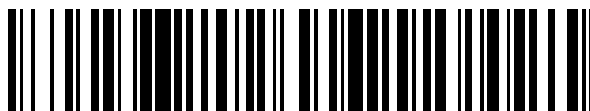


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 556**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012** **PCT/US2012/071072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13096686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012** **E 12815943 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018** **EP 2794854**

54 Título: **Detección de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano**

30 Prioridad:

23.12.2011 US 201161579710 P

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

20.07.2018

73 Titular/es:

DEPUY SYNTHES PRODUCTS LLC (100.0%)
325 Paramount Drive
Raynham, MA 02767-0350, US

72 Inventor/es:

DORAI, HAIMANTI;
FAVIS, REYNA L.;
YAO, XIANG;
SUN, YU;
KIHM, ANTHONY y
RASSNICK, STEFANIE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 676 556 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

Detección de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a métodos de detección de células terapéuticas alogénicas, como, por ejemplo, células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, en una muestra de un paciente que se trata con las células terapéuticas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las terapias celulares alogénicas son una nueva tecnología prometedora para el tratamiento de una serie de necesidades médicas no satisfechas. Sin embargo, las terapias celulares son productos únicos y presentan algunos desafíos únicos en el proceso de desarrollo. Un ejemplo específico de esta tecnología es el desarrollo de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano ("hUTC") para una serie de indicaciones clínicas. Después de la administración de hUTC a los sujetos, la medición de la presencia y/o el número de células detectadas en la sangre del sujeto es información deseable relevante para la farmacocinética de hUTC como producto de terapia celular. Sin embargo, esto plantea un desafío ya que hUTC puede tener características que son similares a las células reunidas a partir de la sangre del sujeto. Por lo tanto, es necesario distinguir hUTC de otras células.

[0003] Los estudios clínicos durante el desarrollo de fármacos incluyen estudios farmacocinéticos para examinar parámetros de absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco *in vivo*. Un elemento importante de los estudios farmacocinéticos consiste en determinar el nivel de exposición de un fármaco en los sujetos. Típicamente, esto se hace a través del análisis de niveles de fármaco a partir de muestras de sangre; los niveles de exposición se evalúan en relación con los resultados de eficacia y seguridad. En el caso de un producto de terapia celular, como hUTC, el estudio de la biodistribución o la farmacocinética de hUTC en ensayos clínicos presenta un desafío porque no existe un método establecido para distinguir hUTC (u otros productos celulares) de las propias células de los sujetos. Por lo tanto, es difícil determinar la biodisponibilidad de hUTC.

[0004] El enfoque actualmente aceptado para determinar si las células terapéuticas alogénicas (por ejemplo, hUTC) están presentes en la circulación requiere el uso de células terapéuticas alogénicas (por ejemplo, hUTC) de un donante masculino y transfusión intravenosa en sujetos femeninos. Véase, por ejemplo, Bader P. et al., "How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation?" Trasplante de médula ósea, 2005; 35: 107 - 119; véase también Durnam, DM et al., "Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific *in situ* hybridization assay", Blood, 1989; 74: 2220-2226. La PCR en tiempo real se usa para detectar el cromosoma Y en una muestra de la sangre del sujeto y los resultados proporcionan una cuantificación relativa o señal binaria para indicar la presencia o ausencia de células terapéuticas alogénicas (por ejemplo, hUTC) en la muestra de sangre. Véase Bader P. et al. Este enfoque requiere excluir a las mujeres de las células (por ejemplo, los donantes hUTC) y los sujetos varones de los análisis sobre la farmacocinética de hUTC en los estudios clínicos. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de un método para detectar células alogénicas, tales como, por ejemplo, UTC, en pacientes después de la administración de las células.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0005] La invención proporciona un método para detectar células circulantes terapéuticas alogénicas en una muestra de sangre que comprende:

- a. ensayar células terapéuticas alogénicas circulantes y células mononucleares de sangre periférica humana para identificar uno o más marcadores positivos para células terapéuticas alogénicas y uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica del paciente;
- b. comparar uno o más marcadores positivos para células terapéuticas alogénicas circulantes y uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica del paciente para identificar uno o más marcadores únicos que distingan las células terapéuticas alogénicas de las células mononucleares de sangre periférica del paciente;
- c. analizar una muestra de sangre de un paciente que ha sido tratado con células terapéuticas alogénicas usando un método de ensayo para detectar uno o más marcadores únicos positivos para las células terapéuticas alogénicas circulantes; y
- d. distinguir entre las células mononucleares de sangre periférica del paciente y las células terapéuticas alogénicas circulantes basándose en la detección de uno o más marcadores únicos;

en donde las células terapéuticas alogénicas circulantes son células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, y en donde uno o más marcadores únicos para células humanas derivadas de tejido de cordón umbilical comprenden CD10, CD13, NRP1, LAMP1, DKK3, NRP1 o LAMB1.

[0006] La invención proporciona además un método para detectar células circulantes derivadas de tejido de cordón

umbilical humano en una muestra de sangre que comprende las etapas de:

- a. aislar la fracción de células mononucleares derivadas de tejido de cordón umbilical humano/sangre periférica de una muestra de sangre que contiene células derivadas de tejido de cordón umbilical humanas circulantes;
 - b. eliminar cualquier plasma;
 - c. analizar la fracción de células mononucleares derivadas de tejido del cordón umbilical humano/sangre periférica por citometría de flujo para CD45 como un marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica y CD13 como un marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humanas en circulación; y
 - d. detectar la presencia de células mononucleares de sangre periférica humana y células derivadas de tejido de cordón umbilical humanas basadas en la detección de CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica humana y CD13 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.
- [0007]** La invención permite detectar la presencia de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en una muestra de células mononucleares de sangre periférica humana. La invención permite la detección de tales células terapéuticas sin estar limitadas por el cariotipo de las células terapéuticas (XY frente a XX) y el género del receptor (paciente).
- [0008]** En una realización, uno o más marcadores positivos para las células mononucleares de sangre periférica de pacientes comprende CD45.
- [0009]** Los métodos pueden ser adecuados para detectar cualesquiera células terapéuticas alogénicas de interés. Por ejemplo, las células terapéuticas alogénicas pueden seleccionarse del grupo que consiste en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, células derivadas de sangre de cordón umbilical humano, células derivadas de placenta, células derivadas de células madre mesenquimales, células hepáticas, células de islotes pancreáticos, cardiomiocitos y células de matriz ósea de colágeno insolubles. Los métodos también pueden usarse para detectar dos o más tipos diferentes de células terapéuticas alogénicas en una muestra de sangre.
- [0010]** Una variedad de diferentes métodos de ensayo puede usarse para estos métodos, tales como por ejemplo, citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica, detección de ácidos nucleicos, PCR, y combinaciones de los mismos. Además, los métodos pueden incluir un paso de enriquecimiento entre los pasos (a) y (b). El paso de enriquecimiento puede incluir tecnología de captura magnética. El paso de distinguir incluye diferenciar entre células terapéuticas alogénicas administradas al paciente y células mononucleares de sangre periférica del paciente. El paciente puede ser un humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un hámster, un conejillo de indias, un perro o un cerdo.
- [0011]** Se describen aquí kits, que pueden usarse en el método de detección de células terapéuticas alogénicas en una muestra de sangre. Los kits pueden incluir un perfil de marcador que tiene uno o más marcadores de células terapéuticas alogénicas positivas y uno o más marcadores positivos para las células mononucleares de sangre periférica del paciente.
- [0012]** El paciente puede ser un humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un hámster, un conejillo de indias, un perro o un cerdo.
- [0013]** En una realización, el marcador positivo para las células mononucleares de sangre periférica del paciente es CD45 y el marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano es CD10. En otra realización, los marcadores para células mononucleares de sangre periférica de paciente y para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano incluyen uno o más de CD10, CD13, NRP1, CD45, LAMP1, DKK3, NRP1 o LAMB1. El método puede emplear una variedad de técnicas de ensayo que incluyen citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica, detección de ácido nucleico, PCR y combinaciones de los mismos. El o los únicos marcadores positivos para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano pueden ser uno o más de CD10, CD13, NRP1, LAMP1, DKK3, NRP1, LAMB1 y combinaciones de los mismos.
- [0014]** El método puede comprender además la realización de una etapa de enriquecimiento entre las etapas (a) y (b). El paso de enriquecimiento puede ser la tecnología de captura magnética.
- [0015]** Otra realización de la invención es un método de detección de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en sangre que incluye las etapas de: someter a ensayo las células derivadas de tejido de cordón umbilical humanas y células mononucleares de sangre periférica humana para identificar uno o más marcadores positivos para las células humanas derivadas de tejido de cordón umbilical y uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica humana; proporcionar una muestra de sangre que contiene células humanas derivadas de tejido de cordón umbilical; aislar la célula derivada de tejido de cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de sangre periférica de la muestra de sangre; analizar la célula derivada de tejido del cordón umbilical humano/fracción mononuclear de sangre periférica por citometría de flujo para CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica y CD10 o CD13 como marcador positivo para células

derivadas de tejido del cordón umbilical humano y detectar la presencia de las células mononucleares de sangre periférica humana y las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano basadas en la detección de CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica humana y CD10 o CD13 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

[0016] La etapa de análisis puede incluir el análisis de la célula derivada de tejido de cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de sangre periférica mediante citometría de flujo para CD45 como un marcador positivo para células mononucleares de la sangre periférica y CD13 como marcador positivo para células derivadas del tejido del cordón umbilical humano. Alternativamente, el paso de análisis puede incluir el análisis de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de de sangre periférica por citometría de flujo para CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica y CD10 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. El método también puede incluir la realización de una etapa de enriquecimiento antes de analizar la célula derivada de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de de sangre periférica tal como, por ejemplo, tecnología de captura magnética.

[0017] Otra realización de la invención es un método de detección de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en la sangre que incluye las etapas de: proporcionar una muestra de sangre que contiene células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; aislar las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de de sangre periférica de la muestra de sangre; eliminar cualquier plasma; analizar la célula derivada de tejido del cordón umbilical humano/fracción mononuclear de sangre periférica mediante citometría de flujo para CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica y CD13 como marcador positivo para células derivadas de tejido del cordón umbilical humano y detectar la presencia de células humanas mononucleares de sangre periférica y células derivadas de tejido de cordón umbilical humano basadas en la detección de CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica humana y CD13 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. El método también puede incluir realizar una etapa de enriquecimiento antes de analizar las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de de sangre periférica tal como, por ejemplo, tecnología de captura magnética. El método también puede incluir la detección de CD10 como un marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

[0018] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, y tienen el potencial de diferenciarse. En una realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse y tienen las siguientes características: 1) expresar CD10, CD13, CD44, CD90 y HLA-ABC; (2) no expresar CD31, CD34, CD45, HLA-DR y CD117, y (3) no expresar hTERT o telomerasa. Alternativamente, las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano pueden aislarse del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse y tienen las siguientes características: (1) expresar CD10, CD13, CD44, CD90 y HLA-ABC; (2) no expresar CD31, CD34, CD45, HLA-DR y CD117; (3) no expresar hTERT o telomerasa; (4) expresar el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, el retículo, el ligando 3 del receptor de quimiocina y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y (4) expresar, en relación con un fibroblasto humano, la célula madre mesenquimal o célula de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o retículo 1.

[0019] Otra realización de la invención es el método de detección de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en la sangre, incluyendo las etapas de: (a) proporcionar una muestra de sangre de un paciente que ha sido tratado con células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; (b) analizar la muestra usando un método de ensayo para detectar uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica humana y uno o más marcadores positivos para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; y (c) distinguir entre las células mononucleares de sangre periférica humana y uno o más marcadores positivos para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. En una realización, el marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica humana es CD45 y el marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano es CD10. El paso de análisis puede utilizar citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica, detección de ácido nucleico y/o PCR. El método puede incluir, además, la realización de un paso de enriquecimiento entre los pasos (a) y (b). El paso de enriquecimiento puede ser la tecnología de captura magnética.

