

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 587**

51 Int. Cl.:

A61K 35/44 (2015.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2011 PCT/US2011/047264**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13022447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2011 E 11748836 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2741755**

54 Título: **Tratamiento de enfermedad vascular periférica usando células derivadas de tejido del cordón umbilical**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

73 Titular/es:

**DEPUY SYNTHES PRODUCTS LLC (100.0%)
325 Paramount Drive
Raynham, MA 02767, US**

72 Inventor/es:

**BUENSUCESO, CHARITO S.;
KIHM, ANTHONY J.;
DHANARAJ, SRIDEVI;
ATLAS, ROEE;
NUR, ISRAEL;
MEIDLER, ROBERTO y
BAR, LILIANA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 661 587 T3

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

Tratamiento de enfermedad vascular periférica usando células derivadas de tejido del cordón umbilical**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La enfermedad vascular periférica (PVD) puede ser resultado de la oclusión aterosclerótica de los vasos sanguíneos, particularmente en miembros y áreas distales del corazón, dando como resultado un flujo sanguíneo disminuido e insuficiente perfusión de oxígeno a los tejidos en las proximidades de y corriente abajo de la oclusión. La PVD se manifiesta frecuentemente en los vasos sanguíneos ilíacos, los vasos sanguíneos femorales y poplíteos y los vasos sanguíneos subclavios, y sus efectos pueden verse exacerbados por trombos, embolias o traumas. Se estima que aproximadamente de 8 a 12 millones de personas en los Estados Unidos, especialmente entre la población anciana y aquellos con diabetes, están afligidos con PVD.

20 Los síntomas comunes de PVD incluyen calambres en los miembros y extremidades superiores e inferiores, entumecimiento, debilidad, fatiga muscular, dolor en los miembros y extremidades, hipotermia en los miembros y extremidades, decoloración de las extremidades, piel seca o escamosa, e hipertensión. El síntoma más común es la claudicación o sensación de dolor, opresión y fatiga en los músculos corriente abajo del vaso ocluido que tiene lugar durante algún tipo de ejercicio, como caminar, pero se resuelve por sí mismo después de un período de descanso.

30 En términos de fisiopatología, los vasos sanguíneos ocluidos provocan isquemia de los tejidos en el sitio de y distal a la obstrucción. Esta isquemia es referida generalmente como isquemia periférica, lo que significa que tiene lugar en localizaciones distales al corazón. La severidad de la isquemia es una función del tamaño y el número de obstrucciones, ya sea que la obstrucción se encuentre cerca de un músculo u órgano, y de si hay suficiente vasculatura redundante. En casos más severos, la isquemia produce la muerte de los tejidos afectados y puede dar como resultado la amputación de los miembros afectados, o incluso la muerte del paciente.

35 Los métodos actuales para el tratamiento de los casos más severos de PVD incluyen regímenes quimioterapéuticos, angioplastia, inserción de stents, cirugía reconstructiva, injertos de bypass, resección de tejidos afectados o, amputación. Desafortunadamente, para muchos pacientes, tales intervenciones muestran solo un éxito limitado, y muchos pacientes experimentan un empeoramiento de las afecciones o los síntomas.

40 Actualmente, hay interés en usar células madre, que pueden dividirse y diferenciarse, o células musculares de otras fuentes, incluyendo células de músculo liso y esqueléticas, para ayudar en la reparación o reversión del daño tisular. El trasplante de células madre se puede utilizar como una herramienta clínica para reconstituir un tejido objetivo, restaurando de este modo la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de tecnología de células madre es muy variada, incluyendo ingeniería tisular, administración de terapia génica y terapias celulares, es decir, la administración de agentes bioterapéuticos a una localización objetivo a través de células vivas suministradas exógenamente o componentes celulares que producen o contienen esos agentes (para una revisión, ver Tresco, PA et al., (2000) Advanced Drug Delivery Reviews 42: 2-37). La identificación de células madre ha estimulado la investigación dirigida a la generación selectiva de tipos de células específicos para medicina regenerativa.

50 Un obstáculo para la realización del potencial terapéutico de la tecnología de células madre ha sido la dificultad de obtener un número suficiente de células madre. El tejido embrionario, o fetal, es una fuente de células madre. Las células madre embrionarias y progenitoras se han aislado de una serie de especies de mamíferos, incluidos humanos, y varios de estos tipos de células han demostrado ser capaces de autorrenovarse y expandirse, así como de diferenciarse en varios linajes celulares diferentes. Pero la derivación de las células madre de fuentes embrionarias o fetales ha planteado muchos problemas éticos y morales que es deseable evitar mediante la identificación de otras fuentes de células multipotentes o pluripotentes.

60 Los tejidos posparto, como el cordón umbilical y la placenta, han generado interés como una fuente alternativa de células madre. Por ejemplo, se han descrito métodos para la recuperación de células madre por perfusión de la placenta o la recolección de sangre o tejido del cordón umbilical. Una limitación a la obtención de células madre por estos métodos ha sido un volumen inadecuado de sangre del cordón umbilical o cantidad de las células obtenidas, así como la heterogeneidad en, o la falta de caracterización de, las poblaciones de células obtenidas de esas fuentes.

65

Un suministro fiable, bien caracterizado y abundante de poblaciones sustancialmente homogéneas de tales células que tienen la capacidad de diferenciarse en una matriz de músculo esquelético, pericito o linajes vasculares sería una ventaja en una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas para la reparación, regeneración y mejora del esqueleto muscular, para la estimulación y/o soporte de la angiogénesis, y para la mejora del flujo sanguíneo posterior a un evento isquémico periférico, particularmente en pacientes con PVD.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se define por las reivindicaciones añadidas, un aspecto de la divulgación presenta un método para tratar a un paciente que tiene enfermedad vascular periférica, el método comprendiendo administrar al paciente células derivadas de tejido de cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad vascular periférica, en donde las células derivadas del tejido del cordón umbilical derivan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, en donde las células son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células de por lo menos un músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, o fenotipo de endotelio vascular; en donde las células requieren L-valina para crecer y pueden crecer en por lo menos aproximadamente el 5% de oxígeno; en donde las células comprenden además por lo menos una de las características siguientes: (a) potencial para por lo menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; (b) unión y expansión en un recipiente de cultivo tisular recubierto o no recubierto, en donde el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina; (c) producción de por lo menos uno de los factores tisulares, vimentina y alfa actina de músculo liso; (d) producción de por lo menos uno de CD10, CD 13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C; (e) falta de producción de por lo menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR,DP,DQ, como se detecta mediante citometría de flujo; (f) expresión de un gen, que en relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para al menos uno de los genes que codifican: interleucina 8; retículo 1; ligando de quimioquina (motivo CXC) 1 (actividad de estimulación del crecimiento de melanoma, alfa); ligando de quimiocina 6 (motivo CXC) (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); ligando de quimiocina 3 (motivo CXC); factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa; (g) expresión de un gen, que en relación a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se reduce para al menos uno de los genes que codifican: homeobox 2 de baja estatura; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando de quimiocina 12 (motivo CXC) (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox 2 de mesénquima (homeobox específico de detención del crecimiento); homólogo de homeobox sine oculis 1 (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a disheveled de morfogénesis 2; Proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de enlace al plasminógeno); dominio src de homología tres (SH3) y rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con enanismo 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína 5iroquois homeobox; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de la vesícula sináptica; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de enlace al factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa; ADNC de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citoquina; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; coactivador transcripcional con motivo de enlace a PDZ (TAZ); homólogo de homeobox de sine oculis 2 (*Drosophila*); Proteína KIAA1034; proteína de membrana 5 asociada a vesículas (miobrevina); proteína 1 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox menos distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxido esteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; coactivador transcripcional con motivo de enlace a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, similar a beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon EUROIMAGE 1968422 de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de péptidos natriuréticos C/guanilato ciclasa C (receptor C de péptidos atrionatriuréticos); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus E1B, proteína de interacción de tipo 3 de 19kDa de BCL2/adenovirus E1B; proteína de enlace a AE 1; polipéptido 1 de subunidad VIIa de citocromo c oxidasa (músculo); similar a la neuralina 1; Gen 1 de translocación de células B; proteína hipotética FLJ23191; y DKFZp586L151; (h) secreción de por lo menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1b, RANTES, y TIMP1; y (i) falta de secreción de por lo menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFBb, MIP1a y VEGF, como se detecta por ELISA.

En una realización particular, la enfermedad vascular periférica es isquemia periférica. En ciertas realizaciones, las células se inducen in vitro para diferenciarse en células de linaje de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular antes de la administración. En otras realizaciones, las células se diseñan genéticamente para producir un producto génico que promueve el tratamiento de la enfermedad vascular periférica.

En algunas realizaciones del método, las células se administran con por lo menos otro tipo de célula, que puede incluir células de músculo esquelético, células progenitoras de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales vasculares, células progenitoras del endotelio vascular, u otras células madre multipotentes o pluripotentes. El otro tipo de célula puede

administrarse simultáneamente con, o antes, o después, de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

En otras realizaciones, las células se administran con por lo menos otro agente, que puede ser un agente antitrombogénico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, pro-angiogénico, o un agente antiapoptótico, por ejemplo. El otro agente puede administrarse simultáneamente con, o antes, o después, de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Las células se administran preferiblemente en o proximales a los sitios de isquemia periférica, pero también se pueden administrar en sitios distales a la isquemia periférica. Pueden administrarse por inyección, infusión, un dispositivo implantado en el paciente, o por implantación de una matriz o andamiaje que contiene las células. Las células pueden ejercer un efecto trófico, como la proliferación, sobre el músculo esquelético, el músculo liso vascular o el endotelio vascular del paciente. Las células pueden inducir la migración de células de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células endoteliales vasculares, células progenitoras de músculo esquelético, pericitos, células progenitoras de músculo liso vascular o células progenitoras de endotelio vascular al sitio o sitios de enfermedad vascular periférica, como isquemia periférica.

Otro aspecto de la invención presenta composiciones farmacéuticas y kits para tratar a un paciente que tiene una enfermedad vascular periférica, que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y las células derivadas de tejido de cordón umbilical descritas anteriormente o preparaciones hechas a partir de dichas células derivadas de tejido de cordón umbilical. En algunas realizaciones preferidas, las preparaciones comprenden FGF y HGF. Las composiciones y kits farmacéuticos se diseñan y/o formulan para poner en práctica los métodos de la divulgación como se ha esbozado anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, los métodos anteriormente descritos pueden ponerse en práctica usando una preparación hecha a partir de células derivadas de tejido de cordón umbilical, en donde la preparación comprende un lisado celular de las células derivadas de tejido de cordón umbilical, una matriz extracelular de las células derivadas de tejido del cordón umbilical o un medio condicionado en el que se cultivaron las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Se prefiere que dichas preparaciones comprendan FGF y HGF.

Otros aspectos de la divulgación presentan composiciones farmacéuticas y kits que contienen preparaciones que comprenden lisados celulares, matrices extracelulares o medios condicionados de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Una realización de la divulgación es un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad vascular periférica, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un pegamento de fibrina y una población homogénea aislada de células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical humano en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad, en donde el tejido del cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en donde la población de células homogénea aislada es capaz de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse y no expresa CD117 y/o telomerasa. La población aislada de células puede tener también una o más de las siguientes características:

- (a) expresa el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidado, el retículo, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos;
- (b) no expresa CD31, CD34 o CD45;
- (c) expresa, en relación a un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o retículo 1;
- (d) tiene el potencial de diferenciarse en células de por lo menos un fenotipo de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular; y
- (e) expresa CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.

En una realización, la enfermedad vascular periférica es isquemia periférica. La composición farmacéutica se administra en los sitios de isquemia periférica. En otra realización, la composición farmacéutica se administra localmente. En una realización, la composición farmacéutica se administra por inyección, infusión, un dispositivo implantado en un paciente o mediante la implantación de una matriz o andamiaje que contiene la composición farmacéutica. En una realización alternativa, la composición farmacéutica se administra por inyección intramuscular e inyección en depósitos adiposos en el músculo. En otra realización, la composición farmacéutica se administra por inyección en espacios intersticiales para no entrar directamente en la circulación. La población aislada de células puede inducirse in vitro para diferenciarse en un linaje de músculo esquelético, músculo vascular, pericito o endotelio vascular antes de la administración. La población de células también puede diseñarse genéticamente para producir un producto genético que promueva el tratamiento de la enfermedad vascular periférica. Opcionalmente, la composición comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste de un agente antitrombogénico, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un pro-angiogénico, un agente antiapoptótico y mezclas de los mismos. Alternativamente, la composición comprende además por lo menos otro tipo de célula (como, por ejemplo, una célula de músculo esquelético, una célula progenitora de músculo esquelético, una célula de músculo liso vascular, una célula progenitora de músculo liso vascular, un pericito, una célula endotelial vascular, una célula

progenitora del endotelio vascular u otra célula madre multipotente o pluripotente). En una realización, la composición farmacéutica ejerce un efecto trófico (como, por ejemplo, proliferación de células endoteliales vasculares). En otra realización, la composición farmacéutica induce la migración de células endoteliales vasculares y/o células progenitoras de endotelio vascular a los sitios de la enfermedad periférica. En una realización alternativa más, la composición farmacéutica induce la migración de células de músculo liso vascular y/o células progenitoras de músculo liso vascular a los sitios de la enfermedad periférica. En otra realización, la composición farmacéutica induce la migración de pericitos a los sitios de la enfermedad vascular periférica. En una realización, el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno y trombina. En otra realización, el pegamento de fibrina comprende de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 IU/ml de trombina y de aproximadamente 39,3 a aproximadamente 60,7 mg / ml de fibrinógeno.

Otra realización de la divulgación es un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad vascular periférica, que comprende administrar un pegamento de fibrina (por ejemplo, una composición que comprende fibrinógeno y trombina) y una población de células homogénea aislada obtenida a partir de tejido de cordón umbilical humano en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad, en donde el tejido del cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en donde la población de células homogénea aislada es capaz de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse y no expresa CD117 y/o telomerasa. La población de células aislada puede tener otras características, incluyendo una o más de las siguientes:

- (a) expresa el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidado, el retículo, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos;
- (b) no expresa CD31, CD34 o CD45;
- (c) expresa, en relación a un fibroblasto humano, célula madre mesenquimal, o célula de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o retículo 1;
- (d) tiene el potencial de diferenciarse en células de por lo menos un fenotipo de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular; y
- (e) expresa CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.

En una realización, la enfermedad vascular periférica es isquemia periférica y, opcionalmente, el adhesivo de fibrina y la población de células se administran en los sitios de isquemia periférica. Se pueden usar varias vías de administración incluyendo administración por inyección, infusión, un dispositivo implantado en un paciente o mediante la implantación de una matriz o andamiaje que contiene las células. En una realización, la población de células y el pegamento de fibrina se administran localmente (como, por ejemplo, por inyección intramuscular e inyección en depósitos adiposos en el músculo). En otra realización, las células y el pegamento de fibrina se administran por inyección en espacios intersticiales para no entrar directamente en la circulación. Opcionalmente, la población de células aislada se induce in vitro para diferenciarse en un músculo esquelético, músculo vascular, pericito o linaje de endotelio vascular antes de la administración. La población de células también puede diseñarse genéticamente para producir un producto genético que promueva el tratamiento de la enfermedad vascular periférica. En una realización, el método comprende además la administración de un agente seleccionado del grupo que consiste de un agente antitrombogénico, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un pro-angiogénico, un agente antiapoptótico y mezclas de los mismos. En otra realización, el método comprende además la administración de por lo menos otro tipo de célula (como por ejemplo, una célula de músculo esquelético, una célula progenitora de músculo esquelético, una célula de músculo liso vascular, una célula progenitora de músculo liso vascular, un pericito, una célula endotelial vascular, una célula progenitora endotelial vascular u otra célula madre multipotente o pluripotente). En una realización, la población de células ejerce un efecto trófico (por ejemplo, proliferación de células endoteliales vasculares). La población de células puede inducir la migración de células endoteliales vasculares y/o células progenitoras endotelio vasculares a los sitios de la enfermedad periférica. Alternativamente, la población de células puede inducir la migración de células de músculo liso vascular y/o células progenitoras de músculo liso vascular a los sitios de la enfermedad periférica. La población de células también puede inducir la migración de pericitos a los sitios de la enfermedad vascular periférica. El pegamento de fibrina puede comprender fibrinógeno y trombina. En una realización, el pegamento de fibrina se administra simultáneamente con, o antes, o después, de la población de células homogénea aislada obtenida a partir de tejido de cordón umbilical humano. En otra realización, el pegamento de fibrina comprende de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 IU/ml de trombina y de aproximadamente 39,3 a aproximadamente 60,7 mg/ml de fibrinógeno.

Otra realización de la divulgación es un kit para tratar a un paciente que tiene una enfermedad vascular periférica que comprende fibrinógeno, trombina y una población de células homogénea aislada obtenida a partir de tejido de cordón umbilical humano en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad, en donde el tejido de cordón umbilical está sustancialmente libre de sangre, y en donde dicha población de células homogénea aislada es capaz de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse y no expresa CD117 y/o telomerasa. El kit puede comprender además instrucciones para su uso. En una realización, el fibrinógeno y la población de células homogénea aislada se proporcionan en una composición a la que se puede añadir trombina inmediatamente antes del uso. La población de células aislada puede tener otras características, incluyendo una o más de las siguientes:

- (a) expresa el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidado, el retículo, el ligando 3 del receptor de

quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos;

(b) no expresa CD31, CD34 o CD45;

(c) expresa, en relación a un fibroblasto humano, célula madre mesenquimal, o célula de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o retículo 1;

5 (d) tiene el potencial de diferenciarse en células de por lo menos un fenotipo de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular; y
(d) expresa CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.

10 En una realización, el kit comprende de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 IU/ml de trombina y de aproximadamente 39,3 a aproximadamente 60, 7 mg/ml de fibrinógeno. En una realización, el kit comprende un componente de fibrinógeno que comprende fibrina y factor XII y un componente de trombina que comprende trombina y calcio.

15 Otras características y ventajas de la invención se entenderán con referencia a la descripción detallada y a los ejemplos que siguen.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 muestra el efecto de hUTC lote N° 120304, MSCs y fibroblastos en la proliferación de células endoteliales. Las células endoteliales se sembraron sobre el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (10.000 células/pocillo) y las hUTC lote N° 120304, MSCs, o fibroblastos dentro de insertos transwell a una densidad de 5000 células/cm² (1.650 células/inserto) en medio de co-cultivo (Hayflick 80% + EGM-2MV 20% o Hayflick 50% + EGM-2MV 50%). Después de 7 días de co-cultivo, las células se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®. Las células endoteliales también se mantuvieron en medio EGM-2MV como control positivo. A, HUVECs. B, HCAECs. C, HIAECs.

25 La Figura 2 muestra el efecto de las hUTC lote N° 120304 y anticuerpos neutralizantes en la proliferación de células endoteliales. Las HUVECs y HCAECs se sembraron sobre el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (10.000 células/pocillo) y las hUTC lote N° 120304, MSCs, o fibroblastos dentro de insertos transwell a una densidad de 5000 células/cm² (1.650 células/inserto) en medios de co-cultivo (Hayflick 50% + EGM-2MV 50%). Los anticuerpos neutralizantes para FGF (7 µg/ml) HGF (1 µg/ml), o VEGF (1 µg/ml) también se añadieron en este momento. Después de 7 días de co-cultivo, las células se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®. Las células endoteliales también se mantuvieron en medio EGM-2MV como control positivo. Se muestran las células tratadas con factor de crecimiento solamente y con factor de crecimiento más anticuerpos neutralizantes. A y B, HUVECs. C y D, HCAECs.

35 La Figura 3 muestra el efecto del lisado de células de las hUTC lote N°120304 y anticuerpos neutralizantes sobre la proliferación de HUVECs. Las HUVECs se sembraron sobre el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (10.000 células/pocillo) en medio EGM-2MV durante 8 horas. Luego las células se privaron de suero mediante incubación durante la noche en 0,5 ml de medio EGM-2MV que contenía 0,5% de FBS y sin factores de crecimiento. Después de eso, se añadieron FBS, lisados de células de hUTC lote N° 120304 recién preparados y anticuerpos neutralizantes para FGF (7 µg/ml) o HGF (1 µg/ml). Después de 4 días de cultivo, las células se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®. Barras gris claro, controles de medios. Barras gris medio, HUVEC incubadas con lisado que contenía 62,5 µg de proteína. Barras gris oscuro, HUVEC incubadas con lisado que contenía 125 µg de proteína.

40 La Figura 4 muestra el efecto de hUTCs y MSCs en la migración de células endoteliales. Las HUVECs o HCAECs se sembraron dentro insertos transwell a una densidad de 5000 células/cm² (23.000 células/inserto) y las hUTC lote N°120304 o MSCs sobre el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (48.000 células/pocillo) en medio de co-cultivo (Hayflick 50% + EGM-2MV 50%). Después de 7 días de co-cultivo, las células que se encontraban en el lado inferior del inserto transwell se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®. Las células endoteliales también se mantuvieron en medio EGM-2MV como control. A, HUVECs. B, HCAECs.

45 La Figura 5 muestra el efecto de las hUTC lote N°120304 y anticuerpos neutralizantes en la migración de células endoteliales. Las HUVECs o HCAECs se sembraron dentro de insertos transwell a una densidad de 5000 células/cm² (23.000 células/inserto) y las hUTC lote N° 120304 sobre el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos a una densidad de 5000 células/cm² (48.000 células/pocillo) en medio de co-cultivo (Hayflick 50% + EGM-2MV 50%). Se añadieron anticuerpos neutralizantes para FGF (7 µg/ml) o HGF (1 µg/ml) en este momento. Después de 7 días de co-cultivo, las células que se encontraban en el lado inferior del inserto transwell se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®. Las células endoteliales también se mantuvieron en medio EGM-2MV como control. A, HUVECs. B, HCAECs.

50 La Figura 6 muestra los datos de perfusión por láser Doppler del experimento con ratones NSG para el estudio divulgado en el Ejemplo 5. Los datos se expresan como media ± sem. La identidad de los puntos de datos se muestra en la leyenda. Los números entre paréntesis son (1) P<0,001 en comparación con el control apropiado; (2) P <0,05 en comparación con células hUTC sin fibrina.

55 La Figura 7 muestra los datos de perfusión por láser Doppler del experimento con ratones desnudos para el

estudio divulgado en el Ejemplo 5. Los datos se expresan como media \pm sem. La identidad de los puntos de datos se muestra en la leyenda. Los números entre paréntesis son (1) $P < 0,001$ en comparación con el control apropiado; (2) $P < 0,05$ en comparación con células hUTC sin fibrina.

La Figura 8 muestra los datos de perfusión por láser Doppler que comparan la administración sistémica (IV), local (IM) y local + pegamento de fibrina para el estudio divulgado en el Ejemplo 6. Los datos se expresan como media \pm sem.

La Figura 9 muestra datos de perfusión por láser Doppler que muestran diferentes dosis de hUTC en pegamento de fibrina administrado localmente (IM) para el estudio divulgado en el Ejemplo 6. Los datos se expresan como media \pm sem.

La Figura 10 muestra los datos de perfusión por láser Doppler que comparan la administración sistémica (IV), local (IM) y local + pegamento de fibrina al de 14 días tras la lesión para el estudio divulgado en el Ejemplo 6. Los datos se muestran como medias por claridad.

La Figura 11 muestra la perfusión por láser Doppler para el estudio divulgado en el Ejemplo 7. La identidad de los puntos de datos se muestra en la leyenda. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$.

La Figura 12 muestra la densidad capilar de los miembros isquémicos en comparación con miembros no isquémicos de los ratones que sobreviven a 21 días para el estudio divulgado en el Ejemplo 7.

La Figura 13 muestra los miembros isquémicos de densidad de las arteriolas en comparación con los miembros no isquémicos de los ratones que sobreviven a 21 días para el estudio divulgado en el Ejemplo 7.

20 DESCRIPCION DETALLADA

A lo largo de la especificación y las reivindicaciones se usan varios términos. a tales términos se les debe dar su significado ordinario en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de una manera consistente con la definición proporcionada en la presente.

Las *células madre* son células indiferenciadas definidas por la capacidad de una única célula tanto para autorrenovarse como para diferenciarse para producir células de progenie, que incluyen progenitores autorrenovables, progenitores no renovables y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse in vitro en células funcionales de varios linajes celulares de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante, y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no a todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

Las células madre se clasifican de acuerdo con su potencial de desarrollo como: (1) *totipotentes*; (2) *pluripotentes*; (3) *multipotentes*; (4) *oligopotentes*; y (5) *unipotentes*. Las células *totipotentes* son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Las células *pluripotentes* son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias. Las células *multipotentes* incluyen aquellas capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (autorrenovables), progenitores oligopotentes restringidos a células sanguíneas y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre. Las células que son *oligopotentes* pueden dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes. Las células que son *unipotentes* son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

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

El *tejido embrionario* se define típicamente como tejido que se origina del embrión (que en humanos se refiere al período desde la fertilización hasta aproximadamente seis semanas de desarrollo. El *tejido fetal* se refiere al tejido que se origina en el feto, que en humanos se refiere al período desde aproximadamente seis semanas de desarrollo hasta el parto. El *tejido extraembrionario* es un tejido asociado con, pero que no se origina de, el embrión o el feto. Los tejidos extraembrionarios incluyen membranas extraembrionarias (corion, amnios, saco vitelino y alantoides), cordón umbilical y placenta (que forma ella misma el corion y la decidua basal materna).

La *diferenciación* es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos

especializada adquiere las características de una célula especializada, como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula *diferenciada* es una 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 procedido en la vía de diferenciación hasta un punto en el que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula específico o subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o revertir a un tipo de célula menos diferenciada. La *des-diferenciación* se refiere al proceso mediante el cual una célula revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en la presente, el *linaje* de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células proviene y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

En un sentido amplio, una *célula progenitora* es una célula que tiene la capacidad de crear progeñe que está más diferenciada que ella misma, y todavía mantiene la capacidad de reponer el conjunto de progenitoras. Según esa definición, las mismas células madre son también células progenitoras, al igual que los precursores más inmediatos a células terminalmente diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, como se describe con mayor detalle a continuación, se puede usar esta definición amplia de *célula progenitora*. En un sentido más estricto, una célula progenitora se define a menudo como una célula que es intermedia en la vía de diferenciación, es decir, surge de una célula madre y es intermedia en la producción de un tipo de célula maduro o un subconjunto de tipos de células. Este tipo de célula progenitora generalmente no es capaz de autorrenovarse. En consecuencia, si se hace referencia a este tipo de célula en la presente, será referida como una *célula progenitora no renovable* o como una *célula progenitora o precursora intermedia*.

