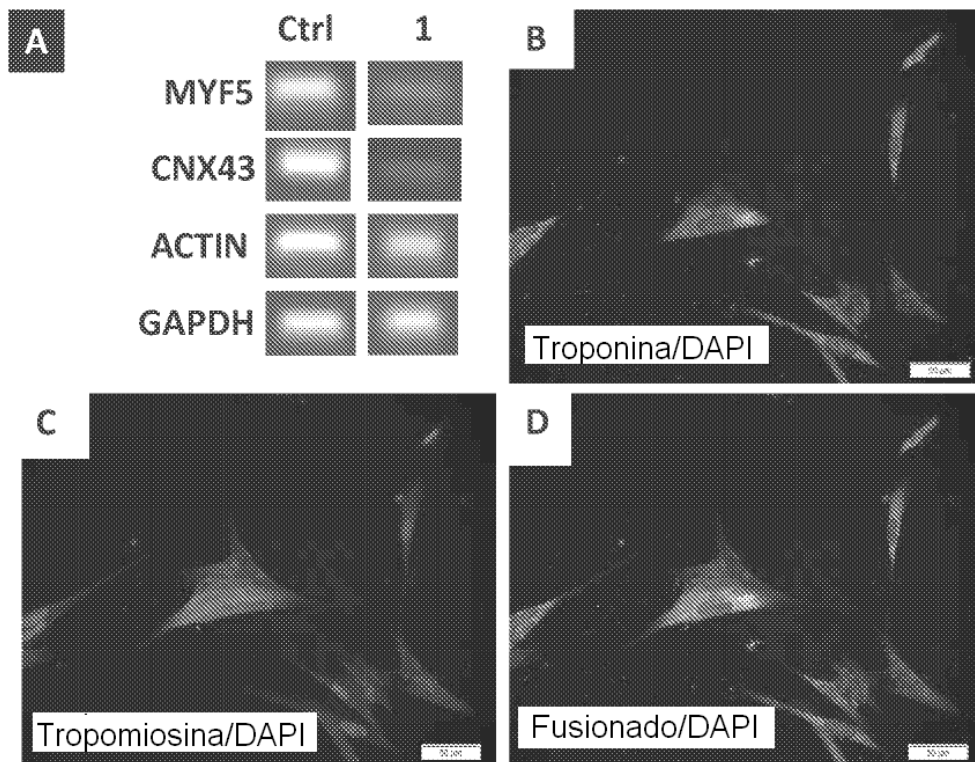


FIG. 10A-D

Cambio promedio con respecto al nivel basal en la percepción de dolor del sujeto en el tiempo

