

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 883**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/51 (2015.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2009** **PCT/US2009/068881**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2010** **WO10071864**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2009** **E 09796901 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2379088**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades y trastornos pulmonares y pulmonares**

30 Prioridad:

19.12.2008 US 139425 P

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

30.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

COLTER, DAVID C.;
KIHM, ANTHONY J.;
WARD, CHRISTINE K. y
GOSIEWSKA, ANNA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 665 883 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades y trastornos pulmonares y pulmonares

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 **[0001]** La invención se refiere al campo de la terapia celular o regenerativa para trastornos, enfermedades y lesiones pulmonares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** Se citan diversas publicaciones, que incluyen patentes, aplicaciones publicadas y artículos técnicos a lo largo de la memoria descriptiva. Cada una de estas publicaciones citadas se incorpora aquí como referencia, en su totalidad.

- 15 **[0003]** La enfermedad pulmonar, crónica y aguda, sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la cuarta causa de muerte en el mundo (Spurzem y Rennard, *Semin Respir Crit Care Med*, 2005; 26: 142-153) y puede ser causada por estrechamiento anatómico de las vías respiratorias o bloqueo de las vías respiratorias con moco que interfiere con la respiración normal. Además, la enfermedad pulmonar intersticial, también conocida como fibrosis pulmonar, se clasifica como una enfermedad restrictiva que incluye una variedad de trastornos pulmonares crónicos. El manejo de la enfermedad pulmonar crónica incluye terapia con medicamentos, oxigenoterapia, cirugía y rehabilitación pulmonar.

- 20 **[0004]** Mientras que el 90% de los pacientes con EPOC son fumadores, solo el 10% de los fumadores desarrollan la enfermedad, lo que sugiere que la predisposición genética puede ser un importante factor pronóstico. (Siafakas y Tzortzaki, *Respir Med*, agosto de 2002, 96 (8): 615 - 24). La enfermedad pulmonar del fumador se caracteriza por inflamación crónica activa, hipersecreción de moco en las vías respiratorias y enfisema (MacNee, *Proc. Am Thorac Soc*. 2005; 2 (4): 258-66; discusión 290-1) y solo es parcialmente reversible al cesar el hábito de fumar. (Spurzem y Rennard, *Semin Respir Crit Care Med*, 2005; 26: 142 - 153). La inflamación de las vías respiratorias y el parénquima pulmonar juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Se ha demostrado que el humo del cigarrillo induce la inflamación pulmonar y, en última instancia, conduce a la EPOC incluso si se ha detenido la exposición al humo del cigarrillo.

- 25 **[0005]** El enfisema es uno de los principales factores que determinan la morbilidad y la mortalidad en las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Esta enfermedad se caracteriza, por ejemplo, por la pérdida de elasticidad del tejido pulmonar, por la destrucción de las estructuras que sostienen los tejidos del pulmón, como los alvéolos, y la destrucción de los capilares que alimentan los alvéolos. Esta destrucción puede ser causada por enzimas inflamatorias, por ejemplo, elastina. El enfisema se define como la ampliación del espacio aéreo periférico en el pulmón (incluidos los bronquiolos respiratorios y los alvéolos), que se acompaña de la destrucción de las estructuras de la pared alveolar. La incidencia de pacientes con enfisema ha aumentado en las últimas décadas como resultado del aumento de los contaminantes ambientales, el tabaquismo y otras exposiciones a sustancias nocivas. El estándar actual de atención hoy demuestra que solo el trasplante de pulmón puede proporcionar remediación para enfisema severo. Sigue existiendo la necesidad de un enfoque adecuado y útil para tratar, reparar y/o mejorar el daño pulmonar en pacientes con enfisema, como el enfisema inducido por elastasa.

- 35 **[0006]** Se han estudiado modelos animales expuestos al humo del cigarrillo para investigar la patología y la eficacia de diversas intervenciones terapéuticas. Lamentablemente, estos estudios solo han demostrado un éxito limitado. Parte del problema es que las cepas de ratas y ratones comúnmente usados solo muestran inflamación leve y secreción de moco en respuesta al humo del cigarrillo. (Guerassimov, A, y col., *Am J Respir Crit Med*, 2004 Nov. 1; 170 (9): 974 - 80. Epub 2004 Jul. 28). y las lesiones correspondientes son rápidamente reversibles. Por lo tanto, los roedores sanos de laboratorio pueden poseer una capacidad extraordinaria para compensar y regenerar la función pulmonar después de una lesión, lo que puede ser la base de su resistencia relativa al desarrollo de EPOC. Recientemente se ha demostrado que las ratas espontáneamente hipersensibles (SH) genéticamente predispuestas muestran fenotipos (p. ej., Inflamación sistémica, hipercoagulación, estrés oxidativo y función inmune suprimida) que también se encuentran en pacientes con EPOC. (Yu, B, y col., *Inhal Toxicol*, 2008 May; 20 (7): 623 - 33). Por lo tanto, el modelo de rata SH puede ofrecer un modelo más relevante de EPOC experimental.

- 45 **[0007]** La enfermedad pulmonar restrictiva es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad y tiene tres etiologías primarias, cáncer de pulmón, neumonía y fibrosis pulmonar. La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad paralizante caracterizada por disnea progresiva y se asocia con una alta tasa de mortalidad, fibrosis tisular fija progresiva, distorsión arquitectónica y pérdida de la función. (Ortiz, LA, y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2003 Jul. 8, 2003; 100 (14): 8407 - 11. Epub 2003 Jun. 18). Un exceso de citocinas profibróticas o una deficiencia en citoquinas antifibróticas ha sido implicada en el proceso patológico. En los Estados Unidos, las estimaciones de prevalencia para la fibrosis pulmonar idiopática varían de hasta seis casos por cien mil personas. En la actualidad, no hay terapias efectivas para revertir o retrasar el curso de la enfermedad. La mayoría de los tratamientos, como los corticosteroides, inmunosupresores, inmunomoduladores o antifibróticos, buscan suprimir la inflamación, pero no se ha demostrado que ninguno altere la progresión de la enfermedad por FPI. Por lo tanto, existe una necesidad significativa para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a ralentizar o detener la fibrosis a la vez que mejora la

reparación y regeneración del pulmón endógeno.

[0008] Se ha demostrado que las células madre mesenquimales (MSCs) pueden diferenciarse en células epiteliales alveolares en pulmones lesionados de ratones lesionados con bleomicina (BLM), y el injerto de MSC puede suprimir la inflamación y la deposición de colágeno en el tejido pulmonar dañado. (Zhao, F, y col., Transplant Proceedings, 2008 Jun. 40 (5): 1700-1705; Ortiz, LA, y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU., 2003 Jul. 8, 2003; 100 (14): 8407 - 11, Epub 2003 Jun. 18; Rojas y col., Am J Respir Cell Mol Biol, 2005; 33: 145). BLM es un antibiótico citostático con actividad antitumoral y es un compuesto bien conocido para estudiar la fibrosis pulmonar en modelos animales. Induce la lesión de las células epiteliales alveolares y la inflamación en el pulmón, lo que lleva a la fibrosis pulmonar.

[0009] La lesión pulmonar aguda (LPA) y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) también continúan siendo causas significativas de morbilidad y mortalidad en el entorno de cuidados intensivos. LPA y SDRA son enfermedades graves caracterizadas por la aparición abrupta de hipoxemia con edema pulmonar difuso en respuesta a una lesión directa (p. ej., ahogamiento, neumonía, gases tóxicos inhalados y contusión pulmonar) o lesión indirecta (p. ej., sepsis grave, transfusión, choque y pancreatitis). LPA y SDRA actualmente se tratan con ventilación mecánica y cuidados de apoyo.

[0010] La terapia celular es uno de los campos más interesantes en la medicina traslacional y se está convirtiendo en una nueva plataforma terapéutica para tratar una amplia gama de trastornos clínicos. En los últimos cinco años, el campo de las terapias celulares en las enfermedades pulmonares ha seguido creciendo rápidamente. Varios estudios han demostrado la viabilidad de emplear la terapia celular para tratar la enfermedad pulmonar. Por ejemplo, las células progenitoras endoteliales circulantes (CPE) pueden contribuir a la regeneración de la vasculatura pulmonar enferma y se están investigando en pacientes con hipertensión pulmonar. (Diller, GP, y col., *Circulation*, 2008 Jun 10, 117 (23): 3020-30, Epub 2008 Jun 2). Además, publicaciones recientes demuestran que las células madre mesenquimales (MSC) también suprimen la lesión pulmonar y la inflamación en varios modelos de ratón de enfermedades pulmonares inflamatorias e inmunomediadas. (Weiss, DJ, y col., Proc. Am Thorac. Soc., 2008 Jul. 15; 5(5): 637 - 67). A pesar de estos hallazgos prometedores, se ha prestado poca atención al desarrollo de una terapia celular para LPA.

[0011] Actualmente, existe interés en usar células madre, que pueden dividir y diferenciar, o células musculares de otras fuentes, incluyendo células musculares lisas y esqueléticas, para ayudar en la reparación o reversión del daño tisular, tal como daño pulmonar debido a enfermedades, trastornos o lesiones pulmonares. El trasplante de células madre se puede utilizar como una herramienta clínica para la reconstitución de un tejido diana, restaurando así la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de la tecnología de células madre es muy variada, incluida la ingeniería de tejidos, la administración de terapia génica y la terapéutica celular, es decir, la administración de agentes bioterapéuticos a una ubicación diana a través de células vivas o componentes celulares suministrados exógenamente que producen o contienen esos agentes. La identificación de células madre ha estimulado la investigación dirigida a la generación selectiva de tipos celulares específicos para la medicina regenerativa. Gupta *et al.* (2007) *The Journal of Immunology* 179(3):1833-1863 describe administración intrapulmonar de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

[0012] Un suministro confiable, bien caracterizado y abundante de poblaciones sustancialmente homogéneas de tales células que tienen la capacidad de diferenciarse en una matriz de tejido pulmonar, incluyendo estructuras vasculares, sería una ventaja en una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas para la reparación pulmonar, regeneración, protección y mejora, y para mejorar el flujo sanguíneo y el intercambio de oxígeno/CO₂ antes, durante o después del daño pulmonar debido a enfermedades pulmonares, trastornos y/o lesiones.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0013] La invención proporciona células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso en el tratamiento de un paciente que tiene una lesión pulmonar aguda, en donde las células derivadas de tejido de cordón umbilical se derivan de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorenovación y expansión en cultivo, tienen el potencial para diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar, son negativas para CD117 y no expresan hTERT o telomerasa.

[0014] La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una paciente que tiene una lesión pulmonar aguda, comprendiendo un portador farmacéuticamente aceptable y células derivadas de tejido de cordón umbilical o una preparación hecha de células derivadas de tejido de cordón umbilical en una cantidad efectiva para tratar la lesión pulmonar, en donde las células derivadas del tejido de cordón umbilical se derivan de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre son capaces de autorenovación y expansión en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar, son negativas para CD117 y no expresan hTERT o telomerasa.

[0015] La invención también proporciona un kit para el uso en el tratamiento de un paciente que tiene una lesión pulmonar aguda, comprendiendo el kit la composición farmacéutica de la invención.

[0016] Un aspecto de la invención presenta métodos para tratar a un paciente que tiene una enfermedad pulmonar,

trastornos y/o lesiones. Dichas enfermedades, trastornos y/o lesiones incluyen, pero no se limitan a, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), fibrosis pulmonar, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y los daños asociados a los mismos.

5 **[0017]** Un aspecto de la invención presenta un método para tratar a un paciente que tiene la enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión, el método que comprende administrar al paciente células derivadas de tejido de cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión, y daño asociado.

10 **[0018]** En una realización particular, la enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar es obstructiva, restrictiva y/o es causada por lesiones tales como las asociadas con o que conducen a LPA y/o SDRA. En ciertas realizaciones, las células se inducen *in vitro* para diferenciarse en células de tejido pulmonar, por ejemplo músculo liso vascular, pericito o linaje de endotelio vascular, antes de la administración. En otras realizaciones, las células se modifican por ingeniería genética para producir un producto génico que promueve el tratamiento de una enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar.

15 **[0019]** En algunas realizaciones del método, las células se administran con al menos otro tipo de célula, que puede incluir células de tejido pulmonar, por ejemplo células progenitoras de pulmón, 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 se puede administrar simultáneamente con, antes o después de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

20 **[0020]** En otras realizaciones, las células se administran con al menos otro agente, que puede ser un agente antitrombogénico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, proangiogénico o un agente antiapoptótico, por ejemplo. El otro agente se puede administrar simultáneamente con, antes o después de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

25 **[0021]** Las células se administran preferiblemente en o cerca de los sitios de la enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar, pero también se pueden administrar en ubicaciones distales a dichos sitios. Se pueden administrar mediante inyección, infusión, un dispositivo implantado en el paciente o mediante la implantación de una matriz o andamio que contiene las células. Las células pueden ejercer un efecto trófico, como la proliferación, en el tejido pulmonar del paciente. Las células pueden inducir la migración de células de tejido pulmonar, por ejemplo, células de músculo liso vascular, células endoteliales vasculares, células progenitoras de pulmón, pericitos, células progenitoras de músculo liso vascular o células progenitoras de endotelio vascular al sitio o sitios de enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión.

30 **[0022]** Otro aspecto de la invención presenta composiciones farmacéuticas y kits para tratar a un paciente que tiene una enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar, que comprende un vehículo, diluyente y/o tampón farmacéuticamente aceptable, y las células derivadas de tejido del cordón umbilical o preparaciones hechas a partir de tales células derivadas de tejido de cordón umbilical. En algunas realizaciones preferidas, las preparaciones comprenden FCF y HGF. Las composiciones y kits farmacéuticos se diseñan y/o formulan para practicar los métodos de la invención como se describe anteriormente.

35 **[0023]** De acuerdo con otro aspecto de la invención, los métodos descritos anteriormente pueden ponerse en práctica usando una preparación hecha a partir de células derivadas de tejido de cordón umbilical, donde la preparación comprende un lisado celular de las células derivadas de tejido de cordón umbilical, una célula extracelular matriz de las células derivadas de tejido del cordón umbilical o un medio acondicionado en el que se cultivaron las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Se prefiere que tales preparaciones comprendan FCF y HGF. Otro aspecto de la invención implica poner en práctica la invención con productos de células derivadas de tejido de cordón umbilical, por ejemplo, factores tróficos.

40 **[0024]** Otros aspectos de la invención incluyen composiciones farmacéuticas y kits que contienen preparaciones que comprenden lisados celulares, matrices extracelulares o medios acondicionados de las células derivadas de tejido del cordón umbilical. Las composiciones también pueden comprender un vehículo, diluyente y/o tampón farmacéuticamente aceptable, como se conoce en la técnica. Otros aspectos de la invención incluyen el tratamiento con composiciones farmacéuticas y kits que comprenden productos de células derivadas de tejido de cordón umbilical.

45 **[0025]** Otras características y ventajas de la invención se entenderán por referencia a la descripción detallada y ejemplos que siguen.

60 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026]

65 La Figura 1 muestra la concentración de proteína total de BALF: la proteína total se midió usando un ensayo de proteína Pierce BCA. Cada punto de datos representa mediciones obtenidas de un solo animal. Las líneas

horizontales representan el promedio de todas las mediciones. El análisis de la prueba T de estudiante fue realizado. Los datos se muestran en forma de tabla a continuación (Tabla 8).

La Figura 2a muestra un análisis de citoquinas/quimioquinas del homosenato pulmonar: se determinaron las concentraciones de veintidós citoquinas/quimiocinas diferentes para homogenizado de pulmón usando un kit de perlas 22 multiplex de ratón (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron usando la máquina BioRad Bioplex. Las barras de datos representan la media de seis muestras. Los datos se muestran en forma de tabla a continuación (Figura 3).

La Figura 2b muestra un análisis citoquina/quimioquina de BALF: se determinaron las concentraciones de veintidós citoquina/quimioquina diferentes para BALF usando un kit de perlas multiplex 22 de ratón (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron usando la máquina BioRad Bioplex. Las barras de datos representan la media de seis muestras. Los datos se muestran en forma de tabla a continuación (Figura 4).

La Figura 3 muestra un análisis de citoquina/quimiocina de homófano de pulmón: se determinaron las concentraciones de veintidós citoquinas/quimiocinas diferentes para homogenizado de pulmón utilizando un kit de perlas 22 multiplex de ratón (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron usando la máquina BioRad Bioplex.

La Figura 4 muestra un análisis BALF de citoquina/quimiocina: las concentraciones de veintidós citoquinas/quimiocinas diferentes se determinaron para BALF usando un kit de perlas multiplex 22 de ratón (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron usando la máquina BioRad Bioplex.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0027] En la siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma. Estas realizaciones se describen con suficiente detalle para permitir a los expertos en la materia practicar la invención, y se entiende que se pueden utilizar otras realizaciones y que se pueden realizar cambios lógicos estructurales, mecánicos, eléctricos y químicos sin apartarse del espíritu o alcance de la invención. Para evitar detalles que no sean necesarios para permitir a los expertos en la materia practicar las realizaciones descritas en este documento, la descripción puede omitir cierta información conocida por los expertos en la materia. La siguiente descripción detallada, por lo tanto, no debe tomarse en un sentido limitativo.

[0028] Se usan varios términos a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. Dichos términos deben tener 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 este documento.

[0029] El "tejido pulmonar" puede incluir, entre otros, todas las estructuras de tejido pulmonar y los tejidos asociados, que incluyen, entre otros, venas, arterias, vasos, capilares y células del tipo que forman parte de, o se asocian con tales estructuras; pulmón y tejido pleural; y linajes y/o fenotipos del músculo liso vascular, pericito y endotelio vascular.

[0030] Como se usa en el presente documento, "enfermedades respiratorias o pulmonares, trastornos y lesiones" incluyen, pero no se limitan a, enfermedades pulmonares obstructivas, enfermedades pulmonares restrictivas, infecciones del tracto respiratorio (superior e inferior), tumores respiratorios, enfermedades de la cavidad pleural y enfermedades vasculares pulmonares. El daño al tejido pulmonar causado por estas enfermedades, trastornos y/o lesiones se puede caracterizar como daño pulmonar dentro del alcance de la presente invención. Además, el tejido pulmonar dañado abarcado por la invención incluye todas las estructuras de tejido pulmonar y los tejidos asociados, que incluyen venas, arterias, vasos, capilares y células del tipo que forman parte de tales estructuras o están asociadas a ellas. Las "enfermedades pulmonares obstructivas" pueden incluir EPOC, fibrosis quística, bronquiectasias, bronquiolitis, enfisema y aspergilosis broncopulmonar alérgica. La EPOC, por ejemplo, es causada por partículas o gases nocivos (más comúnmente por el tabaquismo), que desencadenan una respuesta inflamatoria anormal en el pulmón. La respuesta inflamatoria en las vías respiratorias más grandes se conoce como bronquitis crónica, que se diagnostica clínicamente cuando las personas expectoran esputo con regularidad. En los alvéolos, la respuesta inflamatoria causa la destrucción del tejido del pulmón, un proceso conocido como enfisema. Debe tenerse en cuenta que estos problemas son los asociados con la EPOC en lo que respecta a la presente invención. La etiología de la EPOC incluye, entre otros, el tabaquismo, las exposiciones ocupacionales a polvos en el lugar de trabajo (p. ej., extracción de carbón, extracción de oro, industria textil de algodón e industria química), contaminación del aire y genética.

[0031] Las "enfermedades pulmonares restrictivas", tal como se usan en la presente memoria, también se conocen como enfermedades pulmonares intersticiales (EPI). Muchas de estas son idiopáticas. Los ejemplos incluyen: fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial idiopática (varios tipos), sarcoidosis, neumonía eosinofílica, linfangioleiomiomatosis, histiocitosis pulmonar de células de Langerhan y proteinosis alveolar pulmonar. Las ILD afectan el intersticio del pulmón: epitelio alveolar, endotelio capilar pulmonar, membrana basal, tejidos perivasculares y perilinfáticos. La mayoría de los tipos de ILD implican fibrosis.

[0032] Los tumores respiratorios incluyen tanto tumores malignos como benignos. Los tumores malignos incluyen, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma indiferenciado de células grandes), linfoma, así como otros cánceres.

Los tumores benignos son raros, pero pueden incluir hamartoma pulmonar y malformaciones congénitas, por ejemplo.

[0033] Como se usa en el presente documento, "lesión pulmonar aguda" (LPA) es una lesión pulmonar heterogénea difusa caracterizada por hipoxemia, edema pulmonar no cardiogénico, baja distensibilidad pulmonar y fuga capilar generalizada. LPA es causada por cualquier estímulo de inflamación local o sistémica. El síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) es más severo que la LLA. Tal como se usa en la presente memoria, la LPA y el SDRA se pueden caracterizar por un inicio abrupto de hipoxemia con edema pulmonar difuso en respuesta a una lesión directa o indirecta. Como se usa en el presente documento, "lesión directa" incluye, pero no se limita a, lesiones pulmonares derivadas de episodios de ahogamiento, neumonía, gases tóxicos inhalados y contusiones pulmonares. Tal como se usa en el presente documento, la "lesión indirecta" puede ser por sepsis grave, transfusión, choque y pancreatitis, por ejemplo. Estas lesiones que conducen a LPA y SDRA dan como resultado la alteración de la interfaz alveolar-capilar, la fuga de líquido rico en proteínas en el intersticio y el espacio alveolar, la liberación extensa de citocinas y la migración de neutrófilos.

[0034] Las enfermedades, trastornos y lesiones pulmonares abarcadas por los métodos de la presente invención son conocidas en la técnica. Las características de cada una, incluidas las complicaciones, etiologías y tratamientos asociados, son conocidas por los expertos en la materia. Esto incluye enfermedades pulmonares, trastornos y lesiones que no se analizan específicamente en este documento, ya que se aplicarían a enfermedades, trastornos y lesiones pulmonares obstructivas y restrictivas.

[0035] Las células usadas en la presente invención generalmente se denominan células de posparto o células derivadas de posparto (PPDC). Las células son más específicamente "células derivadas del ombligo" o "células derivadas del cordón umbilical" (UDC), o "células derivadas de tejido del cordón umbilical" (UTC). Además, las células se pueden describir como células madre o progenitoras, el último término se usa en sentido amplio. El término "derivado" se usa para indicar que las células se han obtenido a partir de su fuente biológica y se cultivan o manipulan *in vitro* (por ejemplo, se cultivan en un medio de crecimiento para expandir la población y/o 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 en detalle a continuación.

[0036] Las células madre son células indiferenciadas definidas por la capacidad de una sola célula tanto para autorenovarse, como para diferenciarse para producir células de progenie, que incluyen progenitores autorrenovadores, progenitores no renovables y células diferenciadas terminalmente. 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.

[0037] Las células madre se clasifican de acuerdo con su potencial de desarrollo como: (1) totipotente; (2) pluripotente; (3) multipotente; (4) oligopotente; y (5) unipotente. Las células totipotentes pueden dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Las células pluripotentes pueden 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 todas dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico en particular. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (autorrenovación), progenitores oligopotentes restringidos a células sanguíneas y todos los tipos y elementos celulares (p. ej., 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 pueden dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

[0038] Las células madre también se clasifican en función de 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 renovarse. En circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir los 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 fase 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 a partir de tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, a saber, el cordón umbilical. Se ha encontrado que estas células poseen características características de células madre pluripotentes, incluida la proliferación rápida y el potencial de diferenciación en muchos linajes celulares. Las células madre posparto pueden ser derivadas de la sangre (p. ej., como las obtenidas de la sangre del cordón umbilical) o no derivadas de la sangre (p. ej., obtenidas de los tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y la placenta).

[0039] 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 antes del primer subcultivo. Las células se "expanden" en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en

condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, dando como resultado una población más grande de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular a veces se mide por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número. Esto se conoce como "tiempo de duplicación".

[0040] El término "línea celular" generalmente se refiere a una población de células formadas por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se conoce como un pasaje. Cuando las células son subcultivadas, se las conoce como "pasadas". Una población específica de células, o una línea celular, a veces se denomina o se caracteriza por el número de veces que se ha pasado. Por ejemplo, una población de células cultivadas que ha sido pasada diez veces puede denominarse cultivo de 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 pasaje 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o paso 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 células (es decir, el número de duplicaciones de población) durante el período entre pases depende de muchos factores, que incluyen, entre otros, la densidad de siembra, el sustrato, el medio, las condiciones de crecimiento y el tiempo entre pases.