Como se usa en la presente, la frase *se diferencia en un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico* se refiere a una célula que se compromete con un linaje mesodérmico, ectodérmico o endodérmico específico, respectivamente. Los ejemplos de células que se diferencian en un linaje mesodérmico o dan lugar a células mesodérmicas específicas incluyen, pero no se limitan a, células que son adipogénicas, condrogénicas, cardiogénicas, dermatogénicas, hematopoyéticas, hemangiogénicas, miogénicas, nefrogénicas, urogenitogénicas, osteogénicas, pericardiogénicas o estromales. Ejemplos de células que se diferencian en linaje ectodérmico incluyen, pero no se limitan a, células epidérmicas, células neurogénicas, y células neurogliogénicas. Ejemplos de células que se diferencian en linaje endodérmico incluyen, pero no se limitan a, células pleurigenicas, células hepatogénicas, células que dan lugar al revestimiento del intestino y células que dan lugar a células pancreogénicas y esleogénicas.

Las células usadas en la presente invención son referidas generalmente como *células derivadas de tejido de cordón umbilical* (UTC(s) o hUTC(s)). También son referidas a veces como *células derivadas del ombligo* (UDC). Adicionalmente, las células se pueden describir como células madre o progenitoras, el último término usándose en sentido amplio. El término *derivado* se usa para indicar que las células se han obtenido de su fuente biológica y se cultivan o manipulan de otra manera in vitro (por ejemplo, se cultivan en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones in vitro de células madre umbilicales y las características únicas de las células derivadas del ombligo de la presente invención se describen con detalle a continuación.

Los *pericitos*, también conocidos en la técnica como células Rouget o células murales, se refieren a las células encontradas típicamente incrustadas dentro de la membrana basal vascular de microvasos sanguíneos ((Armulik A et al. (2005) Circ. Res. 97:512-23), que se cree juegan un papel en, entre otras cosas, la comunicación/señalización con células endoteliales, vasoconstricción, vasodilatación, la regulación del flujo sanguíneo, la formación y el desarrollo de la vasculatura sanguínea, angiogénesis y la diferenciación endotelial y detención del crecimiento (Bergers G et al. (2005) Neuro-Oncology 7:452-64).

Se usan varios términos para describir las células en cultivo. *Cultivo celular* se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo condiciones controladas ("en cultivo" o "cultivadas"). Un *cultivo celular primario* es un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo(s) antes del primer subcultivo. Las células se *expanden* en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento bajo condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular, resultando en una población de células mayor. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular se mide a veces por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número. Esto se conoce como *tiempo de duplicación*.

Una *línea celular* es una población de células formadas por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo es referida como un pase. Cuando las células se subcultivan, se hace referencia a ellas como que han sido *pasadas*. Una población específica de células, o una línea celular, a veces se refiere o se caracteriza por el número de veces que se ha pasado. Por ejemplo, una población celular cultivada que se ha pasado diez veces puede denominarse cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células del tejido, se designa P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Los expertos en la técnica entenderán que puede haber muchas duplicaciones

de población durante el período de pase; por lo tanto, el número de duplicaciones de población de un cultivo es mayor que el número de pase. La expansión de celdas (es decir, el número de duplicaciones de población) durante el período entre pases depende de muchos factores, incluyendo pero no limitado a, la densidad de siembra, el sustrato, el medio, las condiciones de crecimiento y el tiempo entre pases.

Un *medio condicionado* es un medio en el que se ha cultivado una célula o población de células específicos, y luego se ha eliminado. 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 están limitados a, hormonas, citoquinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio condicionado.

Generalmente, un *factor trófico* se define como una sustancia que promueve la supervivencia, crecimiento, proliferación y/o maduración de una célula, o estimula la actividad aumentada de una célula.

Cuando se hace referencia a células de vertebrados cultivadas, el término *senescencia* (también *senescencia replicativa* o *senescencia celular*) se refiere a una propiedad atribuible a cultivos celulares finitos; concretamente, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de población (a veces referido como *límite de Hayflick*). Aunque la senescencia celular se describió por primera vez usando células similares a fibroblastos, la mayoría de los tipos de células humanas normales que se pueden cultivar con éxito en cultivo experimentan senescencia celular. La vida útil in vitro de diferentes tipos de células varía, pero la vida útil máxima es típicamente menos de 100 duplicaciones de población (este es el número de duplicaciones para que todas las células en el cultivo se vuelvan senescentes y por tanto el cultivo no pueda dividirse). La senescencia no depende del tiempo cronológico, sino que se mide por el número de divisiones celulares, o duplicaciones de población, que ha experimentado el cultivo. Por tanto, las células que se han hecho quiescentes al eliminar los factores de crecimiento esenciales pueden reanudar el crecimiento y la división cuando se reintroducen los factores de crecimiento, y a partir de entonces llevar a cabo el mismo número de duplicaciones que las células equivalentes cultivadas continuamente. De manera similar, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de varios números de duplicaciones de población y luego se descongelan y cultivan, experimentan sustancialmente el mismo número de duplicaciones que las células que se mantienen sin congelar en cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; en realidad son resistentes a la muerte celular programada (apoptosis) y se han mantenido en estado no divisorio durante tanto tiempo como tres años. Estas células están muy vivas y son metabólicamente activas, pero no se dividen. No se ha descubierto todavía que el estado no divisorio de las células senescentes sea reversible por ningún agente biológico, químico o viral.

Como se usa en la presente, el término *medio de crecimiento* se refiere generalmente a un medio suficiente para el cultivo de células derivadas de tejido de cordón umbilical. En particular, un medio actualmente preferido para el cultivo de las células de la invención comprende Medio Esencial Modificado de Dulbecco (DMEM). Se prefiere particularmente e DMEM-glucosa baja (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DMEM-LG se suplementa preferiblemente con suero, más preferiblemente suero bovino fetal o suero humano. Típicamente, se agrega 15% (v/v) de suero bovino fetal (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan UT), junto con antibióticos/antimicóticos ((preferiblemente 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 miligramos/mililitro de estreptomycin, y 0,25 microgramos/mililitro de anfotericina B; Invitrogen, Carlsbad, CA)) y 0,001% (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). En algunos casos, se utilizan diferentes medios de crecimiento o se proporcionan diferentes suplementos, y estos se indican normalmente en el texto como suplementos al Medio de Crecimiento. En ciertos medios químicamente definidos, las células pueden cultivarse sin presencia de suero. En tales casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que pueden añadirse al medio para soportar y sostener las células. Los factores actualmente preferidos para ser añadidos para crecimiento en medios libres de suero incluyen uno o más de bFGF, EGF, IGF-I y PDGF. En realizaciones más preferidas, se añaden dos, tres o los cuatro factores a los medios libres de suero o químicamente definidos. En otras realizaciones, se añade LIF al medio libre de suero para soportar o mejorar el crecimiento de las células.

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

El término *cantidad eficaz* se refiere a una concentración o cantidad de un compuesto, material o composición, como se describe en la presente, que es eficaz para lograr un resultado biológico particular. Tales resultados incluyen, pero no están limitados a, la regeneración, reparación o mejora del tejido esquelético, la mejora del flujo sanguíneo y/o la estimulación y/o el soporte de la angiogénesis en pacientes con isquemia periférica. Dicha actividad eficaz puede lograrse, por ejemplo, administrando las células y/o composiciones de la presente invención a pacientes con isquemia periférica. Con respecto a las células derivadas de tejido del cordón umbilical como se administran a un paciente in vivo, una cantidad eficaz puede variar desde algunos cientos o menos hasta tanto como varios millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad eficaz puede variar desde 10³ -10¹¹, más

específicamente por lo menos aproximadamente 10^4 células. Se apreciará que el número de células a ser administradas variará dependiendo de los detalles específicos del trastorno que a ser tratado, incluyendo pro no limitado a, el tamaño o volumen total/área superficial a ser tratada, y la proximidad del sitio de administración a la localización de la región a ser tratada, entre otros factores familiares para el biólogo medicinal.

5 Los términos *tratar, tratando o tratamiento* se refieren a cualquier éxito o indicio de éxito en la atenuación o mejora de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión, disminución de los síntomas o hacer la lesión, patología o afección más tolerable para el paciente, disminuyendo la tasa de degeneración o disminución, haciendo que el punto final de degeneración sea menos
10 debilitante, mejore el bienestar físico o mental de un sujeto o prolongue la duración de la supervivencia. El tratamiento o la mejora de los síntomas pueden basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico, examen neurológico y/o evaluaciones psiquiátricas.

15 Los términos *período (o tiempo) efectivo y condiciones efectivas* se refieren a un período de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos in vitro), necesarios o preferidos para que un agente o composición farmacéutica logre el resultado deseado .

20 Los términos *paciente o sujeto* se usan de manera intercambiable en la presente, y se refieren a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente humanos, que se tratan con las composiciones farmacéuticas o terapéuticas o de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

25 La *isquemia* se refiere a cualquier disminución o interrupción en el suministro de sangre a cualquier órgano, tejido, o parte corporal provocado por cualquier constricción u obstrucción de la vasculatura. *Episodio isquémico o evento isquémico* se usan de manera intercambiable en la presente y se refieren a cualquier período transitorio o permanente de isquemia. *Isquemia periférica* se refiere a cualquier disminución o interrupción en el suministro de sangre a cualquier órgano, tejido o parte corporal, excluyendo el corazón, provocado por cualquier constricción u obstrucción de la vasculatura. *Enfermedad vascular periférica (PVD)* se refiere a enfermedades de los vasos sanguíneos fuera del corazón y el cerebro. A menudo implica un estrechamiento de los vasos sanguíneos que llevan
30 sangre a las extremidades, y es el resultado de dos tipos de trastornos de la circulación, concretamente, (1) enfermedad vascular periférica funcional que implica espasmos a corto plazo que estrecha los vasos sanguíneos; y (2) enfermedad vascular periférica orgánica que implica cambios estructurales en los vasos sanguíneos, como los provocados por inflamación o bloqueos grasos, por ejemplo. Como se usa en la presente, PVD también abarca Raynouds, claudicación intermitente e isquemia crítica de los miembros.

35 El término *portador o medio farmacéuticamente aceptable*, que puede usarse de manera intercambiable con el término *portador o medio biológicamente compatible*, se refiere a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que no sólo son compatibles con las células y otros agentes a ser administrados terapéuticamente, sino también son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para el uso
40 en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación acorde excesivas con un beneficio/proporción de riesgo razonables. Como se describe con mayor detalle en la presente, los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la presente invención incluyen líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y materiales sólidos (por ejemplo, andamiajes y matrices celulares, láminas de tubos y otros materiales similares conocidos en la técnica y descritos con mayor
45 detalle en la presente). 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 (*biodegradable, bioerosionable*). Un material biodegradable puede ser además *bioabsorbible o bioabsorbible*, es decir, puede disolverse y absorberse en fluidos corporales (los implantes solubles en agua son un ejemplo), o degradarse y finalmente eliminarse del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o descomposición y eliminación a través de vías naturales. La velocidad de degradación puede variar de acuerdo con la velocidad de liberación deseada una vez implantado en el cuerpo. La matriz deseablemente también actúa como un andamiaje temporal hasta que se reemplaza por músculo esquelético, pericitos, músculo liso vascular o tejido endotelial vascular recién crecido. Por lo tanto, en una realización, la matriz proporciona liberación sostenida de los otros agentes usados en conjunción con las células derivadas de tejido de corcón umbilical y puede proporcionar una estructura para desarrollar crecimiento de tejido en el paciente. En otras realizaciones, la matriz simplemente proporciona un andamiaje temporal para el
50 desarrollo de tejido. La matriz puede ser de forma particulada (macropartículas mayores de 10 micras de diámetro o micropartículas menores de 10 micras de diámetro), o puede estar en la forma de un implante tridimensional, estructuralmente estable (por ejemplo, un andamiaje). El implante puede ser, por ejemplo, un cubo, cilindro, tubo, bloque, película, lámina, o una forma anatómica apropiada.

60 Se usan varios términos en la presente con respecto al trasplante de células o tejidos. Los términos *transferencia autóloga, trasplante autólogo, autoinjerto* y similares se refieren al trasplante en el que el donante de trasplante también es el receptor del trasplante. Los términos *transferencia alogénica, trasplante alogénico, aloinjerto* y similares se refieren al trasplante en el que el donante de trasplante es de la misma especie que el receptor del trasplante, pero no es el receptor. Un trasplante de células en el que las células del donante se han emparejado
65 histocompatiblemente con un receptor es a veces referido como una *transferencia singénica*. Los términos

transferencia xenogénica, trasplante xenogénico, xenoinjerto y similares se refieren al trasplante en el que el donante de trasplante es de una especie diferente al receptor del trasplante.

5 En sus varias realizaciones descritas en la presente, la presente divulgación presenta métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedad vascular periférica que utilizan células progenitoras y poblaciones celulares derivadas de tejido umbilical. Estos métodos y composiciones farmacéuticas están diseñados para estimular y soportar la angiogénesis, mejorar el flujo sanguíneo, regenerar, reparar y mejorar el músculo esquelético dañado por un evento isquémico periférico y/o proteger el músculo esquelético de daño isquémico. Las células, poblaciones de células y preparaciones que comprenden lisados celulares, medios
10 condicionados y similares, usadas en las preparaciones farmacéuticas y métodos de la presente invención se describen con detalle en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2005/0058631 y 2005/0054098, y también en la presente a continuación.

15 Una realización de la divulgación es un método para tratar una enfermedad vascular periférica con una célula derivada de tejido de cordón umbilical como se describe en la presente. En una realización de la invención, las células se proporcionan como parte de una composición farmacéutica.

En otra realización de la divulgación, el método para tratar una enfermedad vascular periférica utiliza pegamento de fibrina (también conocido como un sellador de fibrina). Como se usa en la presente, el término "pegamento de fibrina" abarcará cualquier sustancia biológica o sintética utilizada para crear un coágulo de fibrina. En una realización, el pegamento de fibrina es un andamiaje para la implantación celular. De manera óptima, el pegamento de fibrina tiene la capacidad de resistir, durante un período de tiempo suficiente, su degradación en el interior del cuerpo. En una realización, el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno (factor I), como, por ejemplo, fibrinógeno recombinante o fibrinógeno purificado de sangre, y trombina. En otra realización, el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno, trombina, factor XIII y opcionalmente uno o más de calcio, aprotinina, fibronectina y plasminógeno. En otra realización más, el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno, trombina y opcionalmente uno o más de factor XIII, agentes anti-fibrinolíticos (por ejemplo, ácido transexámico), estabilizantes (por ejemplo, clorhidrato de arginina), calcio, aprotinina, fibronectina y plasminógeno. En una realización alternativa, el pegamento de fibrina está sustancialmente libre de inhibidores de proteasa añadidos. En otra realización más, el pegamento de fibrina comprende BAC2 (fibrinógeno) y trombina. En una realización alternativa, el pegamento de fibrina es pegamento de fibrina EVICEL® (Sellador de fibrina EVICEL® (Humano), Omrix Pharmaceuticals) (trombina y BAC2 (fibrinógeno)). En una realización, el pegamento de fibrina puede proporcionarse como un sistema multi-componente, que se mezcla antes del uso, con un componente que comprende fibrina (y opcionalmente factor XIII) y otro componente que comprende trombina (y opcionalmente calcio). En otra realización, el pegamento de fibrina es un andamiaje como se describe en la Solicitud Provisional U.S. N° 61/372.929 (presentada el 12 de agosto de 2010), cuya divulgación se incorpora por referencia en su totalidad en lo que respecta a la descripción, caracterización y uso de andamiajes de fibrina.

40 El pegamento de fibrina puede administrarse simultáneamente con, o antes, o después de células derivadas de tejido de cordón umbilical como se describe en la presente (células derivadas del cordón umbilical). En una realización, el pegamento de fibrina y las células derivadas del cordón umbilical como se describen en la presente se proporcionan en la forma de una composición como, por ejemplo, una composición farmacéutica. En una realización, la composición se administra localmente (como, por ejemplo, por inyección intramuscular o inyección en depósitos adiposos en el músculo). En otra realización, el pegamento de fibrina y las células derivadas del cordón umbilical como se describen en la presente administran localmente (como, por ejemplo, por inyección intramuscular o inyección en depósitos adiposos en el músculo). En otra realización, la composición, o las células y el pegamento de fibrina, se administran por inyección en espacios intersticiales para no entrar directamente en la circulación. En otra realización, el método comprende proporcionar las células en fibrinógeno a las que se agrega trombina inmediatamente antes de la administración local. En una realización, el pegamento de fibrina comprende de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 IU/ml, alternativamente de aproximadamente 18 a 22 IU/ml de trombina y de aproximadamente 39,3 a aproximadamente 60, 7 mg/ml, alternativamente de aproximadamente 45 a aproximadamente 60 mg/ml, alternativamente de aproximadamente 40 a aproximadamente 55 mg/ml, alternativamente de aproximadamente 45 a aproximadamente 55 mg/ml de fibrinógeno (por ejemplo, BAC2). En otra realización más, el pegamento de fibrina comprende aproximadamente 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 IU/ml de trombina y aproximadamente 40, 43, 45, 48, 50, 52, 53, 58 ó 60 mg/ml de fibrinógeno. En una realización, aproximadamente se usan 1×10^6 células con el pegamento de fibrina.

60 De acuerdo con los métodos descritos en la presente, se recupera un cordón umbilical de mamífero después o poco después de la finalización de un embarazo a término completo o prematuro, por ejemplo, después de la expulsión de después del nacimiento. El tejido del cordón umbilical puede transportarse desde el sitio de nacimiento a un laboratorio en un recipiente estéril como un matraz, un vaso de precipitados, una placa de cultivo o una bolsa. El recipiente puede tener una solución o medio, que incluye pero no limitado a una solución salina, como Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (también conocido como Medio Mínimo Esencial de Dulbecco) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier solución utilizada para el transporte de órganos usados
65 para el trasplante como solución de la Universidad de Wisconsin o solución perfluoroquímica. Pueden añadirse al

medio o tampón uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos, como pero no limitado a penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina. El tejido puede enjuagarse con una solución anticoagulante como solución que contenga heparina. Es preferible mantener el tejido a aproximadamente 4-10° C antes de la extracción de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Es incluso más preferible que el tejido no se congele antes de la extracción de las células derivadas de tejido de cordón umbilical.

El aislamiento de células derivadas del cordón umbilical tiene lugar preferiblemente en un ambiente aséptico. El cordón umbilical puede separarse de la placenta por medios conocidos en la técnica. La sangre y los desechos se eliminan preferiblemente del tejido antes del aislamiento de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Por ejemplo, el tejido umbilical puede lavarse con solución tampón, incluyendo, pero no limitado a, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado también puede comprender uno o más agentes antimicóticos y/o antibióticos, incluyendo pero no limitado a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

El tejido umbilical que comprende un cordón umbilical completo o un fragmento o sección del mismo se desagrega por fuerza mecánica (fuerzas de picado o de cizallamiento). En una realización actualmente preferida, el procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. Se conocen en la técnica muchos enzimas son útiles para el aislamiento de células individuales de matrices de tejido complejas para facilitar el crecimiento en cultivo. Las enzimas de digestión varían desde débilmente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) a fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina), y están disponibles comercialmente. Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles con esto incluye actividades enzimáticas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serina proteasas (como tripsina, quimotripsina o elastasa), y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, se sabe que las colagenasas son útiles para aislar varias células de los tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN de cadena sencilla y pueden minimizar la aglomeración celular durante el aislamiento. Los métodos preferidos implican un tratamiento enzimático con, por ejemplo, colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa e hialuronidasa. En ciertas realizaciones, se usa una mezcla de colagenasa y la proteasa dispasa neutra en el paso de disociación. Realizaciones más específicas emplean digestión en presencia de por menos una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de proteasa, dispasa y termolisina. Otras realizaciones más emplean digestión con ambas actividades de enzima colagenasa y dispasa. También se utilizan métodos que incluyen digestión con actividad de hialuronidasa además de actividades de colagenasa y dispasa. El experto en la técnica apreciará que muchos de tales tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para aislar células a partir de diversas fuentes de tejidos. Por ejemplo, las mezclas de enzimas para disociación de tejidos vendidas bajo el nombre comercial LIBERASE® (Roche, Indianapolis, IN) son adecuadas para su uso en los presentes métodos. Se conocen otras fuentes de enzimas, y los expertos en la técnica pueden también obtener dichos enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto en la técnica también está bien equipado para evaluar enzimas o combinaciones de enzimas nuevas o adicionales por su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferidos son de 0,5, 1, 1,5 ó 2 horas de duración o más. En otras realizaciones preferidas, el tejido se incubaba a 37° C durante el tratamiento enzimático del paso de disociación.

En algunas realizaciones de la divulgación, el tejido umbilical se separa en secciones que comprenden diversos aspectos del tejido, como neonatales, neonatales/maternos y aspectos maternos de la placenta, por ejemplo. Las secciones separadas se disocian luego mediante disociación mecánica y/o enzimática de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Las células de linaje neonatal o materno se pueden identificar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante análisis de cariotipo o hibridación in situ para un cromosoma Y.

Las células aisladas o el tejido umbilical del que se derivan las células pueden usarse para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a recipientes de cultivo de tejidos estériles, ya sea sin recubrir o recubiertos con matriz extracelular o ligandos como laminina, colágeno (nativo, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de mantener el crecimiento de las células como, pero no limitado a, DMEM (glucosa alta o baja), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 y medio libre de suero/medios comercializado bajo el nombre comercial CELL-GRO-FREE® (Mediatech, Inc., Herndon, VA). El medio de cultivo puede suplementarse con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferiblemente aproximadamente 2-15% (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS); beta-mercaptoetanol (BME o 2-ME), preferiblemente aproximadamente 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF- 1), factor inhibidor de leucocitos (LIF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, como penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solos o en combinación. El medio de cultivo comprende preferiblemente Medio de Crecimiento como se define en los Ejemplos siguientes.

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. En una realización preferida, las células se cultivan a de aproximadamente el 0 a aproximadamente el 5 por ciento por volumen de CO₂ en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan a de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 25 por ciento de O₂ en aire, preferiblemente de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 20 por ciento de O₂ en aire. Las células se cultivan preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 40° C y más preferiblemente se cultivan a 37° C. Las células se cultivan preferiblemente en una incubadora. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical preferiblemente se cultivan bajo un bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, vitamina C, Catalasa, vitamina E, N-acetilcisteína). "Bajo estrés oxidativo", como se usa en la presente, se refiere a condiciones sin daño de radicales libres o mínimo a las células cultivadas.

Los métodos para la selección del medio de cultivo, la preparación del medio y las técnicas de cultivo celular más apropiado son bien conocidos en la técnica y se describen en una variedad de fuentes, incluyendo Doyle et al., (eds.), 1995, CELL & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho and Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston, que se incorporan en la presente por referencia.

Después de cultivar las células o fragmentos de tejido aislados durante un período de tiempo suficiente, las células derivadas de tejido de cordón umbilical habrán crecido, ya sea como resultado de la migración desde el tejido umbilical o de división celular, o ambos. En algunas realizaciones de la invención, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se pasan, o se retiran a un recipiente de cultivo separado que contiene medio nuevo del mismo tipo o diferente al usado inicialmente, donde la población de células puede expandirse mitóticamente. Las células de la invención se pueden usar en cualquier punto entre el pase 0 y la senescencia. Las células preferiblemente se pasan entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, más preferiblemente se pasan de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferiblemente se pasan 10 ó 11 veces. Puede realizarse 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 umbilical se fraccionan en subpoblaciones a partir de las cuales se pueden aislar las células derivadas de tejido del cordón umbilical. El fraccionamiento o la selección pueden lograrse usando técnicas estándar para la separación de células incluyendo, pero no limitadas a, tratamiento enzimático para disociar tejido umbilical en sus células componentes, seguido por clonación y selección de tipos de células específicos, incluyendo, pero no limitado a, selección basada en morfología y/o marcadores bioquímicos; crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de las células no deseadas (selección negativa); separación basada en la capacidad de aglutinación 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 a contracorriente); unidad de separación por gravedad; distribución contracorriente; electroforesis; y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Para una revisión de la selección clonal y técnicas de separación celular, ver Freshney, 1994, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, 3ª Ed., Wiley-Liss, Inc., Nueva York, que se incorpora en la presente por referencia.

El medio de cultivo se cambia según sea necesario, por ejemplo, aspirando cuidadosamente el medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y reponiendo con medio nuevo. La incubación se continúa hasta que se acumula un número o densidad suficiente de células en la placa. Las secciones de tejido explantado originales se pueden eliminar y las células restantes se tripsinizan usando técnicas estándar o usando un raspador de células. Después de la tripsinización, las células se recolectan, se retiran a medio nuevo y se incuban como anteriormente. En algunas realizaciones, el medio se cambia por lo menos una vez aproximadamente a las 24 horas después de la tripsinización para eliminar cualquier célula flotante. Las células que permanecen en cultivo se consideran células derivadas de tejido del cordón umbilical.

Las células derivadas de tejido de cordón umbilical se pueden criopreservar. Por consiguiente, en una realización preferida descrita con mayor detalle a continuación, las células derivadas de tejido del cordón umbilical para transferencia autóloga (tanto para la madre como para el niño) pueden derivarse de tejidos umbilicales apropiados después del nacimiento de un niño, luego criopreservarse para estar disponibles en el caso de que luego sean necesarias para el trasplante.

Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden caracterizarse, por ejemplo, por características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de población, tiempo de duplicación, pases hasta la senescencia), análisis de cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal, linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para detección de epítomos), perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices de chips de genes; reacción en cadena de polimerasa (por ejemplo PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteínas (por ejemplo, por ensayo de coagulación de plasma o análisis de medio condicionado con PDC, por

ejemplo, por Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)), reacción de linfocitos mixta (por ejemplo, como medida de la estimulación de PBMCs), y/o otros métodos conocidos en la técnica.

5 Ejemplos de células derivadas de tejido del cordón umbilical se depositaron con la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA) el 10 de Junio del 2004, y se les asignaron los Números de Entrada ATCC como sigue: (1) a la designación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el N° de Entrada PTA-6067; y (2) a la designación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el N° de Entrada PTA-6068.

10 En varias realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical poseen una o más de las siguientes características de crecimiento (1) requieren L-valina para crecimiento en cultivo; (2) son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno desde aproximadamente el 5% a por lo menos aproximadamente el 20% (3) tienen el potencial de por lo menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de alcanzar la senescencia; y (4) se unen y expanden en un recipiente de cultivo tisular recubierto o no recubierto, en donde el
15 recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

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

25 En otras realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden caracterizarse por la producción de ciertas proteínas, incluyendo (1) la producción de por lo menos uno de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa; y (2) producción de por lo menos uno de los marcadores de superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A,B,C, como se detecta por citometría de flujo. En otras realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden caracterizarse por la falta de producción de por lo 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, según se detecta por citometría de flujo. Particularmente preferidas son las células que producen por lo menos dos de factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa. Más preferidas son las
30 células que producen las tres proteínas factor tisular, vimentina y actina de músculo liso alfa.

En otras realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden caracterizarse por expresión génica, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para un gen que codifica por lo menos uno de interleucina 8; retículo 1; ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando de quimiocina 6 (motivo C-X-C) (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); ligando de quimiocina 3 (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 alfa inducida.

40 En otras realizaciones más, las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden caracterizarse por expresión génica, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se reduce para una gen que codifica por lo menos uno de: homeobox 2 de baja estatura; proteína 2 de choque térmico de 27 kDa; ligando de quimiocina 12 (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeobox 2 de mesénquima (homeobox específico de detención del crecimiento); homólogo de homeobox de *sine oculis 1* (*Drosophila*); cristalina, alfa B; activador asociado a dishevelled de morfogénesis 2; Proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de enlace al plasminógeno); dominio src de homología tres (SH3) y rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con enanismo 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de procolágeno C-endopeptidasa; homólogo 7 de frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína 5 iroquois homeobox; hefaestina; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de la vesícula sináptica; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de enlace al factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa; ADNc de *Homo sapiens* FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citoquina; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de enlace a PDZ (TAZ); homólogo de homeobox de *sine oculis 2* (*Drosophila*); Proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesículas (miobrevina); proteína 1 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox menos distal 5; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfa hidroxí esteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; coactivador transcripcional con motivo de enlace a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, similar a beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon EUROIMAGE 1968422 de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de *Homo sapiens*; EphA3; proteína KIAA0367; receptor de péptidos natriuréticos C/guanilato ciclase C (receptor C de péptidos atrionatriuréticos); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus E1B, proteína de interacción de tipo 3 de 19kDa de BCL2/adenovirus E1B; proteína de enlace a AE 1; polipéptido 1 de subunidad VIIa de citocromo c oxidasa (músculo)

65

En otras realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden caracterizarse por la secreción de por lo menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1b, RANTES, y TIMP1. En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden caracterizarse por la falta de secreción de por lo menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1a y VEGF, como se detecta por ELISA.

En algunas realizaciones preferidas, las células que se derivan de tejido de cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo, requieren L-valina para el crecimiento, pueden crecer en por lo menos aproximadamente el 5% de oxígeno, y comprenden por lo menos una de las siguientes características: potencial para por lo menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; unión y expansión en un recipiente de cultivo de tejidos recubierto o no recubierto que comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina; producción de vimentina y actina de músculo liso alfa; producción de CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y, expresión de un gen, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal o una célula de médula ósea de cresta iliaca, se incrementa para un gen que codifica interleucina 8 y retículo 1. En algunas realizaciones, tales células no producen CD45 ni CD 117. Las células como se describen en este párrafo pueden usarse en métodos para tratar a un paciente que tiene enfermedad vascular periférica, pueden usarse en composiciones farmacéuticas para tratar enfermedad vascular periférica, por ejemplo, en donde dichas composiciones comprenden las células que tienen estas características y un portador farmacéuticamente aceptable, y se pueden usar en kits para elaborar, usar y poner en práctica dichos métodos y composiciones farmacéuticas como se describe y ejemplifica en la presente. Adicionalmente, las células como se describen en este párrafo pueden usarse para generar medios de cultivo celular condicionados o para elaborar preparaciones como extractos celulares y fracciones subcelulares que pueden usarse para hacer, usar y poner en práctica tales métodos y composiciones farmacéuticas como se describe y ejemplifica en la presente.

En realizaciones preferidas, las células no expresan telomerasa (hTert). Por consiguiente, una realización de la invención son células derivadas del cordón umbilical que no expresan telomerasa (hTert) y que tienen una o más de las características divulgadas en la presente.

En una realización de la divulgación, las células se aíslan de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaz de autorrenovarse y expandirse en cultivo y carecen de la producción de CD117 y/o telomerasa. Las células opcionalmente (i) expresan el receptor de lipoproteína 1 de baja densidad oxidado, el retículo, el ligando 3 del receptor de quimiocina y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD31, CD34 o CD45; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimales, o células de médula ósea de cresta iliaca, niveles aumentados de interleucina 8 o retículo 1; y/o (iv) tienen el potencial de diferenciarse en células de por lo menos un fenotipo de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular; y/o (v) expresar CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En otra realización de la divulgación, las células se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaz de autorrenovarse y expandirse en cultivo y carecen de la producción de CD1 17, CD34, CD31 y/o telomerasa. En otra realización más de la invención, las células se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaz de autorrenovarse y expandirse en cultivo y carecen de la producción de CD117, CD45, CD34, CD31 y/o telomerasa.

Entre las células que se prefieren actualmente para uso con la invención en varios de sus aspectos están las células derivadas de tejido de cordón umbilical que tienen las características descritas anteriormente y más particularmente aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con los pases, y además en donde las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A,B,C, en donde las células producen las proteínas inmunológicamente detectables que corresponden a los marcadores enumerados. Todavía más preferidas son las células que, adicionalmente a lo anterior, no producen proteínas correspondientes a ninguno de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 o HLA-DR, DP, DQ, como se detecta mediante citometría de flujo.

Ciertas células que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de líneas que llevan a varios fenotipos son inestables y, por tanto, pueden diferenciarse espontáneamente. Actualmente se prefieren para su uso con la invención las células que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo a lo largo de líneas de mioblastos, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, hemangiogénico, angiogénico, vasculogénico o endotelial vascular. Las células preferidas, cuando crecen 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 varios genes, por ejemplo como se determina usando una prueba de diagnóstico médico vendida bajo el nombre comercial GENECHIP (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Las células permanecen sustancialmente constantes, por ejemplo en sus características de marcador de superficie sobre los pases, a través de múltiples duplicaciones de población.

Otro aspecto de la divulgación presenta el uso de poblaciones de células derivadas de tejido de cordón umbilical descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la población de células es heterogénea. Una población celular heterogénea de la invención puede comprender por lo menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ó 95% de células derivadas de tejido del cordón umbilical de la invención. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender células madre u otras células progenitoras, como mioblastos u otras células progenitoras musculares, hemangioblastos o células precursoras de vasos sanguíneos, o pueden comprender células de músculo esquelético completamente diferenciadas, células de músculo liso, pericitos, o células endoteliales de vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente sólo células derivadas de tejido de cordón umbilical (preferiblemente por lo menos aproximadamente el 96%, 97%, 98%, 99% o más células derivadas de tejido de cordón umbilical). La población celular homogénea de la invención puede comprender células derivadas del ombligo o placenta. Las poblaciones homogéneas de células derivadas del ombligo están preferiblemente libres de células de linaje materno. Las poblaciones homogéneas de células derivadas de la placenta pueden ser de linaje neonatal o materno. La homogeneidad de una población celular puede lograrse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación celular (por ejemplo, citometría de flujo) o mediante expansión clonal de acuerdo con métodos conocidos. Por tanto, las poblaciones celulares homogéneas preferidas pueden comprender una línea celular clonal de células derivadas de tejido de cordón umbilical. Dichas poblaciones son particularmente útiles cuando se ha aislado un clon celular con funcionalidad altamente deseable.

También se proporciona en la presente el uso de poblaciones de células incubadas en presencia de uno o más factores, o bajo condiciones, que estimulan la diferenciación de células madre a lo largo de una vía de músculo liso vascular, endotelial vascular, pericito o músculo esquelético. Dichos factores son conocidos en la técnica y el experto en la técnica apreciará que la determinación de las condiciones adecuadas para la diferenciación puede lograrse con experimentación rutinaria. La optimización de tales condiciones puede lograrse mediante diseño y análisis estadístico experimental, por ejemplo, la metodología de superficie de respuesta permite la optimización simultánea de múltiples variables, por ejemplo, en un cultivo biológico. Los factores actualmente preferidos incluyen, pero no están limitados a, factores tróficos o de crecimiento, quimiocinas, citoquinas, productos celulares, agentes de desmetilación, y otros estímulos que se conocen ahora o se determinan después que estimulan la diferenciación, por ejemplo, de células madre a lo largo de vías o linajes angiogénicos, hemangiogénicos, vasculogénicos, de músculo esquelético, de músculo liso vascular, pericito o endotelial vascular.

Las células derivadas de tejido de cordón umbilical también pueden modificarse genéticamente para producir productos génicos terapéuticamente útiles, para producir agentes angiogénicos para facilitar o soportar la formación o crecimiento de vasos sanguíneos adicionales, o para producir factores para reclutar células progenitoras endoteliales en el área de daño isquémico. Las células progenitoras endoteliales facilitan la vasculogénesis y el flujo sanguíneo, particularmente después de un evento isquémico (Urbich C y Dimmeler S (2004) Circ. Res. 95:343-53). Los factores que juegan un papel en el reclutamiento de células endoteliales incluyen, pero no están limitados a, VEGF, factor 1 derivado del estroma (SDF-1), eritropoyetina (EPO), G-CSF, estatinas, estrógeno, PPAR γ , CXCR4, FGF y HGF. La modificación genética puede lograrse usando cualquiera de una variedad de vectores incluyendo, pero no limitado a, vectores virales integrantes, por ejemplo, vector de retrovirus o vectores virales adeno-asociados; vectores de replicación no integrantes, por ejemplo, vectores del virus del papiloma, vectores SV40, vectores adenovirales; o vectores virales defectuosos en la replicación. Otros métodos de introducción de ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas o por inyección de ADN directa.

Las células huésped se transforman o transfectan preferiblemente con ADN controlado por o en asociación operativa con, uno o más elementos de control de la expresión apropiados como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable. Puede usarse cualquier promotor para dirigir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no están limitados a, el promotor/potenciador de CMV, SV40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o promotor del gen de elastina. En algunas realizaciones, los elementos de control usados para controlar la expresión del gen de interés pueden permitir la expresión regulada del gen de tal manera que el producto se sintetiza sólo cuando se necesita in vivo. Si se desea expresión transitoria, los promotores constitutivos se usan preferiblemente en un vector no integrante y/o de replicación defectuosa. Alternativamente, los promotores inducibles podrían usarse para dirigir la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Los promotores inducibles incluyen, pero no están limitados a, los asociados con metalotioneína y proteínas de choque térmico.

Después de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células diseñadas genéticamente crezcan en medios enriquecidos y luego cambiarse a medios selectivos. El marcador seleccionable en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y crecer para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse a las líneas celulares. Este método se puede usar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen el producto génico.

Las células de la divulgación pueden diseñarse genéticamente para "eliminar" o "reducir" la expresión de factores que promueven la inflamación o el rechazo en el sitio del implante. Las técnicas negativas moduladoras para la reducción de los niveles de expresión del gen objetivo o los niveles de actividad del producto del gen objetivo se tratan a continuación. "Modulación negativa", como se usa en la presente, se refiere a una reducción en el nivel y/o actividad del producto génico objetivo con relación al nivel y/o la actividad del producto génico objetivo en

ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo de una células de músculo esquelético, célula de músculo liso vascular, pericito, célula endotelial vascular o, células progenitoras de los mismos puede reducirse o eliminarse usando una variedad de técnicas que incluyen, por ejemplo, inhibición de la expresión por inactivación del gen usando la técnica de recombinación homóloga. Típicamente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' para esa región) se interrumpe por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, evitando la producción de ARNm normal del gen objetivo y dando como resultado la inactivación del gen. Un gen también puede ser inactivado creando una delección en parte de un gen, o eliminando el gen completo. Usando un constructo con dos regiones de homología para el gen objetivo que están muy separadas en el genoma, pueden eliminarse las secuencias que intervienen en las dos regiones (Mombaerts et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084-3087). También pueden usarse Antisentido, ADNzimas, ribozimas, ARN interferente pequeño (ARNip) y otras de dichas moléculas que inhiben la expresión del gen objetivo para reducir el nivel de actividad del gen objetivo. Por ejemplo, se ha demostrado que las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de los complejos de genes de histocompatibilidad principal (HLA) son las más versátiles con respecto a las respuestas inmunes. Además, pueden utilizarse moléculas de triple hélice para reducir el nivel de actividad del gen objetivo. Estas técnicas se describen en detalle por L.G. Davis et al. (eds), 1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2ª edición, Appleton & Lange, Norwalk, CN.

En otros aspectos, la divulgación utiliza lisados celulares y fracciones solubles de células preparados a partir de células derivadas de tejido de cordón umbilical, o poblaciones de células heterogéneas u homogéneas que comprenden células derivadas de tejido de cordón umbilical, así como células o poblaciones derivadas de tejido de cordón umbilical de los mismos que han sido modificadas genéticamente o que han sido estimuladas para diferenciarse a lo largo de una vía del músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular. Tales lisados y fracciones de los mismos tienen muchas utilidades. El uso de la fracción soluble en lisado celular (es decir, sustancialmente libre de membranas) in vivo, por ejemplo, permite que el medio intracelular beneficioso se use alogénicamente en un paciente sin introducir una cantidad apreciable de las proteínas de la superficie celular que es más probable que activen el rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. Los métodos de lisar células son bien conocidos en la técnica e incluyen varios medios de disrupción mecánica, disrupción enzimática o disrupción química, o combinaciones de los mismos. Tales lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su Medio de Crecimiento y contener por tanto factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células lavadas libres den medio en, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones mayores que la densidad de la población original, si se prefiere.

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

Los lisados celulares o fracciones solubles en células preparados a partir de poblaciones de células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden usarse tal como están, se pueden concentrar adicionalmente, por ejemplo, mediante ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica, o combinarse con otros compuestos como productos biológicos, por ejemplo composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares o fracciones de los mismos pueden usarse in vitro o in vivo, solos o por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. Los lisados, si se introducen in vivo, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o de forma remota para proporcionar, por ejemplo, factores de crecimiento celular necesarios a un paciente.

En una realización adicional, las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden cultivarse in vitro para producir productos biológicos con alto rendimiento. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical que producen de forma natural un producto biológico particular de interés (por ejemplo, un factor trófico), o que han sido diseñadas genéticamente para producir un producto biológico, pueden expandirse clonalmente usando las técnicas de cultivo descritas en la presente. Alternativamente, las células pueden expandirse en un medio que induce la diferenciación a un músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o linaje endotelial vascular. En cada caso, los productos biológicos producidos por la célula y secretados al medio pueden aislarse fácilmente del medio condicionado usando técnicas de separación estándar, por ejemplo, como precipitación diferencial de proteínas, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, electroforesis y HPLC, por nombrar algunos. Se puede usar un "biorreactor" para aprovechar el método de flujo para alimentar, por ejemplo, un cultivo tridimensional in vitro. Esencialmente, a medida que se pasa el medio nuevo a través del cultivo tridimensional, se lava el producto biológico del cultivo y luego puede aislarse del flujo de salida, como anteriormente.

Alternativamente, un producto biológico de interés puede permanecer dentro de la célula y, por tanto, su recolección puede requerir que las células se lisen, como se ha descrito anteriormente. El producto biológico puede luego purificarse usando una o más de las técnicas anteriormente enumeradas.

65

En otras realizaciones, la divulgación utiliza medio condicionado de células derivadas de tejido del cordón umbilical cultivadas para su uso in vitro e in vivo como se describe a continuación. El uso de medio condicionado celular permite que los factores tróficos beneficiosos secretados por las células derivadas de tejido del cordón umbilical se usen alogénicamente en un paciente sin introducir células intactas que puedan activar el rechazo u otras respuestas inmunológicas adversas. El medio condicionado se prepara cultivando células en un medio de cultivo, luego eliminando las células del medio.

El medio acondicionado preparado a partir de poblaciones de células derivadas de tejido del cordón umbilical puede usarse como tal, concentrarse adicionalmente, por ejemplo, por ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, purificarse parcialmente, combinarse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica, o combinarse con otros compuestos como compuestos biológicos, por ejemplo composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. El medio condicionado puede usarse in vitro o in vivo, solo o combinado con células vivas autólogas o singénicas, por ejemplo. El medio condicionado, si se introduce in vivo, puede introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o remotamente para proporcionar el crecimiento celular o factores tróficos necesarios a un paciente.

En otra realización, se prepara, recoge y utiliza una matriz extracelular (ECM) producida cultivando células derivadas de tejido del cordón umbilical en sustratos líquidos, sólidos o semisólidos como una alternativa al implante de células vivas en un sujeto con necesidad de reparación o reemplazo de tejidos. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical se cultivan in vitro, en un marco tridimensional como se describe en otro sitio de la presente, en condiciones tales que se secreta una cantidad deseada de ECM sobre el marco. Las células que comprenden el nuevo tejido se eliminan y la ECM se procesa para un uso adicional, por ejemplo, como una preparación inyectable. Para lograr esto, se destruyen las células en el marco y se elimina cualquier residuo celular del marco. Este proceso puede llevarse a cabo de varias maneras diferentes. Por ejemplo, el tejido vivo se puede congelar rápidamente en nitrógeno líquido sin un crioprotector, o el tejido puede sumergirse en agua destilada estéril para que las células exploten en respuesta a la presión osmótica.

Una vez que se han destruido las células, las membranas celulares pueden ser interrumpidas y eliminarse los restos celulares mediante tratamiento con un enjuague detergente suave, como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) o un detergente zwitteriónico. Alternativamente, el tejido puede digerirse enzimáticamente y/o extraerse con reactivos que descomponen las membranas celulares y permiten la eliminación del contenido celular. Ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas. Ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos como, por ejemplo, alquilaryl poliéter alcohol (TRITON X-100), octilfenoxi polietoxi-etanol (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, Philadelphia, PA), polietilenglicol éter (Rohm and Haas, Philadelphia, PA); y detergentes iónicos como dodecil sulfato de sodio, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen de 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o no ramificada.

La recolección de la ECM puede realizarse de varias maneras, dependiendo al menos en parte de si el nuevo tejido se ha formado en un marco tridimensional que es biodegradable o no biodegradable, como en el caso de metales. Por ejemplo, si el marco no es biodegradable, la ECM puede eliminarse sometiendo el marco a sonicación, chorros de agua a alta presión, raspado mecánico, o tratamiento suave con detergentes o enzimas, o cualquier combinación de los anteriores.

Si el marco es biodegradable, la ECM puede recolectarse, por ejemplo, permitiendo que el marco se degrade o disuelva en la solución. Alternativamente, si el marco biodegradable está compuesto de un material que puede inyectarse el mismo junto con la ECM, el marco y la ECM pueden procesarse en su totalidad para inyección posterior. Alternativamente, la ECM puede eliminarse del marco biodegradable mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la recolección de ECM de un marco no biodegradable. Todos los procesos de recolección están diseñados preferiblemente para no desnaturalizar la ECM.

Después de que se ha recolectado, la ECM puede procesarse adicionalmente. Por ejemplo, la ECM puede homogeneizarse a partículas finas usando técnicas bien conocidas en la técnica, como por sonicación, de modo que pueda pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes de la ECM también pueden reticularse, si se desea, por irradiación gamma. Preferiblemente, la ECM puede irradiarse entre 0,25 a 2 megaradios para esterilizar y reticular la ECM. La reticulación química usando agentes que son tóxicos, como el glutaraldehído, es posible pero no generalmente preferida.

Las cantidades y/o proporciones de proteínas, como los varios tipos de colágeno presentes en la ECM, pueden ajustarse mezclando la ECM producida por las células de la invención con ECM de uno o más tipos de células diferentes. Adicionalmente, las sustancias biológicamente activas como proteínas, factores de crecimiento y/o fármacos pueden incorporarse en la ECM. Sustancias biológicamente activas ejemplares incluyen factores de crecimiento tisular, como TGF-beta, y similares, que promueven la curación y la reparación del tejido en el sitio de la

inyección. Tales agentes adicionales pueden utilizarse en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en la presente, por ejemplo, con lisados celulares completos, fracciones celulares solubles, o componentes y productos purificados adicionales producidos por las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que utilizan células derivadas de tejido del cordón umbilical, poblaciones de células derivadas de tejido del cordón umbilical, componentes y productos de células derivadas de tejido del cordón umbilical en varios métodos para el tratamiento de lesiones o daño provocados por un episodio isquémico periférico. Ciertas realizaciones abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas (células derivadas de tejido del cordón umbilical solas o mezcladas con otros tipos de células). Otras realizaciones abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares de células derivadas de tejido del cordón umbilical (por ejemplo, lisados celulares, fracciones celulares solubles, medio condicionado, ECM o componentes de cualquiera de los anteriores) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos producidos de manera natural por células derivadas de tejido de cordón umbilical o mediante modificación genética, medio condicionado de cultivo celular derivado de tejido del cordón umbilical). En cualquier caso, la composición farmacéutica puede comprender además otros agentes activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores miotróficos o fármacos mioregenerativos o mioprotectores como se conoce en la técnica.

20 Los ejemplos de otros componentes que pueden añadirse a las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no están limitados a: (1) otros fármacos miobeneficiosos o mioprotectores, o fármacos angiobeneficiosos o angioprotectores; (2) componentes de matriz extracelular seleccionados, como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos (alternativamente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden diseñarse genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes antiapoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimetocuerpo de EPO, trombotopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasa); (4) compuestos antiinflamatorios (p. Ej., Inhibidores de p38 MAP cinasa, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, Pemirolast, Tranilast, REMICADE® (Centocor, Inc., Malvern, PA), Sirolimus y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS) (como Tepoxalin, Tolmetin y Suprafen); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, como inhibidores de calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y varios anticuerpos; (6) antioxidantes como probucol, vitaminas C y E, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; (7) factores tróficos como Agrina, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, NEGF-1, NEGF-2, PDGF, GDF, IGF1, IGF2, EGF y FGF; y, (8) factores que funcionan en el reclutamiento e incorporación de células progenitoras endoteliales en tejido isquémico, como VEGF, SDF-1, EPO, G-CSF, estatinas, estrógeno, PPAR γ , CXCR4, por nombrar solo algunos.

35 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación comprenden células derivadas de tejido del cordón umbilical, componentes o productos de las mismas, que incluyen preparaciones elaboradas a partir de células derivadas de tejido del cordón umbilical, formuladas con un portador o medio farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina (como solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, polivinilpirrolidina, carbohidratos (como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos) e hidroximetilcelulosa. Tales preparaciones pueden esterilizarse, y si se desea, mezclarse con agentes auxiliares como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones y agentes colorantes. Los portadores farmacéuticos adecuados para uso 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 la WO 96/05309.

50 Típicamente, pero no exclusivamente, las composiciones farmacéuticas que comprenden componentes o productos de células derivadas de tejido del cordón umbilical, pero no células vivas, se formulan como líquidos (o como comprimidos sólidos, cápsulas y similares, cuando es apropiada la administración oral). Estos pueden formularse para la administración mediante cualquier vía aceptable conocida en la técnica para lograr la administración de fármacos y moléculas biológicas al músculo esquelético objetivo, músculo liso vascular, pericito o tejido endotelial vascular, incluyendo, pero no limitado a, oral, nasal, oftálmico y parenteral, incluso intravenoso. Las vías particulares de administración parenteral incluyen, pero no están limitadas a, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intracisternal, o mediante jeringuillas con agujas o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

60 Las composiciones farmacéuticas que comprenden células derivadas de tejido umbilical vivo se formulan típicamente como líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles (incluyendo pegamento de fibrina)) o sólidos (por ejemplo, matrices, andamiajes y similares, como sea apropiado para el diseño de tejido muscular vascular o esquelético). Las composiciones líquidas se formulan para la administración mediante cualquier vía aceptable conocida en la técnica para lograr la administración de células vivas a los tejidos del músculo esquelético o vascular objetivo. Típicamente, estas incluyen inyección o infusión, ya sea de forma difusa, o dirigida al sitio de lesión, daño o afección isquémica periférica, por una vía de administración que incluye, pero no se limita a, administración intramuscular, intravenosa o intraarterial a través de jeringuillas con agujas y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas en un portador semisólido o sólido se formulan típicamente para su implantación quirúrgica en el sitio de lesión, daño o aflicción isquémica. Se apreciará que las composiciones líquidas también pueden administrarse mediante procedimientos quirúrgicos. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas semisólidas o sólidas pueden comprender geles semipermeables, entramados, andamiajes celulares y similares, que pueden ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede ser deseable o apropiado secuestrar las células exógenas de su entorno, pero permitir que las células secreten y administren moléculas biológicas (por ejemplo, factores miotróficos, factores angiogénicos o factores de reclutamiento de células progenitoras endoteliales) a células del músculo esquelético o vasculares circundantes. En estas realizaciones, las células pueden formularse como implantes autónomos que comprenden células derivadas de tejido del cordón umbilical vivo o población celular que comprende células derivadas de tejido del cordón umbilical rodeadas por una barrera selectivamente permeable, no degradable que separa físicamente las células trasplantadas del tejido huésped. Dichos implantes son a veces referidos como "inmunoprotectores", ya que tienen la capacidad de evitar que las células inmunes y las macromoléculas maten las células trasplantadas en ausencia de inmunosupresión inducida farmacológicamente (para una revisión de dichos dispositivos y métodos, ver, por ejemplo, P.A. Tresco et al., (2000) *Adv. Drug Delivery Rev.* 42:3-27).