[0020] Otra realización más de la invención es un método de detección de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en la sangre, incluyendo las etapas de: (a) proporcionar una muestra de sangre que contiene células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; (b) aislar las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de sangre periférica de la muestra de sangre; y (c) analizar la fracción de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de de sangre periférica por citometría de flujo para CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica y CD10 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

[0021] Una realización alternativa de la invención es un método de detección de células derivadas de tejido de

cordón umbilical humano en la sangre que comprende las etapas de: proporcionar una muestra de sangre que contiene células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; aislar células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de de sangre periférica de la muestra de sangre; eliminando cualquier plasma; y analizando la fracción de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de de sangre periférica mediante citometría de flujo para CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica y CD13 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

[0022] Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y los ejemplos que siguen.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderá mejor cuando se lea en conjunción con las figuras adjuntas. Con el propósito de ilustrar la invención, las figuras demuestran realizaciones de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que la invención no está limitada a las disposiciones, ejemplos e instrumentos precisos que se muestran.

La Figura 1 enumera las 24 muestras y la edad del cultivo de células para cada muestra utilizada para el Estudio 1 en el Ejemplo 1. En particular, la Tabla de la Figura 1A enumera las 24 muestras utilizadas para el análisis de microensayos y el gráfico de la Figura 1B muestra la edad del cultivo celular para cada una de estas 24 muestras.

La Figura 2A muestra una expresión comparativa del gen PTPRC (CD45) en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (hUTC) y en varios tipos de células sanguíneas que comprenden CMSP humanas.

La Figura 2B muestra una comparación de la expresión del gen MME (CD10) en hUTC y en diversos tipos de células sanguíneas que comprenden células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP).

La Figura 2C muestra una comparación de la expresión del gen ANPEP (CD13) en hUTC y en varios tipos de células sanguíneas que comprenden CMSP humanas.

La Figura 3 muestra el análisis por RT-PCR de genes seleccionados cuya expresión en hUTC es más alta que la de CMSP humanas.

La Figura 4A muestra los resultados de un ensayo de citometría de flujo para la detección de marcadores de superficie celular en hUTC. Con referencia a la Figura 4A, los paneles A1, B1, C1, D1 y E1 muestran los controles no teñidos. El panel A2 muestra CD13 y 7AAD. El panel B2 muestra CD10 y 7AAD. El panel C2 muestra NRP1 y 7AAD. El panel D2 muestra CD45 y 7AAD. El panel E2 muestra LAMP1 y 7AAD.

La Figura 4B muestra los resultados de un ensayo de citometría de flujo para la detección de marcadores de superficie celular en CMSP humanas. Con referencia a la Figura 4B, los paneles A1, B1, C1, D1 y E1 muestran los controles no teñidos. El panel A2 muestra CD13 y 7AAD. El panel B2 muestra CD10 y 7AAD. El panel C2 muestra NRP1 y 7AAD. El panel D2 muestra CD45 y 7AAD. El panel E2 muestra LAMP1 y 7AAD.

La Figura 4C muestra los resultados para un ensayo de citometría de flujo para la detección de los marcadores internos DKK3 y LAMP1 en CMSP y hUTC.

La Figura 5A muestra la detección de hUTC en una mezcla que comprende hUTC (que varía de 1.500 a 1.700 células/ml) y CMSP humanas (1 millón de células/ml) en presencia de 1 ml de suero humano usando citometría de flujo.

La Figura 5B muestra la detección de hUTC en una mezcla que comprende hUTC (que varía de 1.700 a 110.000 células/ml) y CMSP humanas (1 millón de células/ml) en presencia de 1 ml de suero humano usando citometría de flujo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0024] Esta solicitud está dirigida a métodos para detectar células terapéuticas alogénicas como células progenitoras que circulan en la sangre de un paciente (por ejemplo, humano). Las células progenitoras u otras células modificadas genéticamente, que son componentes de un producto de terapia celular, se están desarrollando para una serie de indicaciones clínicas. Estas células, tales como, por ejemplo, hUTC, se administran al paciente mediante, por ejemplo, administración intravenosa. La disposición de estas células en la sangre circulante debe determinarse para evaluar la farmacocinética de las células como un producto de terapia celular y también para determinar con mayor precisión el éxito de la terapia. Sin embargo, la sangre humana está compuesta de múltiples tipos de células sanguíneas, uno o más tipos de las cuales expresan algunas proteínas que también pueden expresarse en células progenitoras o modificadas genéticamente. Además, es importante desarrollar un ensayo suficientemente sensible que pueda detectar un pequeño número de estas células (como, por ejemplo, hUTC) en un gran exceso de células en la sangre del receptor. La detección de estas células en presencia de sangre humana, por lo tanto, se convierte en un desafío que requiere la obtención de suficiente sensibilidad y especificidad. Por lo tanto, existe la necesidad de un ensayo que pueda identificar y distinguir células progenitoras o modificadas genéticamente de células sanguíneas humanas.

I. Definiciones

[0025] Una "muestra" tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier sustancia, que puede contener el analito de interés. Una muestra puede ser un fluido biológico, como sangre entera o componentes de sangre completa, incluidos glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, suero y plasma, líquido ascético, orina, líquido cefalorraquídeo y otros constituyentes del cuerpo.

[0026] Las células, que pueden ser identificadas en una muestra de sangre que contiene células mononucleares periféricas utilizando los métodos de la descripción, generalmente se denominan células postparto o células derivadas posparto (PPDCs). 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) o "células derivadas del tejido del cordón umbilical humano" (hUTC). 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.

[0027] Las células madre son células no diferenciadas definidas por la capacidad de una sola célula tanto de auto-renovación como para diferenciar para producir células de la progenie, incluyendo progenitores auto-renovación, progenitores no-renovación, 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, sino a todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

[0028] Las células madre se clasifican de acuerdo con su potencial de desarrollo como: (1) totipotentes; (2) pluripotentes; (3) multifactoriales; (4) oligopotentes; y (5) unipotentes. 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 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).

[0029] Las células madre también se clasifican sobre la base 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 que puede derivarse 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 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 (por ejemplo, como las obtenidas de la sangre del cordón umbilical) o no derivadas de la sangre (por ejemplo, tal como se obtienen de los tejidos no sanguíneos del cordón umbilical).

[0030] Varios términos se utilizan 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".

[0031] El término "línea celular" se refiere generalmente 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 se ha pasado diez veces se puede denominar cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células del tejido, se denomina P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (PI 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 pasaje. 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.

[0032] "Diferenciación" es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, como por ejemplo una célula nerviosa o una célula muscular. 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 de célula específica 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. Tal 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 a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

[0033] En un sentido amplio, una "célula progenitora" es una célula que tiene la capacidad de crear progenie más diferenciada que ella misma, y sin embargo, conserva la capacidad para reponer el conjunto de los 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 más detalle a continuación, se puede usar esta definición amplia de célula progenitora. En un sentido más restringido, una célula progenitora se define a menudo como una célula que es intermedia en la vía de diferenciación, es decir, surge de una célula madre y es intermedia en la producción de un tipo de célula 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".

[0034] 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 el aumento de la actividad de una célula.

[0035] 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 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.

[0036] El término "aislado" tal como se utiliza en este documento generalmente se refiere a una célula, que ha sido separada 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, mediante la sujeción de una pieza de tejido a trituración suave.

[0037] Tal como se utiliza aquí, el término células mononucleares de sangre periférica ("CMSP") abarca cualquier célula de sangre que tiene un núcleo redondo. Las células mononucleares de sangre periférica ejemplares incluyen, pero no se limitan a, linfocitos, monocitos y macrófagos.

II. Métodos de detección de células alogénicas terapéuticas en una muestra de sangre del paciente

[0038] Esta solicitud proporciona métodos para la detección de células terapéuticas alogénicas en muestra de sangre de un paciente después de que las células se han administrado al paciente. Los métodos implican los pasos de (a) proporcionar una muestra de sangre de un paciente que ha sido tratado con las células terapéuticas alogénicas; (b) analizar la muestra usando un método de ensayo para detectar uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica ("CMSP") (por ejemplo, cualquier célula sanguínea que tenga un núcleo redondo) y/o uno o más marcadores positivos para células terapéuticas; y (c) distinguir entre las células mononucleares de sangre periférica humana y uno o más marcadores positivos para células terapéuticas alogénicas que no son expresadas por las células mononucleares de sangre periférica. Para poder distinguir entre los marcadores para las células mononucleares de sangre periférica del paciente y uno o más marcadores positivos para células terapéuticas que no son expresadas por las células mononucleares de sangre periférica, también es necesario identificar primero estos marcadores. Por lo tanto, los métodos pueden incluir adicionalmente la etapa de analizar estos marcadores. Los métodos de la invención permiten la detección de tales células sin estar limitadas por el cariotipo de la célula terapéutica alogénica (es decir, XX frente a XY) y el sexo del paciente. Por lo tanto, los métodos no están limitados por el género ni están limitados a la identificación de células terapéuticas alogénicas masculinas (XX) en un paciente femenino.

[0039] En una realización, la invención proporciona métodos para la detección o identificación de células derivadas del tejido del cordón umbilical humano en una muestra de sangre. Los métodos implican los pasos de: (a) proporcionar una muestra de sangre de un paciente que ha sido tratado con células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; (b) analizar la muestra usando un método de ensayo para detectar uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica humana y uno o más marcadores positivos para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; y (c) distinguir entre las células mononucleares de sangre periférica humana y las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. Para poder distinguir, también se necesita analizar el perfil de marcador único para poder seleccionar el perfil de marcador único distintivo. También se puede emplear una etapa adicional para cuantificar la cantidad de hUTC. En una realización, pueden usarse los marcadores mostrados en el Ejemplo 3.

[0040] En otra realización, la invención describe métodos para distinguir y/o medir un producto de terapia celular hUTC tras la administración intravenosa en humanos. Los métodos identifican marcadores moleculares que se expresan a niveles sustancialmente más altos en hUTC en comparación con células normalmente presentes en sangre, es decir, células mononucleares de sangre periférica ("CMSP"). Dado que los métodos se basan en un perfil de marcador único para la identificación de hUTC, permiten la detección de tales células sin estar limitadas por el cariotipo de la hUTC (XX frente a XY) y el sexo del paciente. No están limitados por el género ni están limitados solo a hombres hUTC. Por lo tanto, estos métodos permiten el análisis de hUTC tanto masculinos como femeninos en sujetos masculinos y femeninos, en cualquier combinación.

[0041] Los métodos de la invención son adecuados para distinguir las células terapéuticas alogénicas en la sangre de un paciente a partir de una variedad de fuentes. En particular, los métodos de la invención son adecuados para detectar un pequeño número de hUTC en presencia de un gran exceso de la sangre de un receptor. Este método es aplicable para cualquier miembro del sistema de mamíferos y no está restringido al derivado de humanos. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden usarse para distinguir células terapéuticas alogénicas tales como, por ejemplo, hUTC de CMSP en un ser humano. Alternativamente, los métodos pueden usarse para distinguir células terapéuticas alogénicas tales como, por ejemplo, hUTC de CMSP en un primate no humano, ratón, rata, hámster, cobaya, perro o cerdo.

[0042] Estos métodos ayudan a diferenciar hUTC y otras células terapéuticas alogénicas de la CMSP y pueden ayudar a la farmacocinética del monitor en sujetos que reciben un producto de terapia celular.