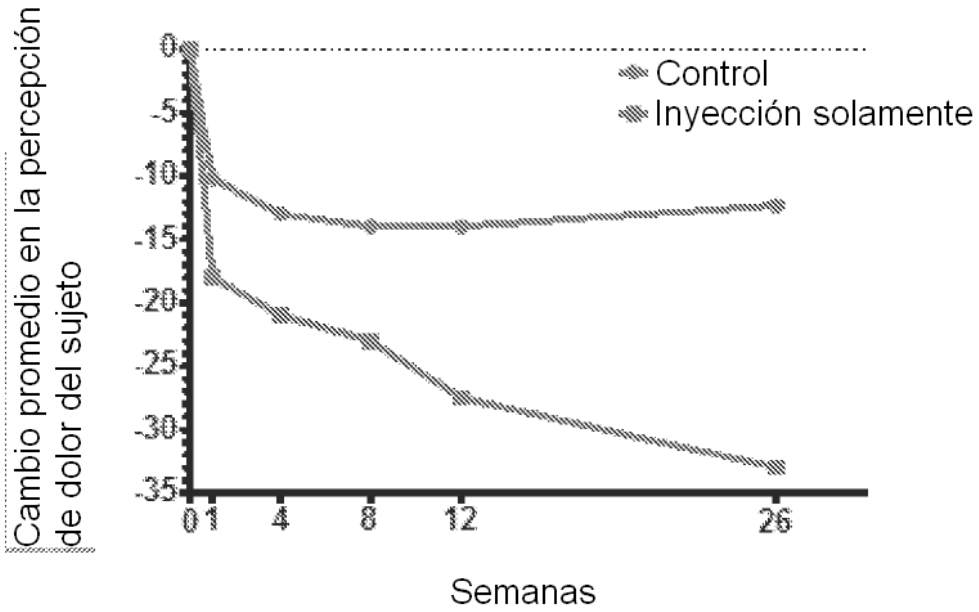


FIG. 11A

Cambio promedio con respecto al nivel basal en la categoría de isquemia crónica de miembros en el tiempo