[0041] "Diferenciación" es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula "diferenciada" es aquella que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometido", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la ruta de diferenciación hasta un punto en el que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo específico de célula 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. "Desdiferenciación" se refiere al proceso por el cual una célula revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en el presente documento, el "linaje" de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células proviene y de qué células puede originarse. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

[0042] En un sentido amplio, una "célula progenitora" es una célula que tiene la capacidad de crear una progenie que está más diferenciada, y aún retiene la capacidad de reponer el conjunto de progenitores. Según esa definición, las células madre en sí mismas también son células progenitoras, al igual que los precursores más inmediatos de las células diferenciadas terminalmente. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, como se describe en mayor detalle a continuación, se puede usar esta definición amplia de célula progenitora. En un sentido más restringido, una célula progenitora a menudo se define 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 madura o un subconjunto de tipos de células. Este tipo de célula progenitora generalmente no puede autorenovarse. En consecuencia, si este tipo de célula se denomina aquí, se denominará "célula progenitora no renovadora" o como "célula progenitora o precursora intermedia".

[0043] Varios términos se usan en la presente memoria con respecto al trasplante de células o tejidos; o terapia de reemplazo celular. Los términos "transferencia autóloga", "trasplante autólogo", "autoinjerto" y similares se refieren a tratamientos en los que la célula o el donante de trasplante también es la célula o el receptor del trasplante. Los términos "transferencia alogénica", "trasplante alogénico", "aloinjerto" y similares se refieren a tratamientos en los que la célula o el donante de trasplante es de la misma especie que el receptor, pero no es el mismo individuo. Una transferencia de células en la que las células del donante se han emparejado histocompatiblemente con un receptor a veces se denomina una "transferencia singénica". Los términos "transferencia xenogénica", "trasplante xenogénico", "xenoinjerto" y similares se refieren al trasplante en el que la célula o donante de trasplante es de una especie diferente que el receptor.

[0044] Los términos "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "medio farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse indistintamente con los términos "vehículo biológicamente compatible" o "medio biológicamente compatible" generalmente se refieren a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que no solo son compatibles con las células y otros agentes para ser administrados terapéuticamente, sino que también son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Como se describe en mayor detalle aquí, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para uso en la presente invención incluyen líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y materiales sólidos (por ejemplo, andamios y matrices celulares, tubos, láminas y otros materiales similares conocidos en la técnica y se describe con mayor detalle en este documento). Estos materiales semisólidos y sólidos pueden diseñarse para resistir la degradación dentro del cuerpo (no biodegradable) o pueden diseñarse para degradarse dentro del cuerpo (biodegradable, bioerosionable). Un material biodegradable puede además ser bioabsorbible o bioabsorbible, es decir, puede disolverse y absorberse en fluidos corporales (por ejemplo, implantes hidrosolubles) o degradarse y finalmente eliminarse del cuerpo, ya sea por conversión a otros materiales o por descomposición y eliminación a través de caminos naturales. La velocidad de biodegradación puede variar de acuerdo con la velocidad de liberación deseada

una vez implantada en el cuerpo.

[0045] Un "medio acondicionado" es un medio en el que se ha cultivado una célula o población de células específica, 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 se limitan a, hormonas, citoquinas, matriz extracelular (MEC), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado.

[0046] Generalmente, un "factor trófico" se define como una sustancia que promueve la supervivencia, el crecimiento, la proliferación y/o la maduración de una célula, o estimula la actividad aumentada de una célula.

[0047] Como se usa en el presente documento, el término "medio de crecimiento" generalmente se refiere a un medio suficiente para el cultivo de células derivadas del posparto. En particular, un medio actualmente preferido para el cultivo de las células de la invención comprende el medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM). Particularmente preferido es DMEM-baja glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DMEM-LG se suplementa preferiblemente con suero, más preferiblemente suero bovino fetal o suero humano. Típicamente, se agrega suero fetal bovino al 15% (v/v) (por ejemplo, suero bovino fetal definido, Hyclone, Logan Utah), junto con antibióticos/antimicrobianos (preferiblemente 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 miligramos/mililitro de estreptomicina, 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 usan diferentes medios de crecimiento o se proporcionan diferentes suplementos, que normalmente se indican en el texto como suplementos al medio de crecimiento. En ciertos medios químicamente definidos, las células pueden crecer sin presencia de suero. En tales casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que se pueden agregar al medio para soportar y sostener las células. Los factores actualmente preferidos a ser agregados para el crecimiento en medios exentos de suero incluyen uno o más de bFGF, FGF, FGF-1 y PDGF. En realizaciones más preferidas, dos, tres o cuatro factores se añaden a medios sin suero o químicamente definidos. En otras realizaciones, se agrega FIL al medio libre de suero para soportar o mejorar el crecimiento de las células.

[0048] El término "condiciones de crecimiento estándar", tal como se utiliza aquí se refiere a cultivo de células a 37°C, en una atmósfera estándar que comprende 5% de CO₂ y la humedad relativa se mantuvo a aproximadamente el 100%. Aunque las condiciones anteriores son útiles para el cultivo, debe entenderse que tales condiciones pueden variarse por el experto en la materia que apreciará las opciones disponibles en la técnica para cultivar células.

[0049] El término "cantidad efectiva" se refiere a una concentración o cantidad de un compuesto, material o composición, como se describe en este documento, que es eficaz para lograr un resultado biológico particular. Tales resultados incluyen, pero no se limitan 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 daño pulmonar por esas enfermedades, trastornos y lesiones dentro del alcance de esta invención. Dicha actividad efectiva se puede lograr, por ejemplo, administrando las células y/o composiciones de la presente invención a pacientes con daño pulmonar como se describe en este documento. Con respecto a la administración de UTC a un paciente *in vivo*, una cantidad efectiva puede variar desde unos pocos cientos o menos, hasta tantos como varios millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad efectiva puede variar de aproximadamente 10³ a aproximadamente 10¹¹ células más específicamente, al menos aproximadamente 10⁴ células. Se apreciará que la cantidad de células que se administrarán variará dependiendo de las características específicas de la enfermedad pulmonar, el trastorno o la lesión que se va a tratar, incluidos, entre otros, el tamaño o el volumen total/área superficial a tratar, y la proximidad del sitio de administración a la ubicación de la región a tratar, entre otros factores familiares para el biólogo medicinal.

[0050] Los términos "tratar", "tratado" o "tratamiento" se refieren a cualquier éxito o indicios de éxito en la atenuación o mejora de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como disminución, remisión, disminución de síntomas o hacer que la lesión, patología o condición sea más tolerable para el paciente, disminuyendo la tasa de degeneración o disminución, haciendo que el punto final de degeneración sea menos debilitante, mejorando el bienestar físico o mental de un sujeto, o prolongando 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 o examen neurológico.

[0051] Los términos "período efectivo", "período efectivo de tiempo" o "condiciones efectivas" se refieren generalmente a un período de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos *in vitro*) necesarias o preferidas para un agente o composición farmacéutica para lograr el resultado deseado.

[0052] Los términos "individuo", "paciente" o "sujeto" se usan indistintamente en este documento, y se refieren a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente seres humanos, que se tratan con las composiciones farmacéuticas o terapéuticas o de acuerdo con los métodos descritos aquí.

[0053] El término "matriz", como se usa en la presente memoria, se refiere en general a materiales biodegradables y/o bioreabsorbibles que se administran con las células a un paciente. La matriz puede actuar como un almacén temporal hasta que sea reemplazada por células recién desarrolladas, tales como, músculo esquelético, pericitos, músculo liso vascular o tejido endotelial vascular. En algunas realizaciones, la matriz puede proporcionar la liberación sostenida de fracciones tróficas u otros agentes usados junto con las células y puede proporcionar una estructura para desarrollar el crecimiento de tejido en el paciente. En otras realizaciones, la matriz simplemente proporciona un almacén temporal para el tejido en desarrollo. La matriz puede estar en forma de partículas (macropartículas de más de 10 micras de diámetro o micropartículas de menos de 10 micras de diámetro), o puede estar en forma de un implante tridimensional estructuralmente estable (por ejemplo, un andamio). La matriz puede ser una suspensión, hidrogel o una estructura tridimensional tal como un cubo, cilindro, tubo, bloque, película, lámina o una forma anatómica apropiada.

[0054] El término "andamio" como se usa en este documento se refiere generalmente a una estructura porosa tridimensional que proporciona una plantilla para el crecimiento celular. Un andamio está hecho de materiales biodegradables y/o bioreabsorbibles que se degradan con el tiempo dentro del cuerpo. El tiempo necesario para que el andamio se degrade puede depender del peso molecular de los materiales. Por lo tanto, un material de mayor peso molecular puede dar como resultado armazones poliméricos que conservan su integridad estructural durante períodos de tiempo más largos; mientras que los pesos moleculares más bajos dan como resultado una liberación más lenta y vidas más cortas de andamios. El andamio se puede hacer por cualquier medio conocido en la técnica. Los ejemplos de polímeros que pueden usarse para formar el almacén incluyen polímeros naturales y sintéticos.

[0055] El término "aislado", como se usa en la presente memoria, se refiere en general a una célula que se ha separado de su entorno natural. Este término incluye la separación física bruta de su entorno natural, por ejemplo, la eliminación del animal donante. En realizaciones preferidas, una célula aislada no está presente en un tejido, es decir, la célula está separada o disociada de las células vecinas con las que normalmente está en contacto. Preferiblemente, las células se administran como una suspensión celular. Como se usa en el presente documento, la frase "suspensión celular" incluye células que están en contacto con un medio y que se han disociado, por ejemplo, sometiendo una pieza de tejido a trituración suave.

[0056] En sus diversas realizaciones descritas en este documento, la presente invención presenta métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades, trastornos y/o lesiones pulmonares que utilizan células progenitoras y poblaciones celulares derivadas de tejidos posparto, tejido umbilical en particular. Estos métodos y composiciones farmacéuticas están diseñadas para estimular y apoyar la angiogénesis, mejorar el flujo sanguíneo, regenerar, reparar y mejorar el tejido pulmonar dañado por una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión, y/o proteger el tejido pulmonar de tales enfermedades, trastornos y/o lesiones. Las células, poblaciones celulares y preparaciones que comprenden lisados celulares, medios acondicionados y similares, usados en las preparaciones farmacéuticas y los métodos de la presente invención se describen en detalle en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631 y 2005/0054098, y también aquí a continuación.

[0057] De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, se recupera un cordón umbilical de mamífero tras o poco después de la finalización de un embarazo a término o pretérmino, por ejemplo, después de la expulsión del post-nacimiento. El tejido de posparto se puede transportar desde el lugar de nacimiento a un laboratorio en un recipiente estéril, como un matraz, un vaso de precipitados, un plato de cultivo o una bolsa. El contenedor puede tener una solución o medio, que incluye pero no se limita a una solución salina, como el Medio 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 utilizados para trasplantes, como solución de la Universidad de Wisconsin o solución de perfluoroquímica. Uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos, tales como, entre otros, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, se pueden añadir al medio o tampón. El tejido posparto se puede enjuagar con una solución anticoagulante tal como una solución que contiene heparina. Es preferible mantener el tejido a aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C antes de la extracción del UTC. Es aún más preferible que el tejido no se congele antes de la extracción del UTC.

[0058] El aislamiento del UTC preferiblemente se produce en un entorno aséptico. El cordón umbilical puede separarse de la placenta por medios conocidos en la técnica. La sangre y los restos se eliminan preferiblemente del tejido posparto antes del aislamiento del UTC. Por ejemplo, el tejido posparto se puede lavar con solución tampón, que incluye, pero no se limita a, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado también puede comprender uno o más agentes antimicóticos y/o antibióticos, que incluyen, pero no se limitan a, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

[0059] El tejido de posparto que comprende un cordón umbilical, o un fragmento o sección del mismo, se desagrega preferiblemente por fuerza mecánica (fuerzas de picado o cizallamiento). En una realización actualmente preferida, el procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. Se sabe en la técnica que muchas 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 tales enzimas incluye actividades enzimáticas

mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, proteasas de serina (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa) y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, se sabe que las colagenasas son útiles para aislar varias células de los tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN monocatenario y pueden minimizar la aglutinación celular durante el aislamiento. Los métodos preferidos implican el tratamiento enzimático con colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa e hialuronidasa. El experto en la técnica apreciará que muchos de tales tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para aislar células de diversas fuentes de tejidos, y está bien equipado para evaluar enzimas o combinaciones enzimáticas nuevas o adicionales por su utilidad para aislar las células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferidos pueden ser de aproximadamente 0,5 a 2 horas de duración o más. En otras realizaciones preferidas, el tejido se incuba a aproximadamente 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disociación.

[0060] Las células aisladas se pueden usar para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a recipientes de cultivo tisular estériles, ya sea sin recubrir o recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (nativo, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular. Las células se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de mantener el crecimiento de la célula, tales como, entre otros, DMEM (glucosa alta o baja), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio FIO de Ham (FIO), Medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 y medio libre de suero/medio comercializado con el nombre comercial CELL-GRO-FREE (Mediatech, Inc., Herndon, Virginia). El medio de cultivo se puede complementar con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero bovino fetal (SBF), preferiblemente aproximadamente 2-15% (v/v); suero equino (SE); suero humano (SH); 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 (FCE), factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), factor de crecimiento insulínico-1 (FCI-1), factor inhibidor de leucocitos (FIL) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, que incluyen L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, solos o en combinación. El medio de cultivo preferiblemente comprende medio de crecimiento (por ejemplo, DMF-M-glucosa baja, suero, BME y un agente antibiótico).

[0061] Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. En una realización preferida, las células se cultivaron a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO₂ en el aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivaron a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento O₂ en el aire, preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento O₂ en el aire. Las células preferiblemente se cultivan 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. El UTC se cultiva preferiblemente 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 el presente documento, se refiere a las condiciones de daño de radicales libres nulo o mínimo a las células cultivadas.

[0062] Los métodos para la selección del medio de cultivo más apropiado, la preparación del medio y las técnicas de cultivo celular son bien conocidos en la técnica y se describen en una variedad de fuentes, que incluyen Doyle y col., (Eds.), 1995, *Cell. & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, *Animal Cell Bioreactors*, Butterworth-Heinemann, Boston, que se incorporan aquí como referencia.

[0063] En algunas realizaciones de la invención, los UTC se someten a pases, o se retiran a un recipiente de cultivo separado que contiene medio nuevo del mismo o diferente tipo que el 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 someten a un pase entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, más preferiblemente se pasan de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferiblemente se pasan 10 u 11 veces. La clonación y/o subclonación pueden realizarse para confirmar que se ha aislado una población clonal de células.

[0064] En algunos aspectos de la invención, los diferentes tipos de células presentes en el tejido posparto se fraccionan en subpoblaciones a partir de las cuales se puede aislar el UTC. El fraccionamiento o la selección pueden lograrse utilizando técnicas estándar para la separación celular que incluyen, pero no se limitan a, tratamiento enzimático para disociar el tejido posparto en sus células componentes, seguido de la clonación y selección de tipos celulares específicos, que incluyen, entre otros: selección basada en marcadores morfológicos y/o bioquímicos; crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva); destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente); unidad de separación por gravedad; distribución en contracorriente; electroforesis; y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

- [0065]** El medio de cultivo se cambia según sea necesario. Por ejemplo, aspirando cuidadosamente el medio del plato con una pipeta, y reponiendo con medio fresco. La incubación se continúa hasta que se acumule un número o densidad suficiente de células en el plato. Posteriormente, cualquier sección de tejido explantado original que exista se puede eliminar y las células restantes se pueden separar del plato mediante tripsinización usando técnicas estándar o usando un raspador de células. Después de la tripsinización, las células se recogen, se retiran a medio nuevo y se incuban como anteriormente. En algunas realizaciones, el medio se cambia al 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 UTC.
- [0066]** El UTC puede ser crioconservado. Por consiguiente, en una realización preferida descrita con mayor detalle a continuación, el UTC para la transferencia autóloga (ya sea para la madre o el niño) puede derivarse de los tejidos posparto apropiados después del nacimiento de un niño, y luego criopreservados para estar disponible en caso de que más tarde se necesitan para el trasplante.
- [0067]** El UTC puede caracterizarse, por ejemplo, por características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de población, tiempo de duplicación, pasos hasta la senescencia), análisis de cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal, linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis de 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 la polimerasa (por ejemplo, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteína (p. ej., mediante ensayo de coagulación plasmática o análisis de medio condicionado PDC, por ejemplo, mediante Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), reacción de linfocitos mixtos (p. ej., como medida de estimulación de PBMC) y/u otros métodos conocidos en la técnica.
- [0068]** Se depositaron ejemplos de UTC derivados de tejido de ombligo en la American Type Culture Collection el 10 de junio de 2004 y se asignaron los números de acceso de ATCC de la siguiente manera: (1) se asignó la designación de cepa UMB 022803 (P7) con el número de acceso PTA- 6067; y (2) se asignó la designación de cepa UMB 022803 (P17) con el número de acceso PTA-6068.
- [0069]** En diversas realizaciones, el UTC posee 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 5% hasta aproximadamente 20%; (3) tienen el potencial de al menos alrededor de 40 duplicaciones en cultivo antes de la senescencia; y (4) se unen y expanden en recipientes de cultivo tisular que no están recubiertos, o que están recubiertos con gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.
- [0070]** En ciertas realizaciones, el UTC posee un cariotipo normal, que se mantiene a medida que se pasan las células. Los métodos para el cariotipo están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica.
- [0071]** En otras realizaciones, el UTC puede caracterizarse por la producción de ciertas proteínas, que incluyen: (1) producción de al menos uno de entre el factor tisular, la vimentina y la actina de músculo liso alfa; y (2) la producción de al menos uno de 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, el UTC puede caracterizarse por la falta de producción de al menos uno de marcadores de superficie celular CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ, según se detecta mediante citometría de flujo. Particularmente preferidas son las células que producen al menos dos de: factor tisular; vimentina; y alfa-actina de músculo liso. Más preferidas son aquellas células que producen las tres proteínas: factor tisular; vimentina; y alfa-actina de músculo liso.
- [0072]** En otras realizaciones, el UTC puede 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 al menos uno de: interleucina 8; reticulon 1; ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 1 (actividad estimulante del crecimiento de melonoma, alfa); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3; factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa.
- [0073]** En otras realizaciones más, el UTC se puede caracterizar 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 un gen que codifica al menos uno de: estatura corta homeobox 2; choque térmico con la proteína 2 de 27 kDa; quimioquina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); mesénquima homeo box 2 (homeo box específico de detención del crecimiento); sine oculis homeobox homólogo 1 (Drosophila); cristalina, alfa B; activador asociado desmelenado de morfogénesis 2; proteína DKFZp586B2420; similar a la neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador procolágeno C-endoropeptidasa; homólogo 7 frizzled (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); iroquois homeobox proteína 5; hefestio; integrina, beta 8; glicoproteína 2 de la vesícula sináptica; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína de unión al

factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa; Homo sapiens ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citocina; canal de potasio intermedio/conductancia pequeña activada por calcio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); sine oculis homeobox homólogo 2 (Drosophila); Proteína KIAA1034; proteína de membrana 5 asociada a vesículas (miobrevina); Proteína 1 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene FCE; respuesta de crecimiento temprano 3; homeo box 5 no distal; proteína hipotética FLJ20373; familia 1 de aldo-ceto reductasa, miembro C3 (3-alfahidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a FCE); Clon de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens EUROIMAGE 1968422; EphA3; Proteína KIAA0367; receptor péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor C péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ 14054; ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus E1B proteína de interacción de 19 kDa similar a 3; AE proteína de unión 1; y la subunidad VIIa de citocromo c oxidasa polipéptido 1 (músculo).

[0074] En otras realizaciones, el UTC puede caracterizarse por la secreción de al menos uno de: MCP-1; IL-6; IL-8; GCP-2; HGF; KGF; FCF; HB-FCE; BDNF; TPO; MIP1b; I309; MDC; RANTES; y TIMP1. En algunas realizaciones, el UTC puede caracterizarse por la falta de secreción de al menos uno de: TGF-beta2; ANG2; PDGFbb; MIP1b; I309; MDC; y FCEV, como se detectó mediante ELISA.

[0075] En algunas realizaciones preferidas, el UTC se deriva de tejido de cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, es capaz de autorrenovación y expansión en cultivo, requiere L-valina para crecimiento, puede crecer en al menos aproximadamente 5% de oxígeno, y comprender al menos una de las siguientes características: (1) el potencial de al menos alrededor de 40 duplicaciones en cultivo; (2) la capacidad de unirse y expandirse en un recipiente de cultivo tisular no recubierto o uno recubierto con gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina; (3) producción de vimentina y alfa-actina de músculo liso; (4) producción de CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y (5) 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 ilíaca, se incrementa para un gen que codifica la interleucina 8 y el retículo 1. En algunas realizaciones, tales UTC no produce CD45 y CD117.

[0076] El UTC descrito anteriormente puede usarse en métodos para tratar a un paciente que tiene enfermedad vascular periférica, puede usarse en composiciones farmacéuticas para tratar enfermedad vascular periférica, por ejemplo, en donde tales composiciones comprenden células que tienen estas características y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se pueden usar en kits para fabricar, usar y practicar dichos métodos y composiciones farmacéuticas como se describe y ejemplifica aquí. Además, el UTC como se describió anteriormente se puede usar para generar medios de cultivo celular acondicionados o para preparar preparaciones tales como extractos celulares y fracciones subcelulares que se pueden usar para preparar, usar y practicar dichos métodos y composiciones farmacéuticas como se describe y ejemplifica aquí.

[0077] En realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más de las características de crecimiento, producción de proteína/marcador de proteína, expresión génica o secreción de sustancia listadas anteriormente. Más preferido es una célula que comprende, tres, cuatro, cinco o más de las características. Todavía más preferido es UTC que comprende seis, siete, ocho o más de las características. Todavía más preferido en la actualidad es una célula que comprende todas las características anteriores.

[0078] Entre las células que se prefieren actualmente para uso con la invención en varios de sus aspectos, están UTC que tienen las características descritas anteriormente, y más particularmente, aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con pases, y además en donde las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-A,B,C y en donde las células producen las proteínas inmunológicamente detectables que corresponden a los marcadores enumerados. Todavía más preferidas son aquellas células que, además de lo anterior, no producen proteínas correspondientes a ninguno de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD1 17, CD 141 o HLA-DR, DP, DQ, como se detecta por citometría de flujo.

[0079] Ciertas células que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de líneas que conducen a diversos fenotipos son inestables y, por lo tanto, pueden diferenciarse espontáneamente. Actualmente preferidas para uso con la invención son células que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo, a lo largo de líneas de mioblastos, músculos esqueléticos, músculos lisos vasculares, pericitos, hemangiogénicos, angiogénicos, vasculogénicos o endoteliales vasculares. 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 diversos genes, por ejemplo, tal como se determina usando una prueba de diagnóstico médica vendida con el nombre GENECHIP (Affymetrix, Inc., Santa Clara, California). Las células permanecen sustancialmente constantes, por ejemplo, en sus características de marcador de superficie sobre los pases y a través de múltiples duplicaciones de población.

[0080] Otro aspecto de la invención presenta el uso de poblaciones de UTC descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la población celular puede ser heterogénea. Una población celular heterogénea de la invención puede comprender al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% UTC de la

invención. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender además células madre u otras células progenitoras, tales como mioblastos u otras células progenitoras musculares, hemangioblastos o células precursoras de vasos sanguíneos; o puede comprender además células de músculo esquelético completamente diferenciadas, células de músculo liso, pericitos o células endoteliales de vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente solo el UTC (preferiblemente al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o más UTC). La población celular homogénea de la invención puede comprender células derivadas de ombligo. Las poblaciones homogéneas de células derivadas del ombligo están preferiblemente libres de células de linaje materno. La homogeneidad de una población celular se puede lograr mediante 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 lo tanto, las poblaciones de UTC homogéneas preferidas pueden comprender una línea celular clonal de células derivadas del posparto. Tales poblaciones son particularmente útiles cuando se ha aislado un clon celular con funcionalidad altamente deseable.

[0081] También se proporciona en la presente memoria el uso de poblaciones de células incubadas en presencia de uno o más factores, o en condiciones, que estimulan la diferenciación de células madre a lo largo de una ruta de músculo liso vascular, endotelio vascular o pericito. Tales 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 se puede lograr mediante diseño y análisis estadístico experimental, por ejemplo, la metodología de superficie de respuesta permite la optimización simultánea de múltiples variables en un cultivo biológico. Los factores actualmente preferidos incluyen, entre otros, crecimiento o factores tróficos, quimiocinas, citocinas, productos celulares, agentes desmetilantes y otros estímulos que ahora se conocen o se determinan posteriormente para estimular la diferenciación, por ejemplo, de células madre a lo largo de genes angiogénicos, hemangiogénicos, vasculogénicos, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o vías o linajes endoteliales vasculares.