[0043] Los métodos de la invención son adecuados para la detección de células terapéuticas alogénicas (tales como por ejemplo hUTC) en muestras de sangre de pacientes después de haber sido tratados con las células. Por lo tanto, los métodos de la invención son adecuados para la detección de células terapéuticas alogénicas (tales como, por ejemplo, hUTC) que pueden haberse administrado previamente. Los métodos descritos en este documento pueden ser adecuados para la detección de cualquier célula de interés terapéutico tal como, por ejemplo, células derivadas de sangre de cordón humano, células derivadas de placenta, células madre mesenquimales y células derivadas de células madre mesenquimales, hUTC, cardiomiocitos, etc. o cualquier célula diana que exprese una proteína específica o proteínas de interés. Otras células adecuadas para uso en estos métodos incluyen células de hígado, células de islotes pancreáticos, fibroblastos y células de matriz de hueso de colágeno insolubles (ICBM).

[0044] Los métodos también pueden ser adecuados para la detección de dos o más tipos de células terapéuticas alogénicas (tales como por ejemplo hUTC) en muestras de sangre de pacientes después de haber sido tratados con las células. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para detectar tanto células derivadas de tejido de cordón umbilical humano como células derivadas de placenta en una muestra de sangre. Alternativamente, los métodos pueden usarse para detectar células derivadas de tejido de cordón umbilical humano y fibroblastos dérmicos en una muestra de sangre. Los métodos también pueden usarse para detectar células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, células derivadas de placenta y fibroblastos dérmicos en una muestra de sangre.

A. Identificación de un perfil marcador único distintivo

[0045] Los métodos de la invención incluyen la etapa de identificar un perfil de marcador único distintivo basado en la presencia de la célula terapéutica (células derivadas de tejido de cordón umbilical humano) en una muestra de sangre del paciente que contiene CMSP.

[0046] Para derivar este perfil único marcador, la expresión de genes y la presencia de marcadores de superficie celular necesita compararse entre las células (por ejemplo, células derivadas de tejido de cordón umbilical humano) y CMSP. Para detectar la presencia de hUTC en la sangre, se pueden utilizar múltiples tecnologías que incluyen tecnologías basadas en proteínas como ELISA e inmunohistoquímica o tecnologías basadas en ácidos nucleicos, como la hibridación *in situ*. Alternativamente, la tecnología de PCR también se puede usar. Como se describe en los ejemplos a continuación, el nivel de expresión de diversos genes en CMSP y/o las células terapéuticas alogénicas también se puede obtener a partir de fuentes disponibles públicamente.

[0047] Basado en el nivel de expresión de estos diversos genes, se pueden identificar ciertos genes marcadores únicos. En una realización, particularmente adecuada para el rastreo rápido, el marcador es un marcador de

superficie celular.

[0048] Como se ilustra en los ejemplos a continuación, los marcadores moleculares en hUTC pueden identificarse mediante la comparación del perfil de expresión de estas células a la de las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP). Comparando los perfiles de expresión de los marcadores hUTC y CMSP que se expresan a niveles sustancialmente más altos en hUTC en comparación con las células normalmente presentes en la circulación y viceversa, se identifican así para cada paciente. Los marcadores identificados incluyen CD45, CD13 y CD10. Ya que tanto la hUTC como las células circulantes pueden mostrar niveles de expresión dinámica, el método se basa en múltiples marcadores que pueden distinguir hUTCs de las células en la circulación del receptor.

[0049] El perfil único marcador puede incluir uno o más marcadores positivos para las células alogénicas, cuya presencia se está ensayando, y uno o más marcadores positivos para las células mononucleares de sangre periférica. Por lo tanto, cuando se analizan células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, el perfil marcador puede incluir uno o más marcadores positivos para hUTC y uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica. Alternativamente, las células alogénicas, cuya presencia se está ensayando, pueden identificarse usando solo uno o más marcadores únicos para las células alogénicas suficientes para distinguir estas células de las células mononucleares de sangre periférica.

[0050] En una realización, particularmente útil para identificar hUTC en CMSP, el perfil de marcador único incluye una o más de CD10, CD13, NRP1, CD45, LAMP1, DKK3, NRP1, o LAMB1. En una realización, el perfil de marcador único comprende al menos una o más características de marcador (por ejemplo, positivas) para la hUTC y al menos una característica de marcador (por ejemplo, positiva) para CMSP (tal como, por ejemplo, CD45).

[0051] En otra realización, también particularmente útil para identificar hUTC en CMSP, el perfil de marcador único incluye uno o más marcadores únicos que son positivos para la hUTC y que son suficientes para distinguir hUTC de las células mononucleares de sangre periférica. Estos uno o más marcadores únicos pueden incluir uno o más de CD 10, CD13, NRP1, LAMP1, DKK3, NRP1 o LAMB1.

[0052] Los expertos reconocerán que la elección de qué marcador usar puede variar dependiendo de la técnica que se utiliza. Por ejemplo, usando un análisis de microensayos (como por ejemplo, matriz Affymetrix GeneChip® HT HG-U133 + PM), ANPEP (CD13), LAMP1 y LAMB1 pueden ser insuficientes para distinguir, mientras que uno o más de los otros marcadores pueden ser suficientes para distinguir. De manera similar, el uso de RT-PCT, LAMP1 puede no ser adecuado como parte del perfil de marcador único que distingue a hUTC de CMSP, mientras que uno o más de los otros marcadores pueden ser suficientes. En una realización, el perfil de marcador único usado para el cribado de hUTC mediante citometría de flujo de superficie celular no incluye DKK3 y LAMB1. En otra realización, el perfil marcador único para citometría intracelular incluye LAMP1 y DKK3.

[0053] Los marcadores adecuados ejemplares para la identificación de hUTC en una muestra de CMSP, usando técnicas seleccionadas se muestran a continuación.

Técnica	Marcadores solo positivos para hUTC usando la técnica	Marcadores solo positivos para CMSP usando la técnica
Análisis de microensayos	MME (CD10), NRP1, DKK3	PTPRC (CD45)
RT-PCR	MME (CD10), NRP1, DKK3, LAMB1	PTPRC (CD45)
Citometría de flujo (superficie)	MME (CD10), ANPEP (CD13)	PTPRC (CD45)
Citometría de flujo (intracelular)	LAMP1	

[0054] Por lo tanto, en una realización, el perfil de marcador único incluye CD10 como los uno o más marcadores positivos de hUTC y CD45 como el uno o más marcadores positivos para CMSP. En otra realización, el perfil marcador único incluye CD10 y/o CD13 como uno o más marcadores positivos hUTC y CD45 como uno o más marcadores positivos para CMSP.

[0055] En otra realización, usando citometría de flujo como el método de ensayo, el perfil de marcador único para identificar hUTC en CMSP incluye CD45 como el uno o más marcadores positivos para células mononucleares periférica de la sangre y CD10 como uno o más marcadores positivos para células derivadas de tejido del cordón umbilical humano.

[0056] En otra realización de la invención, el perfil de fabricante para distinguir hUTC y CMSP comprende CD45, CD10, y CD13 por citometría de flujo, en el que CD10 y CD13 son el uno o más marcadores positivos para hUTC y en el que CD45 es el uno o más marcadores positivos para CMSP.

- 5 **[0057]** Los marcadores adecuados a modo de ejemplo para identificar las células terapéuticas seleccionadas en una muestra de CMSP se muestran a continuación:

10	Tipo de célula	Marcador para el tipo de célula	Marcador de PBMC huesped
	Cordón umbilical humano derivado de la sangre	CD10, CD13, CD107a	CD45
	Placenta derivada	Renina	Choque térmico 27kd
	Derivadas de células madre mesenquimales	IL26, a-glucosidasa	CD45
15	Hígado	FOXA2, HNF1a	CD45
	Células de los islotes pancreáticos	G6PC2, INSULINA	CD45
	Fibroblastos	SDF-1, GCP-2	CD45
20	Células derivadas de la sangre del cordón umbilical humano y fibroblastos dérmicos	IL8, GCP-2	CD45
	Células de cordón umbilical humano y células derivadas de placenta	IL6, MCP-1	CD45
	Matriz ósea colágena insoluble (ICBM)	Integrina α -10; proteína de repetición de anquirina cardíaca	CD45
25	Cardiomiocitos	FoxA2, GATA4, MIR20	CD45

[0058] El perfil de marcador único es que se puede obtener utilizando los siguientes procedimientos, así como la metodología descrita en los ejemplos. Los procedimientos que se describen a continuación pueden abarcar tanto la obtención del perfil de marcador único como la verificación de su precisión. Si bien el paso de verificación puede abarcar el análisis de una muestra, el paso puede ser necesario para determinar la exactitud y los límites de prueba del procedimiento específico mediante el cual se detectará el gen marcador único o la proteína. En esta realización, se puede usar citometría de flujo para identificar los marcadores.

35 **[0059]** *Obtención del perfil único marcador.* El perfil de expresión génica de hUTC, procedente de múltiples fuentes, se generó utilizando Affymetrix GeneChip® HT HG-U133 + PM. Los perfiles de expresión génica de CMSP humana y de rata y otros tipos de células sanguíneas se obtuvieron a partir de bases de datos disponibles públicamente. A partir de los resultados de los perfiles de expresión génica, se puede identificar un conjunto de marcadores que están altamente expresados en hUTC y un conjunto de marcadores que están altamente expresados en CMSP humanas. Se identificaron sesenta y un (61) genes, un subconjunto de los cuales se estudiaron con más detalle. De esta lista de 61 genes, CD45 se identificó como un marcador positivo para hCMSP y CD10 y CD13 como dos marcadores positivos para hUTC.

45 **[0060]** *Verificación de la metodología de ensayo para el perfil de marcador.* Dado que se anticipa que el número de hUTC en una muestra de sangre de un sujeto es bajo, se determinó si podría detectarse y cuantificarse un pequeño número de hUTC en presencia de un gran exceso de CMSP humanas usando los marcadores identificados anteriormente. Para este propósito, se introdujeron cantidades conocidas de hUTC en aproximadamente un millón de CMSP en 1 ml de suero humano. Posteriormente, se analizó una alícuota de cada muestra mediante citometría de flujo para CD45 como un marcador positivo para hCMSP y CD10 o CD13 como marcadores positivos para hUTC. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez con PBS y luego se fijaron y permeabilizaron. Se incubaron alícuotas de células con: (1) anti-CD45 marcado con FITC (Abcam, nº de Cat. 27287); (2) ratón monoclonal para CD10 (Abcam, nº de Cat. 34175) seguido de Ab de cabra anti-ratón marcado con FITC (Abcam, nº de Cat. 6785); y (3) ratón monoclonal para CD13 (Abcam, nº de Cat. 7417) seguido de Ab de cabra anti-ratón marcado con FITC (Abcam, nº de Cat. 6785). El yoduro de propidio (PI) se incluyó en cada muestra para monitorear la viabilidad ya que solo las células vivas fueron cerradas para su posterior análisis. Usando este procedimiento, se confirmó que la prueba para un perfil marcador que comprende CD10, CD13 y CD45 usando citometría de flujo es exitosa para identificar hUTC y CMSP.

60 **[0061]** En una realización, el perfil de marcador único puede estar provisto como parte de un kit que contiene los materiales para las pruebas para el perfil de marcador único.

[0062] La etapa de identificar el perfil de marcador único también puede incluir la etapa de verificar su corrección y la posible validación del perfil de marcador único en cumplimiento de las normas pertinentes.