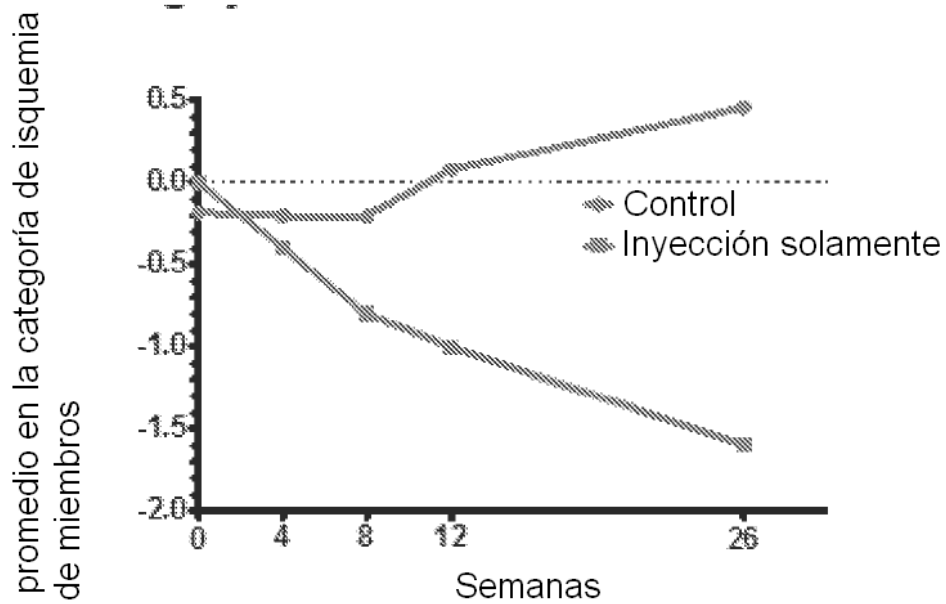


FIG. 11B

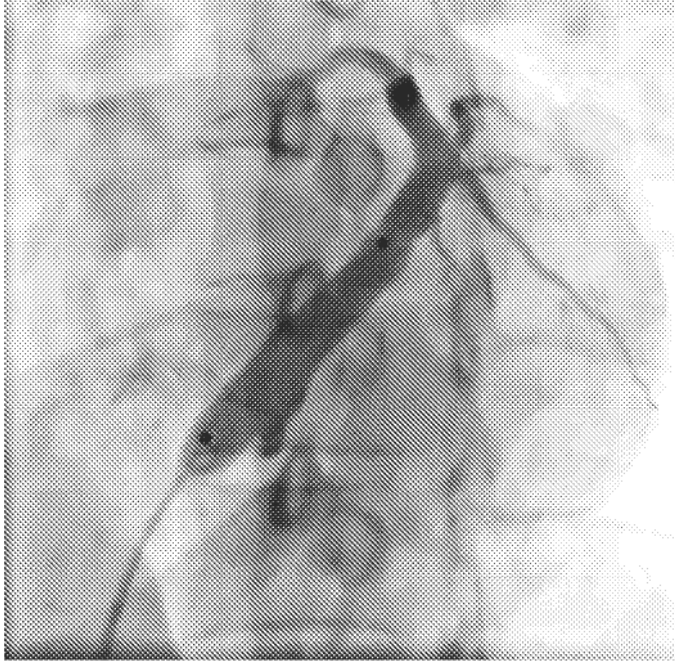


FIG. 12

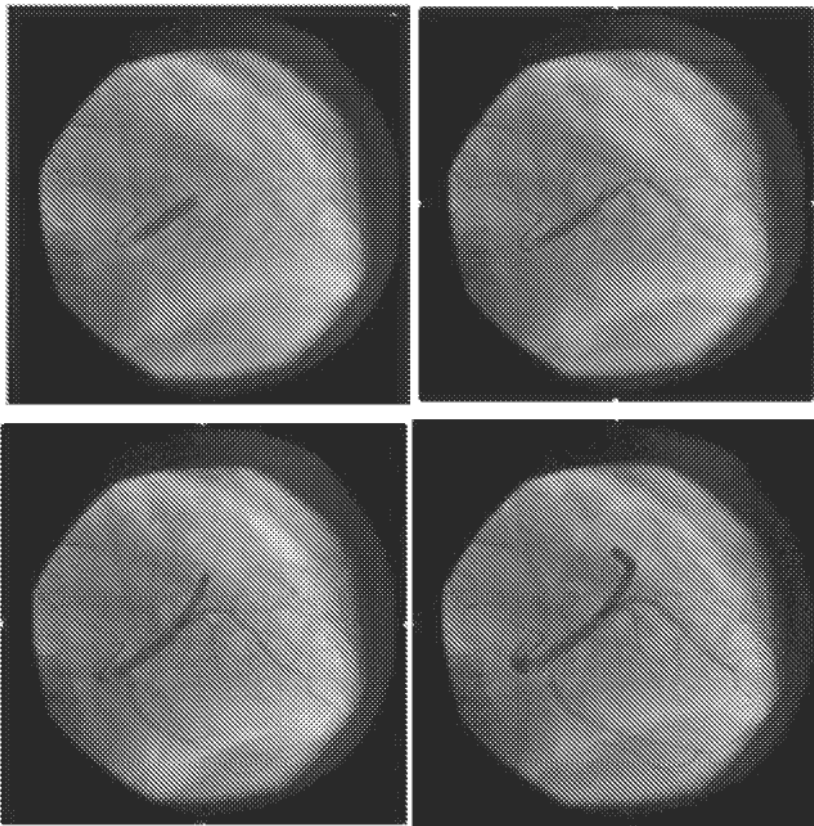