[0082] El UTC también puede modificarse genéticamente para producir productos génicos terapéuticamente útiles, para producir agentes angiogénicos para facilitar o soportar la formación o crecimiento adicional de vasos sanguíneos, o para producir factores para reclutar células progenitoras endoteliales en el área del daño pulmonar. Las células progenitoras endoteliales facilitan la vasculogénesis y el flujo sanguíneo, particularmente después de un evento isquémico. (Urbich C y Dimmeler S, *Circ. Res.*, 2004; 95:343-53). Los factores que desempeñan un papel en el reclutamiento de células endoteliales incluyen, pero no se limitan a, FCEV, factor 1 derivado del estroma (SDF-1), eritropoyetina (EPO), G-CSF, estatinas, estrógeno, PPAR- γ , CXCR4, FGF y HGF. La modificación genética se puede lograr usando cualquiera de una variedad de vectores que incluyen, pero no se limitan a, vectores virales integrantes, por ejemplo, vector de retrovirus o vectores virales adenoasociados; vectores de replicación no integrantes, por ejemplo, vectores de 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 mediante inyección directa de ADN.

[0083] 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 tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable. Cualquier promotor puede usarse para dirigir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan a, promotor/potenciador de CMV, SV40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o promotor del gen de la 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 modo que el producto se sintetice solo cuando se necesite *in vivo*. Si se desea la expresión transitoria, los promotores constitutivos se usan preferiblemente en un vector defectuoso y/o no integrante. Alternativamente, los promotores inducibles podrían usarse para dirigir la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, los asociados con metalotioneína y proteínas de choque térmico.

[0084] Después de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células modificadas crezcan en medios enriquecidos y luego se cambian 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 líneas celulares. Este método se puede usar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen el producto génico.

[0085] Las células de la invención pueden manipularse 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 diana o los niveles de actividad del producto del gen diana se discuten a continuación. "Modulación negativa", como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción en el nivel y/o la actividad del producto del gen diana en relación con el nivel y/o actividad del producto del gen diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo de una célula de músculo esquelético, célula de músculo liso vascular, pericito, célula endotelial vascular o células progenitoras de la misma puede reducirse o anularse usando una serie de técnicas que incluyen, por ejemplo, la inhibición de la expresión inactivando el gen

usando la técnica de recombinación homóloga. Típicamente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' de esa región) se interrumpe por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, impidiendo la producción de ARNm normal del gen diana 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. Mediante el uso de una construcción con dos regiones de homología con el gen diana que están muy separadas en el genoma, las secuencias que intervienen en las dos regiones se pueden eliminar. (Mombaerts y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.*, 1991; 88: 3084-87). Pueden usarse también antisentido, ADNzimas, ribozimas, ARN de interferencia pequeño (ARNip) y otras moléculas similares que inhiben la expresión del gen objetivo para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, se ha demostrado que las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de los complejos del gen de histocompatibilidad principal (HLA) son las más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Además, las moléculas de triple hélice pueden utilizarse para reducir el nivel de actividad del gen diana.

[0086] En otros aspectos, la invención utiliza lisados celulares y fracciones solubles en células preparadas a partir de UTC, o poblaciones de células heterogéneas u homogéneas que comprenden un UTC, así como un UTC o poblaciones que han sido genéticamente modificadas o que han sido estimuladas para diferenciarse a lo largo de un músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o vía del endotelio vascular. Tales lisados y fracciones de los mismos tienen muchas utilidades. El uso de la fracción soluble del lisado UTC (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 puedan desencadenar el rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. Los métodos de lisar células son bien conocidos en la técnica e incluyen diversos 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 así contener factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células lavadas sin medio en, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células lavadas pueden resuspenderse a concentraciones mayores que la densidad de población original, si se prefiere.

[0087] En una realización, los lisados de células completas se preparan, por ejemplo, mediante la ruptura de células sin separación posterior de las fracciones celulares. En otra realización, una fracción de membrana celular se separa de una fracción soluble de las células mediante métodos de rutina conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración o métodos similares.

[0088] Los lisados celulares o fracciones solubles en células preparadas a partir de poblaciones de células derivadas del posparto se pueden usar tal como están, se pueden concentrar adicionalmente mediante, por ejemplo, ultrafiltración o liofilización, o incluso secar, parcialmente purificar, combinar con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. son conocidos en la técnica, o combinados con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo, composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares o fracciones de los mismos se pueden usar *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.

[0089] En una realización adicional, el UTC se puede cultivar *in vitro* para producir productos biológicos con alto rendimiento. Un UTC que produce de forma natural un producto biológico particular de interés (por ejemplo, un factor trófico), o que ha sido modificado genéticamente para producir un producto biológico, puede expandirse clónicamente usando las técnicas de cultivo descritas en este documento. 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 en el medio pueden aislarse fácilmente del medio acondicionado usando técnicas de separación estándar, por ejemplo, precipitación diferencial de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, electroforesis y HPLC, para nombrar unos pocos. 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 fresco a través del cultivo tridimensional, el producto biológico se elimina del cultivo por lavado y luego se puede aislar del flujo de salida, como se indicó anteriormente.

[0090] Alternativamente, un producto biológico de interés puede permanecer dentro de la célula y, por lo tanto, su recogida puede requerir que las células se lisen, como se describió anteriormente. El producto biológico puede purificarse utilizando una o más de las técnicas enumeradas anteriormente.

[0091] En otras realizaciones, la invención utiliza medio acondicionado de UTC cultivado para uso *in vitro* e *in vivo* como se describe a continuación. El uso del medio condicionado UTC permite que los factores tróficos beneficiosos secretados por el UTC se usen alogénicamente en un paciente sin introducir células intactas que puedan desencadenar 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.

[0092] El medio acondicionado preparado a partir de poblaciones de células derivadas del cordón umbilical se puede usar como tal, se concentra adicionalmente, por ejemplo, mediante ultrafiltración o liofilización, o incluso se seca, se

purifica parcialmente, se combina con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica, o combinado con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo, composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. El medio acondicionado puede usarse *in vitro* o *in vivo*, solo o combinado con células vivas autólogas o singénicas, por ejemplo. El medio acondicionado, si se introduce *in vivo*, puede introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o de forma remota para proporcionar crecimiento celular o factores tróficos necesarios a un paciente.

[0093] En otra realización, se prepara, recoge y utiliza una matriz extracelular (ECM) producida cultivando el UTC en sustratos líquidos, sólidos o semisólidos como alternativa al implante de células vivas en un sujeto que necesita reparación o reemplazo tisular. El UTC se cultiva *in vitro*, en un marco tridimensional como se describe en otra parte de este documento, 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 posterior, por ejemplo, como una preparación inyectable. Para lograr esto, las células en el marco se eliminan y cualquier residuo celular se elimina 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 se puede sumergir en agua destilada estéril para que las células estallen en respuesta a la presión osmótica.

[0094] Una vez que se han destruido las células, las membranas celulares pueden romperse y los restos celulares pueden eliminarse por tratamiento con un enjuague detergente suave, tal como EDTA, 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. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, hialuronidasa, dispasa, proteasas y nucleasas. Los ejemplos de detergentes incluyen detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, alcohol de poliéter de alquilarilo (TRITON X-100), octilfenoxi polietoxi-etanol (Rohm and Haas, Philadelphia, PA), BRIJ-35, un éter de laurilo de polietoxietanol (Atlas Chemical Co., San Diego, Calif), polisorbato 20 (TWEEN 20), un monolaurato de polietoxietanol sorbitán (Rohm and Haas, Philadelphia, PA), éter de laurilo de polietileno (Rohm and Haas, Philadelphia, PA); y detergentes iónicos tales como dodecilsulfato de sodio, alcoholes alifáticos superiores sulfatados, alcanos sulfonados y alquilarenos sulfonados que contienen de 7 a 22 átomos de carbono en una cadena ramificada o no ramificada.

[0095] La recogida del ECM puede realizarse de varias formas, dependiendo al menos en parte de si el nuevo tejido se ha formado sobre un marco tridimensional que es biodegradable o no biodegradable, como en el caso de los metales. Por ejemplo, si el marco no es biodegradable, el 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.

[0096] Si el marco es biodegradable, el ECM se puede recoger, por ejemplo, permitiendo que el marco se degrade o se disuelva en la solución. Alternativamente, si el marco biodegradable está compuesto de un material que puede inyectarse junto con el ECM, el marco y el ECM se pueden procesar en su totalidad para inyección posterior. Alternativamente, el ECM puede eliminarse del marco biodegradable mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la recogida de ECM a partir de un marco no biodegradable. Todos los procesos de recolección están diseñados preferiblemente para no desnaturalizar el ECM.

[0097] Después de que se ha recogido, el ECM puede procesarse adicionalmente. Por ejemplo, el ECM se puede homogeneizar a partículas finas usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como mediante sonicación, de modo que pueda pasar a través de una aguja quirúrgica. Los componentes del ECM también se pueden reticular, si se desea, mediante irradiación gamma. Preferiblemente, el ECM se puede irradiar entre 0,25 a 2 megaradios para esterilizar y reticular el ECM. La reticulación química usando agentes que son tóxicos, tales como el glutaraldehído, es posible pero no generalmente preferida.

[0098] Las cantidades y/o proporciones de proteínas, tales como los diversos tipos de colágeno presentes en la ECM, se pueden ajustar mezclando la ECM producida por las células de la invención con ECM de uno o más tipos de células diferentes. Además, las sustancias biológicamente activas como las proteínas, los factores de crecimiento y/o las drogas se pueden incorporar al ECM. Ejemplos de sustancias biológicamente activas incluyen factores de crecimiento tisular, tales como TGF-beta, y similares, que promueven la cicatrización y la reparación del tejido en el sitio de la inyección. Dichos agentes adicionales se pueden utilizar en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en la presente memoria, por ejemplo, con lisados celulares completos, fracciones celulares solubles, o componentes y productos purificados adicionales producidos por el UTC.

[0099] En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que utilizan UTC, poblaciones UTC, componentes y productos de UTC en diversos métodos para el tratamiento de lesiones o daños causados por un episodio isquémico periférico. Ciertas realizaciones abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas (UTC solo o mezclado con otros tipos de células). Otras realizaciones abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares UTC (por ejemplo, lisados celulares, fracciones celulares solubles, medio acondicionado, ECM o componentes de cualquiera de los anteriores) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por el UTC o mediante modificación genética, medio acondicionado de cultivo UTC). Los componentes UTC y los productos que se pueden usar en la presente invención

se describen en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631 y 2005/0054098, y se incorporan aquí como referencia. En cualquier caso, la composición farmacéutica puede comprender además otros agentes activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores miotróficos o fármacos miorregerativos o mioprotectores conocidos en la técnica.

[0100] Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas UTC típicamente se formulan como líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, andamios y similares, según sea apropiado para la ingeniería de tejidos vasculares o pulmonares). Las composiciones líquidas se formulan para la administración mediante cualquier ruta aceptable conocida en la técnica para lograr el suministro de células vivas a los tejidos vasculares o pulmonares diana. Típicamente, estos incluyen inyección o infusión, ya sea de manera difusa, o dirigida al sitio de lesión pulmonar, daño o angustia, por una vía de administración que incluye, pero no se limita a, administración intramuscular, intravenosa o intraarterial a través de jeringas con agujas y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

[0101] Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas en un vehículo semisólido o sólido se formulan típicamente para la implantación quirúrgica en el sitio de lesión, daño o angustia pulmonar. Se apreciará que las composiciones líquidas también se pueden administrar mediante procedimientos quirúrgicos. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas semisólidas o sólidas pueden comprender geles semipermeables, retículos, armazones celulares y similares, que pueden ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede ser deseable o apropiado secuestrar las células exógenas de su entorno, pero permitir que las células secreten y administren moléculas biológicas (por ejemplo, factores miotróficos, factores angiogénicos o factores de reclutamiento de células progenitoras endoteliales) al tejido de pulmón circundante o células vasculares. En estas realizaciones, las células pueden formularse como implantes autónomos que comprenden un UTC vivo o una población celular que comprende un UTC rodeado por una barrera permeable selectivamente no degradable que separa físicamente las células trasplantadas del tejido del huésped. Tales implantes a veces se denominan "inmunoprotectores", ya que tienen la capacidad de evitar que las células inmunes y macromoléculas maten las células trasplantadas en ausencia de inmunosupresión inducida farmacológicamente.

[0102] En otras realizaciones, se utilizan diferentes variedades de geles y redes degradables para las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, los materiales degradables particularmente adecuados para formulaciones de liberación sostenida incluyen polímeros biocompatibles, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y similares.

[0103] En otras realizaciones, puede ser deseable o apropiado administrar las células en un armazón o matriz biodegradable, preferiblemente biorreabsorbible o bioabsorbible. Estos biomateriales, típicamente tridimensionales, contienen las células vivas unidas al andamio, dispersas dentro del andamio o incorporadas en una matriz extracelular atrapada en el andamio. Una vez implantados en la región objetivo del cuerpo, estos implantes se integran con el tejido del huésped, en donde las células trasplantadas se establecen gradualmente. (Véase, por ejemplo, Tresco, P A, y col., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2000; 42:3-27; véase también, Hutmacher, D W, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 2001; 12: 107-174).

[0104] La matriz biocompatible puede estar compuesta de polímeros biodegradables naturales, sintéticos o naturales modificados, que incluyen homopolímeros, copolímeros y polímeros de bloques, así como combinaciones de los mismos. Se observa que un polímero generalmente se nombra en función del monómero del que se sintetiza.

[0105] Los ejemplos de polímeros biodegradables adecuados o clases de polímeros incluyen fibrina, colágeno, elastina, gelatina, vitronectina, fibronectina, laminina, trombina, poli(aminoácido), celulosa oxidada, tropoelastina, seda, ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos, proteínas, polinucleótidos, matrices de membrana basal reconstituida, almidones, dextranos, alginatos, hialuron, quitina, quitosana, agarosa, polisacáridos, ácido hialurónico, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), polietilenglicol, tejido desceldularizado, péptidos autoensamblantes, polipéptidos, glicosaminoglicanos, sus derivados y mezclas de los mismos. Tanto para el ácido glicólico como para el ácido láctico, típicamente se prepara un dímero cíclico intermedio y se purifica antes de la polimerización. Estos dímeros intermedios se llaman glicólido y lactida, respectivamente. Otros polímeros biodegradables útiles o clases de polímeros incluyen, sin limitación, poliésteres alifáticos, poli(oxalatos de alquileño), policarbonatos derivados de tirosina, poliiminocarbonatos, poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amino, poli(fumarato de propileno), polidioxanonas, policarbonatos, polioxalatos, poli(alfahidroxiácidos), poli(ésteres), poliuretano, poli(éster uretano), poli(éter uretano), polianhidridos, 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, poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico)/copolímeros de polietilenglicol, copolímeros de poliuretano y poli(ácido láctico), copolímeros de alfa-aminoácidos, copolímeros de alfa-aminoácidos y ácido caproico, copolímeros de glutamato de alfa-bencilo y polietilenglicol, copolímeros de succinato y poli(glicoles), polifosfaceno, poli(hidroxicalcatoos) y mezclas de los mismos. Sistemas binarios y ternarios también están contemplados.

[0106] En general, un polímero biodegradable adecuado para uso al configurarse la matriz deseablemente de modo que: (1) tenga propiedades mecánicas que son adecuadas para la aplicación prevista; (2) permanezca lo suficientemente intacto hasta que el tejido haya crecido y se haya cicatrizado; (3) no invoque una respuesta inflamatoria o tóxica; (4) se metabolice en el cuerpo después de cumplir su propósito; (5) se procese fácilmente en el producto final deseado a formar; (6) demuestre una vida útil aceptable; y (7) se esterilice fácilmente.

[0107] En un aspecto de la invención, el polímero biocompatible utilizado para formar la matriz está en forma de un hidrogel. En general, los hidrogeles son materiales poliméricos reticulados que pueden absorber más del 20% de su peso en agua mientras que mantienen una estructura tridimensional distinta. Esta definición incluye polímeros reticulados en seco que se hincharán en entornos acuosos, así como también materiales hinchados con agua. Una serie de polímeros hidrófilos se pueden reticular para producir hidrogeles, ya sea el polímero de origen biológico, semisintético o totalmente sintético. El hidrogel puede producirse a partir de un material polimérico sintético. Tales polímeros sintéticos se pueden adaptar a un rango de propiedades y uniformidad de lote a lote predecible, y representan una fuente confiable de material que generalmente está libre de dificultades de inmunogenicidad. Las matrices pueden incluir hidrogeles formados a partir de péptidos autoensamblables, tales como los discutidos en la patente de EE.UU. N^{os} 5.670.483 y 5.955.343, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0160471, y Solicitud PCT N° WO 02/062969.

[0108] Las propiedades que hacen que los hidrogeles sean valiosos en las aplicaciones de suministro 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. Dado que la resistencia mecánica de un gel disminuye en proporción directa al grado de hinchamiento, también está dentro de la contemplación de la presente invención que el hidrogel se pueda unir a un sustrato de modo que el sistema compuesto mejore la resistencia mecánica. En algunas realizaciones, el hidrogel se puede impregnar dentro de un sustrato poroso, para obtener la resistencia mecánica del sustrato, junto con las propiedades de administración útiles del hidrogel.

[0109] Los ejemplos no limitantes de almacén o matriz (a los que a veces se hace referencia colectivamente como "almacén") que se pueden usar en la presente invención incluyen estructuras textiles tales como tejidos, trenzas, mallas, telas no tejidas y tejidos combados; espumas porosas, espumas semiporosas, películas o láminas perforadas, micropartículas, perlas y esferas y estructuras compuestas que son una combinación de las estructuras anteriores. Las esteras no tejidas pueden formarse, por ejemplo, usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), vendido con las suturas de marca VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procesos tales como liofilización, como se describe en la patente de EE.UU. N° 6.355.699, también se puede utilizar. También pueden usarse hidrogeles tales como péptidos de autoensamblaje (por ejemplo, RAD 16). Las redes degradables formadoras *in situ* también son adecuadas para uso en la invención. (Véase, por ejemplo, Anseth, KS y col., J. Controlled Release, 2002; 78: 199 - 209; Wang, D. y col., Biomaterials, 2003; 24: 3969 - 3980; publicación de patente de Estados Unidos 2002/0022676). Estos materiales de formación *in situ* se formulan como fluidos adecuados para inyección, luego se pueden inducir para formar un hidrogel por una variedad de medios tales como cambio de temperatura, pH y exposición a la luz *in situ* o *in vivo*.

[0110] En otra realización, el almacén 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 transforma en un fieltro utilizando técnicas estándar de procesamiento de textiles que consisten en rizado, corte, cardado y punzonado. En otra realización, las células se siembran en armazones de espuma que pueden ser estructuras compuestas.

[0111] En muchas de las formas de realización mencionadas anteriormente, la estructura se puede moldear en una forma útil, tal como la de un vaso sanguíneo. Además, se apreciará que UTC se puede cultivar en dispositivos quirúrgicos o implantables preformados, no degradables, por ejemplo, de una manera correspondiente a la utilizada para preparar bobinas endovasculares de GDC que contienen fibroblastos, por ejemplo. (Marx, WF, y col., Am. J. Neuroradiol, 2001; 22: 323-333).

[0112] La matriz, el almacén o el dispositivo se pueden tratar antes de la inoculación de las células para mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación, las matrices de nylon se pueden tratar con ácido acético 0,1 molar y se pueden incubar en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nailon. El poliestireno se puede tratar de manera similar con ácido sulfúrico. Las superficies externas de un almacén también pueden modificarse para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, como el revestimiento con plasma del almacén o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (p. ej., sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), materiales genéticos como citoquinas y factores de crecimiento, una matriz celular y/o otros materiales, incluidos, pero sin limitarse a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y encías vegetales, entre otros factores que afectan la supervivencia y diferenciación celular.

[0113] Los marcos que contienen UTC 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 subconfluencia o la confluencia, se pueden extraer del cultivo y se pueden inocular en el marco. Los factores de crecimiento pueden agregarse al medio de cultivo antes, durante o después de la inoculación de las células para desencadenar 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 el mismo, o de manera que se reduzca el riesgo de rechazo del implante. Por lo tanto, uno o más compuestos biológicamente activos, que incluyen, pero no se limitan a, compuestos antiinflamatorios, inmunosupresores o factores de crecimiento, pueden añadirse al marco para liberación local.

[0114] Un UTC, partes de un UTC, o poblaciones de células que comprenden un UTC, o componentes de o productos producidos por un UTC, se pueden usar en una variedad de formas para apoyar y facilitar la reparación, regeneración y mejora de células pulmonares. y tejidos, para mejorar el flujo sanguíneo, y para estimular y/o apoyar la angiogénesis, especialmente en pacientes con enfermedad pulmonar. Tales utilidades abarcan métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

[0115] En una realización, como se discutió anteriormente, el UTC puede cultivarse *in vitro* para producir productos biológicos que son producidos naturalmente por las células o producidos por las células cuando se inducen a diferenciarse en tejido pulmonar o producidos por las células a través de modificación genética. Por ejemplo, se descubrió que TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC e IL-8 se secretaban a partir de células derivadas de ombligo cultivadas en medio de crecimiento. (Véase Ejemplos). Además, los factores UTC para el progenito endotelial o el reclutamiento celular tales como FGF, SDF-1, EPO, G-CSF, estatinas, estrógenos, PPAR-γ y C-X-CR4 pueden producirse y pueden secretarse en el medio de crecimiento. Es probable que otros factores tróficos, aún no detectados o no examinados, del uso en el tejido pulmonar o reparación vascular y regeneración, sean producidos por la UTC y posiblemente secretados en el medio.

[0116] A este respecto, otra realización de la invención presenta el uso del UTC para la producción de medio acondicionado, ya sea a partir de un UTC indiferenciado o de un UTC incubado en condiciones que estimulan la diferenciación en un tejido pulmonar o linaje vascular. Tales medios acondicionados se contemplan para su uso en cultivo *in vitro* o *ex vivo* de células precursoras de tejido pulmonar, o *in vivo* para soportar células trasplantadas que comprenden poblaciones homogéneas de UTC o poblaciones heterogéneas que comprenden un UTC y tejido pulmonar o progenitores vasculares, o para reclutar células progenitoras endoteliales al sitio de lesión pulmonar, por ejemplo.

[0117] Otra realización más comprende el uso de lisados de células UTC, fracciones celulares solubles o componentes de los mismos, o ECM o componentes de los mismos, para una variedad de propósitos. Como se mencionó anteriormente, algunos de estos componentes pueden usarse en composiciones farmacéuticas. En otras realizaciones, un lisado celular o ECM se usa para recubrir o tratar 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 contactados en el curso de tales tratamientos. En algunas realizaciones preferidas, tales preparaciones preparadas a partir de un UTC comprenden FGF y HGF.

[0118] En otra realización, un UTC se usa ventajosamente en cocultivos *in vitro* para proporcionar soporte trófico a otras células, en particular, células de tejido pulmonar, por ejemplo, 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 cocultivo, puede ser deseable que el UTC y las otras células deseadas se cultiven conjuntamente en 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, el UTC puede crecer primero hasta la confluencia, y luego servirá como sustrato para el segundo tipo de célula deseado en cultivo. En esta última realización, las células pueden estar además separadas físicamente, por ejemplo, mediante una membrana o dispositivo similar, de modo que el otro tipo de célula puede eliminarse y usarse por separado, siguiendo el período de cocultivo. El uso del UTC en el cocultivo para promover la expansión y diferenciación del tejido pulmonar o de los tipos de células vasculares puede ser aplicable en investigación y en áreas clínicas/terapéuticas. Por ejemplo, los cocultivos UTC se pueden utilizar para facilitar el crecimiento y la diferenciación del tejido pulmonar, por ejemplo, músculo liso vascular, pericitos o células endoteliales vasculares en cultivo, para fines de investigación básica o para su uso en ensayos de selección de fármacos, por ejemplo. Los cocultivos UTC también se pueden utilizar para la expansión *ex vivo* de, por ejemplo, progenitores de músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular para su posterior administración con fines terapéuticos. El tejido pulmonar, por ejemplo, músculo liso vascular, pericito o células progenitoras del endotelio vascular, puede ser cosechado de un individuo, expandirse *ex vivo* en cocultivo con UTC, y luego devuelto a ese individuo (transferencia autóloga) u otro individuo (singénico o transferencia alogénica). En estas realizaciones, se apreciará que, después de la expansión *ex vivo*, la población mixta de células que comprende UTC y tejido pulmonar, por ejemplo, progenitores de músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular, podría administrarse a un paciente que necesitara tratamiento. Alternativamente, en situaciones donde la transferencia autóloga es apropiada o deseable, las poblaciones de células cocultivadas pueden separarse físicamente en cultivo, permitiendo la eliminación del tejido pulmonar autólogo, por ejemplo músculo liso vascular, o progenitores de endotelio vascular, para la administración al paciente.