B. Obtención de una muestra de paciente

[0063] La etapa de obtención de una muestra de paciente incluye la etapa de tomar una muestra de sangre del paciente. Como se mencionó anteriormente, en una realización, el paciente puede ser humano, primate no humano, ratón, rata, hámster, cobaya, perro o cerdo. La muestra de sangre puede purificarse o concentrarse más para aislar las células. Por ejemplo, en una realización, el plasma puede eliminarse de la sangre. El plasma puede eliminarse usando técnicas estándar en la técnica que incluyen la centrifugación.

[0064] La muestra del paciente (por ejemplo, fracción) utilizada para el análisis comprende además las células terapéuticas alogénicas de interés y las células mononucleares de sangre periférica del paciente. En una realización, la muestra del paciente comprende una fracción de células mononucleares de sangre periférica derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

[0065] En una realización, la etapa de obtención de una muestra de paciente incluye además el aislamiento de la fracción celular mononuclear derivada de tejido del cordón umbilical/sangre periférica de la muestra de sangre. Esta realización puede incluir además la etapa de eliminar plasma.

[0066] En una realización alternativa, la etapa de obtención de una muestra de paciente incluye el uso de extracción de Ficoll.

C. Análisis de la muestra del paciente

[0067] En general, la etapa de análisis comprende tomar la muestra de sangre del paciente y para ello, la presencia del perfil de marcador único distintivo de células terapéuticas alogénicas (por ejemplo hUTC). La etapa de análisis también puede incluir determinar la presencia de CMSP basándose en un perfil marcador único como se determinó anteriormente. Por ejemplo, la etapa de analizar la muestra del paciente incluye el uso de un método de ensayo para analizar uno o más marcadores positivos para las células terapéuticas alogénicas y uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica. Por lo tanto, la etapa de análisis incluye detectar la presencia de células basándose en el perfil marcador único ensayado anteriormente. Alternativamente, la etapa de analizar la muestra del paciente incluye el uso de un método de ensayo para analizar uno o más marcadores únicos positivos para la célula terapéutica alogénica suficiente para distinguir estas células de las células mononucleares de sangre periférica.

[0068] En una realización, la etapa de análisis incluye la detección de uno o más marcadores positivos para las células mononucleares de sangre periférica y uno o más marcadores positivos para las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano en la muestra de sangre del paciente. En otra realización, la etapa de análisis incluye detectar uno o más marcadores únicos positivos para hUTC suficiente para distinguir estas células de CMSP en la muestra de sangre del paciente. La muestra de sangre del paciente puede ser una fracción de células mononucleares de sangre periférica derivada de tejido de cordón umbilical humano.

[0069] La etapa de análisis puede llevarse a cabo usando una variedad de técnicas estándar de laboratorio. En una realización, la etapa de análisis puede utilizar citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica, detección de ácidos nucleicos, PCR o combinaciones de los mismos.

[0070] Tecnologías múltiples incluidas las tecnologías a base de proteínas tales como ELISA e inmuno-histoquímica o tecnologías basadas en ácidos nucleicos como hibridación *in situ* pueden usarse para detectar la presencia de hUTC en sangre. Alternativamente, la tecnología de PCR puede usarse para facilitar la cuantificación relativa de hUTC en una muestra de sangre.

[0071] En una realización preferida de la invención, los métodos de la invención se utilizan para distinguir hUTC humano a partir de CMSP humano. En una realización, el perfil marcador único comprende uno o más de CD10, CD13, NRP1, CD45, LAMP1, DKK3, NRP1 o LAMB1 y la etapa de análisis puede utilizar citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica, detección de ácido nucleico, PCR, o combinaciones de los mismos. En otra realización, la etapa de análisis incluye citometría de flujo para analizar CD10 y/o CD13 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano y CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica humana. En otra realización, se utilizan los métodos de la invención para distinguir hUTC a partir de CMSP humana basado en la presencia de uno o más marcadores positivos únicos (como por ejemplo, CD10, CD13, NRP1, LAMP1, DKK3, NRP1, o LAMB1) suficientes para distinguir estas células de las CMSP.

D. Pasos de enriquecimiento opcionales

[0072] Los métodos de la invención pueden incluir además uno o más pasos de enriquecimiento. El término "enriquecimiento" como se usa en este documento se refiere al proceso de aumentar sustancialmente la relación de bioentidades diana (por ejemplo, células terapéuticas alogénicas (tales como, por ejemplo, hUTC)) a materiales no objetivo (por ejemplo, CMSP) en la muestra analítica procesada en comparación con la proporción en la muestra biológica original.

[0073] En particular, si se requiere más sensibilidad para la detección de las células terapéuticas alogénicas (por ejemplo hUTC), una etapa de enriquecimiento puede ser necesaria antes de analizar la muestra del paciente. Por ejemplo, puede ser necesaria una etapa de enriquecimiento cuando hay pocas células terapéuticas alogénicas (por ejemplo, hUTC) presentes en relación con el número de células sanguíneas o que la cantidad de células terapéuticas alogénicas caiga por debajo de los límites de detección de la técnica de laboratorio. Usando el enriquecimiento, los métodos de la invención pueden identificar y cuantificar células terapéuticas alogénicas, incluso si están presentes en muy baja concentración en la sangre del paciente y proporcionan un mecanismo para facilitar la cuantificación de las células presentes en cualquier muestra dada.

[0074] Una variedad de técnicas estándar se puede utilizar para las una o más etapas de enriquecimiento. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan al uso de un medio selectivo para enriquecimiento y agotamiento de tipos celulares específicos, método de adhesiones selectivas, métodos físicos y biológicos de separación celular, electroforesis en gradiente de densidad, centrifugación y similares. Las técnicas de enriquecimiento ilustrativas son columnas de inmunoafinidad, perlas de inmunoafinidad, centrifugación a través de una sacarosa o gradiente de Ficoll.

[0075] Por lo tanto, en función del número de hUTC/ml de sangre y el número de hUTC/millón de CMSP, puede ser necesario aislar o enriquecer la fracción hUTC antes del análisis. El anticuerpo anti-CD45, conjugado a perlas magnéticas se puede usar para este propósito (véase discusión a continuación).

Separación de células con cuentas magnéticas

[0076] La etapa de enriquecimiento puede incluir la separación de células con partículas/perlas magnéticas. Las partículas magnéticas son bien conocidas en la técnica, como lo es su uso en reacciones de afinidad bioespecíficas inmunes y otras. En general, cualquier material que facilite la separación magnética o gravitacional se puede emplear para este fin. Ejemplos de procedimientos de enriquecimiento usando perlas magnéticas se describen en la Patente de EE.UU. N° 7.863.012 y la Solicitud publicada de EE.UU. N° 2011/0147180.

[0077] Las partículas magnéticas se pueden clasificar en función del tamaño: grande (1,5 a aproximadamente 50 micrómetros); pequeño (alrededor de 0,7-1,5 micras); o coloidal (<200 nm), que también se conocen como nanopartículas. Los terceros, que también se conocen como ferrofluidos o materiales de tipo ferrofluido y tienen muchas de las propiedades de los ferrofluidos clásicos, a veces se denominan aquí partículas superparamagnéticas coloidales.

[0078] Pequeñas partículas magnéticas del tipo descrito anteriormente son muy útiles en los análisis que implican reacciones de afinidad bio-específicas, ya que están convenientemente recubiertas con polímeros biofuncionales (por ejemplo, proteínas), proporcionan áreas superficiales muy altas, y dan cinética de reacción razonable. Se han descrito partículas magnéticas que varían de aproximadamente 0,7-1,5 micrómetros en la bibliografía de patentes, que incluyen, a modo de ejemplo, la patente de EE.UU. N°s 3.970.518; 4.018.886; 4.230.685; 4.267.234; 4.452.773; 4.554.088; y 4,659,678. Algunas de estas partículas se describen como soportes sólidos útiles para reactivos inmunológicos.

[0079] La eficiencia con la que las separaciones magnéticas se pueden hacer y la recuperación y pureza de células marcadas magnéticamente dependerá de muchos factores. Estos incluyen: número de células que se separan, densidad del receptor o epítipo de dichas células, carga magnética por célula, unión no específica (NSB) del material magnético, transferencia de células no diana atrapadas, técnica empleada, naturaleza del recipiente, naturaleza de la superficie del recipiente, viscosidad del medio y dispositivo de separación magnética empleado. Si el nivel de unión no específica de un sistema es sustancialmente constante, como suele ser el caso, a medida que la población diana disminuya, también lo hará la pureza.

[0080] Como ejemplo, un sistema con 0,8% NSB que recupera el 80% de una población, que es en el 0,25% en la mezcla original, tendrá una pureza del 25%. Mientras que, si la población inicial era de 0,01% (una célula diana en 10^6 células espectadoras), y la NSB era 0,001%, entonces la pureza sería 8%. Por lo tanto, una alta pureza del material diana en la mezcla de muestras da como resultado una recolección más específica y efectiva del material diana. Se requiere o es ventajosa una unión no específica extremadamente baja para facilitar la detección y el análisis de células raras, tales como las células tumorales derivadas del epitelio presentes en la circulación.

[0081] Cuanto menor sea la población de una célula diana (tal como, por ejemplo, hUTC), más difícil será etiquetar y recuperar magnéticamente. Además, el etiquetado y la recuperación dependerán notablemente de la naturaleza de las partículas magnéticas empleadas. Por ejemplo, cuando las células se incuban con partículas magnéticas grandes, como perlas magnéticas Dynal® (Invitrogen), las células se etiquetan a través de colisiones creadas por la mezcla del sistema, ya que las perlas son demasiado grandes para difundirse de manera efectiva. Por lo tanto, si una célula estuviera presente en una población con una frecuencia de 1 célula por ml de sangre o incluso menos, entonces la probabilidad de etiquetar las células diana se relacionaría con la cantidad de partículas magnéticas añadidas al sistema y el tiempo de mezcla. Dado que la mezcla de células con tales partículas durante períodos sustanciales sería perjudicial, se hace necesario aumentar la concentración de partículas tanto como sea posible.

Sin embargo, existe un límite en la cantidad de partículas magnéticas que se pueden agregar, ya que se puede sustituir una célula rara mezclada con otras células sanguíneas por una célula rara mezclada con grandes cantidades de partículas magnéticas tras la separación. La última condición no mejora notablemente la capacidad de enumerar las células de interés o de examinarlas.

[0082] En una realización, las partículas magnéticas para su uso en la realización de la etapa de enriquecimiento se comportan como coloides. Tales partículas se caracterizan por su tamaño de partícula submicrométrica, que generalmente es inferior a aproximadamente 200 nm (0,20 micras), y su estabilidad a la separación gravitacional de la solución durante períodos prolongados. Además de las muchas otras ventajas, este rango de tamaño las hace esencialmente invisibles a las técnicas analíticas comúnmente aplicadas al análisis de células. Las partículas dentro del intervalo de aproximadamente 90-150 nm y que tienen entre aproximadamente 70-90% de masa magnética se contemplan para su uso en la presente invención. Las partículas magnéticas adecuadas están compuestas por un núcleo cristalino de material superparamagnético rodeado por moléculas, que están unidas, por ejemplo, se absorben físicamente o se unen covalentemente al núcleo magnético y que confieren propiedades coloidales estabilizantes. El material de recubrimiento debe aplicarse preferiblemente en una cantidad efectiva para evitar interacciones no específicas entre las macromoléculas biológicas encontradas en la muestra y los núcleos magnéticos. Dichas macromoléculas biológicas pueden incluir carbohidratos tales como residuos de ácido siálico en la superficie de células no diana, lectinas, glicoproteínas y otros componentes de membrana. Además, el material debe contener tanto masa por nanopartícula como sea posible. El tamaño de los cristales magnéticos que comprenden el núcleo es suficientemente pequeño para que no contengan un dominio magnético completo. El tamaño de las nanopartículas es suficientemente pequeño como para que su energía browniana supere su momento magnético. En consecuencia, la alineación del Polo Norte, del Polo Sur y la subsiguiente atracción/repulsión mutua de estas partículas magnéticas coloidales no parece ocurrir incluso en campos magnéticos moderadamente fuertes, lo que contribuye a la estabilidad de su solución. Finalmente, las partículas magnéticas deben ser separables en separadores de campos externos de alto gradiente magnético. Esa característica facilita la manipulación de la muestra y proporciona ventajas económicas sobre las columnas de gradiente interno más complicadas cargadas con perlas ferromagnéticas o lana de acero. Las partículas magnéticas que tienen las propiedades descritas anteriormente pueden prepararse por modificación de los materiales de base descritos en la patente de EE.UU. N^{os} 4.795.698; 5.597.531 y 5.698.271.