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

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

La matriz biocompatible puede estar compuesta de polímeros biodegradables naturales, naturales modificados o sintéticos, incluyendo homopolímeros, copolímeros y polímeros de bloque, así como combinaciones de los mismos. Cabe destacar que un polímero generalmente se nombra en función del monómero del que se sintetiza.

Los ejemplos de polímeros o clases de polímeros biodegradables adecuados incluyen fibrina, colágeno, elastina, gelatina, vitronectina, fibronectina, laminina, trombina, poli(aminoácido), celulosa oxidada, tropoelastina, seda, ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos; proteínas, polinucleótidos, matrices de membrana basal reconstituida, almidones, dextranos, alginatos, hialuron, quitina, quitosano, agarosa, polisacáridos, ácido hialurónico, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), polietilenglicol, tejido descelularizado, péptidos autoensamblables, polipéptidos, glicosaminoglicanos, sus derivados y mezclas de los mismos. Para tanto el ácido glicólico como el ácido láctico, se prepara típicamente un dímero cíclico intermedio y se purifica 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, poli(oxalatos de alquileno), policarbonatos derivados de tirosina, poliiminocarbonatos, poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amina, poli(fumarato de propileno), polidioxanonas, policarbonatos, polioxalatos, poli(alfahidroxiácidos), poli(ésteres), poliuretano, poli(éster uretano), poli(éter uretano), polianhídridos, poliacetatos, policaprolactonas, poli(ortoésteres), poliaminoácidos, poliamidas y mezclas y copolímeros de los mismos. 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 poli(ácido láctico) / poli(ácido glicólico)/polietilenglicol, copolímeros de poliuretano y poli(ácido láctico), copolímeros de alfa-aminoácidos, copolímeros de alfa-aminoácidos y ácido caproico, copolímeros de alfa-bencil glutamato y polietilenglicol, copolímeros de succinato y poli(glicoles), polifosfaceno, poli(hidroxicanoatos) y mezclas de los mismos. También se contemplan sistemas binarios y ternarios.

En general, un polímero biodegradable adecuado para su uso como matriz está configurado deseablemente de modo que tenga propiedades mecánicas que sean adecuadas para la aplicación pretendida, permanezca lo suficientemente intacto hasta que el tejido haya crecido y curado, no invoque una respuesta inflamatoria o tóxica, se metabolice en el cuerpo después de cumplir su propósito, se procese fácilmente en el producto final deseado que se va a formar, demuestre una vida útil aceptable y se esterilice fácilmente.

En un aspecto de la divulgación, el polímero biocompatible usado para formar la matriz está en la forma de un hidrogel. En una realización de la invención, el hidrogel comprende un pegamento de fibrina. En general, los

hidrogeles son materiales poliméricos reticulados que pueden absorber más del 20% de su peso en agua mientras mantienen una estructura tridimensional distinta. Esta definición incluye polímeros reticulados secos que se hincharán en ambientes acuosos, así como materiales hinchados con agua. Un huésped de polímeros hidrófilos puede reticularse para producir hidrogeles, ya sea si el polímero es de origen biológico, semisintético o totalmente sintético. El hidrogel puede producirse a partir de un material polimérico sintético. Tales polímeros sintéticos se pueden adaptar a un intervalo de propiedades y uniformidad de lotes predecible, y representan una fuente fiable de material que generalmente está libre de preocupaciones de inmunogenicidad. Las matrices pueden incluir hidrogeles formados a partir de péptidos autoensamblables, como los tratados en las Patentes U.S. N° 5.670.483 y 5.955.343, Publicación de Solicitud U.S. N° 2002/0160471, y Publicación de PCT N° WO 02/062969.

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

Ejemplos no limitativos de andamiaje o matriz (a los que a veces se hace referencia colectivamente como "marco") que pueden usarse en la presente invención incluyen estructuras textiles como tejidos, tejidos de punto, trenzas, mallas, telas no tejidas, y tejidos deformados; espumas porosas, espumas semi-porosas, películas o láminas perforadas, micropartículas, perlas y esferas y estructuras compuestas que son una combinación de las estructuras anteriores. Las esteras no tejidas pueden formarse, por ejemplo, usando fibras compuestas por un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), vendido como las suturas de nombre comercial VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). También pueden usarse espumas compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos como secado por congelación, o liofilización, como se describe en la patente de U.S.: N° 6.355.699. También pueden usarse hidrogeles tales como péptidos autoensamblables (por ejemplo, RAD 16). También son adecuadas para su uso en la invención las redes degradables de formación in situ (ver, por ejemplo, Anseth, KS et al. (2002) J. Controlled Release 78:199-209; Wang, D. et al., (2003) Biomaterials 24:3969-3980; Publicación de Patente U.S. 2002/0022676 de He et al.). Estos materiales de formación in situ se formulan como fluidos adecuados para inyección, y luego se pueden inducir para formar un hidrogel por una variedad de medios como cambio de temperatura, pH y exposición a la luz in situ o in vivo.

En otra realización, el marco es un fieltro, que puede estar compuesto de un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico. El hilo se hace en un fieltro usando técnicas de procesamiento de textiles estándar que consisten en engaste, corte, cardado y punzonado. En otra realización, las células se siembran en andamiajes de espuma que pueden ser estructuras compuestas.

En muchas de las realizaciones mencionadas anteriormente, el marco puede moldearse en una forma útil, como la de un vaso sanguíneo. Además, se apreciará que las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden cultivarse en dispositivos quirúrgicos no degradables o implantables, preformados, por ejemplo, de una manera correspondiente a la usada para preparar bobinas endovasculares de GDC que contienen fibroblastos, por ejemplo (Marx, WF et al., (2001) Am. J. Neuroradiol. 22:323-333).

La matriz, el andamiaje o el dispositivo pueden tratarse antes de la inoculación de las células para mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación, pueden tratarse matrices de nylon con ácido acético 0,1 molar y pueden incubarse en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nylon. El poliestireno puede tratarse de manera similar usando ácido sulfúrico. Las superficies externas de un marco también pueden modificarse para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, como recubriendo de plasma el marco o por la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), materiales genéticos como citoquinas y factores de crecimiento, una matriz celular y/o otros materiales, incluyendo, pero no limitado a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, entre otros factores que afectan a la supervivencia y diferenciación celular.

Los marcos que contienen hUTC se preparan de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar libremente en un recipiente de cultivo hasta la sub-confluencia o la confluencia, recogerse del cultivo e inocularse en el marco. Pueden agregarse factores de crecimiento al medio de cultivo antes de, durante o después de la inoculación de las células para activar la diferenciación y la formación de tejido, si se desea. Alternativamente, los propios marcos pueden modificarse de modo que se mejore el crecimiento de las células sobre los mismos, o de manera que se reduzca el riesgo de rechazo del implante. Por tanto, pueden añadirse al marco para liberación local uno o más compuestos biológicamente activos, incluyendo, pero no limitado

a, compuestos antiinflamatorios, inmunosupresores o factores de crecimiento.

Las células derivadas de tejido del cordón umbilical, partes de células derivadas de tejido del cordón umbilical o poblaciones celulares que comprenden células derivadas de tejido del cordón umbilical o componentes de o productos producidos por células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden usarse de una variedad de maneras para soportar y facilitar la reparación, regeneración y mejora de células y tejidos del músculo esquelético, para mejorar el flujo sanguíneo y para estimular y/o apoyar la angiogénesis, especialmente en pacientes con enfermedad vascular periférica. Dichas utilidades abarcan métodos in vitro, ex vivo e in vivo.

En una realización, como se ha tratado anteriormente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden cultivarse in vitro para producir productos biológicos que son producidos de manera natural por las células, o producidos por las células cuando se inducen para diferenciarse en linajes de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelial vascular, o producidos por las células a través de modificación genéticas. Por ejemplo, se descubrió que TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC e IL-8 se secretaban a partir de células derivadas de ombligo cultivadas en medio de crecimiento. Adicionalmente, los factores para el reclutamiento de células progenitoras endoteliales como VEGF, SDF-1, EPO, G-CSF, estatinas, estrógenos, PPAR γ y CXCR4 pueden producirse por células derivadas de tejido del cordón umbilical y pueden secretarse en el medio de crecimiento. Otros factores tróficos, aún no detectados o no examinados, para su uso en la reparación y regeneración del músculo esquelético o vascular, es probable que sean producidas por células derivadas de tejido del cordón umbilical y posiblemente se secreten en el medio.

A este respecto, otra realización de la invención presenta el uso de células derivadas de tejido del cordón umbilical para la producción de medio condicionado, ya sea a partir de células derivadas de tejido del cordón umbilical indiferenciadas o de células derivadas de tejido del cordón umbilical incubadas bajo condiciones que estimulan la diferenciación en un linaje del músculo esquelético o vascular. Dichos medios condicionados se contemplan para su uso en cultivo in vitro o ex vivo de células precursoras de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelial vascular, o in vivo para soportar células trasplantadas que comprenden poblaciones homogéneas de células derivadas de tejido del cordón umbilical o poblaciones heterogéneas que comprenden células derivadas de tejido del cordón umbilical y progenitoras de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o del endotelial vascular, o para reclutar células progenitoras endoteliales al sitio de lesión isquémica, por ejemplo.

Otra realización más comprende el uso de lisados de células hUTC, fracciones de células solubles o componentes de las mismas, o ECM o componentes de las mismas, para una variedad de propósitos. Como se ha mencionado anteriormente, algunos de estos componentes pueden usarse en composiciones farmacéuticas. En otras realizaciones, se usa un lisado celular o ECM para recubrir o tratar de otro modo sustancias o dispositivos que se usarán quirúrgicamente, o para implantación, o para propósitos ex vivo, para promover la curación o supervivencia de células o tejidos con los que se ha contactado en el curso de tales tratamientos. En algunas realizaciones preferidas, dichas preparaciones elaboradas a partir de células derivadas de tejido del cordón umbilical comprenden FGF y HGF.

En otra realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se usan ventajosamente en co-cultivos in vitro para proporcionar soporte trófico a otras células, en particular, células de músculo esquelético, células progenitoras de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales vasculares o células progenitoras del endotelio vascular. En algunas realizaciones preferidas, el soporte trófico es la proliferación de las células. Para el co-cultivo, puede ser deseable que las células derivadas de tejido del cordón umbilical y las otras células deseadas se co-cultiven bajo condiciones en las que los dos tipos de células están en contacto. Esto puede lograrse, por ejemplo, sembrando las células como una población heterogénea de células en medio de cultivo o en un sustrato de cultivo adecuado. Alternativamente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden cultivarse primero hasta la confluencia, y luego servirán como sustrato para el segundo tipo de célula deseado en cultivo. En esta última realización, las células pueden estar además separadas físicamente, por ejemplo, por una membrana o dispositivo similar, de modo que el otro tipo de célula puede retirarse y usarse por separado, tras el período de co-cultivo. El uso de células derivadas de tejido del cordón umbilical en el co-cultivo para promover la expansión y la diferenciación de tipos de células del músculo esquelético o vasculares puede ser aplicable en investigación y en áreas clínicas/terapéuticas. Por ejemplo, el co-cultivo de células derivadas de tejido del cordón umbilical puede utilizarse para facilitar el crecimiento y diferenciación de células del músculo esquelético, músculo liso vascular, pericitos o endoteliales vasculares en cultivo, para fines de investigación básica o para su uso en ensayos de detección de fármacos, por ejemplo. El co-cultivo de células derivadas de tejido del cordón umbilical también puede utilizarse para la expansión ex vivo de progenitores del músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular para su posterior administración con fines terapéuticos. Por ejemplo, las células progenitoras de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular pueden recolectarse de un individuo, expandirse ex vivo en co-cultivo con células derivadas de tejido del cordón umbilical, luego devolverse a ese individuo (transferencia autóloga) u otro individuo (transferencia singénica o alogénica). En estas realizaciones, se apreciará que, después de la expansión ex vivo, la población mixta de células que comprende las células derivadas de tejido

del cordón umbilical y los progenitores del músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito, o endotelio vascular podrían administrarse a un paciente con necesidad de tratamiento. Alternativamente, en situaciones donde la transferencia autóloga es apropiada o deseable, las poblaciones de células co-cultivadas pueden separarse físicamente en cultivo, permitiendo la eliminación de progenitores del músculo esquelético autólogo, músculo liso vascular o endotelio vascular para la administración al paciente.

Como se describe en las Publicaciones de Patente de U.S. N° 2005/0058631, 2005/0054098 y 2005/0058630, las células derivadas de tejido del cordón umbilical han demostrado que se trasplantan eficazmente en el cuerpo, y para mejorar el flujo sanguíneo y reducir la necrosis del tejido en un modelo animal aceptado. Esos descubrimientos, junto con los descubrimientos expuestos en la presente invención, apoyan las realizaciones preferidas de la invención, en donde las células derivadas de tejido del cordón umbilical se usan en terapia celular para tratar lesión o daño isquémico reparando o regenerando músculo esquelético y/o tejido vascular en un paciente con enfermedad vascular periférica, o mejorando el flujo sanguíneo o estimulando y/o apoyando la angiogénesis en un paciente con enfermedad vascular periférica. En una realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se trasplantan a una localización objetivo en el cuerpo, especialmente en o proximal a la localización del episodio isquémico, donde las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden diferenciarse en uno o más fenotipos de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden proporcionar soporte trófico para progenitores de células de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, pericito o endoteliales vasculares y/o células de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, pericitos o células endoteliales vasculares in situ, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden producir factores para reclutar células progenitoras endoteliales al sitio de la lesión isquémica, o las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden ejercer un efecto beneficioso en dos o más de esas maneras, entre otras. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical secretan factores tróficos incluyendo, pero no limitado a, GFGFm, IL-6, IL-8, HGF, IGF-1, TPO, y similares. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden ayudar en el reclutamiento de células progenitoras vasculares tales como angioblastos para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Las células derivadas de tejido de cordón umbilical pueden ejercer efectos tróficos en el cuerpo del paciente al que se administran. Por ejemplo, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden ejercer efectos tróficos sobre células de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células endoteliales vasculares, pericitos o células progenitoras de las mismas. En algunas realizaciones preferidas, el efecto trófico es la proliferación de dichas células. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical también pueden inducir la migración de células en el cuerpo del paciente al que se administran. Tal migración puede facilitar la reparación, regeneración y tratamiento de la enfermedad vascular periférica como isquemia periférica. Por ejemplo, las células derivadas de tejido del cordón umbilical administradas en o cerca de un sitio de enfermedad vascular periférica pueden inducir la migración de células al sitio de enfermedad vascular periférica para reparar, regenerar o tratar de otro modo el tejido enfermo y sus alrededores. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical así administradas pueden inducir la migración de células de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células endoteliales vasculares, pericitos o células progenitoras de las mismas. En realizaciones preferidas, las células derivadas de tejido del cordón umbilical inducen la migración de células endoteliales vasculares y/o células progenitoras del endotelio vascular al sitio, o por lo menos cerca del sitio de la enfermedad vascular periférica. En algunas realizaciones, la migración es inducida o apoyada por FGF y/o HGF, preferiblemente FGF y HGF expresados por las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Las preparaciones elaboradas a partir de células derivadas de tejido del cordón umbilical, incluyendo lisados celulares, fracciones subcelulares y similares, también pueden usarse para tratar enfermedad vascular periférica. Tales preparaciones pueden formularse con portadores farmacéuticamente aceptables como los descritos y ejemplificados en la presente, y administrarse a pacientes en cantidades eficaces para tratar la enfermedad vascular periférica. En realizaciones preferidas, las preparaciones elaboradas a partir de células derivadas de tejido del cordón umbilical comprenden FGF y HGF.

Las realizaciones específicas de la invención se dirigen a la reparación, regeneración, reemplazo de, o el apoyo directo de la reparación, regeneración, o reemplazo de vasos sanguíneos para el tratamiento de lesión o daño isquémico periférico.

Las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden administrarse solas (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. Como se ha descrito anteriormente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden administrarse como se formulan en una preparación farmacéutica con una matriz o andamiaje, o con portadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Cuando las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran con otras células, pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente con las otras células (ya sea antes o después de las otras células). Las células que pueden administrarse junto con células derivadas de tejido del cordón umbilical incluyen, pero no se limitan a, miocitos, células de músculo esquelético, células progenitoras de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales vasculares, o células progenitoras de endotelio vascular, y/o otras células madre multipotentes o pluripotentes. Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con las células derivadas de tejido del cordón umbilical inmediatamente o poco antes de la administración, o se pueden co-cultivar durante un período de tiempo antes de la administración.

Las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden administrarse con otros fármacos o moléculas biológicas beneficiosos, u otros agentes activos, como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores angiogénicos o fármacos mioregenerativos o mioprotectores medicamentosos como se conoce en la técnica. Cuando las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran con otros agentes, pueden administrarse juntas en una única composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (ya sea antes o después de la administración de los otros agentes). Los otros agentes pueden ser parte de un régimen de tratamiento que comienza o antes del trasplante y continúa durante el transcurso de la recuperación, o puede iniciarse en el momento del trasplante, o incluso después del trasplante, según lo considere apropiado un médico experto en la materia.

Los ejemplos de otros componentes que pueden administrarse con células derivadas de tejido del cordón umbilical incluyen, pero no están limitados a: (1) otros factores angiogénicos, fármacos angiogénicos, o factores o fármacos mioregenerativos o miooprotectores; (2) componentes de la matriz extracelular seleccionados, como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos (alternativamente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden diseñarse genéticamente para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes anti-apoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimetocuerpo de EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasa); (4) compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAP quinasa, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, Pemirolast, Tranliast, REMICADE® (Centocor, Inc., Malvern, PA), Sirolimus y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS) (como Tepoxalin, Tolmetin y Suprafen); (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, como inhibidores de calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) antioxidantes como probucol, vitaminas C y E, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína y N-acetilcisteína; y (6) anestésicos locales, por nombrar unos pocos.

En una realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se administran como células indiferenciadas, es decir, cultivadas en Medio de Crecimiento. Alternativamente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden administrarse después de la exposición en cultivo a condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo de músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o de endotelio vascular deseado.

Las células de la invención pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, administrarse (por ejemplo, por medio de un catéter, jeringuilla, derivación, stent, microcatéter o bomba), o administrarse de otra manera directa o indirectamente al sitio de la lesión, daño o aflicción isquémica. Las vías de administración de las células de la invención o composiciones de las mismas incluyen, pero no están limitadas a, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratecal, intracisternal, o por jeringuillas con agujas o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, el implante quirúrgico en una localización precisa en el cuerpo es típicamente un medio adecuado de administración. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas pueden administrarse a través de la sangre, o directamente en el tejido del músculo afectado (por ejemplo, a través de un área difusamente afectada, como sería el caso para lesión isquémica difusa). La migración de las células derivadas de tejido del cordón umbilical puede guiarse por señales químicas, factores de crecimiento o calpaínas.

Las células o composiciones y/o matrices derivadas de tejido del cordón umbilical que comprenden las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden administrarse al sitio mediante un microcatéter, intracaterización o mediante una minibomba. El excipiente vehículo o portador puede ser cualquiera de los que se sabe que son farmacéuticamente aceptables para la administración a un paciente, particularmente localmente en el sitio en el que se va a inducir la diferenciación celular. Ejemplos incluyen medios líquidos, por ejemplo, Medio Eagle Modificado de 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.

Otras realizaciones abarcan métodos para tratar lesión o daño isquémico periférico administrando composiciones terapéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y componentes celulares de células derivadas de tejido del cordón umbilical (por ejemplo, lisados celulares o componentes de los mismos) o productos (por ejemplo, tróficos y otros factores biológicos producidos de manera natural por células derivadas de tejido del cordón umbilical o mediante modificación genética, medio condicionado de cultivo de células derivadas de tejido del cordón umbilical), o medio de crecimiento de células derivadas de tejido del cordón umbilical o productos purificados a partir de medio de crecimiento. En realizaciones preferidas, los factores biológicos son FGF y HGF. Estos métodos pueden comprender además la administración de otros agentes activos, como factores de crecimiento, factores angiogénicos o fármacos mioregenerativos o mioprotectores como se conoce en la técnica.

Las formas y los regímenes de dosificación para administrar células derivadas de tejido del cordón umbilical

o cualquiera de las otras composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en la presente se desarrollan de acuerdo con una buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición del paciente individual, por ejemplo, naturaleza y extensión de la lesión o daño del evento isquémico periférico, edad, sexo, peso corporal y condición médica general, y otros factores conocidos por los médicos. Por tanto, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica a ser administrada a un paciente se determina por estas consideraciones como se conoce en la técnica.

Las células derivadas de tejido de cordón umbilical han demostrado que no estimulan PBMCs alogénicas en una reacción de linfocitos mixta. Por consiguiente, el trasplante con células derivadas de tejido del cordón umbilical alogénicas, o incluso xenogénicas, puede tolerarse en algunas situaciones. En algunas realizaciones, las propias células derivadas de tejido del cordón umbilical proporcionan ellas mismas un efecto inmunosupresor, evitando de ese modo el rechazo del huésped de las células derivadas de tejido del cordón umbilical trasplantadas. En tales situaciones, la inmunosupresión farmacológica durante la terapia celular puede no ser necesaria.

Sin embargo, en otras situaciones, puede ser deseable o apropiado inmunodeprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse administrando las células en un dispositivo encapsulado, como se ha descrito anteriormente. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, las células derivadas de tejido del cordón umbilical pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad, como se ha mencionado anteriormente.

La supervivencia de las células derivadas de tejido del cordón umbilical trasplantadas en un paciente vivo puede determinarse mediante el uso de una variedad de técnicas de escaneo, por ejemplo, escaneo por tomografía axial computarizada (CAT o CT), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o escaneos por tomografía de emisión de positrones (PET). La determinación de la supervivencia del trasplante también puede hacerse post mortem eliminando el músculo esquelético o el tejido vascular, y examinándolo visualmente o a través de un microscopio. Alternativamente, las células pueden tratarse con tinciones que son específicas para células del músculo esquelético, células del músculo liso vascular, pericitos o células endoteliales vasculares. Las células trasplantadas también pueden identificarse mediante la incorporación previa de colorantes trazadores como microesferas etiquetadas con rodamina o fluoresceína, azul rápido, micropartículas férricas, bisbenzamida o productos genéticos indicadores introducidos genéticamente, como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

En otro aspecto, la divulgación proporciona kits que utilizan células derivadas de tejido del cordón umbilical, poblaciones de células derivadas de tejido del cordón umbilical, componentes y productos de células derivadas de tejido del cordón umbilical en varios métodos para estimular y/o apoyar la angiogénesis, para mejorar el flujo sanguíneo, para regenerar, reparar y mejorar el músculo esquelético lesionado o dañado por un evento isquémico periférico, como se ha descrito anteriormente. Cuando se usan para el tratamiento de daño o lesión causada por un evento isquémico u otro tratamiento programado, los kits pueden incluir una o más poblaciones celulares, incluyendo por lo menos células derivadas de tejido del cordón umbilical y un portador farmacéuticamente aceptable (líquido, semisólido o sólido) Los kits también pueden incluir opcionalmente un medio de administración de las células, por ejemplo mediante inyección. Los kits pueden incluir además instrucciones para el uso de las células. Los kits preparados para su uso en hospital de campo, como para uso militar, pueden incluir suministros de procedimiento completo, incluidos andamiajes de tejido, suturas quirúrgicas y similares, donde las células se van a usar en conjunción con la reparación de lesiones agudas. Los kits para ensayos y métodos in vitro como se describen en la presente pueden contener uno o más de (1) células derivadas de tejido del cordón umbilical o componentes o productos de células derivadas del tejido de cordón umbilical, (2) reactivos para poner en práctica el método in vitro, (3) otras células o poblaciones celulares, como sea apropiado, y (4) instrucciones para realizar el método in vitro.

Los siguientes ejemplos describen la invención con mayor detalle. Estos ejemplos se pretende que ilustren adicionalmente, no que limiten, los aspectos de la invención descritos en la presente.

Ejemplo 1

Eficacia de Células Derivadas del Ombligo en Modelo de Isquemia Periférica de Miembro Trasero Murino Materiales y Métodos

Cultivo y aislamiento de Células Umbilicales. Las células derivadas del ombligo (UDC) se prepararon como se describe en las Publicaciones de Patente U.S. 2005/0058631 ó 2005/0054098. Las células se cultivaron hasta el pase 10 ó 11 (aproximadamente 20 a 25 duplicaciones de población) y luego se conservaron criogénicamente.

Grupos de Tratamiento del Modelo de Isquemia:

Grupo

- 1 PBS, control negativo
- 2 Plásmido de expresión para factor de crecimiento del endotelio vascular (pVEGF), control positivo
- 3 células de la línea celular N° 1, 5×10^5 células en total
- 4 células de la línea celular N° 1, células 1×10^6 en total
- 5 células de la línea celular N° 2, células 1×10^6 en total
- 6 células de la línea celular N° 1, cultivadas, 1×10^6 células en total

línea celular 1: U120304 p10,
línea celular 2: U072804A p11

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

Cirugía. El día 0, se indujo quirúrgicamente isquemia aguda de las patas traseras en ratones atímicos, desnudos mediante ligadura unilateral y escisión de la arteria iliofemoral izquierda. Los ratones se dividieron en 6 grupos de por lo menos $n = 8$ para el tratamiento con UDCs o controles. Los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento para los grupos 1 a 5. Como el grupo 6 se añadió tarde en el estudio, no tuvo lugar aleatorización. Adicionalmente, los conflictos de programación imposibilitaron la realización de microCT/PET concurrentemente con el estudio original. Este análisis se realizó en un grupo de 8 animales adicionales (4 de control y 4 de células cultivada 1) incluidos después de la finalización del estudio de 21 días.

Inyecciones de células. Un día después de la cirugía, los ratones se anestesiaron para el análisis por formación de imágenes con láser Doppler de la región plantar. Mientras los ratones todavía estaban bajo anestesia, las células se inyectaron en 5 sitios en el miembro izquierdo (isquémico): (1) 20 µl en la tibilias anterior; (2) 2 x 20 µl en el gastrocnemio; y (3) 2x 20 µl en el recto femoral del paquete del cuádriceps.