[0119] Como se describe en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631, 2005/0054098 y 2005/0058630, UTC, y sus componentes y productos, se ha demostrado que se trasplantan eficazmente en el cuerpo y mejoran el flujo de la sangre y reducen la necrosis tisular en un modelo animal aceptado. Esos hallazgos, junto con los descubrimientos expuestos en la presente invención, apoyan las realizaciones preferidas de la invención, en donde el UTC se usa en terapia celular para tratar lesión pulmonar o daño reparando o regenerando tejido pulmonar y/o tejido vascular en un paciente con un pulmón dañado, o mejorando el flujo sanguíneo o estimulando y/o apoyando la angiogénesis en un paciente con daño pulmonar. En una realización, el UTC se trasplanta a una ubicación diana en el cuerpo, especialmente en o proximal a la ubicación del daño pulmonar, donde el UTC puede diferenciarse en uno o más fenotipos de tejido pulmonar, por ejemplo, músculo liso vascular, pericito, o fenotipos de endotelio vascular, el UTC puede proporcionar soporte trófico para tejido pulmonar, por ejemplo células de músculo liso vascular, pericito o progenitores de células endoteliales vasculares y/o células de tejido pulmonar. In situ, el UTC puede producir factores para reclutar células progenitoras endoteliales en el sitio de la lesión pulmonar, o el UTC puede ejercer un efecto beneficioso en dos o más de esos modos, entre otros. El UTC secreta factores tróficos que incluyen, entre otros, GFGFm, IL-6, IL-8, HGF, FCI-I, TPO y similares. El UTC puede ayudar en el reclutamiento de células progenitoras vasculares tales como angioblastos para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos.

[0120] El UTC puede ejercer efectos tróficos en el cuerpo del paciente al que se administran. Por ejemplo, el UTC puede ejercer efectos tróficos sobre células de tejido pulmonar, por ejemplo, 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 tales células. El UTC también puede inducir la migración de células en el cuerpo del paciente al que se administran. Dicha migración puede facilitar la reparación, regeneración y tratamiento de enfermedades pulmonares, trastornos y/o lesiones, tales como EPOC, LPA, SDRA y fibrosis pulmonar. Por ejemplo, un UTC administrado en o cerca de un sitio de daño pulmonar puede inducir la migración de las células al sitio del daño pulmonar para reparar, regenerar o tratar el tejido enfermo y su entorno. El UTC así administrado puede inducir la migración de células de tejido pulmonar, por ejemplo, células de músculo liso vascular, células endoteliales vasculares, pericitos o células progenitoras de las mismas. En realizaciones preferidas, el UTC induce la migración de células endoteliales vasculares y/o células progenitoras del endotelio vascular al sitio, o al menos cerca del sitio del daño pulmonar. En algunas realizaciones, la migración es inducida o soportada por FCF y/o HGF, preferiblemente FCF y HGF expresados por el UTC. Las preparaciones preparadas a partir del UTC, que incluyen lisados celulares, fracciones subcelulares, productos y similares, también pueden usarse para tratar enfermedades, trastornos y/o lesiones pulmonares. Dichas preparaciones pueden formularse con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como los descritos y ejemplificados en la presente memoria, y administrarse a pacientes en cantidades eficaces para tratar enfermedades, trastornos y/o lesiones pulmonares. En realizaciones preferidas, las preparaciones preparadas a partir del UTC comprenden FCF y HGF.

[0121] Las realizaciones específicas de la invención están dirigidas a la reparación directa, la regeneración o la sustitución de, o el soporte de la reparación, regeneración o reemplazo de, vasos sanguíneos para el tratamiento de lesión o daño pulmonar.

[0122] El UTC puede administrarse solo (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. Como se describió anteriormente, el UTC se puede administrar como se formuló en una preparación farmacéutica con una matriz o andamio, o con vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables. Cuando el UTC se administra con otras células, se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente con las otras células (antes o después de las otras células). Las células que pueden administrarse junto con UTC incluyen, entre otras, miocitos, células de tejido pulmonar, células progenitoras de músculo esquelético, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales vasculares o células progenitoras de endotelio vascular, y/u otras células madre multipotentes o pluripotentes. Las células de diferentes tipos se pueden mezclar con el UTC inmediatamente o poco antes de la administración, o se pueden cultivar conjuntamente durante un período de tiempo antes de la administración.

[0123] El UTC puede administrarse con otros fármacos beneficiosos o moléculas biológicas, u otros agentes activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores angiogénicos o fármacos mioregenerativos o mioprotectores como se conoce en la técnica. Cuando el UTC se administra con otros agentes, se pueden administrar juntos en una única composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (antes o después de la administración de los otros agentes). Los otros agentes pueden ser parte de un régimen de tratamiento que comienza antes del trasplante y continúa durante el transcurso de la recuperación, o puede iniciarse en el momento del trasplante, o incluso después del trasplante, según lo considere un médico experto en la materia.

[0124] En una realización, el UTC se administra como células indiferenciadas, es decir, cultivadas en medio de crecimiento. Alternativamente, el UTC puede administrarse después de la exposición en cultivo a condiciones que estimulen la diferenciación hacia un fenotipo de tejido pulmonar deseado, por ejemplo, músculo liso vascular, pericito o fenotipos de endotelio vascular.

[0125] Las células de la invención pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, administrarse (por ejemplo, por

medio de un catéter, jeringa, derivación, stent, microcatéter o bomba), o administrarse de otra manera directa o indirectamente al sitio de la lesión pulmonar, daño o angustia. Las rutas de administración de las células de la invención, o composiciones de las mismas, incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratecal, intracisternal, o mediante jeringas con agujas o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

[0126] Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en una ubicación 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 pulmonar afectado (por ejemplo, a lo largo de un área difusamente afectada, tal como sería el caso para LPA o SDRA difuso). La migración del UTC puede guiarse por señales químicas, factores de crecimiento o calpaínas.

[0127] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical, o las composiciones y/o matrices que comprenden las células derivadas de tejido de cordón umbilical, se pueden administrar al sitio mediante un microcatéter, intracateterización o mediante una minibomba. El excipiente o vehículo puede ser cualquiera de los que se sabe que son farmacéuticamente aceptables para administración a un paciente, particularmente localmente en el sitio que se inducirá la diferenciación celular. Los ejemplos incluyen medios líquidos, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbeccos (DMEM), solución salina estéril, solución salina tamponada con fosfato estéril, medio de Leibovitz (L15, Invitrogen, Carlsbad, California), dextrosa en agua estéril y cualquier otro líquido fisiológicamente aceptable.

[0128] Otras formas de realización abarcan métodos para tratar lesiones o daños pulmonares administrando composiciones terapéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y componentes celulares UTC (por ejemplo, lisados celulares o componentes de los mismos) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por el UTC o mediante modificación genética, medio condicionado del cultivo UTC), o medio de crecimiento UTC o productos purificados a partir del medio de crecimiento. En realizaciones preferidas, los factores biológicos son FCF y HGF. Estos métodos pueden comprender además la administración de otros agentes activos, tales como factores de crecimiento, factores angiogénicos o fármacos mioregenerativos o mioprotectores conocidos en la técnica.

[0129] Las formas de dosificación y los regímenes para administrar el UTC o cualquiera de las otras composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en este documento 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 dañino del pulmón, edad, sexo, peso corporal y condición médica general, y otros factores conocidos por los médicos. Por lo tanto, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica para administración a un paciente se determina por estas consideraciones como se conoce en la técnica.

[0130] Se ha demostrado que UTC no estimula PBMC alogénicas en una reacción de linfocitos mixtos. Por consiguiente, el trasplante alogénico, o incluso xenogénico, de UTC puede ser tolerado en algunos casos. En algunas realizaciones, el propio UTC proporciona un efecto inmunosupresor, evitando de ese modo el rechazo del huésped del UTC trasplantado. En tales casos, la inmunosupresión farmacológica durante la terapia celular puede no ser necesaria.

[0131] Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosupresionar 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 entregando las células en un dispositivo encapsulado, como se describió anteriormente. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, el UTC puede modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad, como se mencionó anteriormente.

[0132] La supervivencia del UTC trasplantado en un paciente vivo puede determinarse mediante el uso de una variedad de técnicas de exploración, por ejemplo, exploración por tomografía axial computarizada (CAT o CT), imagen de resonancia magnética (MRI) o escaneos de tomografía por emisión de positrones (PET). La determinación de la supervivencia del trasplante también puede realizarse post mortem mediante la eliminación del tejido pulmonar o vascular, y su examen visual o a través de un microscopio. Alternativamente, las células se pueden tratar con tinciones que son específicas para células de tejido pulmonar, por ejemplo, células de músculo liso vascular, pericitos o células endoteliales vasculares. Las células trasplantadas también se pueden identificar mediante la incorporación previa de colorantes trazadores tales como microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, azul rápido, micropartículas férricas, bisbenzamida o productos del gen informador introducidos genéticamente, tales como beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

[0133] En otro aspecto, la invención proporciona kits que utilizan UTC, poblaciones de UTC, componentes y productos del UTC en diversos métodos para estimular y/o apoyar la angiogénesis, para mejorar el flujo sanguíneo, para regenerar, reparar y mejorar el tejido pulmonar. lesionado o dañado por un evento dañino para los pulmones, como se describe arriba. Cuando se usen para el tratamiento de daños o lesiones causadas por una enfermedad pulmonar, trastornos y/o lesiones u otro tratamiento programado, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, incluyendo al menos el UTC y un vehículo farmacéuticamente aceptable (líquido, semi-sólido o sólido). Los

kits también pueden incluir opcionalmente un medio de administración de las células, por ejemplo mediante inyección. Los kits pueden incluir instrucciones para el uso de las células. Los kits preparados para uso en el hospital de campo, como para uso militar, pueden incluir suministros de procedimiento completo, incluidos andamios de tejido, suturas quirúrgicas y similares, donde las células se van a utilizar junto con la reparación de lesiones agudas. Los kits para ensayos y métodos *in vitro* como se describen en este documento pueden contener uno o más de (1) un UTC o componentes o productos del UTC, (2) reactivos para practicar el método *in vitro*, (3) otras células o poblaciones celulares, como apropiado, e (4) instrucciones para conducir el método *in vitro*.

[0134] Los siguientes ejemplos describen varios aspectos de las realizaciones de la invención en mayor detalle. Estos ejemplos están destinados a ilustrar adicionalmente aspectos de la invención descritos en el presente documento. Estos ejemplos no deben interpretarse para limitar el aspecto así ejemplificado.

EJEMPLO 1

Eficacia protectora pulmonar en un modelo de ratón de lesión aguda del pulmón inducida por hiperoxia

[0135] Este ejemplo ilustra la efectividad del UTC humano (hUTC) (el aislamiento y la caracterización de hUTC se pueden encontrar en los Ejemplos 5-15) para mejorar la reparación y regeneración pulmonar en un modelo de lesión pulmonar inducida por hiperoxia.

Cultivo de células umbilicales y aislamiento

[0136] Se prepararon células derivadas de cordón umbilical (UDC, hUTC) como se describe en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631 y 2005/0054098. Las células se cultivaron hasta el paso deseado y después se conservaron criogénicamente.

Modelo animal

[0137] Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra (de siete semanas de edad) de Ace Animals (Boyertown, PA). Inmediatamente antes de la inyección, hUTC se descongelaron a 37°C (baño de agua) y se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en 1mL de PBS. Las células se contaron usando un hemocitómetro. La viabilidad celular se determinó por exclusión con colorante azul tripán. Las células se reconstituyeron a una concentración de 1×10^6 células en 200 μ L de PBS.

[0138] El esquema del estudio se resume en la Tabla 1-1 a continuación. El día 0, las células (1×10^6 hUTC en 200 μ L de PBS) o vehículo PBS se administraron lentamente a ratones mediante inyección intravenosa de la vena de la cola usando una jeringa 1mL y una aguja de calibre 26 y los animales se expusieron al aire ambiente o 90% O₂. La exposición a 90% de O₂ se llevó a cabo mediante la colocación de los animales en una cámara de BioSpherix (BioSpherix, LTD, Lacona, NY) que ha sido preparado y se equilibró a 90% O₂ para LHR. Se proporcionó cuidado de soporte (soporte de calor y NutriCal) diariamente para estos animales. Las observaciones de los animales, la mortalidad, la supervivencia y el porcentaje de concentraciones de oxígeno para cada tanque se registraron dos veces al día. El día cuatro después del tratamiento, los animales se sacrificaron usando 50 mg/ml de Nembutal (pentobarbital).

Tabla 1-1. Diseño experimental.

Grupo de tratamiento	Tratamiento atmosférico	Tratamiento	Número de animales
1	Aire ambiental	PBS	12
2	90% O ₂	PBS	12
3	90% O ₂	1×10^6 hUTC	12

Análisis de proteína total de lavado broncoalveolar (BALF)

[0139] Para determinar la proteína total en cada muestra, se analizó BALF libre de células usando un ensayo de proteína BCA (Pierce). El análisis se completó utilizando el programa Softmax 4.0 y los datos se graficaron usando Graph Pad Prism Software.

Análisis de citocinas/quimioquinas de BALF y homogenados pulmonares

[0140] Para preparar BALF, se sacrificaron 6 animales por grupo de tratamiento y se lavaron los pulmones una vez con 1, 0 ml de PBS estéril (Invitrogen) y los tubos se colocaron en hielo húmedo. El BALF se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos y el fluido sobrenadante se eliminó y se usó para un análisis adicional.

[0141] Para preparar homogenados de pulmón, se sacrificaron 6 animales por grupo, se sometieron a perfusión corporal total con PBS y se diseccionaron los pulmones izquierdos y se colocaron en hielo en tubos Lysing Matrix D y luego se centrifugaron en un instrumento FastPrep a una velocidad de 4,0 durante 40 segundos.

[0142] Se determinaron los niveles de citocina/quimioquina tanto en BALF como en el sobrenadante de homogenato de pulmón usando un kit de perlas 22 multiplex de ratón (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron usando la máquina BioRad Bioplex. Los resultados fueron graficados y analizados usando GraphPad Prism Software.

Detección de células humanas

[0143] Se aisló ARN total de tejidos de ratón por Asuragen, Inc., de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la compañía. La pureza y la cantidad de muestras de ARN total se determinaron mediante lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm usando un espectrofotómetro UV NanoDrop ND-1000. La integridad del ARN se evaluó usando un bioanalizador Agilent.

[0144] Se usaron ensayos específicos del ser humano para el ARNm de GAPDH (Hs99999905_ml_GAPDH) para estimar el número de hUTC dentro del tejido de pulmón de ratón. Las muestras para el análisis cuantitativo de RT-PCR (qRT-PCR) usando TaqMan Assays® (Applied Biosystems) de tubo único fueron procesadas por Asuragen, Inc., de acuerdo con procedimientos estándar de operación de la empresa. Las diluciones de ARN total se transcribieron inversamente usando el TaqMan® High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante y en un volumen total de reacción de 20 microlitros por dilución. A continuación, se analizaron 50 ng de ADNc de entrada mediante PCR. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado en un termociclador ABI 7500 en tiempo real validado. Después de la incubación a 95°C durante 10 minutos, las muestras se amplificaron en 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, a continuación, 60°C durante 1 minuto. El número total de hUTC dentro de los pulmones del ratón se estimó basándose en una curva estándar generada analizando cantidades conocidas de ARN total de hUTC purificado.

Proteína Total BALF

[0145] La exposición a 90% de O₂ durante 4 días resultó en un aumento en el contenido de proteína total de BALF en comparación con los animales de control del aire ambiental (p <0,01, Figura 1, Tabla 1-2). Además, hubo una disminución estadísticamente significativa en la proteína BALF total en el grupo de tratamiento 90% O₂ hUTC en comparación con el grupo de tratamiento con 90% O₂ PBS (p <0,05).

Tabla 1-2. *Concentración total de proteína BALF:* la proteína total se midió usando el ensayo de proteína BCA de Pierce.

Grupo de tratamiento	Número de animal	Concentración de proteína BALF total (ug/dl)
1	1	401,89
1	2	1.006,68
1	3	660,67
1	4	494,49
1	5	1.432,64
1	6	76,23
Media:		678,77
Des. Est.		437,77

Grupo de tratamiento	Número de animal	Concentración de proteína BALF total (ug/dl)
2	1	1.701,60
2	2	1.438,46
2	3	1.197,13
2	4	2.823,95
2	5	4.482,76
2	6	3.174,32
Media:		2.469,70
Des. Est.		1.260,74

Grupo de tratamiento	Número de animal	Concentración de proteína BALF total (ug/dl)
3	1	984,87
3	2	691,20
3	3	1.172,41
3	4	893,28
3	5	695,56
3	6	1.359,95
Media:		966,21
Des. Est.		265,37

15 Análisis de Citoquina de Homogenado Pulmonar y BALF

[0146] Se observó una disminución estadísticamente significativa en el factor queratinocítico BALF (KC), citocina inducible por interferón gamma (IP-IO), interleucina 1 α (IL-1 α) y factor quimiotáctico monocotiledóneo homogenizado de pulmón -1 (MCP-1) en animales tratados con hUTC y expuestos al 90% de O₂ en comparación con los animales tratados con vehículo PBS y expuestos al 90% de O₂ (p <0,02). (Figuras 2a y 2b, Figuras 3 y 4).

Injerto de células humanas

[0147] El día cuatro, después del tratamiento, se sacrificaron los animales, se recogieron los pulmones y se aisló el ARN total para la detección de células humanas. Los resultados mostraron la presencia de hUTC dentro de los pulmones de los animales tratados con hUTC, pero ausente de los pulmones de los animales tratados con PBS (Tabla 1-3).

Tabla 1-3. Detección de células humanas. La presencia de hUTC dentro de los pulmones de ratón en el día cuatro después del tratamiento se determinó midiendo transcritos de ARNm de GAPDH específicos para humanos usando PCR en tiempo real. Los valores del umbral del ciclo (CT) menores que 34 indican que están presentes hUTC dentro del tejido pulmonar del ratón. No se detectaron transcritos de ARNm hUTC dentro del tejido pulmonar de ratón (Ausente). Se detectaron transcritos de ARNm de hUTC en el tejido pulmonar de ratón (presente).

Grupo de tratamiento	Valor CT medio	HUTC dentro del pulmón del ratón
1	36,1	Ausente
1	36,5	Ausente
2	34,9	Ausente
2	34,4	Ausente
3	26,2	Presente
3	29,6	Presente
3	26,6	Presente
3	26,9	Presente
3	26,1	Presente
3	26,5	Presente

[0148] Se evaluó el efecto de la administración profiláctica intravenosa de hUTC sobre el desarrollo de lesión pulmonar aguda inducida por hiperoxia en ratones. El nivel reducido de proteína total en el BALF, después de la administración de hUTC en ratones expuestos al 90% de O₂, sugiere que hUTC pudo reducir la fuga/edema vascular inducido por hiperoxia en el pulmón. Además, los datos mostraron que hUTC causó una reducción en los niveles de tres importantes quimiocinas que sugieren una reducción de la inflamación en el pulmón. Estos datos proporcionan evidencia de que hUTC podría ser un agente terapéutico importante para el tratamiento de la enfermedad pulmonar.

EJEMPLO 2

Eficacia terapéutica en un modelo de roedor de enfermedad pulmonar obstructiva crónica

[0149] Este ejemplo ilustra la efectividad de hUTC para mejorar la reparación y regeneración pulmonar en un modelo de roedor de lesión pulmonar inducida por humo de cigarrillo. Los datos demuestran el valor terapéutico de hUTC para el tratamiento preventivo de la EPOC.

Cultivo de células umbilicales y aislamiento

[0150] Se prepararon células derivadas de cordón umbilical (UDCs, hUTCs) como se describe en las Publicaciones

de Patente de los Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631 y 2005/0054098. Las células se cultivaron hasta el paso deseado y luego se conservaron criogénicamente.

Modelo animal

[0151] Se comprarán ratas SH sanas, machos, de 12 a 15 semanas de edad de Charles River Laboratories, Raleigh, NC. Cada cepa de rata se aleatorizará por peso corporal en tres grupos (Tabla 2-1). A continuación, las ratas SD quedarán expuestas al cuerpo entero al humo del tabaco (concentración total de partículas de 75-85 mg/m (3)) o aire ambiental filtrado durante 6 h/día durante 15 días (3 días/sem).

Preparación de dosis

[0152] El día 15, finalizará el tratamiento de humo y se administrará el vehículo hUTC o PBS. Inmediatamente antes de la inyección, hUTC se descongelará a 37°C (baño de agua), se lavará dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspenderá en 1 mL de PBS. Las células se contarán usando un hemocitómetro. La viabilidad celular se determinará por exclusión con colorante azul tripano. Las células se reconstituirán a las concentraciones apropiadas de células $1e^6$ y células $3e^6$ en 2 mL de PBS. Las células se administrarán lentamente a través de la inyección de la vena de la cola durante un intervalo de dos minutos.

[0153] Dos semanas después de las inyecciones en vehículo o hUTC, los animales se sacrificarán para recoger fluido de lavado broncoalveolar (BALF) (8 animales/grupo de tratamiento) y tejido pulmonar (8 animales/grupo de tratamiento).

Tabla 2-1. Diseño experimental.

Grupo de tratamiento	Atmósfera	Tiempo de administración	Tratamiento
1	Aire ambiental	0	PBS
2	Humo	0	PBS
3	Humo	0	$1e^6$ hUTC
4	Humo	0	$3e^6$ hUTC

Preparación de BALF

[0154] Para preparar BALF, se sacrificarán ocho animales por grupo de tratamiento y se lavarán los pulmones una vez con 1,0 mL de PBS estéril (Invitrogen) y se colocarán los tubos que contienen BALF fresco sobre hielo húmedo. El BALF se centrifugará a 1.000 rpm durante 5 minutos y el fluido sobrenadante se eliminará y se usará para un análisis posterior.

Análisis de citocinas BALF

[0155] Los niveles de citocina/quimioquina de BALF se determinarán usando un kit de perlas multiplex 22 de ratón (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron usando la máquina BioRad Bioplex. Los resultados se graficarán y analizarán utilizando GraphPad Prism Software.

Análisis de proteína total BALF

[0156] Para determinar la proteína total en cada muestra, se analizará BALF libre de células usando un ensayo de proteína BCA (Pierce). El análisis se completará con el programa Softmax 4.0 y los datos se representarán gráficamente utilizando Graph Pad Prism Software.

Histología

[0157] Los pulmones se recogerán de ocho animales por grupo de tratamiento. La mitad de cada pulmón se fijará con solución tampón neutra de formaldehído al 10% durante 24 horas, se deshidratará en una serie graduada de etanol, se incrustará en parafina y se cortará a 5 μ m. Las secciones de parafina se estabilizarán con hematoxilina-eosina (HE) y Masson para el análisis histopatológico. La mitad del pulmón restante se congelará instantáneamente y se procesará para detectar MPO y células humanas (véase a continuación).

Actividad de mieloperoxidasa (MPO)

[0158] Se homogeneizarán aproximadamente 200 mg de tejido pulmonar del lóbulo superior derecho en 20 mmol/l de tampón de fosfato de calcio (pH 7,4) y se ultracentrifugarán. La precipitación se conservará en -70°C con HTAB para la medición de MPO. La actividad de MPO luego será determinada.

Aislamiento de ARN

[0159] El ARN total se aislará de todo el tejido pulmonar congelado a presión por Asuragen, Inc., de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la compañía. La pureza y la cantidad de muestras de ARN total se determinarán mediante lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV. La integridad del ARN se evaluará utilizando un bioanalizador Agilent.