[0083] Dado que las pequeñas nanopartículas (30-70 nm) se difundirán más fácilmente, van a etiquetar preferentemente las células en comparación con sus contrapartes más grandes. Cuando se usan gradientes muy altos, como en las columnas con gradientes internos, el rendimiento de estos materiales, independientemente del tamaño, no cambia mucho. Por otro lado, cuando se usan gradientes externos, o gradientes de menor magnitud que los que se pueden generar en columnas de microperlas o de lana de acero, la ocupación de pequeñas nanopartículas en las células tiene un efecto significativo. Se demostró de manera concluyente que este era el caso mediante el fraccionamiento de nanopartículas de DC y el estudio de los efectos sobre la recuperación. Con base en estos estudios y otros experimentos de optimización, se establecieron medios para fraccionar nanopartículas magnéticamente o en columnas donde se podían preparar partículas magnéticas revestidas con base que carecían de nanopartículas excesivamente pequeñas o grandes. Por ejemplo, pueden producirse partículas revestidas con una base de un diámetro medio de 100 nm que contienen, en el mejor de los casos, pequeñas cantidades de material de menos de 80 nm o más de 130 nm. De forma similar, se puede fabricar material de aproximadamente 120 nm sin material apreciable de menos de 90-95 nm y más de 160 nm. Dichos materiales se comportaron de forma óptima con respecto a la recuperación y podrían hacerse subóptimos mediante la inclusión de nanopartículas de 60-70 nm. Un intervalo de tamaño de partícula preferido para uso en la práctica de esta invención es 90-150 nm para partículas magnéticas revestidas con base, por ejemplo, magnetita recubierta con BSA.

[0084] En base a lo anterior, la separación magnética de alto gradiente con un dispositivo de campo externo que emplea partículas magnéticas coloidales de unión no específica altamente magnética es el método de elección para separar un subconjunto de células de interés de una población mixta de células eucarióticas (tal como, por ejemplo, células terapéuticas alogénicas (por ejemplo, hUTC) en células mononucleares de sangre periférica), particularmente si el subconjunto de interés comprende solamente una pequeña fracción de la población completa. Dichos materiales, debido a sus propiedades difusivas, encuentran rápidamente y etiquetan magnéticamente los eventos raros, como las células tumorales en la sangre. En una realización, para que las separaciones magnéticas para el análisis de células terapéuticas alogénicas (por ejemplo, hUTC) sean satisfactorias, las partículas magnéticas deben ser específicas para epítomos que no están presentes en las células terapéuticas alogénicas (por ejemplo, hUTC).

[0085] Una etapa de enriquecimiento mediante el uso de perlas magnéticas incluye el uso de nanopartículas magnéticas (tales como los descritos anteriormente), que están etiquetadas con un anticuerpo monoclonal. Estos anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos que identifican células mononucleares de sangre periférica pero no células terapéuticas alogénicas. El anticuerpo monoclonal unido a las nanopartículas se une a las células mononucleares de sangre periférica que luego pueden separarse usando medios magnéticos. Típicamente, tal separación se logra mediante el uso de separadores de campo externo de alto gradiente magnético. Una técnica ejemplar adecuada para separar por medios magnéticos se describe en la patente de los EE.UU. N^o 6.365.362. En una realización, se usa un anticuerpo anti-CD45 conjugado con una partícula magnética. Alternativamente, la etapa

de enriquecimiento incluye el uso de anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, para eliminar las células T.

[0086] En otra realización, la etapa de enriquecimiento incluye anticuerpos monoclonales que identifican las células terapéuticas alogénicas. En una realización adicional, las células terapéuticas alogénicas son hUTC y los anticuerpos incluyen uno o más anticuerpos anti-CD 10 o anti-CD13.

[0087] En una realización, los métodos de la invención incluyen el uso de un sistema de células de la búsqueda (Veridex, LLC (Raritan, NJ)), que ha sido optimizado para la detección de hUTC y CMSP.

[0088] Ya que la cantidad aproximada de células terapéuticas alogénicas (como por ejemplo hUTC) en una muestra de paciente puede ser desconocida, los métodos de la invención pueden también incluir la etapa de conservar una muestra suficiente paciente para ejecutar un análisis adicional. Esto puede ser particularmente útil cuando el análisis inicial podría no ser capaz de detectar las células terapéuticas alogénicas (tales como, por ejemplo, hUTC) debido a que las células terapéuticas alogénicas están presentes en una cantidad por debajo del límite de detección de la técnica de ensayo utilizada. Por lo tanto, en una realización, el método incluye adicionalmente un análisis adicional de una muestra de paciente si no se detectan inicialmente células terapéuticas alogénicas (tales como, por ejemplo, hUTC). Este análisis adicional también incluye uno o más pasos de enriquecimiento como los discutidos anteriormente.

E. Determinación de la presencia de células alogénicas terapéuticas y células mononucleares de sangre periférica en la muestra de sangre del paciente

[0089] Los métodos de la invención comprenden además la determinación de la presencia de células terapéuticas alogénicas en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. La etapa de determinar la presencia de dichas células incluye comparar los resultados del análisis de la muestra con el marcador único, que se analizó anteriormente, en el que la presencia de marcadores únicos para células terapéuticas alogénicas indica la presencia de células terapéuticas alogénicas en la muestra. El paso de determinación también puede incluir la comparación del resultado con un marcador único para las CMSP como se identificó anteriormente. Por lo tanto, la etapa de determinación incluye comparar los resultados para uno o más marcadores positivos para la célula terapéutica alogénica (hUTC) y uno o más marcadores negativos para CMSP para el perfil marcador anterior.

[0090] En otra realización, el método de la invención comprende la determinación de la presencia de cordón umbilical humano derivado de tejido en una muestra de células mononucleares de sangre periférica (tales como por ejemplo, humano o roedor). La etapa de determinación incluye comparar los resultados del análisis de la muestra con el marcador único, que se ensayó anteriormente, en el que la presencia de marcadores únicos para las células terapéuticas alogénicas indica la presencia de las células hUTC en la muestra. El paso de determinación también puede incluir comparar el resultado con un marcador único para las CMSP como se identificó anteriormente. La etapa de determinación puede incluir uno o más marcadores positivos para la hUTC y uno o más marcadores positivos para CMSP como se discutió anteriormente.

[0091] La etapa de determinación incluye también distinguir entre las células mononucleares de sangre periférica humana y células derivadas de tejido de cordón umbilical humano basado en la detección de uno o más marcadores positivos para las células mononucleares de sangre periférica humana y uno o más marcadores positivos para células derivadas de tejido del cordón umbilical humano. La etapa de determinación también puede incluir la diferenciación entre células derivadas de tejido de cordón umbilical humano administradas al paciente y células mononucleares de sangre periférica humana del paciente.

[0092] La etapa de determinar la presencia de las células también puede incluir la cuantificación de las células. En una realización, la etapa de determinación para la presencia de hUTC incluye cuantificar el número de hUTC en la muestra.

[0093] La etapa de determinar la presencia puede además incluir la selección de una o más células derivadas de tejido del cordón umbilical humano en base a la presencia del perfil de marcador único (como por ejemplo, uno o más marcadores positivos para hUTC).

[0094] La etapa de determinación puede incluir también la detección de la presencia de las células mononucleares de sangre periférica humana y células derivadas de tejido de cordón umbilical humano basado en la detección de CD45 como un marcador positivo para las células mononucleares de sangre periférica humana y CD10 o CD13 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

[0095] En realizaciones alternativas, los métodos descritos en el presente documento pueden ser adecuados para distinguir las células terapéuticas alogénicas de rata CMSP, que pueden ser particularmente útiles para el seguimiento en modelos de enfermedad de rata.

[0096] En una realización, la presente invención describe un método para la identificación de hUTC en sangre. El método implica los siguientes pasos: (a) proporcionar una muestra de sangre de un paciente que ha sido tratado con

células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; (b) analizar la muestra usando un método de ensayo para detectar uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica humana y uno o más marcadores positivos para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano; y (c) distinguir entre las células mononucleares de sangre periférica humana y uno o más marcadores positivos para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. También se puede emplear una etapa adicional para cuantificar la cantidad de hUTC. En una realización, se usan uno o más de los marcadores mostrados en el Ejemplo 3.

[0097] En otra realización, los métodos de la invención son adecuados para la identificación de alrededor de 1.700 o más hUTC/ml en presencia de 1 millón de CMSP humanas usando citometría de flujo sin depender de una etapa de enriquecimiento.

III. Kits y sistemas para pruebas de células terapéuticas alogénicas en una muestra de sangre

[0098] Otra realización descrita en el presente documento es un kit para el ensayo de la presencia de células terapéuticas alogénicas tal como hUTC en una muestra de sangre utilizando los métodos descritos.

[0099] Los kits pueden comprender el perfil marcador único distintivo y componentes adecuados para identificar el perfil único marcador distintivo de acuerdo con uno o más procedimientos analíticos. Por ejemplo, un kit adecuado para distinguir un perfil de marcador único usando RT-PCR incluiría cebadores de PCR adecuados para amplificar los genes de perfil de marcador únicos. De forma similar, un kit adecuado para distinguir un perfil de marcador único por un ensayo unido a anticuerpo incluiría los anticuerpos que se unen a los marcadores.

[0100] En una realización, el kit está diseñado para detectar hUTC en una población de CMSP. En otra realización, el kit comprende el perfil marcador único CD10, CD13 y CD45 y otros componentes adecuados para identificar CD10, CD13 y CD45 usando una o más de citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica, detección de ácido nucleico, PCR o combinaciones de las mismas.

[0101] Otra realización más es un sistema para detectar células terapéuticas alogénicas (tales como, por ejemplo, hUTC) en una población de CMSP. El sistema incluye materiales necesarios para llevar a cabo los métodos descritos en este documento.

IV. Células derivadas de tejido del cordón umbilical humano

[0102] Si bien se contempla que los métodos se pueden usar para distinguir células terapéuticas (por ejemplo, progenitoras/células madre) de células hospedadoras, en los métodos de la invención, las células son células humanas derivadas de tejido de cordón umbilical ("hUTC" o "UTC"). Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano útiles se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo, y tienen el potencial de diferenciarse. La UTC y las poblaciones UTC adecuadas para identificación por los métodos de la invención se describen en detalle en los detalles a continuación en la presente memoria descriptiva así como en las patentes de EE.UU. N^{os} 7.510.873; 7.524.489; y Aplicación Publicada EE.UU. N^o 2005/0058631.

A. Aislamiento y crecimiento de células derivadas de tejido del cordón umbilical

[0103] De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, un cordón umbilical de mamífero se recupera en o poco después de la terminación de cualquiera de un plazo completo o un embarazo antes de término, por ejemplo, después de la expulsión después del 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 los órganos utilizados para el trasplante, como la solución de la Universidad de Wisconsin o la solución de perfluoroquímica. Uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos, tales como, entre otros, penicilina, estreptomicina, 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 4-10°C antes de la extracción de UTC. Es aún más preferible que el tejido no se congele antes de la extracción de UTC.