Análisis. Se realizó formación de imágenes por láser Doppler los días 1, 4, 8, 14 y 21. A los 21 días, se sacrificaron los ratones y se extirparon los músculos de tibilias anterior (TA), gastrocnemio y cuádriceps y se criofijaron para corte fino y tinción inmunohistoquímica con anticuerpo CD31. El análisis de MicroCT/PET usando gas fluorometano para determinar el estado de perfusión de los músculos se realizó a los 8 días. Estos ratones se sacrificaron inmediatamente después y los músculos de los miembros traseros se procesaron para inmunohistoquímica con CD31 en secciones finas criofijadas.

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

Resultados

El objetivo de estos experimentos era determinar si las UDCs protegen a los tejidos de lesión en un modelo de isquemia de las patas traseras de roedores. Este modelo se realizó creando una lesión en el flujo sanguíneo femoral e inyectando células en el área aproximadamente 24 horas después de la lesión. Los resultados se evaluaron estimando la perfusión de los miembros de estos animales y comparándola con el miembro contralateral que no estaba lesionado. También se recogieron los tejidos de estos animales al final del estudio para evaluar la vasculatura y la lesión en los animales. Este estudio también se realizó con células humanas en ratones desnudos para evitar el rechazo xenogénico de las células implantadas.

Los resultados presentados en la Figura 1 muestran que las UDCs confirieron un beneficio a los ratones, ya que había una perfusión mejorada en los animales tratados con las células cultivadas en el Día 4 y 8, mientras que el flujo sanguíneo también se mejoró en los animales tratados con las células 120304 descongeladas inmediatamente antes de la inyección en el Día 8. Las células 072804A no mostraron un beneficio en ningún punto temporal, sugiriendo una diferencia entre estos dos lotes de células. En general, los animales mostraron una mejora a lo largo del tiempo, lo que indica que esta raza de animales tiene cierto grado de capacidad de reparación nativa. Estos animales también eran relativamente jóvenes lo que puede ser un factor en sus capacidades regenerativas innatas.

Los músculos TA se recogieron al final del estudio, y las secciones se sondearon con un anticuerpo anti CD31 para detectar células endoteliales vasculares. Los resultados representativos se muestran en la Figura 2. Los resultados muestran que los animales de control de PBS presentaron necrosis grave y vasculatura limitada en el miembro isquémico (por ejemplo, ratones N° 26 y N° 43) mientras que los miembros tratados con UDC mostraron niveles relativos mayores de tinción de CD31 y niveles reducidos de necrosis. Los resultados también sugieren que

los animales tratados con UDCs cultivadas mostraron una vasculatura mejorada en comparación con los controles - (control de PBS y en algunos casos, el miembro normal (no lesionado)). Se observó una mayor tinción de CD31 en el miembro isquémico pero tratado en comparación con el miembro normal. Los animales tratados con plásmido VEGF y Umb072804A mostraron resultados similares al control de PBS.

5

Resumen

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

10

15

20

Referencias

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

25

Ejemplo 2

Ensayo de Formación de Red Endotelial

La angiogénesis, o la formación de nueva vasculatura, es necesaria para el crecimiento de tejido nuevo. La inducción de la angiogénesis es un objetivo terapéutico importante en muchas condiciones patológicas. Para identificar el potencial de la actividad angiogénica de las células derivadas de tejido del cordón umbilical en ensayos in vitro, se siguió un método bien establecido de siembra de células endoteliales sobre una placa de cultivo recubierta con un sustrato de cultivo celular biológico bajo el nombre comercial MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA), un extracto de membrana basal (Nicosia and Ottinetti (1990) In Vitro Cell Dev. Biol. 26(2): 119-28). Tratar las células endoteliales sobre MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) con factores angiogénicos estimulará las células para formar una red similar a los capilares. Este es un ensayo in vitro común para probar estimuladores e inhibidores de la formación de vasos sanguíneos (Ito et al. (1996) Int. J. Cancer 67(1):148-52). Los experimentos hicieron uso de un sistema de co-cultivo con células derivadas de tejido del cordón umbilical sembradas en insertos de pocillos de cultivo. Estos insertos permeables permiten el intercambio pasivo de componentes de los medios entre los medios de cultivo celular derivados del tejido del cordón umbilical y endotelial.

30

35

40

Métodos y materiales

Cultivo celular

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

50

55

Las células que crecían activamente se tripsinizaron, se contaron y se sembraron en insertos de cultivo de tejido de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante de 48 a 72 horas en medio de crecimiento a 37° C bajo condiciones de crecimiento estándar.

60

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

65

Las MSCs que crecían activamente se tripsinizaron y se contaron y se sembraron en insertos de cultivo de tejido de 6,5 milímetros de diámetro COSTAR TRANSWELL (Corning, Corning, NY) a 15.000 células por inserto. Las células se cultivaron en los insertos durante 48-72 horas en medio de crecimiento bajo condiciones de crecimiento

estándar.

Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Se obtuvieron HUVEC de Cambrex (Walkersville, MD). Las células se cultivaron en cultivos separados en medios de células endoteliales o EBM o EGM (Cambrex). Las células se cultivaron en plástico cultivado de tejido estándar en condiciones de crecimiento estándar. Las células usadas para experimentos estaban entre los pases 4 y 10.

Células endoteliales de la arteria coronaria humana (HCAEC). Se adquirieron HCAEC de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD). Estas células también se mantuvieron en cultivos separados en cualquiera de las formulaciones de medios EBM o EGM. Las células se cultivaron en plástico cultivado de tejido estándar bajo condiciones de crecimiento estándar. Las células usadas para los experimentos estaban entre los pases 4 y 8.

Ensayos de formación de red endotelial (MATRIGEL). Las placas de cultivo se recubrieron con MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente, el MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, MA) se descongeló a 4 ° C y se alicuotaron aproximadamente 250 microlitros y se distribuyeron uniformemente en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos enfriada (Corning). La placa se incubó luego a 37° C durante 30 minutos para permitir que se solidificara el material. Los cultivos de células endoteliales que crecían activamente se tripsinizaron y contaron. Las células se lavaron dos veces en medio de crecimiento con 2% de FBS por centrifugación, resuspensión y aspiración del sobrenadante. Las células se sembraron en los pocillos recubiertos a 20.000 células por pocillo en aproximadamente 0,5 mililitros de medio de crecimiento con 2% (v/v) de FBS. Las células se incubaron luego durante aproximadamente 30 minutos para permitir que las células sedimentaran.

Los cultivos de células endoteliales se trataron entonces con bFGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o VEGF humano 10 nanomolar (Peprotech, Rocky Hill, NJ) para servir como un control positivo para la respuesta de células endoteliales. Se añadieron insertos Transwell sembrados con células derivadas de tejido del cordón umbilical a pocillos apropiados con medio de crecimiento con 2% de FBS en la cámara del inserto. Los cultivos se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ durante aproximadamente 24 horas. Se retiró de la incubadora la placa de pocillos, y las imágenes de los cultivos de células endoteliales se recolectaron con un microscopio invertido Olympus (Olympus, Melville, NY).

Resultados

En un sistema de co-cultivo con células derivadas de placenta o con células derivadas de cordón umbilical, la HUVEC forma redes celulares (datos no mostrados). Las células HUVEC forman redes celulares limitadas en experimentos de co-cultivo con hMSCs y con bFGF 10 nanomolar (no mostrado). Las células HUVEC sin ningún tratamiento mostraron muy poca o ninguna formación de red (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las células derivadas de tejido del cordón umbilical liberan factores angiogénicos que estimulan la HUVEC.

En un sistema de co-cultivo con células derivadas de placenta o con células derivadas de cordón umbilical, las CAECs forman redes celulares (datos no mostrados).

La tabla 2-1 muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células derivadas de la placenta y el tejido del cordón umbilical en medio de crecimiento. Las células derivadas de tejido de la placenta y del cordón umbilical se sembraron en insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron a 37°C en oxígeno atmosférico durante 48 horas en los insertos y luego se cambiaron a un medio de 2% de FBS y se devolvieron a 37°C durante 24 horas. Se retiró el medio, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80° C, y se analizó mediante el ensayo ELISA múltiple SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son las medias de mediciones duplicadas. Los resultados muestran que las células derivadas del cordón umbilical y la placenta no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivado de plaquetas bb (PDGF-bb) o factor de crecimiento epidérmico de enlace a heparina (HBEGF). Las células liberan cantidades medibles de inhibidor de tejido de metalinoproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Tabla 2-1. Factores angiogénicos potenciales liberados de células derivadas del cordón umbilical y la placenta.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGFBB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	91655.3	175.5	<2.0	275.5	3.0	58.3	7.5	644.6	<1.2
Plac (P11)	1592832.4	28.1	<2.0	1273.1	193.3	5960.3	34.8	12361.1	1.7
Cord Umb (P4)	81831.7	<9.8	<2.0	365.9	14.1	200.2	5.8	<4.0	<1.2
Solo Medio	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

Las células derivadas del cordón umbilical y la placenta se cultivaron en 24 horas en medios con 2% de FBS en oxígeno atmosférico. Se eliminó el medio y se analizó mediante el ensayo ELISA múltiple SearchLight (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis duplicado. Los valores son concentraciones en los medios informadas en picogramos por mililitro de medios de cultivo. Plac: células derivadas de placenta; Cord Umb: células derivadas del cordón umbilical.

La Tabla 2-2 muestra los niveles de factores angiogénicos conocidos liberados por las células derivadas del cordón umbilical y la placenta. Las células derivadas del cordón umbilical y la placenta se sembraron en insertos como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en medio de crecimiento con 5% de oxígeno durante 48 horas en los insertos y luego se cambiaron a un medio de 2% de FBS 2% y se devolvieron al 5% de O₂ de incubación durante 24 horas. Se retiró el medio, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C ° C, y se analizó por el ensayo ELISA múltiple SearchLight (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Los resultados mostrados son las medias de las mediciones duplicadas. Los resultados muestran que las células derivadas del cordón umbilical y la placenta no liberan niveles detectables de factor de crecimiento derivados de plaquetas bb (PDGF-BB) o factor de crecimiento epidérmico de enlace a heparina (HBEGF). Las células liberan cantidades medibles de inhibidor de tejido de metalinoproteasa-1 (TIMP-1), angiopoyetina 2 (ANG2), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Tabla 2-2. Factores angiogénicos potenciales liberados de células derivadas del cordón umbilical y la placenta.

	TIMP1 (pg/ml)	ANG2 (pg/ml)	PDGF- BB (pg/ml)	TPO (pg/ml)	KGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HBEGF (pg/ml)
Plac (P4)	72972.5	253.6	<2.0	743.1	2.5	30.2	15.1	1495.1	<1.2
Plac (P11)	458023.1	55.1	<2.0	2562.2	114.2	2138.0	295.1	7521.3	1.8
Cord Umb (P4)	50244.7	<9.8	<2.0	403.3	10.7	156.8	5.7	<4.0	<1.2
Solo Medio	<9.8	25.1	<2.0	<6.4	<2.0	<3.2	<5.4	<4.0	<1.2

Las células derivadas del cordón umbilical y la placenta se cultivaron en 24 horas en medio con 2% de FBS en 5% de oxígeno. Se eliminó el medio y se ensayo mediante el ensayo ELISA múltiple SearchLight (Pierce). Los resultados son las medias de un análisis duplicado. Los valores son concentraciones en los medios informados en picogramos por mililitro de medio de cultivo. Plac: células derivadas de placenta; Cord Umb: células derivadas del cordón umbilical.

Resumen.

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

Ejemplo 3

Efecto si hUTCs en la proliferación in vitro y la migración de células endoteliales

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

Materiales y métodos

Cultivo de células

Se descongelaron células derivadas de tejido umbilical humano criopreservadas (hUTCs) lote N° 120304 en el pase 8-9 y se sembraron en matraces recubiertos con gelatina y se cultivaron en medio de cultivo Hayflick (DMEM - glucosa baja (Gibco, número de catálogo 11885-084) , 15% v/v de suero fetal bovino (FBS, Hyclone, número de catálogo SH30070.03), 0,001% v/v de beta-mercaptoetanol (Sigma, número de catálogo M7154) y 50 U/ml de penicilina y 50 microgramos/ml de estreptomina (Gibco, número de catálogo 3810-74-0)). Para los estudios detallados aquí, las células usadas estaban en el pase 10 ó 11. Se obtuvieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs, número de catálogo C2517A), células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAECs, número de catálogo CC2585) y células endoteliales de la arteria ilíaca humana (HIAECs, número de catálogo CC2545) de Cambrex y se cultivaron en medio de crecimiento endotelial (EGM-2MV, número de catálogo 3202) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células madre mesenquimales humanas (MSCs, número de catálogo PT-2501) también se adquirieron de Cambrex y se mantuvieron en medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM, número de catálogo PT-3001) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se contaron usando un instrumento Guava® (Guava Technologies, Hayward, CA) y se sembraron a una densidad de 5000 células/cm². Las células se pasaron rutinariamente cada 3-4 días.

Factores de crecimiento y anticuerpos

El factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (bFGF, número de catálogo 100-18B) y el factor de crecimiento de hepatocitos humano recombinante (HGF, número de catálogo 100-39) eran de Peprotech y el factor de crecimiento endotelial vascular humano recombinante (VEGF, número de catálogo 293- VE) era de R and D Systems. Los anticuerpos para bFGF (número de catálogo ab111937), HGF (número de catálogo ab10678) y VEGF (número de catálogo ab9570) se adquirieron de Abcam (Cambridge, MA).

Preparación del lisado celular

Se prepararon lisados celulares a partir de pellets de células hUTC congeladas lote N° 120304 de crecimiento previos. Brevemente, el lote de hUTC N° 120304 se cultivó durante 4 días, se recolectó por tripsinización y se peletizó mediante centrifugación. Luego se lavaron las células con PBS 3 veces y se resuspendieron en PBS a 1×10^7 células/ml. Se colocaron alícuotas de suspensiones de 1 ml en tubos de microcentrífuga siliconizados estériles de 1,5 ml y se centrifugaron a 300 rcf durante 5 minutos. El PBS se aspiró y los pellets celulares se almacenaron a -80 ° C hasta su uso.

Para preparar los lisados celulares, se sumergieron tubos que contenían pellets celulares en nitrógeno líquido (LN2) durante 60 segundos y luego se sumergieron inmediatamente en un baño de agua a 37° C durante 60 segundos o hasta que se descongelaron, pero no más de 3 minutos. Este paso se repitió 3 veces. Tras este paso, las muestras congeladas-descongeladas se centrifugaron a 13000 rcf a 4° C durante 10 minutos y luego se colocaron en hielo. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y se transfirió a un tubo de 1,5 ml siliconado estéril nuevo. El paso de centrifugación se repitió 3 veces y se agrupó el sobrenadante resultante. La concentración de proteínas se determinó usando el protocolo de microensayo del kit de ensayo de proteínas Quickstart Bradford (Bio-rad, número de catálogo 500-0201).

Medición de la Proliferación Celular

Las células se recolectaron y colocaron en placas directamente en la formulación de medios indicada a una

concentración de 5000 células/cm². Para experimentos de co-cultivo, se usaron transwell de 24 pocillos (Corning número de catálogo 3413) con células endoteliales colocadas en placas en el fondo del pocillo (10.000 células/pocillo) y hUTCs, MSCs o fibroblastos colocados en placas dentro de los insertos transwell (1650 células/insertos transwell). En los períodos de tiempo indicados, los insertos que contenían hUTCs, MSCs o fibroblastos se retiraron y descartaron. Las células endoteliales se recolectaron añadiendo 90 µl de tripsina a cada pocillo. Las células se liberaron pipeteando hacia arriba y hacia abajo y luego se transfirieron a una placa de 96 pocillos limpia. La tripsina se inhibió mediante la adición de 90 µl de medio. Las células se tiñeron mediante la adición de 20 µl de solución de tinción (18 µl de medio + 1 µl de reactivo Guava Viacount Flex + 1 µl de DMSO) y se cuantificaron usando un instrumento Guava® (Guava Technologies, Hayward, CA).

Para estudios en el efecto del lisado de células hUTC lote N° 120304 sobre la proliferación de HUVECs, se sembraron HUVECs en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo en medio EGM-2MV durante 8 horas. Luego las células se privaron de suero por incubación durante la noche en 0,5 ml de medio EGM-2MV que contenía 0,5% de FBSy sin factores de crecimiento. Posteriormente, se añadieron FBS, lisado de células hUTC lote N° 120304 recién preparado que contenía 62,5 µg o 125 µg de proteína, y anticuerpos neutralizantes para FGF (7 µg/ml) o HGF (1 µg/ml). Después de 4 días de cultivo, las células se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®.

Para estudios sobre los mecanismos potenciales del aumento mediado por hUTC en la proliferación de células endoteliales, se incluyeron anticuerpos neutralizantes para FGF (7 µg/ml), HGF (1 µg/ml) y VEGF (µg/ml) en co -cultivos de HUVECs y HCAECs con hUTCs. Los anticuerpos se añadieron al medio de cultivo celular cuando las células se colocaron en placas inicialmente. Después de 7 días de co-cultivo, las células se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®.

Evaluación de la migración celular

Para la medición de la migración celular, se usó una disposición de transwell de 6 pocillos (Corning número de catálogo 3428). Las células se sembraron directamente en la formulación de medio indicada a una densidad de 5000 células/cm². Las células endoteliales se sembraron dentro de los insertos transwell (23.000 células/inserto transwell) y las hUTC del lote 120304 o MSCs se colocaron en el fondo del pocillo (48.000 células/pocillo). La migración se evaluó después de 7 días de co-cultivo contando el número de células en la parte inferior del transwell. Brevemente, los transwells se transfirieron a un pocillo limpio y se lavaron una vez con PBS. Las células de la parte inferior del pocillo se recolectaron añadiendo tripsina al fondo del pocillo. La tripsina se inhibió mediante la adición de medio de crecimiento completo y las células se recolectaron por centrifugación. Después las células se resuspendieron en 25 µl de medio y 20 µl de este se usó para obtener recuentos celulares usando un instrumento Guava®.

Para estudios sobre los mecanismos potenciales del aumento mediado por hUTC en la migración de células endoteliales, se incluyeron anticuerpos neutralizantes para FGF (7 µg/ml) y HGF (1 µg/ml) en co-cultivos de HUVECs y HCAECs con hUTC lote N° 120304. Los anticuerpos se añadieron al medio de cultivo celular cuando las células se colocaron inicialmente en placas. Después de 7 días de co-cultivo, las células que se encontraban en la parte inferior del inserto Transwell se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®.

Resultados

Efecto de las hUTCs en la proliferación de células endoteliales

Se utilizó un sistema de co-cultivo para estudiar los efectos de las hUTCs en la proliferación de células endoteliales. Este se realizó usando un dispositivo transwell con células endoteliales colocadas en placas en el fondo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos y hUTCs colocadas en placas dentro de los insertos transwell. En estos experimentos, se usaron dos formulaciones de medio diferentes (composición del medio detallada en Materiales y Métodos): (1) Hayflick 80% + EGM-2MV 20% (H80) o (2) Hayflick 50% + EGM-2MV 50% (H50). Después de 6 o 7 días de co-cultivo, se retiraron los insertos transwell, se recolectaron las células endoteliales por tripsinización, y se contaron usando el instrumento Guava®.

El efecto de las hUTC lote N° 120304 sobre la proliferación de células endoteliales cultivadas en H80 en comparación con H50 se muestra en la Figura 1. La proliferación de HUVECs mantenidas en H50 fue mayor que las mantenidas en H80 (Figura 1A), mientras que las HCAECs y HIAECs mostraron un crecimiento similar en estas formulaciones de medio de co-cultivo (Figura 1B y Figura 1C). En ambas formulaciones de medio, el co-cultivo de células endoteliales con las hUTC del lote N° 120304 dio como resultado aumentos significativos en el número de células después de 7 días. Todos los estudios posteriores de co-cultivo de hUTCs y células endoteliales se realizaron en la formulación de medio Hayflick 50% + EGM-2MV 50% (H50).

También se probaron MSCs y fibroblastos en co-cultivos con células endoteliales para determinar si otros tipos de células tienen la capacidad de influir en la proliferación de células endoteliales. Como se muestra en la

Figura 1A, no hubo diferencia en la proliferación de HUVECs en medios de co-cultivo (H50 o H80) y en aquellos que se co-cultivaron con MSCs o con fibroblastos. Lo mismo ocurrió con HCAECs (Figura 1B) y HIAECs (Figura 1C) donde el co-cultivo con las hUTC lote N° 120304 dio como resultado un aumento en la proliferación celular mientras que no se observaron diferencias entre células en medios de co-cultivo (H50 o H80) y aquellas que fueron co-cultivadas con MSCs.

Para investigar los mecanismos potenciales del aumento de la proliferación de células endoteliales mediado por hUTC, se incluyeron anticuerpos neutralizantes para FGF (7 µg/ml), HGF (1 µg/ml) y VEGF (µg/ml) en co-cultivos de HUVECs y HCAECs con hUTCs. Los resultados en las Figuras 2A a 2D muestran que tanto en HUVECs como en HCAECs, la adición de anticuerpos neutralizantes para FGF y HGF redujo el aumento en el número de células inducido por las hUTC lote N° 120304. A las concentraciones que se usaron para estos estudios, estos anticuerpos neutralizantes bloquearon la proliferación de HUVECs inducida por los factores de crecimiento (Figuras 2A y 2B). Es interesante observar que un anticuerpo neutralizante para VEGF no tuvo un efecto significativo en la proliferación celular inducida por co-cultivo de tanto HUVECs (Figuras 2A y 2B) como HCAECs (Figuras 2C y 2D) con las hUTC lote N° 120304. En estudios separados, la proliferación de hUTC lote N° 120304 no se vio afectada por la adición de anticuerpos neutralizantes para FGF y VEGF al medio de cultivo (datos no mostrados).

Efecto del lisado de células hUTC lote N° 120304 sobre la proliferación de HUVECs

También se realizaron estudios para determinar el efecto del lisado celular sobre la proliferación de HUVECs. Las HUVECs se sembraron en placas de 24 pocillos en medio EGM-2MV durante 8 horas a una densidad de 5000 células/cm². A continuación, las células se privaron de suero mediante una incubación durante la noche en 0,5 ml de medio EGM-2MV que contenía un 0,5% de suero bovino fetal (FBS) y sin factores de crecimiento. Tras la incubación, se añadieron concentraciones variables de lisado de células hUTC lote N° 120304 recién preparado. En algunas situaciones, también se incluyeron FGF, HGF y anticuerpos neutralizantes. Después de 4 días de cultivo, las HUVEC se recolectaron y se contaron usando un instrumento Guava®.

La Figura 3 muestra que la adición de lisados celulares llevó a un aumento en el número de células HUVECs en comparación con células mantenidas en suero bajo (0,5% de FBS) y el aumento en el número de células era proporcional a la cantidad de lisado celular añadido. La menor concentración de lisado celular usada (62,5 µg / ml) dio como resultado un número de células comparable al de las células incubadas en condiciones de medio óptimas (10% de FBS). Además, la adición de un anticuerpo neutralizante para FGF o HGF moderó el aumento en el número de células inducido por las 2 concentraciones diferentes de lisado celular. Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos en co-cultivos de HUVECs con hUTC lote N° 120304.

Efecto de hUTCs sobre la migración de células endoteliales

La migración de células endoteliales se evaluó determinando el número de células que se habían movido a través de una membrana transwell (tamaño de poro = 8 micras). Las células respondedoras, células endoteliales, se sembraron en insertos transwell de 6 pocillos y las hUTCs se colocaron en placas en el fondo del pocillo. Después de un período de co-cultivo, las células que estaban en la parte inferior del transwell se recolectaron y contaron. La Figura 4A muestra la migración de HUVECs que se habían co-cultivado con hUTCs y MSCs. Las hUTC lote N° 120304 indujeron el movimiento de HUVECs a la parte inferior del transwell mientras que las MSCs no lo hicieron (Figura 4A). El mismo resultado se observó con HCAECs donde el co-cultivo con las hUTC lote N° 120304 dio como resultado más células que migraban a través del transwell con relación al medio de control (Figura 4B).

El efecto de las hUTC lote N° 120304 sobre el comportamiento migratorio de HUVECs y HCAECs se probó adicionalmente con el uso de anticuerpos neutralizantes para FGF y HGF. Como se muestra en la Figura 5A, estos anticuerpos redujeron la migración de HUVECs inducidas por hUTC lote N° 120304. En co-cultivos de HCAECs con hUTC lote N° 120304, un anticuerpo neutralizante para HGF bloqueó el aumento mediado por hUTC lote N° 120304 en la migración celular mientras que un anticuerpo neutralizante para FGF no lo hizo (Figura 5B).

Resumen

Los resultados resumidos aquí describen los efectos de las hUTCs en el comportamiento proliferativo y migratorio de células endoteliales in vitro. Los estudios se realizaron usando co-cultivos de hUTC lote N° 120304 y células endoteliales o incubación directa de células endoteliales con lisado celular preparado a partir de hUTC lote N° 120304.

Para los estudios de proliferación, se probaron los efectos de hUTC lote N° 120304 y se usaron tres tipos de células endoteliales de diferentes lechos vasculares como células respondedoras. El co-cultivo con hUTCs dio como resultado una proliferación aumentada de células endoteliales. El co-cultivo con MSCs o fibroblastos dio como resultado números de células comparables a los medios de controles. La respuesta proliferativa de HUVECs a hUTC lote N° 120304 se moderó mediante la adición de anticuerpos neutralizantes para FGF y HGF, pero no neutralizando el anticuerpo para VEGF. Esto implica que la inducción de la proliferación por hUTC lote N° 120304 está mediada

por FGF y HGF. Vale la pena señalar que la incubación de HUVECs con lisado de hUTC lote N° 120304 reflejó el efecto observado con co-cultivos.