Detección de células humanas

[0160] Se usarán ensayos específicos para humanos para ARNm de GAPDH (Hs99999905_ml_GAPDH) para estimar el número de hUTC dentro del tejido de pulmón de ratón. Las muestras para el análisis cuantitativo de RT-PCR (qRT-PCR) usando TaqMan® Assays (Applied Biosystems) de tubo único serán procesadas por Asuragen, Inc., de acuerdo con procedimientos estándar de operación de la empresa. Las diluciones de ARN total se transcribieron inversamente utilizando el TaqMan® High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante y en un volumen total de reacción de 20 microlitros por dilución. Entonces se analizarán 50 ng de ADNc de entrada mediante PCR. Todas las amplificaciones se realizarán por triplicado en un termociclador ABI 7500 en tiempo real validado. Después de la incubación a 95°C durante 10 minutos, las muestras se amplifican en 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, a continuación, 60°C durante 1 minuto.

EJEMPLO 3

Efectos protectores pulmonares y antifibróticos en un modelo de roedor de fibrosis pulmonar

[0161] Este ejemplo ilustra la efectividad de hUTC para prevenir la fibrosis y mejorar la reparación y regeneración pulmonar en un modelo de roedor de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (BLM).

[0162] Cultivo y aislamiento de células umbilicales. Las células derivadas de cordón umbilical (UDC, hUTC) se prepararon como se describe en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos N^{os} 2005/0032209, 2005/0058631 y 2005/0054098. Las células se cultivaron hasta el paso deseado y luego se conservaron criogénicamente.

Modelo animal

[0163] Se obtendrán sesenta y cuatro ratas Sprague-Dawley adultas (200-250 g de peso corporal) y se dividirán al azar en cuatro grupos con dieciséis ratas en cada grupo. Los animales se perfundirán por vía intratraqueal con 5 mg/kg de BLM. Inmediatamente antes de la inyección, hUTC se descongeló a 37°C (baño de agua), se lavó dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendió en 1 mL de PBS. Las células se contarán usando un hemocitómetro. La viabilidad celular se determinará por exclusión con colorante azul tripano. Las células se reconstituirán a la concentración adecuada en 2 mL de PBS. Las células se administrarán lentamente a través de la inyección de la vena de la cola durante un intervalo de dos minutos. El diseño del estudio se resume en la Tabla 3-1 a continuación.

[0164] En los grupos de tratamiento hUTC, 0,1-x10⁶, 1 x 10⁶ o 3x10⁶ hUTC se inyecta en la vena de la cola doce horas después de la perfusión de BLM. El vehículo PBS solo será administrado de manera similar a los grupos de tratamiento de hUTC. Dos semanas después de las inyecciones de vehículo o hUTC, los animales se sacrificarán para recoger el líquido de lavado broncoalveolar (BALF) (8 animales/grupo de tratamiento) y el tejido pulmonar (8 animales/grupo de tratamiento).

Tabla 3-1. Diseño experimental.

Grupo de tratamiento	BLM (mg/kg)	Tratamiento
1	5	PBS
2	5	0,1e ⁶ hUTC
3	5	1e ⁶ hUTC
4	5	3e ⁶ hUTC

Preparación de BALF

[0165] Para preparar BALF, se sacrificarán ocho animales por grupo de tratamiento y se lavarán los pulmones una vez con 1,0 ml de PBS estéril (Invitrogen) y se colocarán los tubos que contienen BALF fresco sobre hielo húmedo. El BALF se centrifugará a 1000 rpm durante 5 minutos y el fluido sobrenadante se eliminará y se usará para un análisis posterior.

Análisis de citocinas BALF

[0166] Los niveles de citocina BALF/quemoquina se determinarán usando un kit de perlas multiplex 22 de ratón

(Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizarán usando la máquina BioRad Bioplex. Los resultados se graficarán y analizarán utilizando GraphPad Prism Software.

Análisis de proteína total BALF

[0167] Para determinar la proteína total en cada muestra, se analizará BALF libre de células usando un ensayo de proteína BCA (Pierce). El análisis se completará con el programa Softmax 4.0 y los datos se representarán gráficamente utilizando Graph Pad Prism Software.

Histología

[0168] Los pulmones se recogerán de ocho animales por grupo de tratamiento. La mitad de cada pulmón se fijará con solución tampón neutra de formaldehído al 10% durante 24 horas, se deshidratará en una serie graduada de etanol, se incrustarán en parafina y se cortarán a 5 µm. Las secciones de parafina se tiñerán con hematoxilina-eosina (HE) y Masson para el análisis histopatológico. La mitad del pulmón restante se congelará rápidamente y se procesará para la detección de células humanas (véase a continuación).

Detección de células humanas

[0169] El ARN total se aislará de todo el tejido pulmonar congelado rápidamente por Asuragen, Inc., de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la compañía. La pureza y la cantidad de muestras de ARN total se determinarán mediante lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm usando un espectrofotómetro UV NanoDrop ND-1000. La integridad del ARN se evaluará utilizando un bioanalizador Agilent.

[0170] Se usarán ensayos específicos de humanos para ARNm de GAPDH (Hs99999905_mi GAPDH) para estimar el número de hUTC dentro del tejido de pulmón de ratón. Las muestras para el análisis cuantitativo de RT-PCR (qRT-PCR) usando TaqMan® Assays (Applied Biosystems) de tubo único serán procesados por Asuragen, Inc., de acuerdo con procedimientos estándar de operación de la empresa. Las diluciones de ARN total se transcribieron inversamente utilizando el TaqMan® High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante y en un volumen total de reacción de 20 microlitros por dilución. Entonces se analizarán 50 ng de ADNc de entrada mediante PCR. Todas las amplificaciones se realizarán por triplicado en un termociclador ABI 7500 en tiempo real validado. Después de la incubación a 95°C durante 10 minutos, las muestras se amplifican en 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, a continuación, 60°C durante 1 minuto.

EJEMPLO 4

Eficacia protectora pulmonar en un modelo de roedor de enfisema inducido por elastasa

[0171] Este estudio demostrará la eficacia de hUTC administrado por vía intravenosa en el tratamiento, mejora y/o prevención del enfisema inducido por elastasa en un modelo de roedor.

[0172] Se anestesiaron ratones o ratas C57BL/6N con éter o inyección intraperitoneal de ketamina (90 mg/kg) y xilazina (1 mg/kg) y se les administrará por vía intranasal 0,3 o 1,2 unidades de elastasa pancreática porcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los ratones de control recibirán administración intranasal de solución salina sola.

[0173] De dos a veinticuatro horas después del tratamiento con elastasa, se administrarán concentraciones crecientes de células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC) mediante inyección en la vena de la cola. Como se describe en la Tabla 4.1, $0,1 \times 10^6$, 1×10^6 o 3×10^6 hUTC, reconstituido en vehículo PBS, se administrará en un volumen total de 200 µl. El vehículo PBS, sin hUTC se administrará de manera similar a los grupos de tratamiento de hUTC. Dos semanas después de las inyecciones en vehículo o hUTC, los animales serán sacrificados para recolectar muestras de tejido pulmonar y líquido de lavado broncoalveolar (BALF), que se almacenarán a -70°C antes del análisis.

Tabla 4.1. Diseño experimental.

Grupo de tratamiento	Tratamiento
1	PBS
2	$0,1 \times 10^6$ hUTC
3	1×10^6 hUTC
4	3×10^6 hUTC

Análisis BALF

[0174] Para preparar BALF, todos los animales se sacrificarán y los pulmones se lavarán una vez con 1, 0 ml de PBS estéril (Invitrogen) y los tubos se colocarán en hielo húmedo. El BALF se centrifugará a 1000 rpm durante 5

minutos y el fluido sobrenadante se eliminará y se usará para un análisis posterior.

[0175] Los niveles de citocina/quimiocina tanto en BALF como en el sobrenadante de homogenato de pulmón se determinarán usando un kit de perlas multiplex 22 de ratón (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron usando la máquina BioRad Bioplex. Los resultados se graficarán y analizarán utilizando GraphPad Prism Software.

Análisis de proteína total BALF

[0176] Para determinar la proteína total en cada muestra, se analizará BALF libre de células usando un ensayo de proteína BCA (Pierce). El análisis se completará con el programa Softmax 4.0 y los datos se representarán gráficamente utilizando Graph Pad Prism Software.

Histología

[0177] Las muestras de tejido pulmonar se fijarán con solución tampón neutra de formaldehído al 10% durante 24 horas, se deshidratan en una serie graduada de etanol, se incrustan en parafina y se cortan a 5 µm. Las secciones de parafina se tiñerán con hematoxilina-eosina (H&E) y Masson para el análisis histopatológico.

Detección de células humanas

[0178] El ARN total se aislará de tejidos de ratón por Asuragen, Inc., de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la compañía. La pureza y la cantidad de muestras de ARN total se determinarán mediante lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm usando un espectrofotómetro UV NanoDrop ND-1000. La integridad del ARN se evaluará utilizando un bioanalizador Agilent.

[0179] Se usarán ensayos específicos de humanos para el ARNm de GAPDH (Hs99999905_ml GAPDH) para estimar el número de hUTC dentro del tejido de pulmón de ratón. Las muestras para el análisis cuantitativo de RT-PCR (qRT-PCR) usando TaqMan® Assays (Applied Biosystems) de tubo único serán procesadas por Asuragen, Inc., de acuerdo con procedimientos estándar de operación de la empresa. Las diluciones de ARN total se transcribieron inversamente utilizando el TaqMan® High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante y en un volumen total de reacción de 20 microlitros por dilución. Entonces se analizarán 50 ng de ADNc de entrada mediante PCR. Todas las amplificaciones se realizarán por triplicado en un termociclador ABI 7500 en tiempo real validado. Después de la incubación a 95°C durante 10 minutos, las muestras se amplifican en 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, a continuación, 60°C durante 1 minuto. El número total de hUTC dentro de los pulmones del ratón se estimará basándose en una curva estándar generada analizando cantidades conocidas de ARN total de hUTC purificado.

Proteína Total BALF

[0180] Se observará una disminución estadísticamente significativa en la concentración de proteína total de BALF en animales tratados con hUTC en comparación con animales tratados con control de vehículo. Además, es posible que se observe una acumulación significativa de neutrófilos en animales de control de PBS, pero se puede producir en grupos de tratamiento de hUTC.

Análisis de proteína de matriz extracelular/citoquina BALF

[0181] Se observará una disminución estadísticamente significativa en las citoquinas profetósicas y/o proinflamatorias en los animales tratados con hUTC en comparación con los animales tratados con control del vehículo. Además, la elastasa aumentará el contenido de ECM en el líquido de lavado broncoalveolar, un marcador de lesión pulmonar. Estos efectos se atenuarán con el tratamiento de hUTC.

Análisis histológico

[0182] El tratamiento con elastasa dará como resultado el desarrollo de áreas subpleurales de inflamación que abarcan una porción significativa del parénquima pulmonar. Además, se observará la pérdida de la arquitectura alveolar y bronquial normal, así como la vasculatura. La administración de hUTC poco después del desafío con elastasa reducirá la extensión de la inflamación y el daño dentro del pulmón, como lo demuestran las grandes áreas de tejido intacto con arquitectura alveolar normal.

Injerto de células humanas

[0183] Se detectarán células humanas dentro de los pulmones de roedores tratados con hUTC pero ausentes de animales tratados con vehículo PBS.

EJEMPLO 5

Aislamiento de células

[0184] Aislamiento de células umbilicales. Los cordones umbilicales se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA). Los tejidos se obtuvieron después de entregas normales. Los protocolos de aislamiento celular se realizaron asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar sangre y residuos, el cordón se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de penicilina a 100 unidades/mililitro, estreptomycin a 100 miligramos/mililitro y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro (Invitrogen Carlsbad, CA). Los tejidos fueron entonces disociados mecánicamente en 150 cm² placas de cultivo de tejido en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-baja glucosa o DMEM-alta glucosa; Invitrogen) hasta que el tejido se trocó en una pulpa fina. Los tejidos cortados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5 gramos de tejido por tubo).

[0185] El tejido se digirió luego en medio DMEM bajo en glucosa o DMEM alto en glucosa, cada uno conteniendo penicilina a 100 unidades/mililitro, estreptomycin a 100 miligramos/mililitro, anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro y las enzimas de digestión. En algunos experimentos se usó una mezcla de enzima de collagenasa y dispasa ("C:D") (collagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 Unidades/mililitro y dispasa (Invitrogen), 50 Unidades/mililitro, en DMEM-medio bajo de glucosa). En otros experimentos, se utilizó una mezcla de collagenasa, dispasa e hialuronidasa ("C:D:H") (C:D:H = collagenasa, 500 Unidades/mililitro; dispasa, 50 Unidades/mililitro; y hialuronidasa (Sigma), 5 Unidades/mililitro, en DMEM-Baja glucosa). Los tubos cónicos que contienen el tejido, el medio y las enzimas de digestión se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 h.

[0186] Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se aspiró. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM: glucosa baja (Invitrogen), suero bovino fetal al 15 por ciento (v/v) (SBF, suero bovino fetal definido, lote n°AND18475, Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 100 unidades por mililitro, estreptomycin a 100 microgramos por mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos por mililitro (cada uno de Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un tamiz de células BD FALCON de nailon de 70 micrómetros (BD Biosciences, San Jose, CA). Se pasó un enjuagado adicional de 5 mililitros que comprendía medio de crecimiento a través del filtro. La suspensión celular se pasó entonces a través de un filtro de células de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences, San Jose, CA) y un aclarado de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

[0187] El filtrado se resuspendió en medio de crecimiento (volumen total 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

[0188] Después de la centrifugación final, se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento fresco. El número de células viables se determinó usando tinción con azul tripán. Las células se cultivaron a continuación en condiciones estándar.

[0189] Las células aisladas de tejidos del cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T-75 revestidos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento. Después de dos días, se aspiraron células gastadas y no adherentes de los matraces. Las células adherentes se lavaron con PBS tres veces para eliminar los restos y las células derivadas de la sangre. Después, las células se rellenaron con medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días desde el paso 0 al paso 1). En pasajes posteriores (del pasaje 1 al 2, etc.), las células alcanzaron una subfluencia (75-85 por ciento de confluencia) en 4-5 días. Para estos pasajes posteriores, las células se sembraron a 5.000 células/cm². Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con 5 por ciento de dióxido de carbono a 37°C.

[0190] En algunos experimentos, se aislaron células de tejidos posparto en DMEM-medio bajo en glucosa después de la digestión con LIBERASE (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3, Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) y hialuronidasa (5 unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue como se describió para otras digestiones de proteasas anteriores, sin embargo, se usó la mezcla de LIBERASA/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C:D o C:D:H. La digestión tisular con LIBERASE dio como resultado el aislamiento de las poblaciones celulares de los tejidos posparto que se expandieron fácilmente.

[0191] Se compararon los procedimientos para aislar células del cordón umbilical usando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión incluyeron: i) collagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) mezcla de collagenasa: dispasa (C:D); v) mezcla de collagenasa: hialuronidasa (C:H); vi) dispasa: mezcla de hialuronidasa (D:H); y vii) mezcla de collagenasa: dispasa: hialuronidasa (C:D:H). Se observaron diferencias en el aislamiento celular utilizando estas diferentes condiciones de digestión enzimática (Tabla 5-1).

[0192] Se hicieron otros intentos para aislar grupos de células del cordón umbilical por diferentes enfoques. En un caso, se cortó el cordón umbilical y se lavó con medio de crecimiento para desalojar los coágulos de sangre y el material gelatinoso. La mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de crecimiento se recogió y se centrifugó a

150 x g. El sedimento se resuspendió y se sembró en matraces recubiertos de gelatina en medio de crecimiento. A partir de estos experimentos, se aisló una población celular que se expandió fácilmente.

[0193] Las células también se han aislado a partir de muestras de sangre de cordón obtenidas de NDRI. El protocolo de aislamiento utilizado fue el de la solicitud de patente internacional PCT/US2002/029971 de Ho et al. Se mezclaron muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre de cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) con tampón de lisis (cloruro de amonio 155 milimolar esterilizado por filtro, bicarbonato de potasio 10 milimolar, EDTA 0,1 milimolar tamponado a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron en una proporción de 1:20 de sangre de cordón umbilical a tampón de lisis. La suspensión celular resultante se sometió a agitación vortical durante 5 segundos, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 x g). El sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contiene suero bovino fetal al 10 por ciento (Hyclone, Logan UT), glutamina 4 milimolar (Mediatech Herndon, VA), penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro (Gibco, Carlsbad, CA). Las células resuspendidas se centrifugaron (10 minutos a 200 x g), se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en matraces T75 (Corning, NY), matraces revestidos con laminina T75, o matraces recubiertos con fibronectina T175 (ambos Becton Dickinson, Bedford, MA).

[0194] Para determinar si las poblaciones celulares podían aislarse bajo diferentes condiciones y expandirse en una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células se digirieron en medio de crecimiento con o sin 0,001 por ciento (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), usando la combinación de enzimas C:D:H, de acuerdo con los procedimientos proporcionados anteriormente. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina a 100 unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro. En todas las condiciones probadas, las células se unieron y se expandieron bien entre el pasaje 0 y 1 (tabla 5-2). Se demostró que las células en las condiciones 5-8 y 13-16 proliferan bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se crioconservaron.

[0195] La combinación de C:D:H proporcionó el mejor rendimiento celular después del aislamiento y generó células que se expandieron durante muchas más generaciones en cultivo que las otras condiciones (Tabla 5-1). No se logró una población de células expansible usando colagenasa o hialuronidasa sola. No se intentó determinar si este resultado es específico de la colagenasa que se probó.

Tabla 5-1: Aislamiento de células del tejido del cordón umbilical usando diferentes combinaciones de enzimas

Digestión de enzima	Células aisladas	Expansión celular
Colagenasa	X	X
Dispasa	+ (>10 h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa:Dispasa	++ (<3 h)	++
Colagenasa:Hialuronidasa	++ (<3 h)	+
Dispasa:Hialuronidasa	+ (>10 h)	+
Colagenasa:Dispasa: Hialuronidasa	+++ (<3 h)	+++

Clave: + = bueno, ++ = muy bueno, +++ = excelente, X = sin éxito

[0196] Las células se unieron y se expandieron bien entre el pase 0 y 1 en todas las condiciones ensayadas para la digestión enzimática y el crecimiento (Tabla 5-2). Las células en las condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que fueron crioconservadas. Todas las células se crioconservaron para un análisis posterior.

Tabla 5-2: Aislamiento y expansión del cultivo de células posparto en diversas condiciones:

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

[0197] Las células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron mediante citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas por digestión enzimática.

[0198] Las preparaciones contenían glóbulos rojos y plaquetas. No se unieron células nucleadas y se dividieron durante las primeras 3 semanas. El medio se cambió 3 semanas después de la siembra y no se observó que las células se unieran y crecieran.

[0199] Podrían aislarse las poblaciones de células del tejido umbilical de manera eficiente usando la combinación enzimática collagenasa (una metaloproteasa), dispasa (proteasa neutra) y hialuronidasa (enzima mucolítica que descompone el ácido hialurónico). También se puede usar LIBERASE, que es una mezcla de collagenasa y una proteasa neutra. Blendzyme 3, que es collagenasa (4 unidades de Wunsch/gramo) y termolisina (1714 unidades de caseína/gramo), también se usó junto con hialuronidasa para aislar las células. Estas células se expandieron fácilmente a lo largo de muchos pasajes cuando se cultivaron en medio de expansión de crecimiento sobre plástico recubierto de gelatina.

[0200] Las células también se aislaron de la sangre residual en las cuerdas, pero no de la sangre del cordón umbilical. La presencia de células en los coágulos de sangre lavados del tejido, que se adhieren y crecen en las condiciones utilizadas, puede deberse a que las células se liberaron durante el proceso de disección.

EJEMPLO 6

Características de crecimiento de las células

[0201] El potencial de expansión celular de las células derivadas del ombligo se comparó con otras poblaciones de células madre aisladas. El proceso de expansión celular a la senescencia se conoce como el límite de Hayflick. (Hayflick, L, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1974; 22(1): 1-12; Hayflick, L, *Gerontologist*, 1974; 14 (1): 37 - 45).

[0202] Se revistieron matraces de plástico de cultivo tisular añadiendo 20 mililitros de gelatina al 2% (p/v) (Tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a un matraz T75 (Corning Inc., Corning, NY) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de gelatina, se añadieron 10 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y luego se aspiraron.

[0203] Para la comparación del potencial de expansión del crecimiento, se utilizaron las siguientes poblaciones de células; i) células madre mesenquimales (MSC, Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de tejido adiposo (Patente de Estados Unidos N° 6.555.374 B1; Solicitud de Patente de Estados Unidos US20040058412); iii) fibroblastos cutáneos dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); y iv) células

derivadas del ombligo. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina en medio de crecimiento. Para pases posteriores, los cultivos celulares se trataron de la siguiente manera. Después de la tripsinización, las células viables se contaron después de la tinción con azul tripán. La suspensión celular (50 microlitros) se combinó con azul tripán (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). Los números de células viables se estimaron usando un hemocitómetro.

[0204] Después del recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T 75 recubiertos de gelatina en 25 mililitros de medio de crecimiento fresco. Las células se cultivaron en una atmósfera estándar (5 por ciento de dióxido de carbono (v/v)) a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia, se pasaron; este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron la senescencia.

[0205] En cada pase, las células se tripsinizaron y se contaron. Se calcularon el rendimiento de células viables, duplicaciones de poblaciones [$\ln(\text{células finales/células iniciales})/\ln 2$], y tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de poblaciones). Para los fines de determinar la expansión celular óptima, se determinó el rendimiento celular total por pasaje multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales).

[0206] También se ensayó el potencial de expansión de las células almacenadas en el paso 10. Se utilizó un conjunto diferente de condiciones. Se probaron fibroblastos de piel dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD) y células derivadas de ombligo. Estas poblaciones de células se habían acumulado en el paso 10 previamente, habiéndose cultivado a 5.000 células/cm² en cada paso hasta ese punto. Se determinó el efecto de la densidad celular en las poblaciones celulares después de la descongelación celular en el paso 10. Las células se descongelaron en condiciones estándar y se contaron usando tinción con azul de tripano. Las células descongeladas se sembraron entonces a 1.000 células/cm² en medio de crecimiento. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces a la semana. Las células se pasaron a medida que alcanzaban aproximadamente el 85% de confluencia. Las células se pasaron posteriormente hasta la senescencia, es decir, hasta que no pudieron expandirse más. Las células se tripsinizaron y se contaron en cada pase. Se calculó el rendimiento celular, la duplicación de la población [$\ln(\text{células finales/células iniciales})/\ln 2$] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo)/duplicación de la población. El rendimiento celular total por pasaje se determinó multiplicando el rendimiento total para el pase anterior por el factor de expansión para cada pase (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales).

[0207] El potencial de expansión de cultivos de células derivadas de ombligo recién aisladas bajo condiciones de siembra de células bajas se ensayó en otro experimento. Las células derivadas del ombligo se aislaron como se describe en un ejemplo previo. Las células se sembraron a 1.000 células/cm² y se pasaron como se describió anteriormente hasta la senescencia. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se pasaron a medida que alcanzaban aproximadamente el 85% de confluencia. En cada pase, las células se tripsinizaron y se contaron mediante tinción con azul tripán. El rendimiento celular, la duplicación de la población [$\ln(\text{célula final/célula inicial})/\ln 2$] y el tiempo de duplicación (tiempo de cultivo/duplicación de la población) se calcularon para cada pase. El rendimiento celular total por pasaje se determinó multiplicando el rendimiento total para el pasaje anterior por el factor de expansión para cada pasaje (es decir, factor de expansión = célula final/inicial de la célula). Las células se cultivaron en matraces recubiertos con gelatina y sin gelatina.

[0208] Se ha demostrado que las bajas condiciones de cultivo celular O₂ pueden mejorar la expansión celular en ciertas circunstancias. (Véase, por ej., US20040005704). Con el fin de determinar si la expansión celular de las células derivadas de ombligo podría mejorarse mediante la alteración de las condiciones de cultivo celular, se cultivaron cultivos de células derivadas de ombligo en condiciones de bajo oxígeno. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en medio de crecimiento en matraces recubiertos con gelatina. Las células se cultivaron inicialmente en condiciones atmosféricas estándar a través del paso 5, momento en el que se transfirieron a condiciones de cultivo de bajo oxígeno (5% O₂).

[0209] En otros experimentos, las células se expandieron sobre placas recubiertas de laminina, recubiertas con laminina, recubiertas de fibronectina, recubiertas con colágeno, recubiertas de colágeno. Se ha demostrado que las culturas se expanden bien en estas diferentes matrices.