[0104] El aislamiento de 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 de 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, estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

[0105] El tejido postparto que comprende un cordón umbilical o un fragmento o sección del mismo se desagrega por

la fuerza mecánica (picada o fuerzas de corte). 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 enzimas compatibles con esta 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 collagenasas 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 un tratamiento enzimático con, por ejemplo, collagenasa y dispasa, o collagenasa, dispasa e hialuronidasa. En ciertas realizaciones, se usa una mezcla de collagenasa y la dispasa de proteasa neutra en la etapa de disociación. Las realizaciones más específicas emplean digestión en presencia de al menos una collagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de proteasa, dispasa y termolisina. Todavía otras realizaciones emplean digestión con ambas actividades de la enzima collagenasa y dispasa. También se utilizan métodos que incluyen digestión con actividad hialuronidasa además de actividades de collagenasa y dispasa. 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. Por ejemplo, las mezclas de enzimas para disociación de tejidos vendidas bajo el nombre comercial LIBERASA (Roche, Indianapolis, IN) son adecuadas para su uso en los métodos instantáneos. Se conocen otras fuentes de enzimas, y los expertos en la técnica también pueden obtener tales enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto en la técnica también está bien equipado para evaluar enzimas o combinaciones de enzimas nuevas o adicionales por su utilidad en el aislamiento de las células. Los tratamientos enzimáticos preferidos son de 0,5, 1, 1,5 o 2 horas de duración o más. En otras realizaciones preferidas, el tejido se incuba a 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disociación.

[0106] En algunas realizaciones, el tejido posparto se separa en secciones que comprenden diversos aspectos del tejido, tales como aspectos neonatales, neonatales/maternos y maternos de la placenta, por ejemplo. Las secciones separadas se disocian luego mediante disociación mecánica y/o enzimática de acuerdo con los métodos descritos en este documento. Las células de linaje neonatal o materno se pueden identificar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante análisis de cariotipo o hibridación *in situ* para un cromosoma Y.

[0107] Las células aisladas o el tejido del cordón umbilical del que se deriva un UTC 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. Además de los medios de cultivo descritos en este documento, se puede cultivar un UTC en cualquier medio de cultivo capaz de mantener el crecimiento de la célula tal como, pero no limitado a, DMEM (glucosa alta o baja), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimáticas (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, y medio libre de suero/medio comercializado bajo 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 (FBS), preferiblemente aproximadamente 2-15% (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS); beta-mercaptoetanol (BME o 2-ME), preferiblemente aproximadamente 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF) 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 puede comprender medio de crecimiento como se define en los ejemplos a continuación.

[0108] 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% en volumen de CO₂ en el aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivaron a aproximadamente 2 a aproximadamente 25% de O₂ en el aire, preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 20% de 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" se refiere a las condiciones de ausencia o un daño mínimo de radicales libres en las células cultivadas.

[0109] Los métodos para la selección del medio de cultivo, la preparación del medio y las técnicas de cultivo celular más apropiadas son bien conocidas 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.

[0110] Después de cultivar las células aisladas o fragmentos de tejido durante un período suficiente, un UTC habrá crecido, ya sea debido a la migración del tejido después del parto o la división celular, o ambos. En algunas realizaciones, el UTC se pasa, o se retira a un recipiente de cultivo separado que contiene medio nuevo del mismo tipo o diferente al utilizado inicialmente, donde la población de células puede expandirse mitóticamente. Las células se pueden usar en cualquier punto entre el paso 0 y la senescencia. Las células preferiblemente se someten a un pasaje 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.

[0111] En ciertas realizaciones, 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 usando 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 pero no se limitan a la selección basada en morfología y/o marcadores bioquímicos; crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación basada en la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta tal como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtraje; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente); separación por gravedad de la unidad; distribución en contracorriente; electroforesis; y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Para una revisión de la selección clonal y técnicas de separación celular, véase Freshney, 1994, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, 3rd Ed., Wiley-Liss, Inc., Nueva York.

[0112] El medio de cultivo se cambia según sea necesario, por ejemplo, mediante la aspiración cuidadosa del medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y la reposición con medio fresco. La incubación continúa hasta que se acumule un número o densidad suficiente de células en el plato. Las secciones de tejido explantado originales se pueden eliminar y las células restantes se tripsinizan usando técnicas estándar o usando un raspador de células. Después de la tripsinización, las células se recogen, se retiran a medio nuevo y se incuban como se indicó 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.

[0113] El UTC puede ser criopreservado. En consecuencia, 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, luego criopreservarse para estar disponible en el caso de que luego se necesiten para el trasplante.

B. Características de las células derivadas de tejido del cordón umbilical

[0114] Aunque hUTC puede distinguirse de CMSP en base a la presencia de, por ejemplo, CD45, CD13 y CD10 y otros marcadores discutidos anteriormente y en los ejemplos a continuación, hUTC posee una variedad de otras características únicas.

[0115] El UTC se puede caracterizar, por ejemplo, por las características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de duplicación de la población, tiempo de duplicación, pasajes a la senescencia), análisis de cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para detección de epítomos), perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices de chips de genes, reacción en cadena de 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 CMSP) y/u otros métodos conocidos en el arte.

[0116] Ejemplos de UTC adecuados derivados de tejido umbilical se depositaron en la American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110) el 10 de junio de 2004, y se asignan números de acceso ATCC como sigue: (1) a la designación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el número de acceso PTA-6067; y (2) se le asignó a la designación de cepa UMB 022803 (P17) el número de acceso PTA-6068.

[0117] 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 al menos aproximadamente 20%; (3) tienen el potencial de al menos alrededor de 40 duplicaciones en cultivo antes de alcanzar la senescencia; y (4) se unen y expanden en un recipiente de cultivo tisular recubierto o no recubierto, en el que el recipiente de cultivo de tejido recubierto comprende un revestimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.

[0118] En ciertas realizaciones, el UTC posee un cariotipo normal, que se mantiene a medida que las células pasan. Los métodos para el cariotipo están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica.

[0119] 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) producción de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C, tal como se detecta mediante citometría de flujo. En otras realizaciones, el UTC puede caracterizarse por la falta de producción de al menos uno de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ. marcadores de superficie celular, como 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. También se prefieren las células que producen las tres proteínas factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso.

[0120] En otras realizaciones, la UTC se puede caracterizar por la expresión de genes, 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 una de: interleucina 8; reticulon 1; ligando 1 de quimioquina (motivo CXC) (actividad estimulante del crecimiento de melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína quimiotáctica de granulocitos 2); ligando 3 de quimiocina (motivo C-X-C); y factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa.

[0121] En aún otras realizaciones, la UTC se puede caracterizar por la expresión de genes, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimal, o una célula de médula ósea 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; ligando 12 de quimioquina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supralvalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); mesénquima homeobox 2 (homeobox 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 homólogo tres (SH3) y dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con runt 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de C-endorpeptidasa del procolágeno; homólogo 7 frizzled (*Drosophila*); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); iroquois homeobox proteína 5; hefesto; 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; conducto activado por calcio de potasio intermedio/pequeña conductividad, 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 EGF; respuesta de crecimiento temprano 3; homeobox 5 no distal; proteína hipotética FLJ20373; familia aldo-ceto reductasa 1, miembro C3 (deshidrogenasa de 3-alfahidroxisteroide, 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 EGF); 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 FLJ14054; ARNm de *Homo sapiens*; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); BCL2/adenovirus E1B, proteína de interacción de 19 kDa de tipo 3; AE proteína de unión 1; y el polipéptido 1 de la subunidad VIIa de citocromo c oxidasa (músculo).

[0122] En otras realizaciones, el UTC se puede caracterizar cuando se cultiva por secreción de al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1b, 1309, MDC RANTES y TIMP1. Además, el UTC se puede caracterizar cuando se cultiva por la falta de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1A y VEGF.

[0123] En algunas realizaciones, los UTC se derivan de tejido de cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, requieren L-valina para crecimiento, pueden crecer en al menos aproximadamente 5% de oxígeno, y comprenden al menos una de las siguientes características: potencial para al menos alrededor de 40 duplicaciones en cultivo; unión y expansión en un recipiente de cultivo tisular recubierto o no recubierto que comprende un revestimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina; producción de vimentina y alfa-actina de músculo liso; producción de CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y, la 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 interleucina 8 y reticulón 1. En algunas realizaciones, tal UTC sí no produce CD45 y CD117.

[0124] En las realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más de las características de crecimiento, producción de proteína/marcador de superficie, expresión génica o secreción de sustancia listadas anteriormente. Más preferida es una célula que comprende tres, cuatro, cinco o más de las características. Todavía más preferido es un UTC que comprende seis, siete, ocho o más de las características. Más preferida es una célula que comprende todas las características anteriores.

[0125] Entre las células que se prefieren actualmente para uso con la invención en varios de sus aspectos están las células posparto que tienen las características descritas anteriormente y más particularmente aquellas en las que las

células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con pases, y además en las que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, en 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 cualquiera de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, como se detecta por citometría de flujo.

[0126] En una realización, los UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, carecen de la producción de CD117 o CD45, expresan CD10 y CD13 y no expresan hTERT o telomerasa. Estos UTC expresan opcionalmente el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, reticulón, ligando 3 de receptor de quimioquina y/o proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o no expresan CD31 o CD34; y/o expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o expresan CD44, CD73 y CD90.

[0127] En otra realización, los UTC se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, expresan CD10, CD13, CD90 y HLA-ABC, y no expresan CD34, CD45, CD117 y HLA-DR. Opcionalmente, estas células tampoco expresan hTERT o telomerasa. En una realización, las células también expresan CD44 y CD43. En otra realización más, las células tampoco expresan CD31. Estos UTC opcionalmente: (i) expresan el receptor de lipoproteína 1 de baja densidad oxidada, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimioquina y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) células de médula ósea de fibroblastos humanos, células madre mesenquimales o cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1.

[0128] En una realización alternativa, los UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse y tienen las siguientes características: (1) expresan CD10, CD13, CD44, CD90 y HLA-ABC; (2) no expresan CD31, CD34, CD45, HLA-DR y CD117, y (3) no expresan hTERT o telomerasa. En otra realización, los UTC se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse y tienen las siguientes características: (1) expresan CD10, CD13, CD44, CD90 y HLA-ABC; (2) no expresan CD31, CD34, CD45, HLA-DR y CD117; (3) no expresan hTERT o telomerasa; (4) expresan el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimioquina y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y (5) expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1.

[0129] En una realización, las hUTC se proporcionan como una población de células, que puede ser homogénea. En algunas realizaciones, la población celular puede ser heterogénea. Una población celular heterogénea puede comprender al menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% UTC. Las poblaciones de células heterogéneas 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

[0130] Además, tal como se usa en los siguientes ejemplos y en cualquier otro lugar de la memoria descriptiva, la hUTC que puede identificarse usando los métodos de selección puede aislarse y caracterizarse de acuerdo con la descripción de las patentes de EE.UU. N^{os} 7.510.873; 7.524.489; y Sol. de Aplicación de EE.UU. N^o 2005/0058631, que se relacionan con la descripción, el aislamiento y la caracterización de hUTC. Además, los procedimientos de enriquecimiento usando perlas magnéticas se describen en la Patente de los Estados Unidos N^o 7.863.012 y la solicitud publicada de los Estados Unidos N^o 2011/0147180, que se refieren a procedimientos de enriquecimiento y perlas magnéticas.