FIG. 13

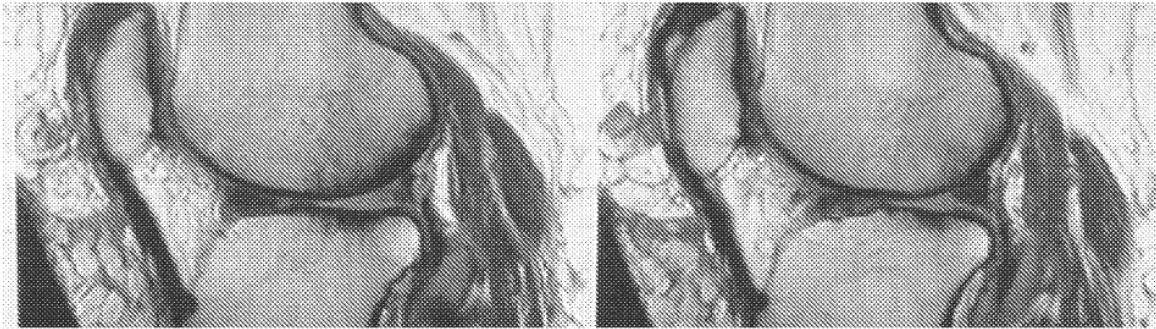


FIG. 14A

FIG. 14B



FIG. 14C

FIG. 14D

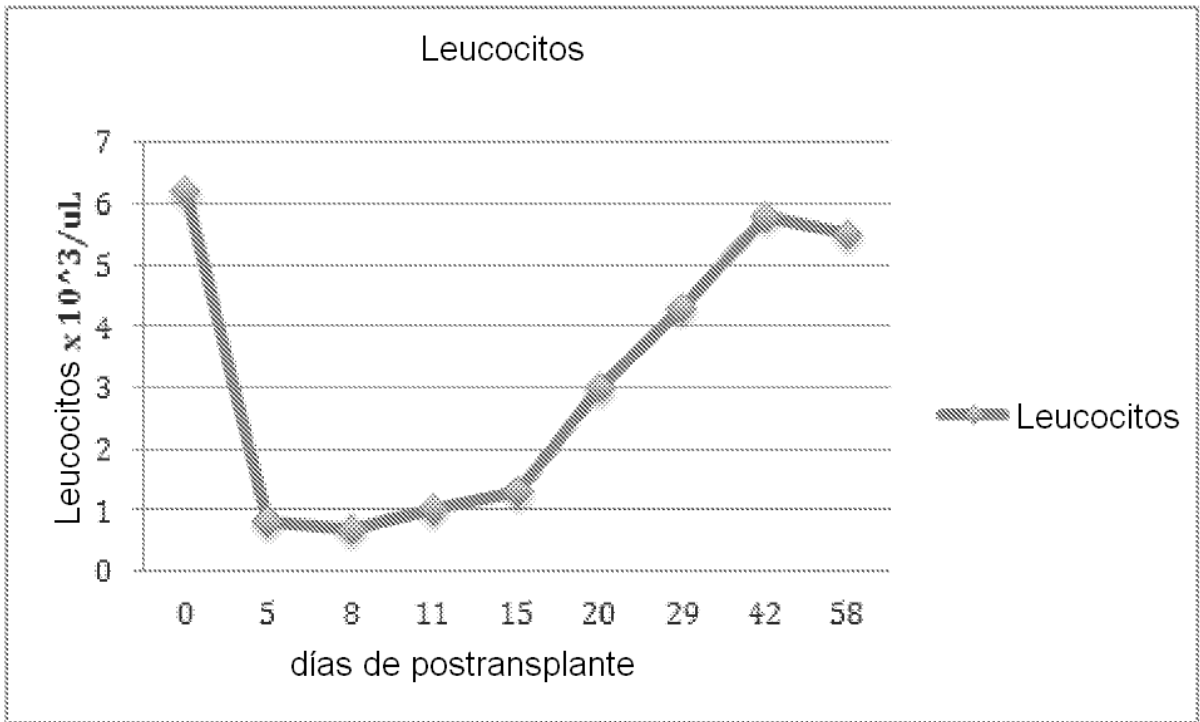