[0210] Las células derivadas de cordón umbilical se expandieron durante más de 40 pases generando rendimientos celulares de >1E17 células en 60 días. Por el contrario, las MSC y los fibroblastos se secieron después de <25 días y <60 días, respectivamente. Aunque tanto las células derivadas de tejido adiposo como las omentales se expandieron durante casi 60 días, generaron rendimientos celulares totales de 4.5E12 y 4.24E13 respectivamente. Por lo tanto, cuando se sembraron a 5.000 células/cm² en las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas de ombligo se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células cultivadas en las mismas condiciones (cuadro 6-1).

Tabla 6-1: Características de crecimiento para diferentes poblaciones celulares crecidas a la senescencia

Tipo de célula	Senescencia	Duplicaciones totales de población	Rendimiento (células totales)
MSC	24 d	8	4.72 E7
Célula derivada de adiposa	57 d	24	4.5 E12
Fibroblastos	53 d	26	2.82 E13
Umbilical	65 d	42	6.15 E17

[0211] Las células derivadas de fibroblastos y del cordón umbilical se expandieron durante más de 10 pases generando rendimientos celulares de células 1E11 en 60 días (Tabla 6-2). En estas condiciones, tanto los fibroblastos como las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical se adelantaron después de 80 días, completando >50 y >40 duplicaciones de población, respectivamente.

Tabla 6-2: Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células usando expansión de crecimiento de baja densidad desde el paso 10 hasta la senescencia

Tipo de célula (N° de paso)	Senescencia	Duplicaciones totales de población	Rendimiento (células totales)
Fibroblasto (P10)	80 días	43,68	2.59 E11
Umbilical (P10)	80 días	53,6	1.25 E14

[0212] Las células se expandieron bien en las condiciones de oxígeno reducido, sin embargo, el cultivo en condiciones de bajo oxígeno no parece tener un efecto significativo sobre la expansión celular para las células derivadas del posparto. Estos resultados son preliminares en el sentido de que cualquier conclusión final que se haga con respecto al efecto de la reducción de oxígeno se extraería mejor de los experimentos en células en crecimiento con poco oxígeno del aislamiento inicial. Las condiciones atmosféricas estándar ya han demostrado ser exitosas para cultivar un número suficiente de células, y no se requiere un cultivo de bajo oxígeno para el crecimiento de las células derivadas del posparto.

[0213] Las condiciones de la expansión de células actuales de cultivar células derivadas del cordón umbilical aisladas a densidades de aproximadamente 5.000 células/cm², en medio de crecimiento en matraces recubiertos de gelatina o no revestidos, bajo oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar grandes números de células en paso 11. Además, los datos sugieren que las células pueden expandirse fácilmente utilizando condiciones de cultivo de densidad inferior (por ejemplo 1.000 células/cm²). La expansión celular derivada del cordón umbilical en condiciones de bajo oxígeno también facilita la expansión celular, aunque todavía no se ha observado una mejora incremental en el potencial de expansión celular cuando se utilizan estas condiciones para el crecimiento. En la actualidad, se prefiere cultivar células derivadas de ombligo en condiciones atmosféricas estándar para generar grandes conjuntos de células. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo se alteran, la expansión celular derivada del ombligo también puede alterarse. Esta estrategia puede usarse para mejorar la capacidad proliferativa y diferenciadora de estas poblaciones de células.

[0214] En las condiciones utilizadas, mientras que el potencial de expansión de MSC y las células derivadas de tejido adiposo es limitado, las células derivadas del ombligo se expanden fácilmente a grandes números.

EJEMPLO 7

Crecimiento de células en medio que contiene D-valina

[0215] Se ha informado que el medio que contiene D-valina en lugar de la isoforma de L-valina normal se puede usar para inhibir selectivamente el crecimiento de células de tipo fibroblasto en cultivo. (Hongpaisan, J, *Cell Biol Int.*, 2000; 24: 1 - 7; Sordillo, LM, y col., *Cell Biol Int. Rep.*, 198 8; 12: 355 - 64). Se realizaron experimentos para determinar si las células derivadas del ombligo podrían crecer en medio que contiene D-valina.

[0216] Las células derivadas del ombligo (P5) y los fibroblastos (P9) se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T75 recubiertos con gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas, se eliminó el medio y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se reemplazó por un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (pedido especial Gibco), suero bovino fetal dializado al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), penicilina a 50 unidades/mililitro y estreptomycin a 50 miligramos/mililitro (Gibco)).

[0217] Las células derivadas de cordón umbilical y las células fibroblásticas sembradas en el medio que contiene D-valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en medio de crecimiento que contiene suero dializado. Las células de fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando de tamaño y cambiando de forma. Todas las

células murieron y finalmente se desprendieron de la superficie del matraz después de cuatro semanas. Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas de tejido del cordón umbilical requieren L-valina para el crecimiento celular y para mantener la viabilidad a largo plazo. La L-valina preferiblemente no se elimina del medio de crecimiento para células derivadas de tejido de cordón umbilical.

EJEMPLO 8

Análisis de cariotipo de células

[0218] Las líneas celulares usadas en terapia celular son preferiblemente homogéneas y están exentas de cualquier tipo de célula contaminante. Las células humanas utilizadas en la terapia celular deben tener un número normal (46) de cromosomas con estructura normal. Para identificar líneas celulares derivadas del ombligo que son homogéneas y libres de células de origen no umbilical, se analizaron cariotipos de muestras celulares.

[0219] Se cultivaron UTC del tejido posparto de un neonato masculino en medio de crecimiento. El tejido posparto de un neonato masculino (X,Y) se seleccionó para permitir la distinción entre las células derivadas de neonatos y las células derivadas de la madre (X,X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron al 80% de confluencia. Un matraz T25 que contenía células se llenó al cuello con medio de crecimiento. Las muestras se entregaron a un laboratorio de citogenética clínica por servicio de mensajería (el tiempo estimado de laboratorio a laboratorio es de una hora). El análisis de cromosomas fue realizado por el Centro de Genética Humana y Molecular en la New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células en metafase contadas, cinco se analizaron para el número de cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra de células se caracterizó como homogénea si se observaron dos cariotipos. Una muestra de células se caracterizó como heterogénea si se observaron más de dos cariotipos. Se contaron y analizaron células en metafase adicionales cuando se identificó un número de cariotipo heterogéneo (cuatro).

[0220] El personal de laboratorio de citogenética interpretó que todas las muestras de células enviadas para el análisis de cromosomas mostraban una apariencia normal. Tres de las dieciséis líneas celulares analizadas mostraron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) que indica la presencia de células derivadas tanto del origen neonatal como materno (Tabla 8-1). Cada una de las muestras de células se caracterizó como homogénea. (Tabla 8-1).

Tabla 8-1. Resultados de cariotipo de UTC.

Tejido	Paso	Células de metafase contadas	Células de metafase analizadas	Número de cariotipos	Cariotipo ISCN
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Umbilical	3	20	5	2	46, XX

[0221] El análisis cromosómico identificó el UTC derivado del ombligo cuyos cariotipos parecen normales tal como lo interpreta un laboratorio citogenético clínico. El análisis del cariotipo también identificó líneas celulares libres de células maternas, según lo determinado por cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 9

Evaluación de citometría de flujo de marcadores de superficie celular

[0222] La caracterización de proteínas de superficie celular o "marcadores" por citometría de flujo puede usarse para determinar la identidad de una línea celular. La consistencia de la expresión puede determinarse a partir de múltiples donantes y en células expuestas a diferentes procesos y condiciones de cultivo. Las líneas celulares posparto aisladas del ombligo se caracterizaron por citometría de flujo, proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

[0223] Las células se cultivaron en medio de crecimiento, en matraces de cultivo de tejidos T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta confluir. Las superficies de crecimiento de los matraces se recubrieron con gelatina incubando gelatina al 2% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

[0224] Las células adherentes en los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, MO) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de SBF en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se añadió anticuerpo al marcador de superficie celular de interés (véase a continuación) a 100 microlitros de suspensión celular y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a

4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento de calibración FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA).

5 **[0225]** Se usaron los siguientes anticuerpos contra marcadores de superficie celular.

Tabla 9-1: Anticuerpos utilizados en la caracterización de marcadores de superficie celular de CDU.

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

25 **[0226]** Las células derivadas de cordón umbilical se analizaron en los pasajes 8, 15 y 20.

[0227] Para comparar las diferencias entre los donantes, se compararon células derivadas de tejido de cordón umbilical de diferentes donantes entre sí.

30 **[0228]** Las células derivadas de cordón umbilical cultivadas en matraces recubiertos de gelatina también se compararon con células derivadas del ombligo cultivadas en matraces no revestidos.

[0229] Se compararon cuatro tratamientos usados para el aislamiento y la preparación de células. Células derivadas de tejido posparto por tratamiento con: 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispasa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispasa se compararon.

35 **[0230]** Las células derivadas del cordón umbilical en el pasaje 8, 15 y 20 analizadas por citometría de flujo expresaron CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicados por aumento de la fluorescencia relativo al control de IgG. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicadas por valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

40 **[0231]** Las células derivadas de cordón umbilical aisladas de donantes separados analizados por citometría de flujo mostraron positivamente la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejados en el aumento de los valores de fluorescencia en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

45 **[0232]** Las células derivadas del cordón umbilical expandidas sobre matraces recubiertos con gelatina y sin revestir analizadas mediante citometría de flujo fueron todas positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con valores aumentados de fluorescencia en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

50 **[0233]** El análisis de las células derivadas del cordón umbilical por citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Estas células derivadas del cordón umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C; y negativas para CD31, CD34, CD45, CD1 17, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad fue consistente entre las variaciones en variables que incluyen el donante, el pasaje, el revestimiento de la superficie del recipiente de cultivo, las enzimas de digestión y la capa placentaria. Se observaron algunas variaciones en la curva de histograma de valores de fluorescencia individuales y rangos, pero todas las curvas positivas en todas las condiciones probadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia mayores que el control de IgG, confirmando así que las células comprenden una población homogénea que tiene expresión positiva de los marcadores .

60

65 **EJEMPLO 10**

Análisis de células por matriz de oligonucleótidos

[0234] Se usaron matrices de oligonucleótidos para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas de placenta y derivadas de cordón umbilical con fibroblastos, células madre mesenquimales humanas y otra línea celular derivada de médula ósea humana. Este análisis proporcionó una caracterización de las células derivadas del posparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

[0235] *Células derivadas de tejido postparto.* Se obtuvieron cordones umbilicales humanos y placenta del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) a partir de partos normales a término con el consentimiento del paciente. Los tejidos se recibieron y las células se aislaron como se describe en el Ejemplo 5 después de la digestión con una mezcla C:D:H. Las células se cultivaron en medio de crecimiento sobre matraces de cultivo de tejidos de plástico recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

[0236] *Fibroblastos.* Los fibroblastos dérmicos humanos se compraron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD, número de lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero bovino fetal al 10% (v/v) (Hyclone) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen)). Las células se cultivaron en un plástico tratado con tejido estándar.

[0237] *Células Madre Mesenquimáticas Humanas (hMSC).* Las hMSC se adquirieron en Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; lotes números 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en MSCGM Media (Cambrex). Las células se cultivaron sobre plástico cultivadas de tejidos estándar a 37°C con 5% de CO₂.

[0238] *Células de médula ósea de cresta ilíaca humana (ICBM).* La médula ósea de cresta ilíaca humana se recibió de NDRI con el consentimiento del paciente. La médula se procesó de acuerdo con el método descrito por Ho, et al. (WO03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (155 mM NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃, y EDTA 0,1 mM, pH 7,2) en una proporción de médula ósea de 1 parte a 20 partes tampón de lisis. La suspensión celular se agitó en vórtice, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en Medio Mínimo Esencial-alfa (Invitrogen) complementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) y glutamina 4 mM. Las células se centrifugaron nuevamente y el sedimento celular se resuspendió en medio nuevo. Las células mononucleares viables se contaron usando exclusión con azul tripán (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se siembran en matraces de cultivo tisular de plástico a 5 x 10⁴ células/cm². Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en cualquiera de O₂ atmosférica estándar o de O₂ al 5%. Las células se cultivaron durante 5 días sin un cambio de medio. Los medios y las células no adherentes se eliminaron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

[0239] Se eliminaron cultivos de células que crecían activamente de los matraces con un raspador de células en solución salina tamponada con fosfato fría (PBS). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en PBS reciente y se centrifugaron nuevamente. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. El ARNm celular se extrajo y se transcribió en ADNc. El ADNc se transcribió luego en ARNc y marcado con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con matrices de oligonucleótidos Affymetrix GENECHIP HG-UI 33 A (Affymetrix, Santa Clara, CA). Las hibridaciones y la recopilación de datos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El análisis de los datos se realizó utilizando el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Tusher, VG y col., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5116 - 5121). Las licencias para el software de análisis están disponibles a través de la Oficina de Licencias Tecnológicas de la Universidad de Stanford, y hay más información disponible en la World Wide Web en el sitio web del Profesor Tibshirani en el Depto. De Estadística de la Universidad de Stanford (www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/).

[0240] Catorce poblaciones diferentes de células se analizaron en este estudio. Las células, junto con la información del paso, el sustrato del cultivo y los medios de cultivo se enumeran en la Tabla 10-1.

Tabla 10-1. Células analizadas por el estudio de micromatrices. Las líneas celulares se enumeran por su código de identificación junto con el pasaje en el momento del análisis, el sustrato de crecimiento celular y los medios de crecimiento.

Población de células	Paso	Sustrato	Medio
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Umbilical (022803)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Umbilical (022803)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (042203)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (042203)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
ICBM (070203) (5% O ₂)	3	Plástico	MEM, 10% FBS
ICBM (070203) (5% O ₂)	5	Plástico	MEM, 10% FBS
ICBM (070203) (5% O ₂)	5	Plástico	MEM, 10% FBS
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10% FBS

[0241] Los datos se evaluaron por análisis de componentes principales con el software SAM como se describió anteriormente. El análisis reveló 290 genes que se expresaron en diferentes cantidades relativas en las células probadas. Este análisis proporcionó comparaciones relativas entre las poblaciones.

[0242] La Tabla 10-2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclidianas se basaron en la comparación de las células basadas en los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La distancia euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes.

Tabla 10-2. Las distancias euclidianas para los pares celulares.

La distancia euclidiana se calculó para los tipos de células utilizando los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclidiana.

PAR DE CÉLULAS	Distancia euclídeana
ICBM-HMSC	24,71
PLACENTA-UMBILICAL	25,52
ICBM-FIBROBLASTO	36,44
ICBM-PLACENTA	37,09
FIBROBLASTO-MSC	39,63
ICBM-UMBILICAL	40,15
Fibroblasto-Umbilical	41,59
MSC-PLACENTA	42,84
MSC-UMBILICAL	46,86
ICBM-PLACENTA	48,41

[0243] Las Tablas 10-3, 10-4 y 10-5 muestran la expresión de genes aumentados en células derivadas de placenta (Tabla 10-3), aumentadas en células derivadas de cordón umbilical (Tabla 10-4) y reducidas en el cordón umbilical y las células derivadas de la placenta (cuadro 10-5).

Tabla 10-3. Los genes que aumentan específicamente su expresión en las células derivadas de la placenta se comparan con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en células derivadas de placenta		
Conjunto de sonda ID	Nombre de genes	Número de acceso NCBI
209732_at	Lectina de tipo C (dependiente de calcio, dominio de carbohidrato-reconocimiento), miembro de superfamilia 2 (inducido por activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	familia de dehidrogenasa de aldehído 1, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	Lipoproteína oxidizada de baja densidad	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parcial	AF070642
202178_at	Quinasa de proteína C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	regulado hacia abajo en cáncer ovárico 1	NM_014890
213542_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp547K1113 (de clon DKFZp547K1113)	AI1246730

Tabla 10-4. Los genes que aumentan específicamente su expresión en las células derivadas del cordón umbilical en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumentadas en células derivadas del cordón umbilical		
Conjunto de sonda ID	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
202859_x_at	Interleucina 8	NM_000584
211506_s_at	Interleucina 8	AF043337
210222_s_at	reticulón 1	BC000314
204470_at	quimioquina (C-X-C motivo) ligando 1 (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma)	NM_001511
206336_at	quimioquina (C-X-C motivo) ligando 6 (proteína quimiotáctica 2 de granulocito)	NM_002993
207850_at	Quimioquina (C-X-C motivo) ligando 3	NM_002090
203485_at	reticulón 1	NM_021136
202644_s_at	factor de necrosis tumoral, proteína alfa-inducida 3	NM_006290

Tabla 10-5. Los genes que disminuyeron su expresión en el cordón umbilical y las células de placenta se combinaron con las otras líneas celulares atacadas.

Genes disminuidos en células derivadas de obliquo y placenta		
Conjunto de sonda ID	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
210135_s_at	corta estatura homeobox 2	AF022654.1
205824_at	choque térmico 27kDa proteína 2	NM_001541.1
209687_at	quimiocina (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de célula estromal 1)	U19695.1
203666_at	quimiocina (C-X-C motivo) ligando 12 (factor derivado de célula estromal 1)	NM_000609.1
212670_at	elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp586M2022 (de clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	mesénquima homeobox 2 (homeobox específico a detención de crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	Since oculis homeobox homólogo 1 (<i>Drosófila</i>)	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador asociado desaliñado de morfogénesis 2	BF513244
213488_at	proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	similar a neuralina 1	AL049176
205200_at	Tetranectina (proteína de unión a plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	gen de translocación 1 de célula B, anti-proliferativo	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción 3 relacionado con runt	AA541630
219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
202465_at	Potenciador de procolágeno C-endopeptidasa	NM_002593.2
203706_s_at	Homólogo frizzled 7 (<i>Drosófila</i>)	NM_003507.1
212736_at	gen hipotético BC008967	BE299456
214587_at	Colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_at	Tenascina C (hexabrachion)	NM_002160.1

210239_at	proteína homeobox iroquois 5	U90304.1
203903_s_at	Hefaestina	NM_014799.1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	glicoproteína de vesícula sináptica 2	NM_014849.1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA 1001744	NM_004750.1
206315_at	citoquina factor tipo receptor 1	NM_002250.1
204401_at	integrina, alfa 7	AK022548.1
216331_at	integrina, alfa 7	AF072132.1
209663_s_at	proteína DKFZP586L151	AW007573
213125_at	coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
206511_s_at	Sine oculis homeobox homólogo 2 (<i>Drosófila</i>)	NM_016932.1
213435_at	proteína KIAA1034	AB028957.1
206115_at	respuesta de crecimiento temprano 3	NM_004430.1
213707_at	homeobox no distal 5	NM_005221.3
218181_s_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
209160_at	familia de reductasa aldo-keto 1, miembro C3 (dehidrogenasa hidroxisteroide 3-alfa, tipo II)	AB018580.1
213905_x_at	Biglicano	AA845258
201261_x_at	Biglicano	BC002416.1
202132_at	coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
213791_at	Proencefalina	NM_006211.1
205422_s_at	Integrina, tipo beta (con dominios de repetición tipo EGF)	NM_004791.1
214927_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm inserto de longitud completa clon ADNc EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
206070_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	proteína KIAA0367	AB002365.1
219789_at	receptor de péptido natriurético C/guanilato ciclase C (receptor de péptido atrionatriurético C)	AI628360
219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp564B222 (de clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesícula 5 (miobrevina)	NM_006634.1
201843_s_at	proteína de matriz extracelular tipo fibulina 1 que contiene EGF	NM_004105.2
221478_at	proteína interactuante tipo 3 BCL2/adenovirus E1B 19	AL132665.1
201792_at	proteína 1 de unión a AE	NM_001129.2
204570_at	Subunidad de oxidasa VIIa citocromo c polipéptido 1 (músculo)	NM_001864.1
201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
202718_at	proteína 2 de unión a factor de crecimiento tipo insulina, 36kDa	NM_000597.1

[0244] Las Tablas 10-6, 10-7 y 10-8 muestran la expresión de genes incrementados en fibroblastos humanos (Tabla 10-6), células ICBM (Tabla 10-7) y MSC (Tabla 10-8).

Tabla 10-6. Genes que se incrementaron en expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en fibroblastos	
	fosfatasa de doble especificidad 2
	Proteína KIAA0527
	<i>Homo sapiens</i> ADNc: FLJ23224 fis, clon ADSU02206
	dineína, citoplásmico, polipéptido intermedio 1
	anquirina 3, nodo de Ranvier (anquirina G)
	inhibina, beta A (activina A, activina AB alfa polipéptido)
	ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4 (función putativa)
	proteína KIAA1053
	proteína con dedo de zinc 1A
	proteína asociada a microtúbulos 41
	Proteína HSPC019
	<i>Homo sapiens</i> ADNc: FLJ23564 fis, clon LNG10773
	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp564A072 (del clon DKFZp564A072)
	Proteína LIM (similar al enigma de unión C de quinasa de proteína de rata)
	inhibidor del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en las células B, proteína asociada a complejo de quinasa
	proteína hipotética FLJ22004
	Secuencia de ARNm humano (clon CTG-A4)
	ESTs, moderadamente similar al factor 2 similar al receptor de citocinas; precursor CRL2 del receptor de citoquinas [<i>Homo sapiens</i>]
	factor de crecimiento transformante, beta 2
	proteína hipotética MGC29643
	antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2
	proteína de retinopatía ligada a X putativa

Tabla 10-7. Genes que se incrementaron en expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Genes aumentados en células ICBM	
	• proteína repetitiva de anquirina cardíaca
	• MHC clase I región ORF
	• integrina, alfa 10
	• proteína hipotética FLJ22362
	• UDP-N-acetilo-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)
	• proteína 44 inducida por interferón
	• SRY (región determinante del sexo Y)-box 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)
	• proteína asociada a queratina 1-1
	• similar a la hipocalcina 1
	• dentada 1 (síndrome de Alagille)
	• proteoglicano 1, gránulo secretor

Tabla 10-8. Los genes que se incrementaron en la expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares analizadas.

Genes aumentados en células MSC	
5	• interleucina 26 • maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa) • subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2 • homólogo de oncogén viral del osteosarcoma murino v-fos FBJ
10	• proteína hipotética DC42 • subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2 • homólogo de oncogén B de osteosarcoma murino FBJ • WNT1 proteína de vía de señalización inducible 1 • Secuencia transformante derivada de la línea celular MCF.2 • canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
15	• homeoproteína 1 de clase emparejada de cartílago • <i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ12232 fis, clon MAMMA 1001206 • <i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ34668 fis, clon LIVER2000775 • jun B proto-oncogen • células B CLL/linfoma 6 (proteína de dedo de cinc 51)
20	• proteína con dedos de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

[0245] El presente ejemplo se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células derivadas del cordón umbilical y la placenta. Este análisis incluyó células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y tres placentas diferentes. El estudio también incluyó dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesenquimales y tres líneas de células de médula ósea de cresta ilíaca. El ARNm que se expresó por estas células se analizó en un conjunto de oligonucleótidos GENECHIP que contenía sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

[0246] El análisis reveló que las transcripciones de 290 genes estaban presentes en diferentes cantidades en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen diez genes que aumentan específicamente en las células derivadas de la placenta y siete genes específicamente aumentados en las células derivadas del cordón umbilical. Se encontró que cincuenta y cuatro genes tenían niveles de expresión específicamente más bajos en células derivadas de tejido de cordón umbilical y derivadas de placenta.

[0247] La expresión de los genes seleccionados se ha confirmado mediante PCR, como se muestra en el Ejemplo 11. Las células derivadas de posparto en general, y las células derivadas de ombligo, en particular, tienen perfiles de expresión génica distintos, por ejemplo, en comparación con otras células humanas, tales como las células derivadas de la médula ósea y los fibroblastos ensayados aquí.

EJEMPLO 11

Marcadores celulares

[0248] Los perfiles de expresión génica de células derivadas de cordón umbilical humano se compararon con los de células derivadas de otras fuentes usando un Affymetrix GENECHIP. Se identificaron seis genes "firma": receptor de LDL 1 oxidado, interleuquina-8 (IL-8), renina, reticulon, ligando de receptor de quimiocina 3 (ligando de CXC 3) y proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2). Estos genes de "firma" se expresaron a niveles relativamente altos en células derivadas de ombligo.

[0249] Los procedimientos descritos en este ejemplo se llevaron a cabo para verificar los datos de micromatrices y comparar los datos para la expresión de genes y proteínas, así como para establecer una serie de ensayos confiables para la detección de identificadores únicos para células derivadas de ombligo.

[0250] Se hicieron crecer células derivadas de cordón umbilical (cuatro aislados) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF, neonatal y adulto) en medio de crecimiento en matraces T75 revestidos con gelatina. Las células madre mesenquimales (MSCs) se cultivaron en un kit de media bala de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM, Cambrex, Walkerville, MD).