[0131] Sin más descripción, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, hacer y utilizar la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera del resto de la divulgación.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Aislamiento, mantenimiento y expansión de hUTC

[0132] Se aislaron células derivadas de tejido del cordón umbilical humano de cuatro donantes y se propagaron en medio de crecimiento suplementado con suero bovino fetal al 15% como se describió anteriormente en la Patente de

EE.UU. Nº 7.510.873.; 7.524.489; y Aplicación Publicada EE.UU. Nº 2005/0058631 y en los ejemplos a continuación. Los cultivos de paso temprano se criopreservaron para generar bancos de células de desarrollo y de trabajo, denominados DCB y WCB, respectivamente. Los cultivos vivos de hUTC se mantuvieron usando uno de los dos métodos siguientes: 1) como cultivos adherentes en matraces de cultivo tisular; y 2) como cultivos en suspensión en matraces de agitación y biorreactores de tanque agitados. Las células se sembraron primero en microvehículos para este último método.

[0133] Tres conjuntos de muestras se sometieron a análisis de microensayos de la siguiente manera: (1) Estudio 1 (estudio de microensayos de donantes); (2) Estudio 2 (estudio de excursión de temperatura); y (3) Estudio 3 (estudio de biomarcadores).

Estudio 1 (estudio de microensayos de donantes)

[0134] En este conjunto de muestras, las células se cultivaron en matraces de agitación, a partir de una población de línea celular de pasaje temprano de duplicación de PDL 5 y terminando con PDL44. Se inició un cultivo típico sembrando medio de crecimiento fresco con un inóculo de aproximadamente 5×10^5 células/ml y se dejó inalterado durante 4 días, momento en el cual se alcanzó una densidad celular viable máxima (VCD de aproximadamente $3-4 \times 10^6$ células/ml) fue logrado. Se recogieron alícuotas de cultivos periódicamente, para un total de treinta y dos (32) muestras. La Tabla 1-1 a continuación enumera las muestras en el estudio.

Table 1-1: Lista de muestras incluidas en el Estudio 1 (estudio de microensayos de donantes)		
Etiqueta	Nombre	Número de donante
R52550	Donante 1; PDL = 11,30	Umb 041505
R52551	Donante 1; PDL = 20,26	Umb 041505
R52552	Donante 1; PDL = 30,06	Umb 041505
R52553	Donante 1; PDL = 33,58	Umb 041505
R52554	Donante 1; PDL = 36,78	Umb 041505
R52555	Donante 1; PDL = 40,03	Umb 041505
R52556	Donante 1; PDL = 43,00	Umb 041505
R52557	Donante 1; PDL = 44,98	Umb 041505
R52559	Donante 2; PDL = 11,30	Umb 072304A
R52560	Donante 2; PDL = 20,92	Umb 072304A
R52561	Donante 2; PDL = 30,29	Umb 072304A
R52562	Donante 2; PDL = 31,13	Umb 072304A
R52563	Donante 2; PDL = 32,66	Umb 072304A
R52564	Donante 2; PDL = 33,01	Umb 072304A
R52565	Donante 2; PDL = 33,81	Umb 072304A
R52558	Donante 2; PDL = 5,00	Umb 072304A
R52567	Donante 3; PDL = 10,79	Umb 083105
R52568	Donante 3; PDL = 20,12	Umb 083105
R52569	Donante 3; PDL = 30,03	Umb 083105
R52570	Donante 3; PDL = 30,45	Umb 083105
R52571	Donante 3; PDL = 31,16	Umb 083105
R52572	Donante 3; PDL = 31,47	Umb 083105
R52573	Donante 3; PDL = 31,69	Umb 083105

[0135] La recolección de células se realizó en cualquiera de los cuatro días de crecimiento como se muestra en la Figura 1 (lado derecho). De la lista de 32 muestras, 24 fueron seleccionadas para el análisis de microensayos. La Figura 1 muestra el nivel de duplicación de la población (PDL) y la región de la curva de crecimiento cuando se cosechó una muestra particular.

Estudio 2 (estudio de excursión de temperatura)

[0136] En este conjunto de muestras, las células se mantuvieron a temperaturas que oscilan entre 25°C y 42°C durante hasta 18 horas antes de la recolección. Las muestras usadas en este estudio se muestran en la Tabla 1-2 a continuación.

Tabla 1-2: Lista de muestras incluidas en el Estudio 2 (Estudio de excursión de temperatura)

Etiqueta	Nombre	Donante
R52550	Donante 1; PDL = 11,30	Umb 041505
R52551	Donante 1; PDL = 20,26	Umb 041505
R52552	Donante 1; PDL = 30,06	Umb 041505
R52553	Donante 1; PDL = 33,58	Umb 041505
R52554	Donante 1; PDL = 36,78	Umb 041505
R52555	Donante 1; PDL = 40,03	Umb 041505
R52556	Donante 1; PDL = 43,00	Umb 041505
R52557	Donante 1; PDL = 44,98	Umb 01505
R52559	Donante 2; PDL = 11,30	Umb 072304A
R52560	Donante 2; PDL = 20,92	Umb 072304A
R52561	Donante 2; PDL = 30,29	Umb 072304A
R52562	Donante 2; PDL = 31,13	Umb 072304A
R52563	Donante 2; PDL = 32,66	Umb 072304A
R52564	Donante 2; PDL = 33,01	Umb 072304A
R52565	Donante 2; PDL = 33,81	Umb 072304A
R52558	Donante 2; PDL = 5,00	Umb 072304A
R52567	Donante 3; PDL = 10,79	Umb 083105
R52568	Donante 3; PDL = 20,12	Umb 083105
R52569	Donante 3; PDL = 30,03	Umb 083105
R52570	Donante 3; PDL = 30,45	Umb 083105
R52571	Donante 3; PDL = 31,16	Umb 083105
R52572	Donante 3; PDL = 31,47	Umb 083105
R52573	Donante 3; PDL = 31,69	Umb 083105
R52566	Donante 3; PDL = 5,00	Umb 0105
R52575	Donante 4; PDL = 10,71	Umb 090304A
R52576	Donante 4; PDL = 14,66	Umb 090304A
R52577	Donante 4; PDL = 19,55	Umb 090304A
R52578	Donante 4; PDL = 25,06	Umb 090304A
R52579	Donante 4; PDL = 27,25	Umb 090304A
R52580	Donante 4; PDL = 23,60	Umb 090304A
R52581	Donante 4; PDL = 30,15	Umb 090304A

Estudio 3 (Estudio de biomarcadores)

[0137] Para este estudio, se utilizó un conjunto de ocho (8) muestras. Las células se expandieron en un biorreactor de tanque agitado y se cosecharon en PDL30. Las muestras utilizadas en este estudio se muestran en la Tabla 1-3 a continuación.

Tabla 1-3: Lista de muestras incluidas en el estudio 3 (estudio de biomarcadores)	
Exp. ID	Nombre de Exp.
E55465	Donante 1 DCB Pasaje temprano PDL 12 Set1
E55466	Donante 1 DCB Pasaje temprano PDL 12 Set2
E55467	Donante 1 DCB Pasaje tardío PDL 40 Set1
E55468	Donante 1 DCB Pasaje tardío PDL 40 Set2
E55469	Donante 1 WCB Pasaje temprano PDL 16 Set1
E55470	Donante 1 WCB Viaje temprano PDL 16 Set2
E55471	Donante 1 WCB Pasaje tardío PDL 36 Set1
E55472	Donante 1 WCB Pasaje tardío PDL 36 Set2

Análisis de los datos

[0138] Un ensayo Affymetrix GeneChip® HT HG-U133+ PM se utilizó para la generación de datos de microensayos. Los datos fueron analizados en dos etapas. En el primer paso, los datos de microensayos generados a partir del estudio de excursión de temperatura (Estudio 2, Tabla 1-2) para comparar el perfil de expresión de hUTC con el de las CMSP humanas. El nivel de expresión de varios genes en CMSP se obtuvo de fuentes públicas, incluida la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI), administrada por los Institutos Nacionales de Salud. En el segundo paso, se utilizaron los datos de microensayos generados a partir del Estudio 1 y los datos archivados de ocho (8) muestras generadas en el Estudio 3 (véanse los Cuadros 1-1 y 1-3). El perfil de expresión de hUTC se comparó con el de (1) CMSP humanas y (2) CMSP de rata. El perfil de expresión de CMSP humana se obtuvo de sujetos humanos sanos (estudio de base de datos NCBI GSE14642), mientras que el perfil de expresión de CMSP de rata se obtuvo de los estudios de base de datos NCBI GSE11083 y GSE19537. Los perfiles de expresión de subtipos de células sanguíneas humanas (células B, células NK, células dendríticas, células T linfoides, monocitos mieloides y neutrófilos) también se obtuvieron a partir de las bases de datos NCBI (estudio GSE22886 y estudio GSE3982). Además, la extracción de las bases de datos Gene Ontology y Entrez identificó 3976 genes de proteína de membrana plasmática humana (GO: 0005886), 355 genes de proteína de superficie celular (GO: 0009986) y 349 genes de antígeno CD. Un subconjunto de 2614 genes de proteína de membrana plasmática humana y de rata y 288 genes de proteína de superficie celular se combinaron con genes en los microensayos humanos y de rata y 315 genes de antígeno CD y se combinaron con microensayos humanos para este estudio.

[0139] Basado en la dinámica de la señal de expresión, es decir, log2 (intensidad) de diez o más como umbral para señales de alta expresión para todos los conjuntos de datos, una lista de 314 conjuntos de sondas de más de 200 genes que están altamente expresados en ambos tipos de muestras fueron identificados. En ambos casos, se seleccionaron los genes cuya expresión en hUTC era dramáticamente diferente de la de las CMSP humanas y se ordenaron por rango. La Tabla 1-4 muestra la lista de genes, generados en el Estudio 2, cuyos niveles de expresión fueron significativamente diferentes entre hUTC y CMSP humanas. Éstas incluyen proteínas de la superficie celular y de la membrana plasmática, así como proteínas intracelulares.

[0140] En la Tabla 1-4, los genes que se identificaron en los tres conjuntos de muestras están subrayados. Los genes que se examinaron con más detalle están en negrita (incluyen DKK3, LAMB1, ANPEP (CD13), LAMP1 (CD107a), PTPRC (CD45), MME (CD10) y NRP1).