La migración se cuantificó contando el número de células que estaban en la parte inferior de un transwell y se usaron tanto HUVECs como HCAECs como células respondedoras. A diferencia de los estudios con proliferación, las respuestas migratorias de estas células son ligeramente diferentes. Las hUTC lote N° 120304 indujeron la migración de HUVECs y HCAECs. Las MSCs no indujeron la migración de HUVECs sugiriendo especificidad de esta respuesta a hUTCs. Los anticuerpos para FGF y HGF negaron el efecto de hUTC lote N° 120304 sobre la migración de HUVECs mientras que solo el anticuerpo para HGF afectó a la migración de HCAECs sugiriendo diferencias entre los dos tipos de células endoteliales.

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

EJEMPLO 4

Expresión de Telomerasa en células derivadas del cordón umbilical

La telomerasa sirve para sintetizar repeticiones teloméricas que sirven para proteger la integridad de los cromosomas y para prolongar la vida útil de la replicación de las células (Liu, K, et al., PNAS, 1999; 96:5147-5152). La telomerasa consiste de dos componentes, la plantilla de ARN de telomerasa (hTER) y la transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT). La regulación de la telomerasa se determina mediante la transcripción de hTERT pero no de hTER. La reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR) para el ARNm de hTERT es, por tanto, un método aceptado para determinar la actividad de la telomerasa de las células.

Aislamiento celular. Se realizaron experimentos de PCR en tiempo real para determinar la producción de telomerasa de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano se prepararon de acuerdo con los ejemplos expuestos anteriormente. En general, se lavaron cordones umbilicales obtenidos del National Disease Research Interchange (Philadelphia, Pa.) después de una administración normal para eliminar la sangre y los desechos y se disociaron mecánicamente. El tejido se incubó luego con enzimas de digestión que incluían colagenasa, dispasa y hialuronidasa en medio de cultivo a 37° C. Se cultivaron células derivadas de tejido del cordón umbilical humano de acuerdo con los métodos expuestos en los ejemplos anteriores. Se obtuvieron células madre mesenquimales y fibroblastos dérmicos normales de la piel (cc-2509 lote N° 9F0844) de Cambrex, Walkersville, Md. Se adquirieron células nTera-2 de la línea celular de carcinoma (teratoma) embrionario testicular humano pluripotentes (NTERA-2 cl.DI), (ver, Plaia et al., Stem Cells, 2006; 24(3):531-546) de ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron de acuerdo con los métodos expuestos anteriormente.

Aislamiento de ARN total. Se extrajo ARN de células usando el kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, CA). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C. El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25° C durante 10 minutos, 37° C durante 60 minutos y 95° C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 ° C.

PCR en tiempo real. El PCR se realizó en muestras de ADNc usando Applied Biosystems Assays-On-Demand™ (también conocido como Ensayos de Expresión Génica TaqMan®) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems). Este kit comercial se utiliza ampliamente para analizar la telomerasa en células humanas. Brevemente, se mezclaron hTert (gen de telomerasa humana) (Hs00162669) y GAPDH humano (un control interno) con ADNc y mezcla maestra TaqMan® Universal PCR usando un sistema de detección de secuencias 7000 con software ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente de 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 de PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Se analizaron células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (N° de entrada ATCC PTA-6067), fibroblastos y células madre mesenquimales para hTert y ARN 18S. Como se muestra en la Tabla 4-1, la hTert, y por lo tanto la telomerasa, no se detectó en células derivadas de tejido del cordón umbilical humano.

Tabla 4-1		
	hTert	ARN 18S
Células Umbilicales (022803)	ND	+
Fibroblastos	ND	+
ND- no detectado; + señal detectada		

Se analizaron células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (aislado 022803, N° de entrada ATCC PTA-6067) y células nTera-2 y los resultados no mostraron expresión de telomerasa en dos lotes de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano mientras que la línea celular de teratoma reveló un alto nivel de expresión (tabla 4-2).

Tabla 4-2					
Tipo de Célula	hTert		GAPDH		hTert norm
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	
nTera2	25.85	27.31	16.41	16.31	0.61
022803	-	-	22.97	22.79	-

Por lo tanto, puede concluirse que las células derivadas de tejido umbilical humano de la presente invención no expresan telomerasa.

Ejemplo 5

Eficacia de Trasplante de hUTC en un Modelo Murino de Isquemia de los Miembros Traseros

Los datos anteriores demostraron que la administración sistémica de hUTC mejoró significativamente el flujo sanguíneo a los 5 y 10 días después del tratamiento en ratones con isquemia unilateral de los miembros traseros. Adicionalmente, un estudio comparativo lado a lado demostró que la inyección sistémica (intravenosa) de hUTC dio como resultado una restauración más significativa del flujo sanguíneo en comparación con la inyección local (intramuscular).

Este ejemplo evalúa la eficacia de la inyección intramuscular de hUTC y hUTC en pegamento de fibrina en un modelo de ratón de isquemia de miembros traseros periférica (modelo de isquemia de miembro trasero unilateral). Se usaron razas de ratones desnudos inmunocomprometidos y NOD/scidIL2ry^{-/-} (NSG).

Modelo y descripción animal

Para los estudios en este ejemplo, se hicieron comparaciones entre ratones desnudos y ratones NSG.

La raza de ratón NSG ha generado interés para estudios de xenotrasplantes debido a sus múltiples defectos inmunológicos incluida la ausencia de linfocitos maduros, células T, células B y células NK. Estos animales sobreviven más de 6 meses y no desarrollan linfomas de timo incluso después de irradiación subletal (Ito M. et al. (2002) Blood. 100: 3175-82).

Se creó isquemia unilateral de los miembros traseros en estos ratones. Brevemente, los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano. Se hizo una incisión en la línea media del miembro trasero izquierdo. Se ligaron la arteria femoral y sus ramificaciones, comenzando desde el ligamento inguinal hasta la bifurcación de las arterias safena y poplítea. Se extirparon las regiones entre las ligaduras y se cerraron las incisiones con suturas Vicryl de seda 5-0 (Ethicon).

Células y pegamento de fibrina

Se proporcionaron suspensiones de células congeladas por envío en un embalaje isotérmico seco. Una vez recibidas, las células se transfirieron a nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo. Las células se descongelaron inmediatamente antes de la inyección. Se contaron las células y se determinó la viabilidad con tinción con azul de tripano y contando con un hemocitómetro. La dosis completa se resuspendió en PBS y se cargó en una jeringuilla de tuberculina de 0,3 ml con una aguja para inyección de calibre 28.

5 Para estos estudios se usó pegamento de fibrina (sellador de Fibrina EVICEL® (Humano), Omrix Pharmaceuticals). Los componentes se descongelaron antes del uso y se diluyeron a una concentración final de 16 - 24 UI/ml de trombina y 39,3 - 60,7 mg/ml para BAC2 (fibrinógeno). Las soluciones madre de trombina (concentración madre de aproximadamente 800-1200 UI/ml) y BAC2 (fibrinógeno) (concentración madre de aproximadamente 55 a 85 mg/ml) se diluyeron 1:50 para trombina y 1:1,4 para BAC2, respectivamente.

Diseño del estudio

10 Se aleatorizaron un total de cuarenta y ocho (48) ratones desnudos (6 a 8 semanas de edad) y cuarenta y ocho (48) ratones NOG/SCID (NSG) (6 a 11 semanas de edad), emparejados por fecha de nacimiento, en los grupos como se detalla en la Tabla 5-1 siguiente.

15

20

25

30

35

40

Grp N°	Animal de Prueba	N° de Animales	Material de Prueba	Dosis de Células	Prueba de Punto Final (Días tras la Lesión)		
					Necrosis	Flujo Sanguíneo por LDI	Densidad Capilar
1	Desnudo	12	hUTC en vehículo	N/A	1-7	1, 7, 14, 21, y 28	7 y 28
2	Desnudo	12	hUTC	1 x 10 ⁶	1-7	1, 7, 14, 21, y 28	7 y 28
3	Desnudo	12	Solución Salina + Fibrina	N/A	1-7	1, 7, 14, 21, y 28	7 y 28
4	Desnudo	12	Solución Salina + Fibrina + hUTC	1 x 10 ⁶	1-7	1, 7, 14, 21, y 28	7 y 28
5	NSG	12	hUTC en Vehículo	N/A	1-7	1, 7, 14, 21, y 28	7 y 28
6	NSG	12	hUTC	1 x 10 ⁶	1-7	1, 7, 14, 21, y 28	7 y 28
7	NSG	12	Solución Salina + Fibrina	N/A	1-7	1, 7, 14, 21, y 28	7 y 28
8	NSG	12	Solución Salina + Fibrina + hUTC	1 x 10 ⁶	1-7	1, 7, 14, 21, y 28	7 y 28

45 La Prueba de Punto Final se realizó midiendo los siguientes parámetros: Evaluación del flujo sanguíneo mediante láser Doppler en los días 1, 7, 14, 21 y 28; evaluación de la densidad capilar mediante tinción con CD31 en el día 7 (3 animales de cada grupo) y en el día 28.

Método

50 Un día después de la creación de la isquemia unilateral del miembro trasero, se inyectaron en el músculo isquémico del miembro trasero vehículo, hUTC en vehículo, pegamento de fibrina o hUTC en pegamento de fibrina.

55 Para las inyecciones de hUTC, se inyectó el número especificado de hUTC en vehículo o hUTC en pegamento de fibrina en el músculo isquémico del miembro trasero. Hubo tres inyecciones (3 x 20 µl) en los miembros superiores y dos (2 x 20 µl) en los miembros inferiores para una dosis total de 100 µl. Los animales de control recibieron el vehículo de la misma manera que las células.

60 Para cada inyección de hUTC en pegamento de fibrina, las células se resuspendieron en trombina (concentración final de 16 a 24 UI/ml). Se alicuotó BAC2 (fibrinógeno, concentración final de 39,3 a 60,7 mg/ml) en un tubo eppendorf separado.

65 Inmediatamente antes de la inyección, se transfirieron hUTC en trombina al tubo que contenía BAC2, se mezclaron y se extrajeron en una jeringuilla de tuberculina de 0,3 ml (con aguja de calibre 28) y se inyectaron en el miembro trasero del ratón. Los 100 µl se administraron en cinco inyecciones intramusculares (IM) de 20 µl - 3 inyecciones en el miembro trasero superior y 2 en el miembro trasero inferior. Los animales de control recibieron

pegamento de fibrina administrado de la misma manera que las células.

Análisis estadístico

5 Los datos se expresan como media ± error estándar de la media. Las comparaciones entre grupos se realizaron con una prueba t de Student de dos colas.

Evaluación del flujo sanguíneo

10 Se evaluó la perfusión sanguínea en los miembros traseros de los ratones usando formación de imágenes por láser Doppler con un dispositivo Moor LDI. Los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano y se colocaron en un conjunto de almohadillas térmicas a 37° C. Para establecer la isquemia inicial, se recogieron datos de perfusión sanguínea en la región plantar de ambos miembros traseros a las 24 horas después de la creación de la lesión. La evaluación de perfusión en serie se realizó en los días 7, 14, 21 y 28. Los datos se presentan como una proporción de los valores de perfusión en los miembros izquierdo (isquémico) frente a derecho (no isquémico).

Resultados y análisis

Formación de Imágenes de Perfusión por Láser Doppler

20 Se muestran los datos de perfusión por láser Doppler (expresados como porcentaje de perfusión en el miembro izquierdo isquémico comparado con el miembro derecho de control no isquémico) para ratones NSG en la Figura 6 y la Tabla 5-2 (a continuación). El mayor efecto del tratamiento se observó con hUTC administradas en matriz de fibrina; la perfusión relativa en estos ratones fue casi el doble que en el grupo control de fibrina al de 21 días (40,3 ± 2,43 frente a 22,6 ± 2,34). A los 21 y 28 días, este efecto era significativamente mayor que ambos grupos de control (P <0,001) así como el grupo que recibió hUTC administradas en vehículo solamente (P <0,05). El efecto de hUTC administradas en el vehículo en la perfusión relativa fue un 27% mayor que el control a los 28 días (P <0,05). En este punto temporal la perfusión relativa en el miembro isquémico de ratones NSG tratados con hUTC en vehículo solamente fue de 30,0 ± 2,3 comparado con 23,7 ± 1,6 para ratones tratados solo con vehículo.

35

40

45

Agente	Día				
	1	7	14	21	28
vehículo	16.5 ± 0.9	25.4 ± 1.7	27.5 ± 1.9	25.6 ± 1.8	23.7 ± 1.3
hUTC	15.7 ± 1.1	30.8 ± 3.3	30.6 ± 3.1	31.7 ± 3.1	30.0 ± 2.3
solución salina + fibrina	17.0 ± 1.1	26.5 ± 2.4	24.6 ± 2.3	22.6 ± 2.3	22.5 ± 2.0
Fibrina + hUTC	14.9 ± 1.2	29.9 ± 3.4	39.6 ± 7.5	40.3 ± 2.4	41.8 ± 4.3
Media ± sem					

50 Los datos de perfusión para ratones desnudos se muestran en la Figura 7 y la Tabla 5-3. El tratamiento con hUTC en fibrina aumentó significativamente (P <0,05) la perfusión en el miembro isquémico los días 14 (53,9 ± 4,7) y 21 (53,4 ± 3,2) en comparación con los controles tratados sólo con fibrina (39,2 ± 1,7 y 40,9 ± 3,7, respectivamente). El efecto de las células en la fibrina tuvo una tendencia más alta a los 28 días (52,0 ± 5,8) en comparación con el control (40,8 ± 4,3), pero no fue significativa debido a una desviación grande en las mediciones entre animales. La administración local de hUTC en vehículo solo tendió a perfusión mejorada a los 21 días (64,0 ± 6,3 frente a 43,7 ± 7,4 para el control) y mejoró significativamente (P <0,05) la perfusión a los 28 días (5,0 ± 3,5 frente a 40,8 ± 4,9). No hubo una diferencia significativa entre los efectos con hUTC administradas solo en fibrina o en vehículo.

55

60

65

Tabla 5-3. Medias \pm para valores de perfusión relativos en ratones desnudos.

Agente	Día				
	1	7	14	21	28
vehículo	13.9 \pm 1.1	32.0 \pm 5.1	40.6 \pm 1.7	43.7 \pm 7.4	47.1 \pm 4.9
hUTC	13.7 \pm 0.6	38.4 \pm 5.1	46.1 \pm 3.0	64.0 \pm 6.3	57.0 \pm 3.5
solución salina + fibrina	14.5 \pm 0.84	29.9 \pm 3.5	39.2 \pm 2.7	40.1 \pm 3.7	40.8 \pm 4.3
Fibrina + hUTC	13.4 \pm 0.69	33.0 \pm 3.7	54.9 \pm 4.7	53.4 \pm 3.2	52.0 \pm 5.8
Media \pm sem					

Estos datos indican que tanto en las razas de ratón NSG como desnudas, las hUTC administradas localmente por inyección IM tuvieron efectos tempranos cuando se mezclaron en un portador de fibrina. En ratones NSG el efecto sostenido fue significativamente más pronunciado que el suministro de células en vehículo solamente.

Conclusión

La administración intramuscular directa de hUTC 1 día después de crear isquemia aumentó la reperfusión de los músculos isquémicos tanto en ratones NSG como en ratones desnudos. La administración de las células en una matriz de fibrina a ratones NSG pareció producir una respuesta que era superior a la administración de células en vehículo solamente. Los animales tratados con administración intramuscular directa de hUTC en un modelo de miembro trasero posterior murino de isquemia periférica mostraron una reperfusión mejorada de los miembros isquémicos tanto en ratones NSG como en ratones desnudos. Sin embargo, los animales que fueron tratados con hUTC en pegamento de fibrina mostraron una respuesta más significativa y sostenida en comparación con la administración de células en vehículo solamente en los ratones NSG.

Ejemplo 6

Eficacia de Trasplante de hUTC en el Modelo de Ratón NOD/scid IL2ry^{-/-} de Isquemia de Miembro Periférica: Estudios de Dosis y Vía de Administración

Este estudio evaluó la eficacia de hUTC en un modelo de ratón de isquemia de los miembros traseros periféricos (modelo de isquemia de miembros posteriores unilateral). Para este estudio, se usó la raza NOD/scid IL2ry^{-/-} (NSG) de ratones. El efecto en la restauración del flujo sanguíneo se evaluó cuando se administraron las hUTC (1) localmente (intramuscular) con vehículo, (2) localmente (intramuscular) con pegamento de fibrina, o (3) sistémicamente (intravenoso). El estudio también evaluó el efecto de hUTC administradas por vía intramuscular a diferentes dosis con o sin pegamento de fibrina, en la restauración del flujo sanguíneo.

Materiales y métodos

Modelo Animal y Descripción

Se usaron ratones NSG. La raza de ratón NSG ha generado interés para los estudios de xenotrasplantes debido a sus múltiples defectos inmunológicos, incluida la ausencia de linfocitos maduros, células T, células B y células NK. Estos animales sobreviven más de 6 meses y no desarrollan linfomas de timo incluso después de irradiación subletal (Ito M. et al. (2002) Blood. 100: 3175-82)..

Se creó isquemia unilateral de los miembros traseros en estos ratones. Brevemente, los animales fueron anestesiados por inhalación de isoflurano. Se hizo una incisión en la línea media del miembro posterior izquierdo. Se ligaron la arteria femoral y sus ramificaciones, comenzando desde el ligamento inguinal hasta la bifurcación de las arterias safena y poplítea. Se extirpó la región entre las ligaduras y la incisión se cerró con suturas Vicryl de seda 5-0.

Células y pegamento de fibrina

Se descongelaron HUTC criopreservadas inmediatamente antes de la inyección. Se contaron las células y se determinó la viabilidad mediante tinción con azul de tripano y contando con un hemocitómetro. La dosis completa se resuspendió en o un vehículo o pegamento de fibrina y se cargó en una jeringuilla de tuberculina de 0,3 ml con una aguja de calibre 28 para la inyección .

Se usó pegamento de fibrina (sellador de fibrina EVICEL® [humano], Omrix Pharmaceuticals). Los

componentes se descongelaron antes del uso y se diluyeron a una concentración final de 16 a 24 UI/ml de trombina y de 39,3 a 60,7 mg/ml para BAC2. Se proporcionaron soluciones madre de trombina (concentración madre de aproximadamente 800-1200 UI/ml) y BAC2 (fibrinógeno) (concentración madre de aproximadamente 55 a 85 mg/ml) y se diluyeron a 1:50 para trombina y 1:1,4 para BAC2, respectivamente.

5

Diseño del estudio

Se aleatorizaron ratones NSG (6 a 11 semanas de edad), emparejados por fecha de nacimiento, en los grupos como se detalla en la Tabla 6-1 siguiente:

10

Grupo	Nº/Grupo	Material de Prueba	Células Totales Administradas	ROA	Flujo Sanguíneo porLDI
1	12	Vehículo	N/A	IM	1, 7, 14, 21, y 28
2	12	hUTC	1 x 10 ⁶	IM	1, 7, 14, 21, y 28
3	12	hUTC	0.5 x 10 ⁶	IM	1, 7, 14, 21, y 28
4	12	Vehículo + Fibrina	N/A	IM	1, 7, 14, 21, y 28
5	12	Vehículo + Fibrina + hUTC	1 x 10 ⁶	IM	1, 7, 14, 21, y 28
6	12	Vehículo + Fibrina + hUTC	0.5 x 10 ⁶	IM	1, 7, 14, 21, y 28
7	12	Vehículo + Fibrina + hUTC	0.25 x 10 ⁶	IM	1, 7, 14, 21, y 28
8	12	Vehículo + Fibrina + hUTC	0.125 x 10 ⁶	IM	1, 7, 14, 21, y 28
9	12	Vehículo	N/A	IV	1, 7, 14, 21, y 28
10	12	hUTC	1 x 10 ⁶	IV	1, 7, 14, 21, y 28

15

20

25

30

Un día después de la creación de la isquemia unilateral de los miembros traseros, se inyectaron hUTC sistémica o localmente. Para las inyecciones sistémicas, se administró el número especificado de hUTC en 100 µl de vehículo a través de la vena de la cola utilizando una jeringuilla de insulina de 0,3 cc y una aguja de calibre 28. Las inyecciones celulares se realizaron durante un período de aproximadamente 1 minuto. Los animales de control recibieron solamente vehículo.

35

Para las inyecciones locales, se inyectó el número especificado de hUTC en vehículo o hUTC en pegamento de fibrina en el músculo isquémico del miembro trasero. Las inyecciones se hicieron en 5 sitios; a cada uno se administraron 20 µl de inyecciones intramusculares (IM). Hubo tres inyecciones (3 x 20 µl) en los miembros superiores y dos (2 x 20 µl) en los miembros inferiores para una dosis total de 100 µl. Los animales de control recibieron el vehículo de la misma manera que las células.

40

Para cada inyección de hUTC en pegamento de fibrina, las células se resuspendieron en trombina (concentración final de 16 a 24 UI/ml). Se alicuotó BAC2 (fibrinógeno, concentración final de 39,3 a 60,7 mg/ml) en un tubo eppendorf separado. Inmediatamente antes de la inyección, se transfirieron las hUTC en trombina al tubo que contenía BAC2, se mezclaron y se extrajeron en una jeringuilla de tuberculina de 0,3 ml (con aguja de calibre 28) y se inyectaron en el miembro trasero del ratón. La dosis de 100 µl se administró en cinco inyecciones intramusculares (IM) de 20 µl - 3 inyecciones en el miembro trasero superior y 2 en el miembro trasero inferior. Los animales de control recibieron pegamento de fibrina administrado de la misma manera que las células.

45

50

Evaluación del flujo sanguíneo

La perfusión sanguínea en los miembros traseros de los ratones se evaluó usando formación de imágenes por láser Doppler con un dispositivo Moor LDI. Los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano y se colocaron en un conjunto de almohadillas térmicas a 37° C. Para establecer la isquemia inicial, se recogieron datos de perfusión sanguínea en la región plantar de ambos miembros traseros a las 24 horas después de la creación de la lesión. La evaluación de perfusión en serie se realizó en los días 7, 14, 21 y 28 después de la lesión. Los datos se presentaron como un porcentaje de los valores de perfusión en los miembros izquierdo (isquémicas) frente a derecho (no isquémicas).

55

60

Resultados

Los valores medios (± sem) para la perfusión relativa en los miembros isquémicos para cada grupo se

65

muestran en la Tabla 6-2 (mostrada a continuación). Se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías en los tres conjuntos de datos (por ejemplo, IM (sin fibrina), IM con fibrina y IV (sin fibrina) usando un nivel de significación del 5%. Se evaluaron los efectos generales de tiempo y tratamiento. Hubo un efecto significativo ($P < 0,01$) de tratamiento y tiempo en todos los grupos. Se realizó una prueba posterior de Bonferroni para comparar todos los grupos para controlar entre sí dentro de cada conjunto (*p. Ej.*, IM, IM con fibrina y IV).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 6-2. Resumen de datos de formación de imágenes por láser Doppler. Se muestran Medias \pm errores estándar (sem) para las mediciones para días específicos (post-lesión).

Grupo	Tratamiento	Dosis de Células	ROA	Día											
				1		7		14		21		28			
				media	sem	media	sem	media	sem	media	sem	media	sem		
1	Vehículo	N/A	IM	11.4	1.0	22.8	2.2	25.4	1.9	26.8	2.8	28.1	3.3		
2	hUTC	1 x 10 ⁶	IM	11.9	0.9	24.4	2.0	35.1	5.4	39.1	5.3	40.6	5.8		
3	hUTC	0.5 x 10 ⁶	IM	12.4	1.3	26.7	2.4	26.7	2.0	35.3	4.0	36.7	3.1		
4	Vehículo + Fibrina	N/A	IM	11.8	1.8	25.3	1.9	23.7	2.7	17.8	1.4	24.1	3.7		
5	Vehículo + Fibrina + hUTC	1 x 10 ⁶	IM	11.1	1.0	26.7	2.4	35.8	6.0	34.4	1.8	43.4	7.6		
6	Vehículo + Fibrina + hUTC	0.5 x 10 ⁶	IM	11.8	0.8	28.1	3.6	34.8	2.8	40.4	6.1	38.5	6.5		
7	Vehículo + Fibrina + hUTC	0.25 x 10 ⁶	IM	10.3	0.8	25.5	1.7	32.1	3.7	38.8	7.3	35.4	6.3		
8	Vehículo + Fibrina + hUTC	0.125 x 10 ⁶	IM	11.6	1.2	28.6	1.6	28.7	2.6	35.8	5.7	39.8	11.4		
9	Vehículo	N/A	IV	11.7	1.0	25.5	2.7	25.2	2.3	22.9	2.4	23.3	1.5		
10	hUTC	1 x 10 ⁶	IV	11.9	1.1	28.1	2.3	33.9	2.3	37.1	3.0	35.6	3.4		

Los números en negrita y en cursiva indican significancia estadística en comparación al control

No hubo una diferencia clara en la magnitud de los efectos con las 3 modalidades de administración diferentes. El uso de 1×10^6 hUTC en fibrina dio como resultado una perfusión relativa de aproximadamente el 43,4% a los 28 días después de la lesión mientras que las hUTC solas dieron como resultado una perfusión relativa máxima del 40,6% (ver Figura 8). Para las células administradas sistémicamente, la perfusión relativa en los miembros isquémicos de los ratones que recibieron hUTC fue significativamente mayor que el control en los días 21 y 28 después de la lesión ($P < 0,01$).

Se probaron dos dosis de células usando administración local (IM). La dosis más alta era significativamente diferente ($P < 0,05$) que el control a los 21 y 28 días después de la lesión. El grupo de dosis baja no era significativamente diferente al control en cualquier día. Los grupos de dosis alta y baja no fueron significativamente diferentes entre sí en ningún momento (Tabla 6-2).

Se probaron cuatro dosis diferentes de hUTC en pegamento de fibrina usando administración local (IM). En el grupo que recibió 1×10^6 células, la perfusión relativa en el miembro isquémico fue significativamente mayor que el control en los días 21 ($P < 0,05$) y 28 ($P < 0,01$) después de la lesión. La perfusión relativa en los grupos que recibieron dosis de 0,5, 0,25 y $0,125 \times 10^6$ células fue significativamente mayor que el control solo en el día 21 ($P < 0,001$, $P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente) después de la lesión. No hubo diferencia entre ninguno de los grupos de dosis (Figura 9).