[0251] Para experimentos de IL-8, las células se descongelaron de nitrógeno líquido y se plaquearon en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm², se cultivaron durante 48 horas en medio de crecimiento y luego se cultivaron durante 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero [DMEM -baja glucosa (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (50 unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro) (Gibco) y 0,1% (p/v) albúmina sérica bovina (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. A continuación, se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes se congelaron a -80°C hasta el análisis de ELISA.

[0252] Se cultivaron células derivadas de tejido de cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados del prepucio neonatal humano, en medio de crecimiento en matraces T75 revestidos con gelatina. Las células se congelaron en el paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 4 mililitros de medio de cultivo y se contaron. Las células se hicieron crecer en un matraz de 75 cm² que contenía 15 ml de medio de crecimiento a 375.000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El medio de privación de suero se recogió al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20°C.

[0253] Para estimar el número de células en cada matraz, se añadieron 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) a cada matraz. Después de separar las células del matraz, la actividad de la tripsina se neutralizó con 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 ml y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y se añadió medio mililitro de crecimiento a cada tubo para resuspender las células. El número de células se determinó con un hemocitómetro.

[0254] La cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero se analizó usando ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

[0255] Se extrajo el ARN de células y fibroblastos derivados del cordón umbilical confluyentes, o para la expresión de IL-8, de células tratadas como se describió anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). El ARN se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a tratamiento con DNasa (2,7 unidades/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluye con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. ARN también fue extraído de cordón umbilical humano. Se suspendió el tejido (30 miligramos) en 700 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente y la extracción de ARN se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ARN se extrajo con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C.

[0256] El ARN fue inverso-transcrito utilizando hexámeros al azar 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.

[0257] Los genes identificados por micromatrices de ADNc como únicos regulados en las células del cordón umbilical (genes distintivos, que incluyen el receptor de LDL oxidado, la interleucina-8, la renina y el retículo), se investigaron adicionalmente usando PCR convencional y en tiempo real.

[0258] La PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión génica vendidos con los productos de expresión génica Ensayos a Pedido (Applied Biosystems). Receptor de LDL oxidado (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulon (Hs00382515); Ligando de CXC 3 (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH se mezclaron con ADNc y mezcla maestra TaqMan Universal PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) usando un sistema de detección de secuencia 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguido 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 (Boletín de usuario n.º 2 de Applied Biosystems para ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

[0259] La PCR convencional se realizó usando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. La PCR se realizó usando 2 microlitros de solución de ADNc (1 x Taq polimerasa (marca AMPLITAQ GOLD) tampón de reacción PCR de mezcla universal (Applied Biosystems) y la desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. La amplificación se optimizó para cada conjunto de cebadores. Ligando CXC 3 y retículo (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para la renina (94°C durante 15 segundos, 53°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 38 ciclos), para el receptor de LDL oxidado y GAPDH (94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores utilizados para la amplificación se enumeran en la concentración de cebador en la reacción de PCR final fue de 1 micromolar, excepto para GAPDH, que fue de 0,5 micromolares. Los cebadores de GAPDH fueron los mismos que para la PCR en tiempo real, excepto que la sonda TaqMan del fabricante no se añadió a la reacción de PCR final. Las muestras se separaron en gel de agarosa al 2% (p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes se capturaron en una película 667 (Universal Twinpack, VWR International, South Plainfield, NJ) usando una cámara POLAROID de distancia focal fija (VWR International, South Plainfield, NJ).

Tabla 11-1: Cebadores utilizados

	a.	Nombre de cebador	Cebadores
5	Receptor de LDL oxidado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID NO: 1)	
		A: 5'-AGAATGGAAAACTGGAATAGG-3' (SEQ ID NO: 2)	
	Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (SEQ ID NO: 3)	
		A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 4)	
	Reticulón	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO: 5)	
10	Interleucina-8	A: 5'-AGTAAACATTGAAACCAC AGCC-3' (SEQ ID NO: 6)	
		S: 5'-TCTGC AGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO: 7)	
		A: 5'-CTTCAAAAACCTTCTCCACAACC-3' (SEQ ID NO: 8)	
	Ligando 3 de quimiocina (CXC)	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO: 9)	
		A: 5'-TCCTGTCAAGTTGGTGCTCC-3' (SEC ID NO: 10)	

15 **[0260]** Se fijaron células derivadas del cordón umbilical con paraformaldehído al 4% (p/v) frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se aisló cada una de las células derivadas del cordón umbilical en el pasaje 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y el pasaje 11 (P11) (dos aislamientos de células derivadas del cordón umbilical) y fibroblastos (P11). La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítopos: vimentina (1:500, Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma - alzado contra conejo; o 1:300; Chemicon, Temecula, CA - alzado contra ratón.), actina de músculo alfa-liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CKI 8; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (CD34 humano Clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores en pases 11 células derivadas del cordón umbilical: GROalfa - PE antihumano (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 antihumano (1:100; Santa Cruz). Biotech, Santa Cruz, CA), receptor de LDL oxidado antihumano 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y NOGA-A anti-humano (1:100; Santa Cruz, Biotech).

20 **[0261]** Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Cuando el epítipo de interés estaba ubicado en la superficie de la célula (CD34, ox-LDL R1), Triton X-100 se omitió en todas las etapas del procedimiento para evitar la pérdida de epítopos. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el proceso. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, se aplicaron luego a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpos primarios se eliminaron y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de soluciones secundarias de anticuerpos (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloque junto con IgG de cabra anti-ratón - Texas Red (1:250; Sondas moleculares, Eugene, OR) y/o IgG anti conejo de cabra - Alexa 488 (1:250; Sondas moleculares) o IgG anti - cabra de burro - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). A continuación se lavaron los cultivos y se aplicaron DAPI de 10 micromolares (sondas moleculares) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

30 **[0262]** Tras la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando un filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epi-fluorescente invertido de Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representaba la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control, en la que se siguió todo el procedimiento descrito anteriormente, con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario (sin control 1°). Las imágenes representativas se capturaron utilizando una cámara de video digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras teñidas triplemente, cada imagen fue tomada usando solo un filtro de emisión a la vez. Los montajes en capas se prepararon con el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

40 **[0263]** Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron, y re-suspendieron 3% (v/v) de SBF en PBS a una concentración celular de 1×10^7 /mililitro. Se entregaron alícuotas de cien microlitros a tubos cónicos. Las células teñidas para antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). El anticuerpo se añadió a alícuotas según las especificaciones del fabricante, y se incubaron las células en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que requieren un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de SBF al 3%. El anticuerpo secundario se añadió según la especificación del fabricante, y se incubaron las células en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Se usaron los siguientes anticuerpos: receptor 1 de LDL oxidado (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 kappa de ratón, (P-4685 y M-5284; Sigma), e IgG burro contra cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.). El análisis de citometría de flujo se realizó con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

[0264] Los resultados de PCR en tiempo real para genes "firma" seleccionados realizados en ADNc de células derivadas de cordón umbilical humano, fibroblastos adultos y neonatales, y células madre mesenquimales (MSC) indican que tanto el retículo como la expresión oxidada del receptor LDL fueron más altos en células derivadas del ombligo en comparación con las otras células. Los datos obtenidos de PCR en tiempo real se analizaron mediante el método $\Delta\Delta CT$ y se expresaron en una escala logarítmica. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ligando CXC 3 y GCP-2 entre las células posparto y los controles. Los resultados de la PCR en tiempo real se confirmaron mediante PCR convencional. La secuenciación de productos de PCR validó estas observaciones. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión del ligando CXC 3 entre las células posparto y los controles usando los cebadores convencionales de PCR CXC ligando 3 enumerados en la Tabla 11-1.

[0265] La expresión de la citoquina, IL-8 en células derivadas de tejido de cordón umbilical fue elevada tanto en células derivadas de tejido de cordón umbilical cultivadas en medio de crecimiento como en suero. Todos los datos de PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y secuenciando productos de PCR.

[0266] Después del crecimiento en medios sin suero, los medios condicionados se examinaron para detectar la presencia de IL-8. Las mayores cantidades de IL-8 se detectaron en medios en los que se habían cultivado células umbilicales (Tabla 11-2). No se detectó IL-8 en un medio en el que se habían cultivado fibroblastos dérmicos humanos.

Tabla 11-2: Expresión de la proteína IL-8 medida por ELISA

Tipo de células	IL-8
Fibroblastos humanos	ND
Aislado de placenta 1	ND
Aislado de UMBC 1	2058,42±144,67
Aislado de placenta 2	ND
Aislado de UMBC 2	2368,86±22,73
Aislado de placenta 3 (O ₂ normal)	17,27±8,63
Aislado de placenta 3 (O ₂ bajo, W/O BME)	264,92±9,88
Resultados del ensayo ELISA par interleucina-8 (IL-8) realizado en células derivadas de placenta y del cordón umbilical, así como fibroblastos de piel humana. Los valores presentados aquí son picograma/millón células, n=2, sem.	
ND: no detectado	

[0267] Las células derivadas del cordón umbilical humano en el pase 0 se sondearon para la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (paso 0), las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: factor de von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina de músculo alfa-liso y vimentina. Las células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para la actina del músculo alfa-liso y la vimentina, con el patrón de tinción consistente a través del pasaje 11.

[0268] La producción de GRO α , GCP-2, receptor LDL 1 oxidado y retículo (NOGO-A) en células derivadas del cordón umbilical en el pasaje 11 se investigó mediante inmunocitoquímica. Las células derivadas de cordón umbilical resultaron positivas para GCP-2, pero la producción de GRO α no fue detectada por este método. Además, las células eran NOGO-A positivas.

[0269] Se ha establecido la concordancia entre los niveles de expresión génica medidos por micromatrices y PCR (tanto en tiempo real como convencional) para cuatro genes: receptor de LDL 1 oxidado, renina, reticulon e IL-8. La expresión de estos genes se reguló diferencialmente a nivel de ARNm en células derivadas del cordón umbilical, con IL-8 también regulada diferencialmente a nivel de proteína. La expresión diferencial de GCP-2 y CXC ligando 3 no se confirmó a nivel de ARNm. Aunque este resultado no es compatible con los datos obtenidos originalmente del experimento de micromatrices, esto puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

[0270] Las células derivadas del cordón umbilical humano en el pasaje 0 se sondearon para la expresión de actina de músculo alfa-liso y vimentina, y fueron positivas para ambas. El patrón de tinción se conservó a través del pasaje 11.

[0271] En conclusión, los datos de ARNm completos verifican al menos parcialmente los datos obtenidos de los experimentos de micromatrices.

EJEMPLO 12

Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos celulares

[0272] Los fenotipos de las células encontradas dentro del tejido del cordón umbilical humano se analizaron mediante inmunohistoquímica.

[0273] Se recogió tejido de cordón umbilical humano y se sumergió la inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v) durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (véase Tabla 12-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, criada frente a conejo; Sigma; o 1:300, levantado contra el ratón; Chemicon, Temecula, CA), actina del músculo alfa-liso (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CKI 8; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma), y CD34 (humano CD34 Clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores: GROalfa-PE antihumano (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 antihumano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor LDL oxidado antihumano 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y NOGO-A anti-humano (1:100; Santa Cruz Biotech). Las muestras fijas se cortaron con un bisturí y se colocaron dentro del compuesto de inclusión OCT (Tissue-Tek OCT, Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. Los bloques congelados se seccionaron (10 micras de espesor) utilizando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para tinción.

[0274] La inmunohistoquímica se realizó de forma similar a estudios previos. (p. ej., Messina et al., Exper. Neurol, 2003; 184: 816 - 829). Las secciones tisulares se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a los antígenos intracelulares. En los casos en que el epítomo de interés estaría localizado en la superficie de la célula (CD34, ox-LDL R1), se omitió el tritón en todas las etapas del procedimiento para evitar la pérdida de epítomos. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el procedimiento. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, se aplicaron entonces a las secciones durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpos primarios y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de soluciones secundarias de anticuerpos (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloque junto con IgG-Texas Red anti-ratón de cabra (1:250; Sondas moleculares, Eugene, OR) e/o IgG anti-conejo de cabra Alexa 488 (1:250; Sondas moleculares) o IgG-FITC anti-cabra de burro (1:150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicaron DAPI de 10 micromolares (Sondas moleculares) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0275] Tras la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epifluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representó mediante señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Las imágenes representativas se capturaron utilizando una cámara de video digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras teñidas triplemente, cada imagen fue tomada usando solo un filtro de emisión a la vez. Los montajes en capas se prepararon con el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Tabla 12-1: Resumen de los anticuerpos primarios utilizados

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

[0276] Los marcadores de vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 se expresaron en un subconjunto de las células encontradas dentro del cordón umbilical (datos no mostrados). En particular, la expresión de vWF y CD34 se restringió a los vasos sanguíneos contenidos dentro de la médula. Las células CD34+ estaban en la capa más interna (lado del lumen). La expresión de vimentina se encontró en toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón.

La AME se limitó a la matriz y las paredes externas de la arteria y la vena, pero no se contuvo dentro de los vasos mismos. CK18 y desmina se observaron solo dentro de los vasos, la desmina se restringió a las capas media y externa.

5 [0277] Ninguno de estos marcadores se observó dentro del cordón umbilical (datos no mostrados).

[0278] Vimentina, desmina, actina de músculo alfa-liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD34 se expresan en células dentro del cordón umbilical humano. En base a estudios de caracterización *in vitro* que muestran que solo se expresan vimentina y alfa-actina de músculo liso, los datos sugieren que el proceso actual de aislamiento celular derivado del cordón umbilical recolecta una subpoblación de células o que las células aisladas cambian la expresión de marcadores para expresar vimentina y alfa-actina de músculo liso.

EJEMPLO 13

15 Secreción de factores tróficos

[0279] Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de células derivadas de ombligo. Se seleccionaron factores que tienen actividad angiogénica, por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen y col., *Ciba Found. Symp.*, 1997; 212: 215-26); proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Salcedo et al., *Blood*, 2000; 96: 34-40); interleuquina-8 (IL-8) (Li y col., *J. Immunol.*, 2003; 170: 3369-76); factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF); factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) (Hughes y col., *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 77: 812-8); inhibidor tisular de metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP1); angiopoyetina 2 (ANG2); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFbb); trombopoyetina (TPO); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-FCE); factor 1 derivado del estroma (SDF-1 alfa), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng y col., *Dev. Biol.*, 2003; 258: 319-33); interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta2 (TGFbeta2)); o actividad de quimioquinas (proteína 1 macrófaga inflamatoria (MIP1 alfa), proteína 1 macrófaga inflamatoria (MIP1beta), quimioattractante 1 de monocitos (MCP-1), Rantes (regulado en la activación, células T normales expresadas y secretadas); I309; timo y la quimiocina regulada por activación (TARC); Eotaxina; quimiocina derivada de macrófagos (MDC); y (IL-8).

[0280] Las células derivadas del cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de crecimiento sobre matraces T75 revestidos con gelatina. Las células se crioconservaron en el pase 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de descongelarse, se añadió medio de crecimiento a las células, seguido de transferencia a un tubo de centrifuga de 15 ml y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 4 mililitros de medio de crecimiento y se contaron las células. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T75 que contienen cada uno 15 ml de medio de crecimiento, y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio libre de suero (DMEM-baja glucosa (Gibco), albúmina sérica bovina al 0,1% (p/v) (Sigma), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomycin (50 microgramos/mililitro, Gibco)) durante 8 horas. Medio libre de suero acondicionado se recogió al final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20°C.

[0281] Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron usando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de la tripsina se inhibió mediante la adición de 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 1 mililitro de medio de crecimiento. El número de células se estimó con un hemocitómetro.

[0282] Las células se cultivaron a 37°C en dióxido de carbono al 5% y oxígeno atmosférico. La cantidad de MCP-1, IL-6, FCEV, SDF-1 alfa, GCP-2, IL-8 y TGF-beta2 producida por cada muestra de células se determinó mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Mn). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son picogramos por mililitro por millón de células (n = 2, sem).

[0283] Quimioquinas (MIP1alfa, MIP1beta, MCP-1, Rantes, I309, TARC, Eotaxina, MDC, IL8), BDNF y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, FCEV, TIMP1, ANG2, PDGFbb, TPO, HB-FCE se midieron usando Searchlight Proteome Arrays (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteoma son ELISA de sándwich multiplexadas para la medición cuantitativa de dos a dieciséis proteínas por pozo. Las matrices se producen detectando un patrón 2 x 2, 3 x 3 o 4 x 4 de cuatro a dieciséis anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento de ELISA en sandwich, se toma una imagen de la placa completa para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. La señal generada en cada punto es proporcional a la cantidad de proteína diana en el estándar o muestra original.

[0284] MCP-1 e IL-6 fueron secretados por PPDC derivados de ombligo y fibroblastos dérmicos (Tabla 13-1). SDF-1alfa y GCP-2 fueron secretados por fibroblastos. GCP-2 e IL-8 fueron secretados por PPDC derivados de ombligo. TGF-beta2 no se detectó de cualquiera de los tipos de célula por ELISA.

Tabla 13-1. Resultados de ELISA: Detección de factores tróficos

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1	GCP-2	IL-8	TGF-beta
Fibroblasto	17 $\pm$ 1	61 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	ND	ND
Umbilical (022803)	1150 $\pm$ 74	4234 $\pm$ 289	ND	ND	160 $\pm$ 11	2058 $\pm$ 145	ND
Umbilical (071003)	2794 $\pm$ 84	1356 $\pm$ 43	ND	ND	2184 $\pm$ 98	2369 $\pm$ 23	ND

Clave: ND: No Detectado., $\pm$ sem

[0285] Ensayo ELISA Multiplexado Searchlight™. TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1beta, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC e IL-8 se secretaron de PPDC derivados de ombligo (Tablas 13-2 y 13-3). No se detectaron Ang2, FCEV o PDGFbb.

Tabla 13-2. Resultados de ensayo ELISA multiplexados Searchlight™

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
U1	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
U3	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

Clave: hFB (fibroblasts humanos), U1 (PPDC derivados del cordón umbilical (022803)), U3 (PPDC derivados del cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

Tabla 13-3. Resultados de ensayo ELISA multiplexados Searchlight™

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxina	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
U1	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
U3	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

Clave: hFB (fibroblasts humanos), U1 (PPDC derivados del cordón umbilical (022803)), U3 (PPDC derivados del cordón umbilical (071003)). ND: No detectado.

[0286] Las células derivadas de cordón umbilical secretaron una cantidad de factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, como HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, como BDNF e IL-6, tienen papeles importantes en la regeneración o protección neuronal.

EJEMPLO 14

Inmunología *In vitro*

[0287] Se evaluaron líneas celulares de cordón umbilical *in vitro* por sus características inmunológicas en un esfuerzo por predecir la respuesta inmunológica, si alguna, que estas células provocarían tras el trasplante *in vivo*. Las líneas celulares posparto se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas se expresan mediante células presentadoras de antígeno (APC) y se requieren para la estimulación directa de células T CD4⁺ ingenuas (Abbas y Lichtman, Cellular and Molecular Immunology, 5ª edición (2003) Saunders, Filadelfia, p.117). Las líneas celulares también se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas & Lichtman, supra); CD 178 (Coumans y col., Journal of Immunological Methods, 1999; 224: 185-196); y PD-L2 (Abbas y Lichtman, supra, Brown et al., The Journal of Immunology, 2003; 170: 1257-1266). Para predecir el grado en que las líneas celulares derivadas del ombligo postparto provocan una respuesta inmune *in vivo*, las líneas celulares se analizaron en una reacción de linfocito mixto unidireccional (MLR).

[0288] Las células se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con gelatina al 2% (Sigma, St. Louis, MO) hasta confluir.

[0289] Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Las células se recogieron, se centrifugaron, y se resuspendieron en 3% (v/v) de SBF en PBS a una concentración celular de 1×10^7 por mililitro. Anticuerpo (Tabla 14-1) se añadió a un centenar de microlitros de suspensión de células según las especificaciones del fabricante y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en quinientos microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo usando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 14-1. Anticuerpos

	Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
5	HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
	CD80	BD Pharmingen	557227
	CD86	BD Pharmingen	555665
	B7-H2	BD Pharmingen	552502
10	HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, Reino Unido)	ab 7904-100
	CD178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
15	PD-L2	BD Pharmingen	557846
	Ratón IgG2alfa	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
	Ratón IgG1 kappa	Sigma	P-4685

[0290] Los viales criopreservados del PPDC derivados de ombligo del pasaje 10 marcados como línea celular "A" se empaquetaron en hielo seco y se enviaron a CTBR (Senneville, Quebec) para llevar a cabo una reacción de linfocitos mixtos utilizando CTBR SOP n° CAC-031. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de múltiples donantes voluntarios masculinos y femeninos. Se analizaron seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un solo donante alogénico que exhibió una respuesta de proliferación robusta en una reacción de linfocitos mixtos con los otros cinco donantes de sangre. Este donante fue seleccionado como el donante de control positivo alogénico. Los cinco donantes de sangre restantes fueron seleccionados como receptores. Se trataron PBMC alogénicas estimuladoras (donadoras), PBMC autólogas y postparto con mitomicina C. Se añadieron células estimuladoras autólogas y tratadas con mitomicina C a PBMC respondedoras (receptoras) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió [³H]timidina a cada muestra y se cultivó durante 18 horas. Después de la cosecha de las células, se extrajo el ADN radiomarcado, y [³H]-timidina se midió utilizando un contador de centelleo. Las reacciones se realizaron por triplicado usando placas de cultivo de dos células con tres receptores por placa.

[0291] El índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) se calculó como la proliferación media del receptor alogénico más donante alogénico tratado con mitomicina C dividido por la proliferación basal del receptor. El índice de estimulación de las células posparto se calculó como la proliferación media del receptor más la línea celular posparto tratada con mitomicina C dividida por la proliferación inicial del receptor.

[0292] Se cribaron seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un único donante alogénico que exhibiría una respuesta de proliferación robusta en una reacción de linfocito mixto con los otros cinco donantes de sangre. Este donante fue seleccionado como el donante de control positivo alogénico. Los cinco donantes de sangre restantes fueron seleccionados como receptores. El donante de control positivo alogénico y las líneas celulares derivadas del cordón umbilical se trataron con mitomicina C y se cultivaron en una reacción de linfocito mixto con los cinco receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado usando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 14-2). El índice de estimulación promedio varió de 6,5 (placa 1) a 9 (placa 2) y los controles positivos alogénicos del donante variaron de 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 14-3).

Tabla 14-2. Datos de reacción de linfocitos mixtos - Línea celular A (Cordón umbilical)

DPM para ensayo de proliferación

Placa ID: Placa 1

Número analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Medio	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2476	Línea base de proliferación de receptor	1074	406	391	623.7	390.07	62.5
	Control de autoestimulación (células tratadas con mitomicina C)	672	510	1402	861.3	475.19	55.2
	Donante alógeno MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	43777	46391	38231	43466.3	5087.12	11.7
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C tipo A)	2914	5822	6109	4881.7	1721.36	35.3
SI (donante)					70		
SI (línea celular)					8		
IM04-2479	Línea base de proliferación de receptor	530	508	527	521.7	11.93	2.3
	Control de autoestimulación (células tratadas con mitomicina C)	701	567	1111	793.0	283.43	35.7
	Donante alógeno MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C tipo A)	5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3
SI (donante)					47		
SI (línea celular)					7		
IM04-2480	Línea base de proliferación de receptor	1192	854	1330	1125.3	244.90	21.8
	Control de autoestimulación (células tratadas con mitomicina C)	2963	993	2197	2051.0	993.08	48.4
	Donante alógeno MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C tipo A)	2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1
SI (donante)					23		
SI (línea celular)					3		
IM04-2481	Línea base de proliferación de receptor	695	451	555	567.0	122.44	21.6
	Control de autoestimulación (células tratadas con mitomicina C)	738	1252	464	818.0	400.04	48.9
	Donante alógeno MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C tipo A)	4495	3671	4674	4280.0	534.95	12.5
SI (donante)					31		
SI (línea celular)					8		

Placa ID: Placa 2

Número analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Mean	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2482	Línea base de proliferación de receptor	432	533	274	413.0	130.54	31.6
	Control de autoestimulación (células tratadas con mitomicina C)	1459	633	598	896.7	487.31	54.3
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratado con mitomicina C)	24286	30823	31346	28818.3	3933.82	13.7
	MLR con línea celular (célula tratada con mitomicina C tipo A)	2762	1502	6723	3662.3	2724.46	74.4
SI (donante)					70		
SI (línea celular)					9		
IM04-2477 (donante alogénico)	Línea base de proliferación de receptor	312	419	349	360.0	54.34	15.1
	Control de autoestimulación (célula autólogas tratadas con mitomicina)	567	604	374	515.0	123.50	24.0
Línea celular tipo A	Línea base de proliferación de receptor	5101	3735	2973	3936.3	1078.19	27.4
	Control de autoestimulación (célula autólogas tratadas con mitomicina)	1924	4570	2153	2882.3	1466.04	50.9

Tabla 14-3. Índice de estimulación promedio de células umbilicales y un donante alógeno en una reacción de linfocitos mixtos con cinco receptores alógenos individuales.**Índice de estimulación promedio**

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

[0293] Los histogramas de células derivadas del cordón umbilical analizadas mediante citometría de flujo muestran expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, según se observa por el valor de fluorescencia compatible con el control IgG, lo que indica que las líneas celulares derivadas del cordón umbilical carecen de las moléculas de superficie celular requeridas para estimular directamente PBMC alógenas (p. ej., células T CD4*).