FIG. 15A

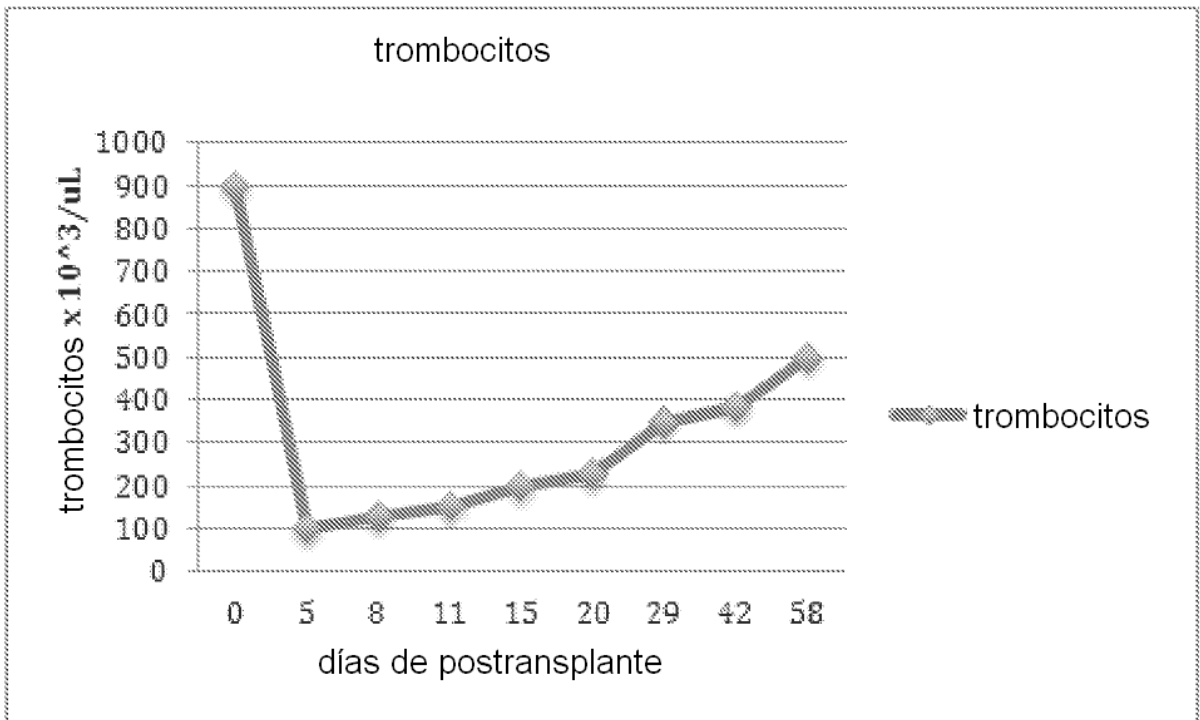


FIG. 15B

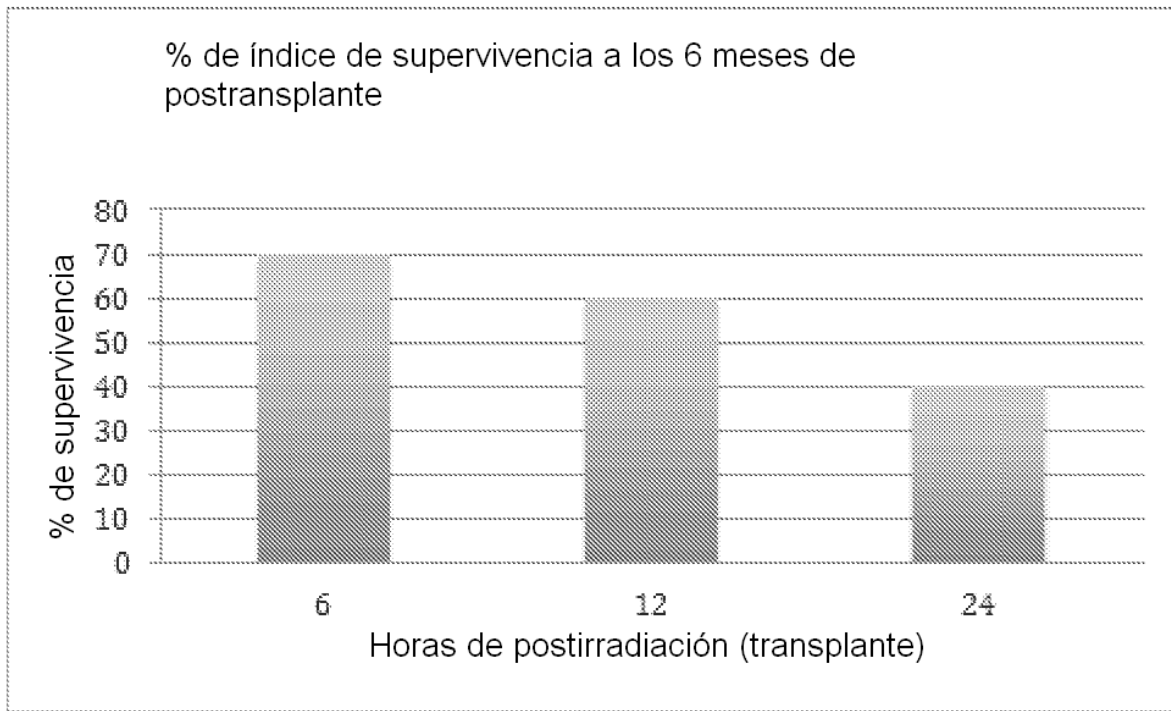


FIG. 16