Hubo una ligera tendencia hacia una mayor reperfusión con dosis crecientes, que es especialmente evidente a los 14 días después de la lesión (datos sin barras de error que se muestran por claridad en la Figura 10).

En resumen, los animales tratados con hUTC administrados por los tres métodos mostraron una reperfusión aumentada de los miembros isquémicos. En este estudio, no hubo una diferencia clara en la magnitud de los efectos con la modalidad de administración. Es notable que la perfusión relativa fue significativamente mayor a los 28 días después de la lesión para los grupos con dosis más altas; independiente de la vía de administración o el número de células.

Ejemplo 7

Evaluación de la eficacia del trasplante de células hUTC en un modelo de ratón de isquemia de los miembros periféricos: un estudio de vía de administración

El propósito de este estudio fue evaluar si la administración de células hUTC restablece el flujo sanguíneo en un modelo de ratón de isquemia de los miembros periféricos (modelo de isquemia de los miembros posteriores unilateral). Se hizo una comparación entre dos vías de administración - administración intravenosa e intramuscular; la última incluía también la suspensión de células en una matriz de fibrina.

Métodos

Los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 7-1 a continuación:

Tabla 7-1 Grupos de Tratamiento					
Grp Nº	Animal de Prueba	Nº de Animales	Material de Prueba	ROA	Dosis de Células
1	Desnudo	12	Solución Salina	IV	N/A
2	Desnudo	12	hUTC	IV	1×10^6
3	Desnudo	12	Solución Salina	IM	N/A
4	Desnudo	12	Solución Salina + hUTC	IM	1×10^6
5	Desnudo	12	Solución Salina + Fibrina	IM	N/A
6	Desnudo	12	Solución Salina + Fibrina + hUTC	IM	1×10^6

Las formaciones de pegamento de fibrina para la Grupos 5 y 6, la administración IM se muestran a continuación en la Tabla 7-2:

Tabla 7-2 Formaciones de pegamento de fibrina para los Grupos 5 y 6, administración IM		
	Grupo 5	Grupo 6
5	Células	Ninguna
	Solución Salina (PBS)	0.075 ml
	Solución A (trombina)	0.0125 ml
10	Solución B (fibrinógeno)	0.0125 ml
Todas las cantidades mostradas son por animal (0.1 ml por animal)		
Trombina = dilución final 1:5000 de solución madre (la solución madre contiene 1.6 µl de trombina (800-1200 IU/ml)) + 998.4 µl de PBS		
15	Fibrinógeno = dilución 1:8 (solución madre es 55-85 mg/ml)	

Se sometió a ratones desnudos inmunotolerantes macho (de 8 a 10 semanas de edad) a isquemia de miembros posteriores unilateral inducida quirúrgicamente. En el día 1 después de la cirugía, se evaluó el flujo sanguíneo en ambos miembros traseros mediante formación de imágenes de perfusión con láser Doppler (LDPI). Se administró una dosis única (10^6) de células hUTC o control de vehículo a 6 grupos de ratones (N = 15/grupo) como se muestra en la Tabla 7-1. La vía de administración fue una inyección IV de 100 µl a través de la vena de la cola o la misma dosis acumulada a través de una inyección de 20 µl IM en el músculo esquelético superior (3 sitios) e inferior (2 sitios) en el miembro isquémico. En 2 grupos que habían recibido inyecciones IM, también se incluyó una matriz de fibrina.

Se realizó LDPI en serie en los días 1, 3, 7, 10, 14 y 21; el último siendo el último día del estudio. Se evaluó la resistencia de natación 3 días antes de la cirugía y de nuevo a los 10 días después de la cirugía. Se consideró que un ratón alcanzaba su límite de resistencia de natación cuando no podía ascender a la superficie a los 5 segundos de la inmersión. Se comparó la proporción entre el tiempo de resistencia de natación después de la isquemia con la media de resistencia antes de la isquemia. Las muestras de tejido muscular gastrocnemio post mortem, obtenidas de miembros isquémicos y normales de 5 ratones de cada grupo que habían alcanzado el día 21 del estudio, se procesaron para tinción histológica de capilares (CD31/PECAM-1) y arteriolas (actina α de músculo liso). Las densidades de los vasos se cuantificaron a partir de imágenes digitalizadas de portaobjetos inmunoteñidos.

Se evaluaron el injerto celular y las densidades de los vasos en tejidos recolectados a los 7 días. El análisis de la densidad de vasos a los 7 días se consideró no útil dado que la separación de los valores de perfusión relativa medios para los grupos de tratamiento y control de células IV fue estadísticamente diferente a los 21 días. Los ensayos de injerto celular no se realizaron debido a dificultades técnicas con los métodos para la detección de células.

Evaluación del flujo sanguíneo

El flujo sanguíneo en los miembros posteriores de los ratones se evaluó usando formación de imágenes láser Doppler con un dispositivo Moor LDI. Los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano y se colocaron en un conjunto de almohadillas térmicas a 37° C. Para establecer la isquemia inicial, los datos de perfusión sanguínea en la región plantar de ambos miembros posteriores se recolectarán a las 24 horas después de la creación de la lesión. La evaluación de perfusión en serie se realizó los días 5, 10, 15 y 20. Los datos se presentaron como una proporción de los valores de perfusión en los miembros izquierdo (isquémico) frente a derecho (no isquémico).

Pruebas de resistencia de natación

Los ratones también se monitorizaron para su capacidad de nadar o mantenerse a flote en una cámara de natación. Para hacer esto, los ratones fueron entrenados para mantenerse a flote en la cámara de natación. Los ratones fueron entrenados todos los días durante 3 días. Al final de este período, los ratones se evaluaron de acuerdo con la cantidad de tiempo que permanecen a flote hasta la fatiga, definida como el fallo de ascender a la superficie del agua para respirar al de 7-10 segundos (valor inicial, -3 días). En el día 0, los ratones se sometieron a lesión unilateral del miembro trasero y las células se administraron 24 horas después de la lesión. Los animales fueron evaluados por su capacidad de natación/resistencia de flotación en los días 10 y 15.

Resultados y análisis

El desgaste de los animales debido a la necrosis de los miembros fue baja en todos los grupos. Todo el

desgaste tuvo lugar en 1 semana. Los números de ratones en cada grupo que se eliminaron del estudio (mostrados entre paréntesis) fueron: Grupo 1 (2); Grupo 2 (1); Grupo 3 (2); Grupo 4 (2); Grupo 5 (1); y Grupo 6 (2).

Formación de Imágenes de Perfusión por Láser Doppler

Los datos de perfusión por láser Doppler (expresados como porcentaje de perfusión en el miembro isquémico izquierdo en comparación con el miembro derecho de control no isquémico) se muestran en Figura 11 y la Tabla 7-3. Hubo reperfusión relativa aumentada en los ratones tratados por infusión IV de células hUTC en comparación con el control que recibió solución salina por infusión IV. Este efecto fue significativo los días 7, 10 y 21. No hubo diferencias significativas entre ninguno de los otros grupos de tratamiento y los controles apropiados. Un máximo inexplicable en la perfusión relativa en todos los animales del grupo de control ocurrió a los 14 días. A los 21 días, los valores en los animales de control habían disminuido. Los valores de perfusión relativos en el día 14 de 2 ratones en el grupo de control IV se excluyeron en base a los valores relativos que fueron mayores del 100%. Incluso con estas exclusiones, no hubo diferencia entre el grupo de células IV y el control en este punto temporal.

Tabla 7-3 Medias ± sems para valores de perfusión relativos

Dosis	Día					
	1	3	7	10	14	21
solución salina iv	14.41±0.85	1363±1.16	23.57±3.39	32.07±2.80	57.29±6.64*	49.53±2.86
células iv	14.19±2.18	16.63±2.18	41.07±3.34	59.46±5.10	59.92±3.93	67.24±3.18
solución salina im	1422±1.39	16.98±2.39	28.82±3.99	33.66±5.29	39.34±8.14	36.21±6.14
células im	12.98±0.71	25.32±4.33	31.13±2.58	42.95±2.00	46.34±1.66	55.43±9.84
fibrina im	13.15±1.01	15.16±2.08	25.64±2.82	35.99±2.51	50.35±3.03	44.20±3.4
fibrina + células im	12.47±0.70	16.34±1.73	27.49±1.73	43.76±5.84	44.73±3.12	52.84±3.9

* valores para 2 ratones excluidos en base a valor de miembro isquémico >100% del miembro de control

Se determinaron las densidades capilares y arterioides en ambos miembros inferiores en secciones delgadas inmunohistológicamente teñidas cosechadas a los 21 días. No hubo correlación entre la densidad microvascular y la perfusión. La densidad relativa de los capilares no era significativamente diferente entre los controles y los grupos tratados (Figura 12).

No hubo diferencia entre las densidades arteriolares de los controles y los animales tratados (Figura 13). Hubo una tendencia hacia densidad reducida de las arteriolas en los músculos inyectados directamente con fibrina.

Se evaluó la capacidad de los ratones para nadar contra una corriente de flujo laminar antes de la cirugía y de nuevo a los 10 días después de la cirugía. El tiempo total de natación se registró antes de la inducción de la isquemia en cada sesión y se comparó. No hubo diferencias significativas entre los controles y los grupos de tratamiento en la evaluación funcional.

En resumen, los resultados muestran que la administración intravenosa de hUTC lleva a la restauración del flujo sanguíneo en los músculos isquémicos en el día 3, el día 10 y el día 21 después de la lesión. En particular, la administración intravenosa de hUTC 1 día después de crear la isquemia dio como resultado la reperfusión acelerada de los músculos isquémicos y un mayor nivel de perfusión relativa al final del experimento (21 días). Otros tratamientos no tuvieron un efecto aparente por ninguna de las medidas usadas en este estudio. El mecanismo por el que hUTC administradas IV aumentó la reperfusión no era aparente en base al análisis del recrecimiento de los vasos en la región isquémica. Es posible que otros mecanismos puedan explicar los efectos observados. Recientemente se ha demostrado que las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea administradas sistémicamente se atrapan en el pulmón donde promueven la protección a una distancia mediante la secreción de factores antiinflamatorios que pueden reducir el grado de lesión temprana a los tejidos (Lee et al. (2009) Stem Cell. 5(1):54-63).

La presente invención no está limitada a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente. Es capaz de variación y modificación dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una población homogénea aislada de células derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso en el tratamiento de isquemia periférica en combinación con un pegamento de fibrina, en donde dicha población homogénea aislada de las células puede obtenerse de tejido de cordón umbilical libre de sangre, y en donde dicha población homogénea aislada de las células es capaz de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse y no expresa CD117, CD45, CD34, CD31 y telomerasa.
- 10 **2.** Una composición farmacéutica que comprende un pegamento de fibrina y población homogénea aislada de células derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso en el tratamiento de isquemia periférica, en donde dicha población homogénea aislada de las células puede obtenerse de tejido de cordón umbilical libre de sangre, y en donde dicha población homogénea aislada de las células es capaz de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tiene el potencial de diferenciarse y no expresa CD117, CD45, CD34, CD31 y telomerasa.
- 15 **3.** La población de células para el uso de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2, en donde la población aislada de células tiene una o más de las siguientes características:
- 20 (a) expresa el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidado, el retículo, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y
 (b) expresa CD10, CD13, CD44, CD73, y CD90.
- 25 **4.** La población de células para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el tratamiento comprende administrar por inyección en los sitios de isquemia periférica.
- 30 **5.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la composición farmacéutica comprende además por lo menos otro tipo de célula y/o por lo menos un agente.
- 35 **6.** La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 5, en donde:
- a) el por lo menos un agente es un agente seleccionado del grupo que consiste de un agente antitrombogénico, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un agente pro-angiogénico, un antiapoptótico y mezclas de los mismos; y
 b) el por lo menos un otro tipo de célula se selecciona del grupo que consiste de una célula de músculo esquelético, una célula progenitora de músculo esquelético, una célula de músculo liso vascular, una célula progenitora de músculo liso vascular, un pericito, una célula endotelial vascular, una célula progenitora de endotelio vascular u otra célula madre multipotente o pluripotente
- 40 **7.** La población de células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, o la composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno y trombina.
- 45 **8.** La población de células o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 7, en donde el pegamento de fibrina comprende de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 IU/ml de trombina y de aproximadamente 39,3 a aproximadamente 60,7 mg/ml de fibrinógeno.
- 50 **9.** Un kit para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene una isquemia periférica en donde el kit comprende el pegamento de fibrina y la población de células o composición farmacéutica enumerados en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

55

60

65

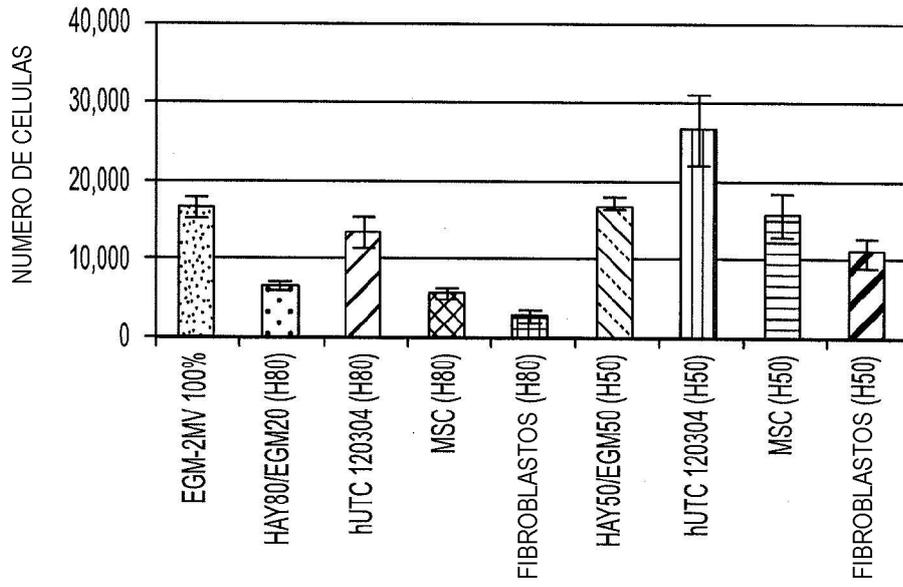


FIG. 1A

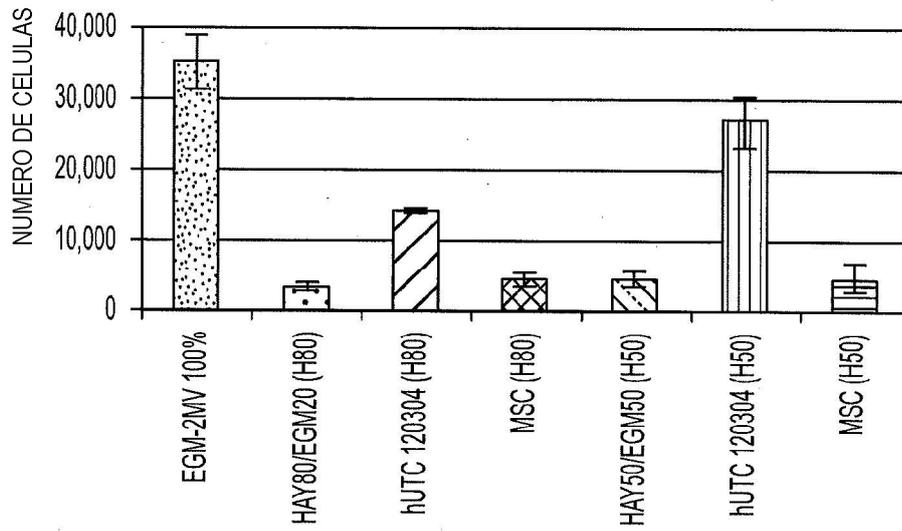


FIG. 1B

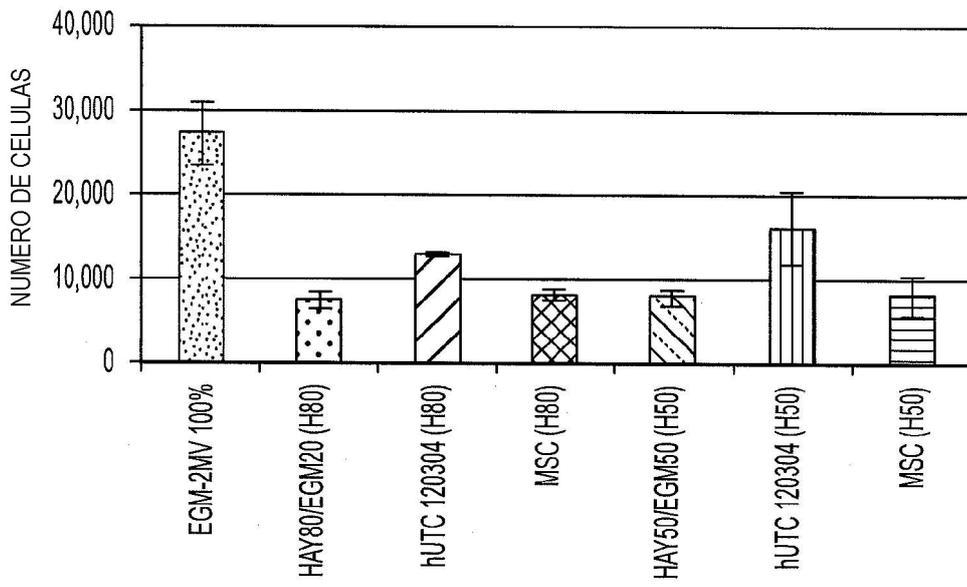


FIG. 1C

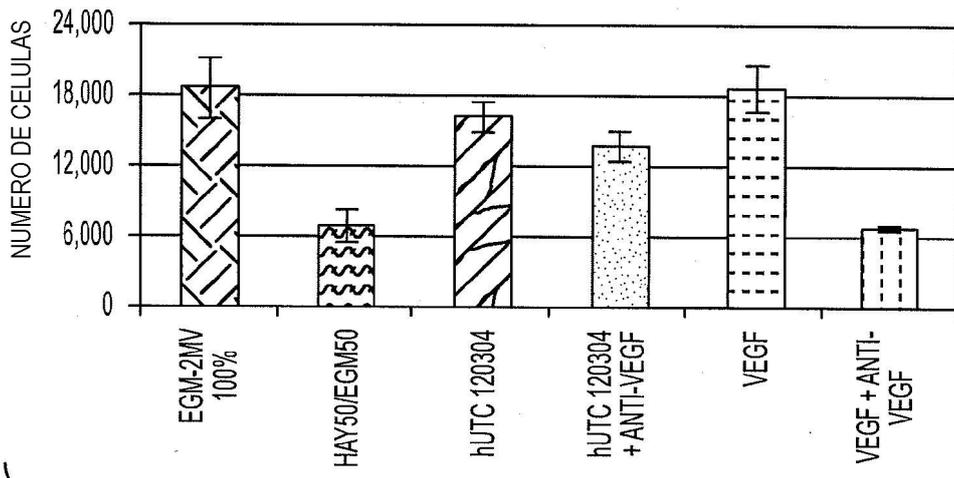
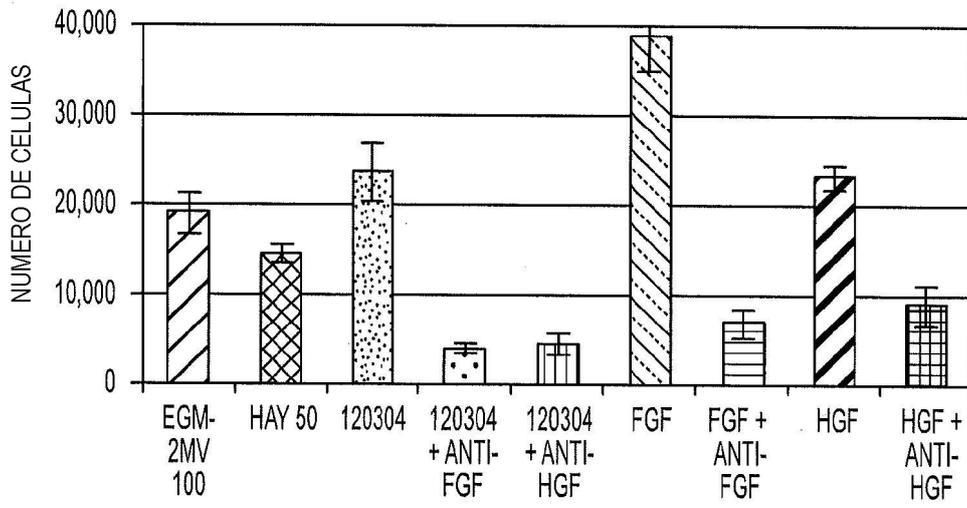


FIG. 2A

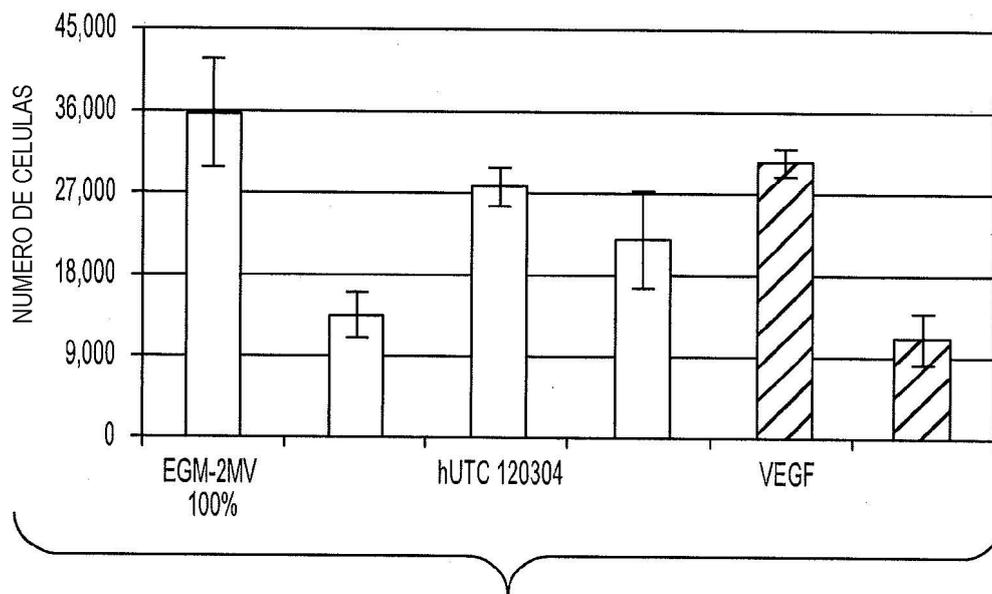
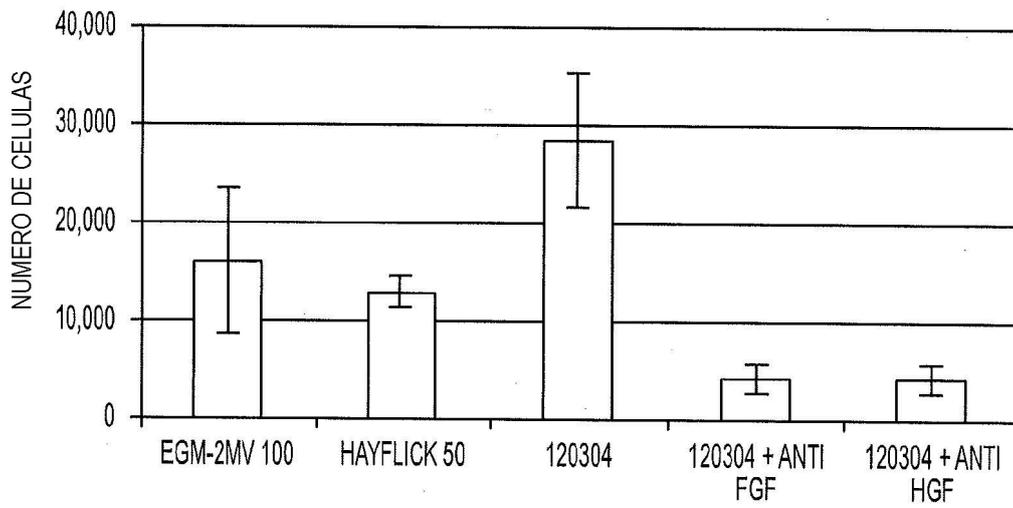