[0294] Las células umbilicales analizadas por citometría de flujo fueron positivas para la expresión de PD-L2, como se refleja en el aumento de la fluorescencia con respecto al control de IgG. Las células fueron negativas para la expresión de CD 178 y HLA-G, como se observó por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0295] En las reacciones de linfocitos mixtos realizados con líneas celulares umbilicales, el índice de estimulación promedio varió de 6,5 a 9, mientras que el de los controles positivos alógenos varió de 42,75 a 70. Las líneas

celulares umbilicales no expresaron cantidades detectables de las proteínas estimulantes HLA- DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, medidas por citometría de flujo. Las líneas celulares umbilicales tampoco expresaron las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD 178, pero la expresión de PD-L2 se detectó mediante citometría de flujo. Las CMSP donadoras alogénicas contenían células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DR, DQ, CD8, CD86 y B7-H2, lo que permite la estimulación de linfocitos alogénicos. La ausencia en células derivadas del ombligo de moléculas de superficie celular presoras de antígeno requeridas para la estimulación directa de células T CD4⁺ ingenuas, así como la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, podría explicar el bajo índice de estimulación exhibido por estas células en una MLR en comparación con controles alogénicos.

[0296] La presente invención no está limitada a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente. La invención es susceptible de variación y modificación dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 15

Ensayo de actividad de telomerasa

[0297] La telomerasa funciona para sintetizar repeticiones teloméricas que sirven para proteger la integridad de los cromosomas y para prolongar la vida de replicación de las células (Liu, K, et al., PNAS, 1999; 96: 5147-5152). La telomerasa consta de dos componentes, la plantilla de ARN de telomerasa (hTERT) y la transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT). La regulación de la telomerasa se determina mediante la transcripción de hTERT pero no de hTERT. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) para el ARNm de hTERT es, por lo tanto, un método aceptado para determinar la actividad de la telomerasa de las células.

Aislamiento celular

[0298] Se realizaron experimentos de PCR en tiempo real para determinar la producción de telomerasa de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. Se prepararon células derivadas de tejido de cordón umbilical humano de acuerdo con los Ejemplos 5-7 y los ejemplos expuestos en la Solicitud de Estados Unidos con N° de Serie 10/877.012 (la solicitud '012) que se publicó como N° de patente de EE.UU. 7.510.873. En general, los cordones umbilicales obtenidos del National Disease Research Interchange (Filadelfia, Pensilvania) después de una administración normal se lavaron para eliminar la sangre y los desechos y se disociaron mecánicamente. El tejido se incubó luego con enzimas de digestión que incluyen colagenasa, dispasa y hialuronidasa en medio de cultivo a 37°C. Se cultivaron células derivadas de tejido de cordón umbilical humano de acuerdo con los métodos expuestos en los ejemplos de la solicitud '012. Las células madre mesenquimales y los fibroblastos dérmicos normales de la piel (cc-2509 lote n° 9F0844) se obtuvieron de Cambrex, Walkersville, Maryland. Una célula celular pluripotente de células embrionarias testiculares (teratoma) nTera-2 (NTERA-2 cl.DI) (Véase, Plaia y col., *Stem Cells*, 2006; 24 (3): 531-546) se adquirió en ATCC (Manassas, Va.) y se cultivó según los métodos expuestos en la solicitud '012.

Aislamiento total de ARN

[0299] Se extrajo el ARN de las células usando el kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, CA). El ARN se eluye con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se guardó a -80°C. ARN se transcribió inversamente usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversos 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

[0300] La PCR se realizó en muestras de ADNc usando Applied Biosystems Assays-On-Demand™ (también conocido como TaqMan® Gene Expression Assays) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems). Este kit comercial se usa 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 secuencia 7000 con software ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 min y 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min. Los datos de PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

[0301] Se ensayaron células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (número de acceso ATCC PTA-6067), fibroblastos y células madre mesenquimatosas para ARN hTERT y 18S. Como se muestra en la Tabla 22-1, no se detectó hTERT y, por lo tanto, telomerasa en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

Tabla 22-1

	hTERT	18S ARN
5	Células umbilicales (022803)	ND
	Fibroblastos	ND

ND- no detectado; + señal detectada

10 **[0302]** Se analizaron células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (aislado 022803, número de acceso ATCC PTA-6067) y células nTera-2 y los resultados no mostraron expresión de la telomerasa en dos lotes de hUTC mientras que la línea celular de teratoma reveló alto nivel de expresión (Tabla 22-1).

LISTADO DE SECUENCIAS

15 **[0303]**

<110> COLTER, DAVID C.
 KIHM, ANTHONY J.
 20 WARD, CHRISTINE K.
 GOSIEWSKA, ANNA

<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES Y TRASTORNOS DE PULMÓN Y PULMONARES
 <130> 026038.0230PTWO

25 <140> 61/139.425
 <141> 2008-12-19

30 <150>
 <151>

<160> 10

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

45 <400> 1
 gagaaatcca aagagcaaat gg 22

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

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

55 <400> 2
 agaattggaaa actggaatag g 21

60 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 3
 tcttcgatgc ttcgattcc 20

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

 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

 <400> 4
 gaattctcgg aatctctgtt g 21

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

 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

 <400> 5
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

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

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

 <400> 6
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22

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

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

 45 <400> 7
 tctgcagctc tgttgaagg 20

 50 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

 <400> 8
 ctcaaaaac ttccacaa cc 22

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

 65 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 9
cccacgccac gctctcc 17

5 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

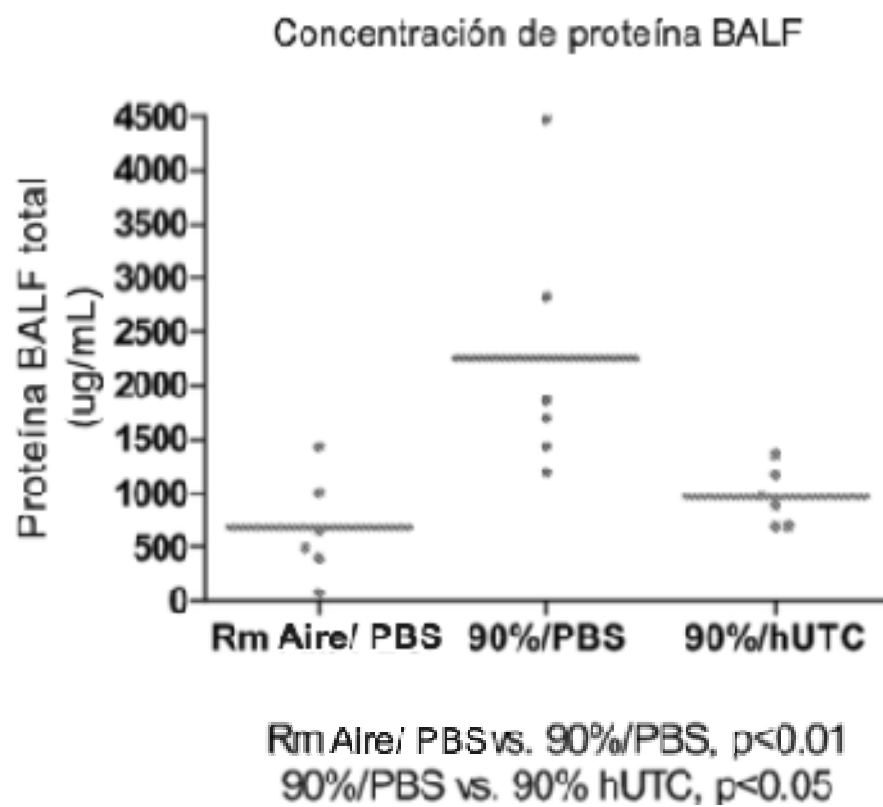
 <400> 10
 tcctgtcagt tgggtctcc 19

15

Reivindicaciones

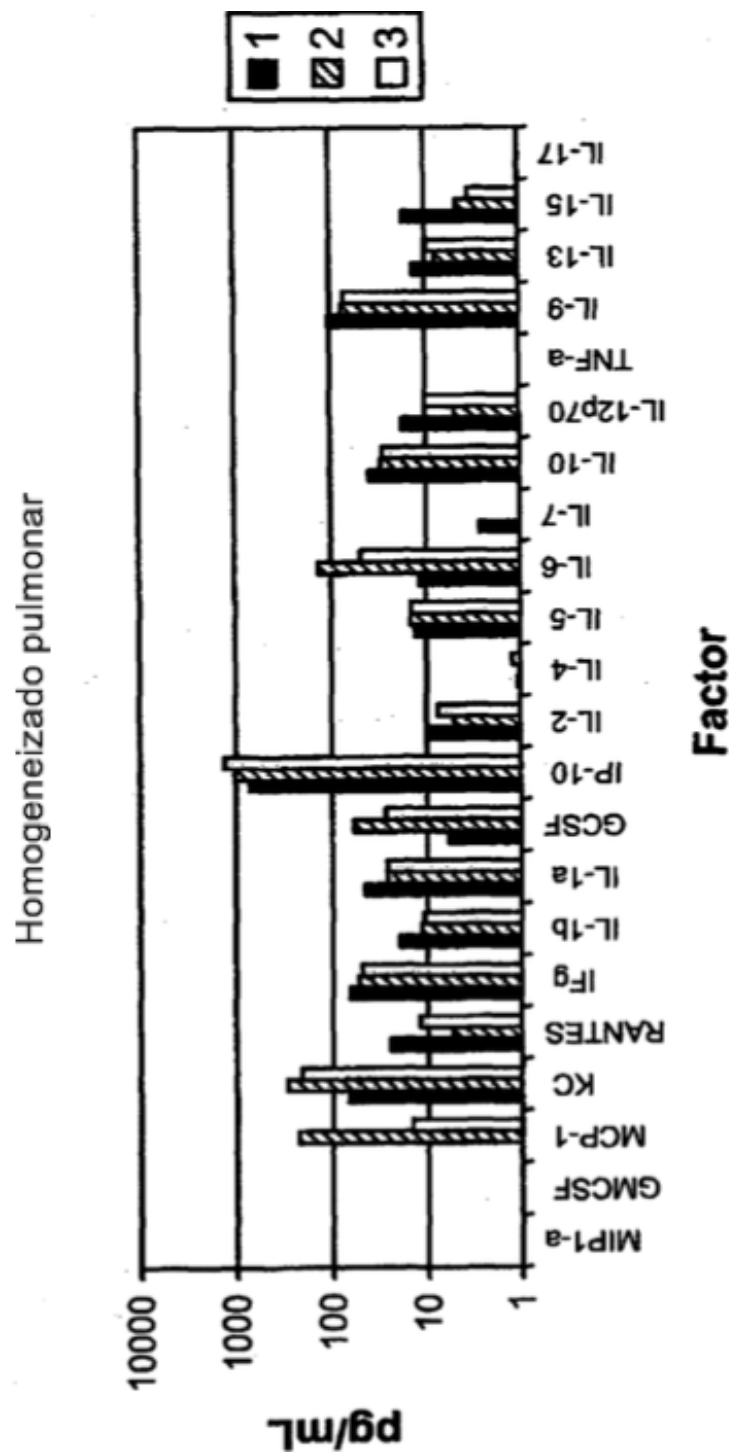
- 5 1. Células derivadas de tejido del cordón umbilical para uso en el tratamiento de un paciente con lesión pulmonar aguda, en donde las células derivadas del tejido del cordón umbilical derivadas del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, teniendo el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar, son negativas para CD117 y no expresan hTERT o telomerasa.
- 10 2. Células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende administrar las células con al menos otro tipo de célula o con al menos otro agente.
- 15 3. Células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso según la reivindicación 2, en donde el otro tipo de célula es una célula de tejido pulmonar seleccionada de célula progenitora de pulmón, célula de músculo liso vascular, célula progenitora de músculo liso vascular, pericito, célula endotelial vascular, célula progenitora vascular del endotelio, u otra célula madre multipotente o pluripotente.
- 20 4. Células derivadas de tejido de cordón umbilical para su uso según la reivindicación 2, en donde el agente es un agente antitrombogénico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un agente proangiogénico o un agente antiapoptótico.
- 25 5. Células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende administrar las células en los sitios de la lesión pulmonar.
- 30 6. Células derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tratamiento comprende administrar las células derivadas de tejido del cordón umbilical mediante inyección, infusión, un dispositivo implantado en el paciente o mediante la implantación de un matriz o andamio que contiene las células.
- 35 7. Células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso según la reivindicación 1, en donde las células ejercen un efecto trófico sobre el tejido pulmonar del paciente, sobre el músculo liso vascular del paciente o sobre el endotelio vascular del paciente.
- 40 8. Células derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el efecto trófico sobre el músculo liso vascular es la proliferación de las células del músculo liso vascular.
- 45 9. Células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso según la reivindicación 7, en donde el efecto trófico sobre el endotelio vascular es la proliferación de las células endoteliales vasculares.
- 50 10. Células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso según la reivindicación 1, en donde las células inducen la migración de células endoteliales vasculares a los sitios de la lesión pulmonar.
- 55 11. Células derivadas de tejido de cordón umbilical para uso según la reivindicación 1, en donde las células inducen la migración de células progenitoras de endotelio vascular, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular o pericitos a los sitios de la lesión pulmonar.
- 60 12. Una composición farmacéutica para uso en tratar a un paciente que tiene lesión pulmonar aguda, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y células derivadas de tejido de cordón umbilical o una preparación hecha de células derivadas de tejido de cordón umbilical en una cantidad eficaz para tratar la lesión pulmonar, en donde las células derivadas del tejido del cordón umbilical derivadas del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo y tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar, son negativas para CD117 y no expresan hTERT o telomerasa.
- 65 13. Un kit para uso en el tratamiento de un paciente que tiene una lesión pulmonar aguda, comprendiendo la composición farmacéutica de la reivindicación 12.

Figura 1



2a/4

Figura 2a



2b/4

Figura 2b

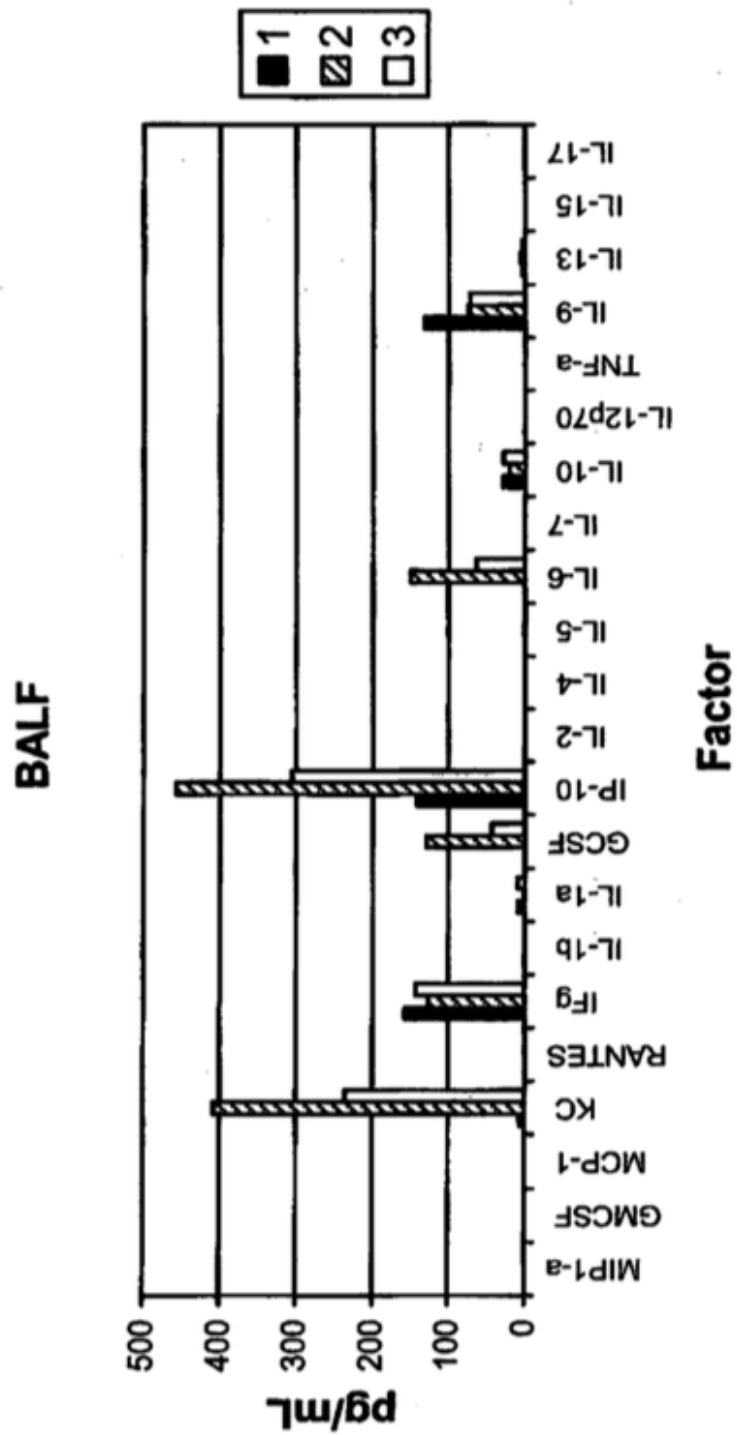


Figura 3

Homogeneizado pulmonar																							
Grupo de tratamiento	Número de animales	MIPI-a	GMCSF	MCP-I	KC	RANTES	IFg	IL-1b	IL-1a	GCSF	IP-10	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-12p70	TNF-a	IL-9	IL-13	IL-15	IL-17
1	1	0	0	0	53	36	52	22	0	6	840	0	1	11	1	0	27	9	0	82	8	0	0
1	2	0	0	0	77	18	76	17	10	6	720	0	1	7	8	0	46	18	0	113	14	27	0
1	3	0	0	0	45	24	59	14	29	4	524	9	1	12	5	0	31	15	0	82	10	0	0
1	4	0	0	0	67	28	58	31	34	7	621	9	1	16	9	16	51	18	0	135	11	22	0
1	5	0	0	0	101	14	83	20	0	6	824	25	1	15	34	0	42	23	0	105	22	24	4
1	6	0	0	0	66	32	63	14	198	7	755	16	1	17	14	0	37	24	0	100	15	28	0
Medio:		0	0	0	68	25	65	20	45	6	714	10	1	13	12	3	39	18	0	103	13	17	1
Des. Est.:		0	0	0	20	9	12	6	76	1	122	10	0	4	12	6	9	6	0	20	5	13	1
2	1	0	0	139	149	9	70	13	37	23	1315	8	1	30	69	0	39	12	0	96	18	0	0
2	2	0	0	526	555	4	51	4	18	171	1146	5	1	13	448	0	20	0	0	62	7	0	0
2	3	0	0	111	103	9	62	24	56	8	712	7	1	14	33	0	37	4	0	82	8	0	0
2	4	0	0	143	322	0	34	8	9	59	503	0	1	11	91	0	26	4	0	63	6	0	0
2	5	0	0	143	334	7	68	11	28	20	1783	8	1	11	47	0	30	4	0	106	8	28	0
2	6	0	0	295	303	4	39	9	11	75	619	4	1	11	121	0	27	5	0	54	0	0	0
Medio:		0	0	226	294	5	54	11	27	59	1013	5	1	15	135	0	30	5	0	77	8	5	0
Des. Est.:		0	0	161	160	4	15	7	18	60	492	3	0	7	156	0	7	4	0	21	6	11	0
3	1	0	0	0	115	7	50	16	30	16	1121	8	1	15	31	0	34	15	0	79	15	0	0
3	2	0	0	0	163	11	50	9	38	20	1105	8	1	16	36	0	28	6	0	65	9	0	0
3	3	0	0	0	157	13	56	7	25	24	1465	7	1	16	53	0	36	9	0	68	9	0	0
3	4	0	0	0	161	16	59	8	24	12	1647	7	1	14	26	0	24	5	0	90	12	21	0
3	5	0	0	0	337	7	41	16	26	49	711	8	1	13	64	0	25	13	0	60	6	0	0
3	6	0	0	88	318	17	40	9	15	45	1839	8	2	14	84	0	24	11	0	73	6	0	0
Medio:		0	0	15	209	12	49	11	27	27	1315	8	1	15	49	0	29	10	0	72	10	3	0
Des. Est.:		0	0	36	94	4	8	4	8	15	413	1	0	1	22	0	5	4	0	11	4	8	0
Prueba t		nd	nd	0.02	0.26	0.08	0.57	0.86	1.00	0.28	0.45	0.10	0.18	0.96	0.25	nd	0.63	0.01	nd	0.68	0.31	0.86	nd

Figura 4

BALF																							
Grupo de tratamiento	Número de animales	MIP1-a	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IFg	IL-1b	IL-1a	GCSEF	IP-10	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-12p70	TNF-a	IL-9	IL-13	IL-15	IL-17
1	1	0	0	0	8	0	162	0	8	0	113	0	0	0	1	0	39	0	0	63	6	0	0
1	2	0	0	0	8	0	174	0	15	0	195	0	0	0	1	0	19	0	0	170	4	0	0
1	3	0	0	0	7	0	131	0	0	0	95	0	0	0	0	0	26	0	0	82	0	0	0
1	4	0	0	0	8	0	195	4	9	0	176	0	0	0	1	0	35	4	0	175	5	0	0
1	5	0	0	0	12	0	197	0	14	0	216	0	0	0	1	0	39	0	0	221	6	0	0
1	6	0	0	0	0	0	79	0	6	0	53	0	0	0	1	0	11	0	0	82	4	0	0
Medio:		0	0	0	7	0	156	1	9	0	141	0	0	0	1	0	28	1	0	132	4	0	0
Des. Est.:		0	0	0	4	0	45	2	6	0	64	0	0	0	0	0	11	1	0	65	2	0	0
2	1	0	0	0	276	0	101	0	0	59	351	0	0	4	24	0	14	0	0	41	4	0	0
2	2	0	0	0	425	0	127	0	0	65	381	0	0	0	36	0	24	0	0	46	5	0	0
2	3	0	0	0	390	0	183	0	7	64	435	0	1	0	27	0	35	0	0	102	7	0	0
2	4	0	0	0	533	0	107	0	0	284	453	0	0	4	384	0	14	0	0	49	0	0	0
2	5	0	0	0	322	0	140	0	0	70	568	0	0	0	84	0	23	0	0	84	11	0	0
2	6	0	0	0	501	0	104	0	0	234	554	0	0	4	347	0	13	0	0	121	7	0	0
Medio:		0	0	0	408	0	127	0	1	129	457	0	0	2	150	0	21	0	0	74	6	0	0
Des. Est.:		0	0	0	100	0	31	0	3	102	89	0	0	2	169	0	9	0	0	34	4	0	0
3	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0	0	0	67	0	32	0	0	60	0	0	0
3	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0	0	0	33	0	23	0	0	41	4	0	0
3	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0	0	0	37	0	35	4	0	110	6	0	0
3	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0	0	0	61	0	24	0	0	69	4	0	0
3	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0	0	4	150	0	25	0	0	76	4	0	0
3	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0	0	0	35	0	28	0	0	77	4	0	0
Medio:		0	0	0	235	0	143	0	9	43	306	0	0	1	64	0	28	1	0	72	4	0	0
Des. Est.:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0	0	2	45	0	5	2	0	23	2	0	0
Prueba t		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd	0.36	0.40	0.29	nd	0.08	0.36	nd	0.88	0.27	nd	nd