FIG. 2B

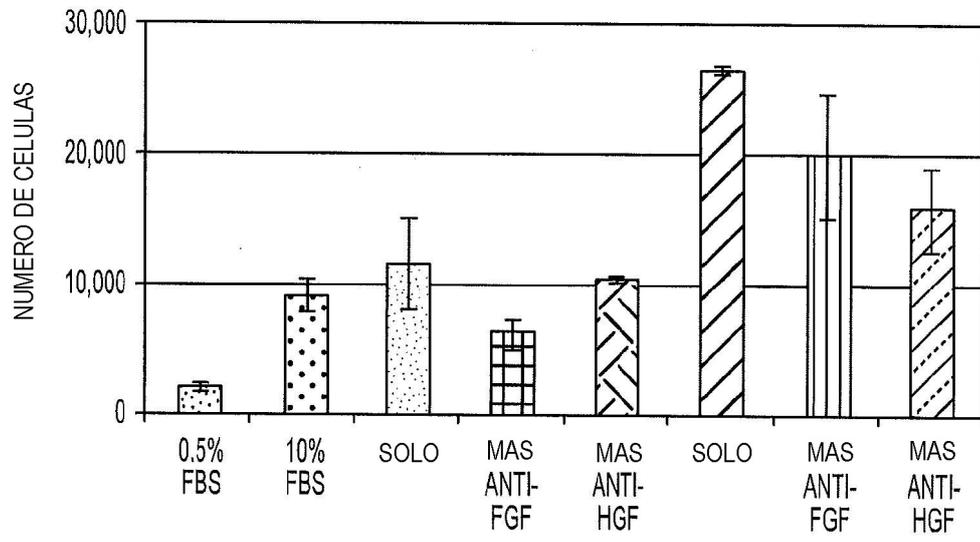


FIG. 3

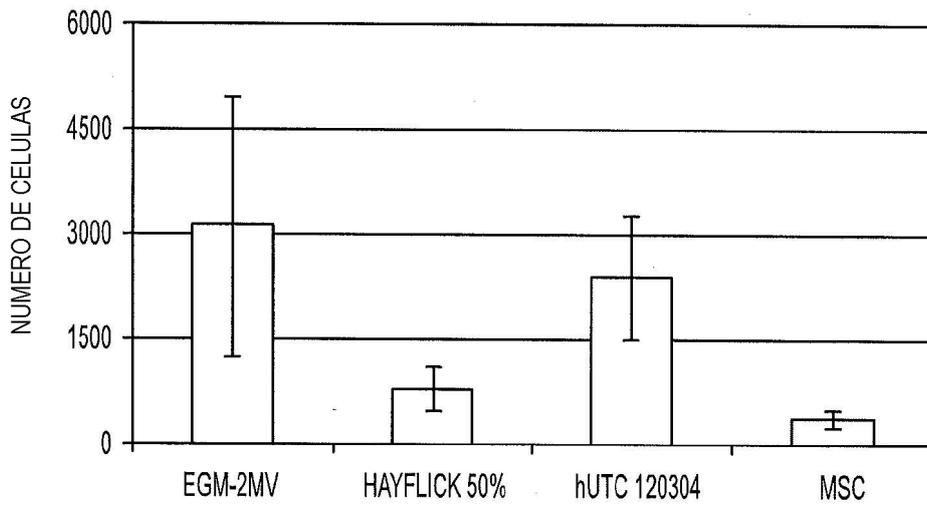


FIG. 4A

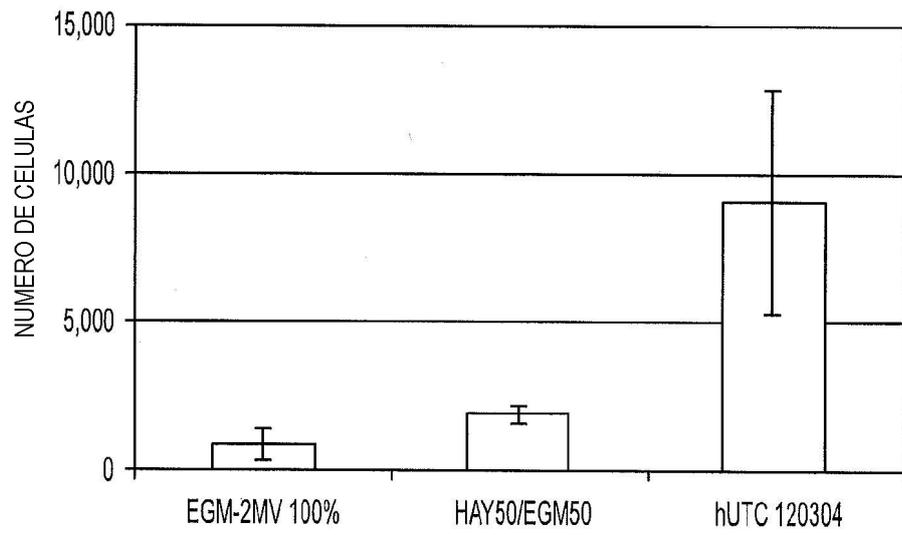


FIG. 4B

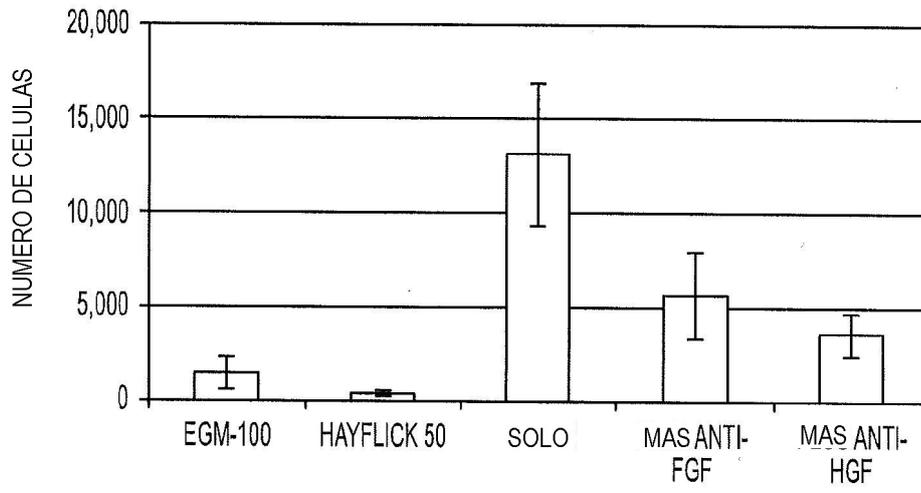


FIG. 5A

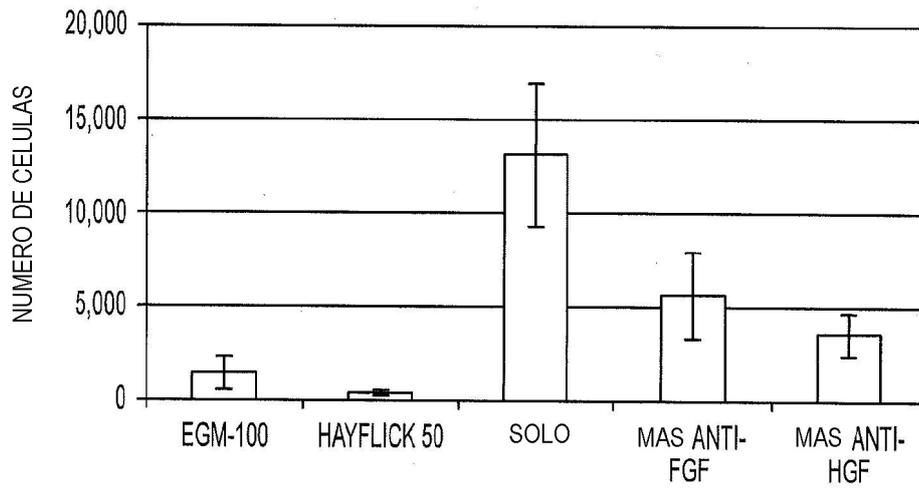


FIG. 5B

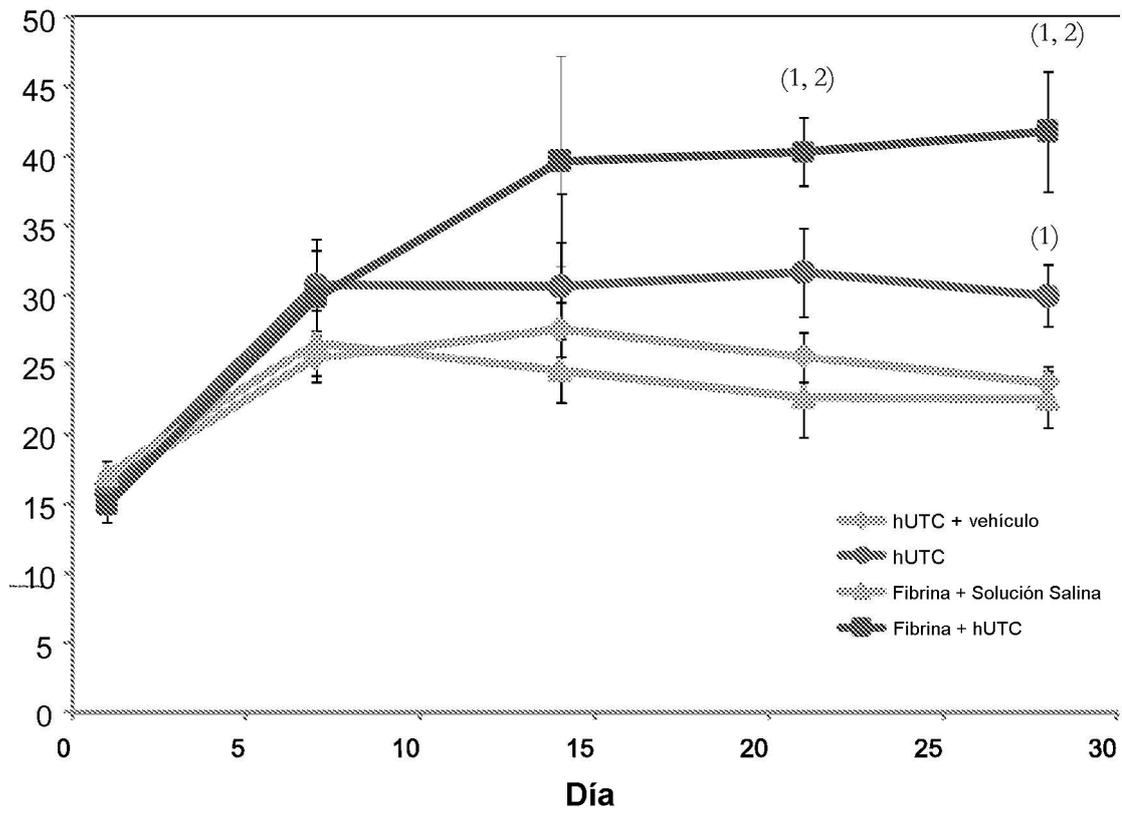


Figura 6

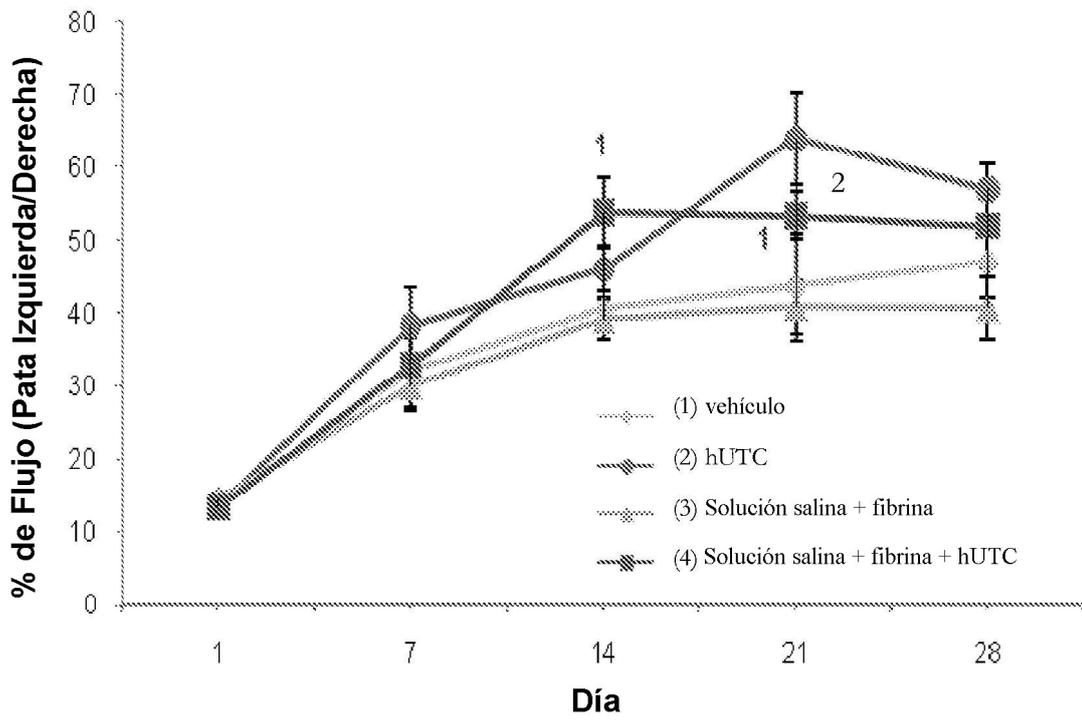


Figura 7

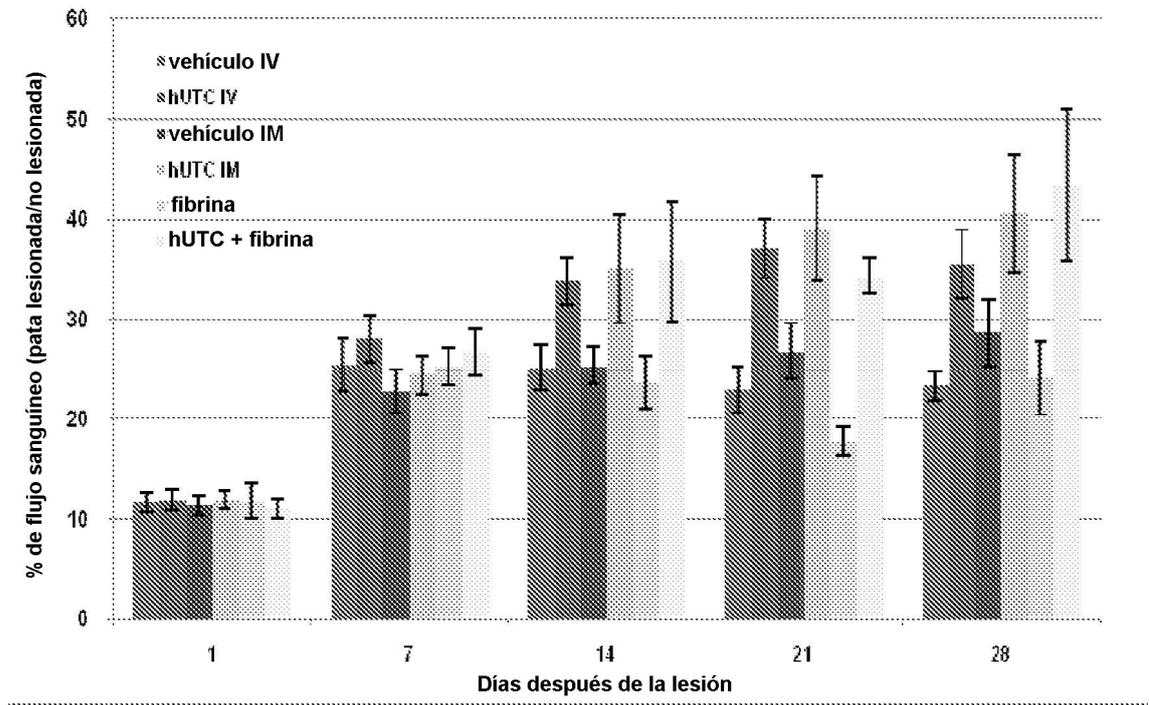


Figura 8

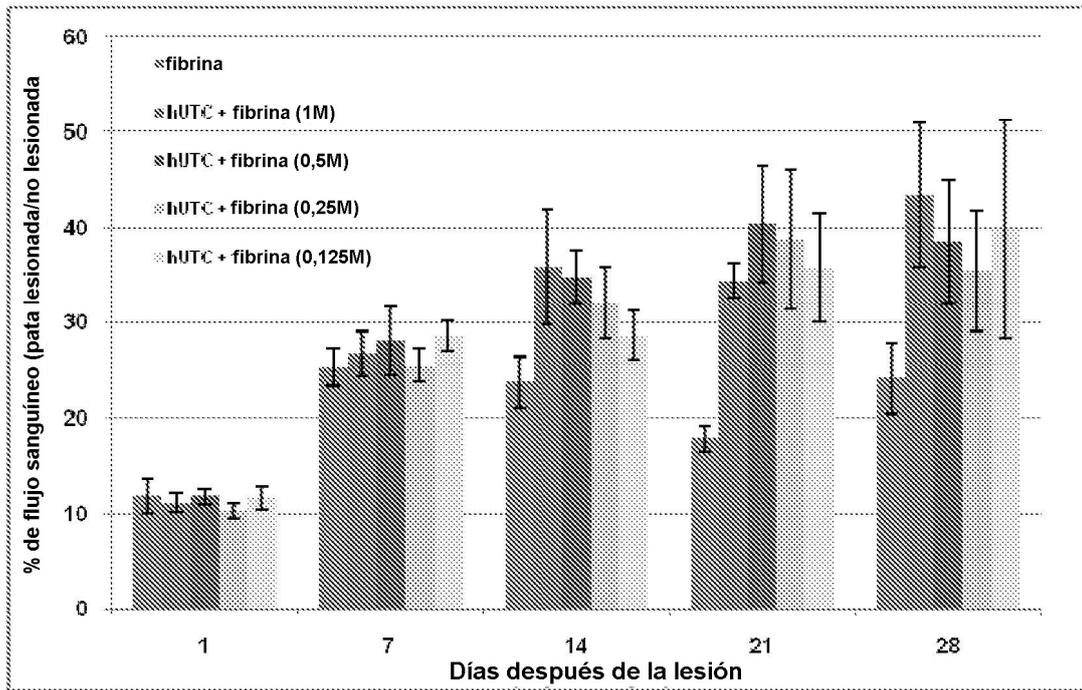


Figura 9

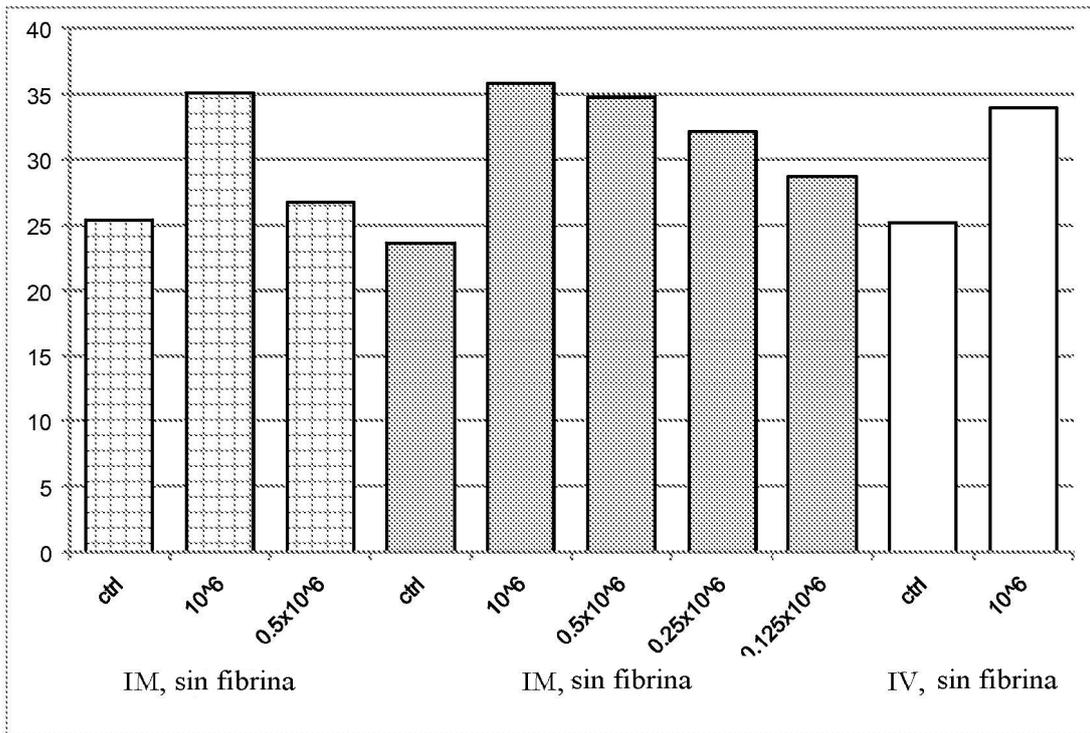


Figura 10

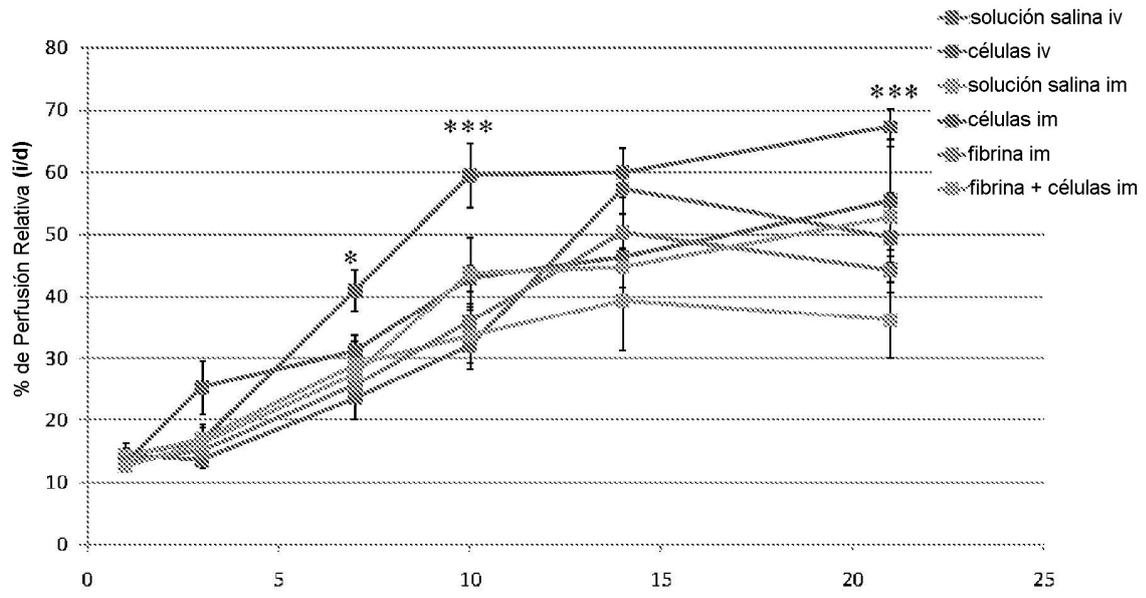


Figura 11

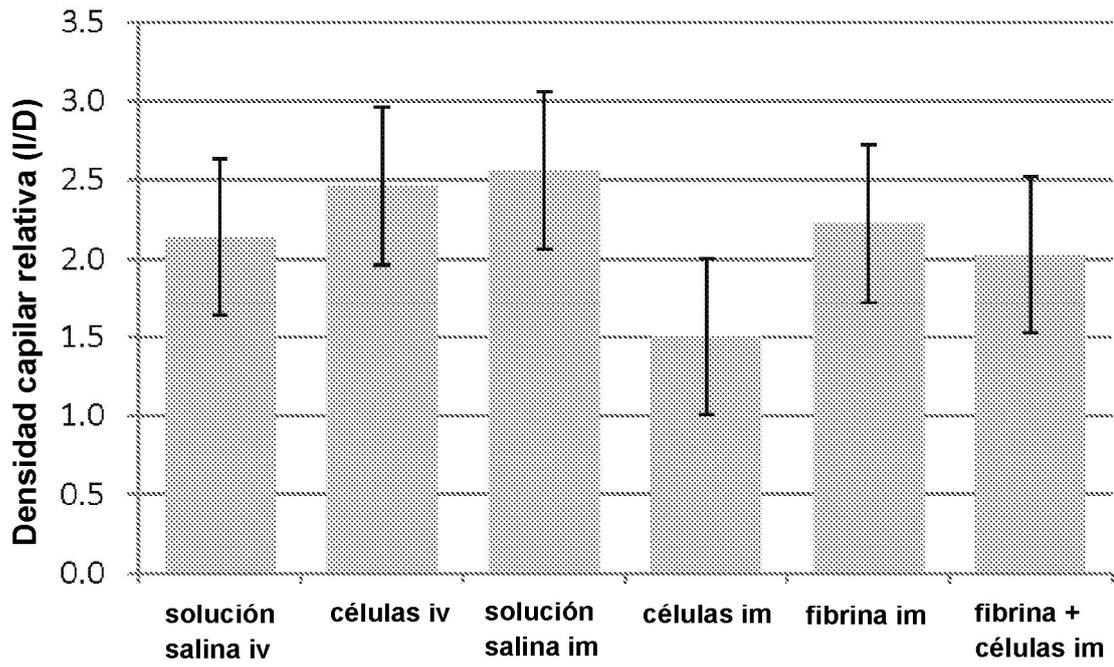


Figura 12

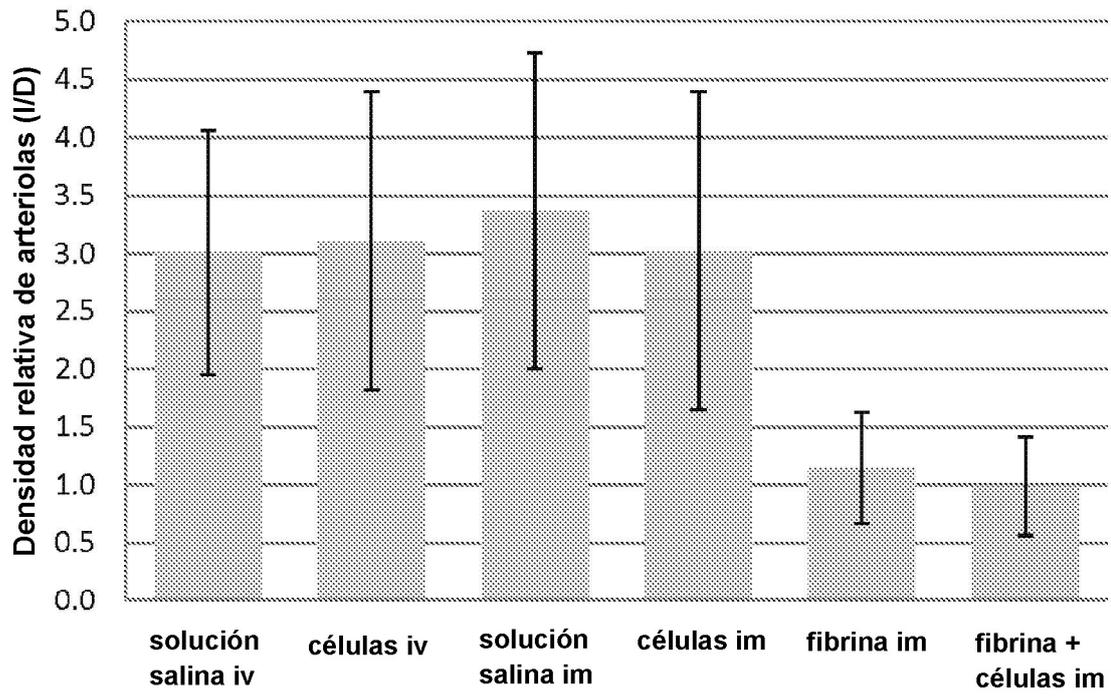


Figura 13