Tabla 1-4: Lista de genes cuyos niveles de expresión fueron significativamente diferentes entre hUTC y aquella de CMSP humanas en las muestras del Estudio 2		
Símbolo de gen	Gen Entrez	Título del gen
KRT19	3880	Queratina 19
DKK3	27122	Dickkopf homólogo 3 (<i>Xenopus laevis</i>)
GJA1	2697	Proteína de unión de hueco, alfa 1, 43 kDa
LOX	4015	Oxidasa de lisilo
FBN1	2200	Fibrilina 1
COL3A1	1281	Colágeno, tipo III, alfa 1
TPM2	7169	Tropomiosina 2 (beta)
COL1A1	1277	Colágeno, tipo I, alfa 1
CYR61	3491	Inductor angiogénico rico en cisteína, 61
DKK1	22943	Dickkopf homólogo 1 (<i>Xenopus laevis</i>)
CTGF	1490	Factor de crecimiento del tejido conectivo
DCBLD2	131566	Discoidina, CUB y dominio LCCL
ITGB5	3693	Integrina, beta 5
COL5A1	1289	Colágeno, tipo V, alfa 1
THY1	7070	Thy-1 antígeno de superficie celular
FTL	2512	Ferritina, polipéptido ligero
NNMT	4837	Nicotinamida N-metiltransferasa
TMEM47	83604	Proteína transmembrana 47
CDH11	1009	Cadherina 11, tipo 2, OB-cadherina (osteoblasto)
SPTBN1	6711	Espectrina, beta, no eritrocítica 1
RPS19	6223	Proteína ribosomal S19
DCN	1634	Decorina
RPS20	6224	Proteína ribosomal S20
LAMB1	3912	Laminina, beta 1
COL5A2	1290	Colágeno, tipo V, alfa 2
SERPINE2	5270	Inhibidor de la peptidasa de terpina, clado E (nexina)
TPBG	7162	Glucoproteína trofoblástica
CLMP	79827	Proteína de membrana tipo CXADR
MAP1B	4131	Proteína asociada a microtúbulos 1B
SLIT2	9353	Ranura homólogo 2 (<i>Drosophila</i>)
FRMD6	122786	Dominio FERM que contiene 6
CSPG4	1464	Condroitín sulfato proteoglicano 4
PLOD2	5352	Procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato-5-dioxigenasa 2
CDH2	1000	Cadherina 2, tipo 1, N-cadherina (neuronal)
COL1A2	1278	Colágeno, tipo I, alfa 2
FAT1	2195	FAT supresor tumoral homólogo 1 (<i>Drosophila</i>)
GNG12	55970	Proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), gamma 12
FGG	2266	Cadena gamma de fibrinógeno
SULF1	23213	Sulfatasa 1
ANTXR1	84168	Receptor de la toxina del ántrax 1
PAPPA	5069	ARN antisentido PAPPA (codificación no proteica)
MFAP5	8076	Proteína asociada a microfibrillas 5
SSTR1	6751	Receptor de somatostatina 1
CAP2	10486	CAP, proteína asociada a ciclase de adenilato,
EDIL3	10085	Replicaciones similares a EGF y dominios similares a I de discoidina

Tabla 1-4: Lista de genes cuyos niveles de expresión fueron significativamente diferentes entre hUTC y aquella de CMSP humanas en las muestras del Estudio 2		
Símbolo de gen	Gen Entrez	Título del gen
TEK	7010	TEK quinasa de tirosina, endotelial
YAP1	10413	Proteína 1 asociada a yes
PTRF	284119	Polimerasa I y factor de liberación del transcrito
LUM	4060	lumican
WWTR1	25937	Regulador de transcripción que contiene el dominio WW
NR2F2	7026	Subfamilia de receptores nucleares 2, grupo F, miembro
ANPEP (CD13)	290	aminopeptidasa de alanilo (membrana)
LAMP1 (CD107a)	3916	proteína de membrana asociada a lisosoma 1
PTPRC (CD45)	5788	proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, C
MME (CD10)	4311	matriz metalo proteasa
NRP1	8829	neuropilina 1

[0141] La Tabla 1-5 muestra la lista de genes (generados en el Estudio 1 y el Estudio 2), cuyos niveles de expresión fueron significativamente diferentes entre hUTC y aquella de CMSP humanas. En la Tabla 1-5, el subrayado indica genes que se identificaron en los tres conjuntos de muestras, es decir, Estudio 1, 2 y 3 (incluyen LAMB1, DKK3 y CAP2). Los genes que se examinaron con más detalle están en negrita (incluyen ANPEP (CD13), LAMP1 (CD107a), PTPRC (CD45), MME (CD10) y NRP1).

Tabla 1-5: Lista de genes cuyos niveles de expresión fueron significativamente diferentes entre hUTC y aquella de CMSP humanas en muestras generadas para los estudios 2 y 3		
Símbolo de Gen	Gen Entrez	Título del gen
<u>LAMB1</u>	3912	laminina beta 1
LUM	4060	Lumicano
WWTR1	25937	Regulador de transcripción que contiene el dominio WW
<u>DKK3</u>	27122	dickkopf homólogo 3 (<i>Xenopus laevis</i>)
NR2F2	7026	Subfamilia de receptores nucleares 2, grupo F, miembro
<u>CAP2</u>	10486	CAP, proteína asociada a ciclase de adenilato, 2
ANPEP (CD13)	290	aminopeptidasa de alanilo (membrana)
LAMP1 (CD107a)	3916	proteína de membrana asociada a lisosoma 1
PTPRC (CD45)	5788	proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, C
MME (CD10)	4311	Metaloproteasa de matriz
NRP1	8829	neuropilina 1

[0142] Como se muestra en la Tabla 1-5, se identificaron once genes por análisis de conjuntos de muestras que comprenden los Estudios 2 y 3, que incluyen tres genes que se identificaron en los tres conjuntos de muestras. De estos once genes, siete genes (NRP1, DKK3, LAMP1, LAMB1, MME (CD10), PTPRC (CD45) y ANPEP (CD13)) se examinaron con más detalle.

[0143] De estos siete genes, NRP1, DKK3, LAMP1, LAMB1 y MME (CD10) son marcadores de superficie celular, mientras que las proteínas expresadas, PTPRC (CD45) y ANPEP (CD13) se localizan intracelularmente. Los niveles de expresión de tres genes, concretamente, PTPRC (CD45) (gen ID N° 207238), MME (CD10) (gen ID N° 203434) y ANPEP (CD13) (gen ID N° 202888) en hUTC y en varios tipos de sangre humana las células que son CMSP se compararon. Esta comparación de expresión de genes de proteínas de la superficie celular, PTPRC (CD45), MME (CD10) y ANPEP (CD13) en hUTC y en varios tipos de células sanguíneas que comprenden CMSP humanas se muestra en las Figuras 2A, B y C, respectivamente. .

EJEMPLO 2

Confirmación de RT-PCR de marcadores identificados

[0144] Los niveles de transcripción de genes seleccionados en hUTC y CMSP humana identificados en el Ejemplo 1 se confirmaron a continuación mediante RT-PCR. Los resultados de la RT-PCR de genes seleccionados cuya

expresión en hUTC se comparó con la de CMSP humanas se muestran en la Figura 3.

[0145] Para obtener estos resultados, se aisló el ARN total de cada preparación de hUTC a partir del cual se preparó ADNc. A continuación, se usaron sondas fluorescentes específicas para cada gen para realizar la reacción de RT-PCR usando el ADNc como molde.

[0146] La Figura 3 muestra los resultados de RT-PCR para MME (CD10), ANPEP (CD13), PTPRC (CD45), DKK3, LAMB1, NRP1, GAPDH y HPRT1 en hUTC y CMSP. Con la excepción de los genes de limpieza, GAPDH y HPRT, todos los genes evaluados muestran una mayor abundancia en hUTC en comparación con las CMSP humanas. Solo la expresión de PTPRC (CD45), que se usó como control negativo y que se sabe que se expresa altamente en CMSP humanas, fue menos abundante en hUTC. Con referencia a la Figura 3, un valor CT más alto es indicativo de una cantidad más baja de transcripción.

[0147] Dado que las CMSP se componen de varios tipos de células sanguíneas, se compararon los perfiles de expresión génica de genes seleccionados expresados en cada uno de estos tipos de células con los de hUTC. Como se muestra en la Figura 2B, mientras que la expresión relativa de MME (CD10) en CMSP es baja en comparación con la de hUTC, su expresión relativa en neutrófilos es alta. De forma similar, aunque la expresión de ANPEP (CD13) en hUTC es comparable a la de CMSP humanas (véase la Figura 2C), su expresión relativa en células T y macrófagos es mayor que la de hUTC.

EJEMPLO 3

Detección de hUTC en CMSP mediante citometría de flujo

[0148] En la lista de genes que muestran expresión diferencial en hUTC y CMSP humana (véase las Tablas 1-4 y 1-5), un subconjunto de cinco genes que expresan el producto del gen en la superficie celular y/o membrana plasmática fueron seleccionados. Además, se seleccionaron dos genes que expresan los productos proteicos correspondientes intracelularmente. Estos marcadores incluyen NRP1, DKK3, LAMB, LAMP1, MME (CD10), PTPRC (CD45) y ANPEP (CD13).

[0149] Para el ensayo de citometría de flujo, las células se recogieron en la fase exponencial y posteriormente, se fijaron y permeabilizaron usando un kit adquirido de BD Bioscience. Una alícuota de esta preparación se incubó luego con anticuerpos contra marcadores seleccionados identificados para estar presentes en la superficie de hUTC, a saber, CD10, CD13, CD45, NRP1 y LAMP1. Después de eliminar el exceso de anticuerpo, las células se incubaron con un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente. Las células se analizaron luego mediante un citómetro de flujo.

[0150] Los resultados para el ensayo de citometría de flujo para la detección de la superficie celular, membrana plasmática, y marcadores intracelulares se muestran en las Figuras 4A a 4C. La Figura 4A muestra los marcadores de superficie celular que se probaron usando hUTC con el panel superior como control. La Figura 4B muestra los marcadores de superficie celular que se probaron usando CMSP con el panel superior como control. La Figura 4C muestra los resultados para un ensayo de citometría de flujo para la detección de los marcadores internos DKK3 y LAMP1 en CMSP y hUTC.

[0151] Con referencia a la Figura 4A, se observó que el 90% de la población de hUTC era positiva para CD13 (CD13⁺), se observó que el 75% de la población de hUTC era CD10 positiva (CD10⁺) y el 17% de la población de hUTC se observó que era positivo para NRP1 (NRP1⁺). No se observó ninguna población de hUTC positiva para CD45 o LAMP1.

[0152] Con referencia a la Figura 4B, se observó que 6% de la población de CMSP era CD13 positiva (CD13⁺), 2% de la población de CMSP era CD10 positiva (CD10⁺), 4% de la población de CMSP se observó que era positivo para NRP1 (NRP1⁺), y se observó que 72% de la población de CMSP era CD45 positiva (CD45⁺). No se observó ninguna población de CMSP que fuera positiva para LAMP1.

[0153] Con referencia a la Figura 4C, se muestran datos de citometría de flujo para los marcadores intracelulares DKK3 y LAMP1. Se observó que el 52% de la población de hUTC era positiva para DKK3. Se observó que el 23% de la población de CMSP era positiva para DKK3. La Figura 4C indica que LAMP1 es un buen marcador interno para hUTC.

[0154] Con la excepción de NRP1, los marcadores del gen de la proteína de la superficie celular podrían usarse para detectar hUTC vivas intactas en muestras mezcladas que contienen CMSP en suero (véase las Figuras 4A y 4B). Aunque NRP1 se transcribe a niveles más altos en hUTC en comparación con el de CMSP humana (Figura 3), NRP1 no se pudo detectar en hUTC por citometría de flujo (véase Figura 4A). Con respecto a CD45, como se esperaba, se expresaron altos niveles de CD45 en la superficie de CMSP humanas vivas solamente (véase la Figura 4B). Además, dos marcadores intracelulares LAMP1 y DKK3 (de la lista de genes expresados diferencialmente, Tabla 1-4) cuya expresión es más alta en hUTC en comparación con CMSP humanas) también se examinaron

(véase Figura 4C). Estos marcadores se pueden usar como confirmación adicional para la identidad de hUTC.

[0155] Las diferencias entre hUTC y CMSP humanas como se analizaron mediante citometría de flujo se muestran en la Tabla 3-1 a continuación.

Tabla 3-1: Diferencia entre hUTC y CMSP con respecto al porcentaje de células positivas tal como se analizó mediante citometría de flujo.							
Población	% CD13	% CD10	% NRP1	% CD45	% LAMP1	% DKK3	% LAMB
hUTC	90	70-90	17	0	92	52	ND
PBMC	6	2	4	45	32	23	ND

[0156] La Tabla 3-2 a continuación resume las diferencias entre hUTC y CMSP tal como se ensayaron mediante RT-PCR en el Ejemplo 2 anterior y por citometría de flujo en el presente Ejemplo. En la Tabla 3-2, Nd significa No determinado.

Tabla 3-2: Resumen de resultados de RT-PCR y citometría de flujo								
	Análisis de Microarray		RT-PCR		Superficie de análisis de flujo		Análisis de flujo intracelular	
	hUTC	CMSP	hUTC	CMSP	hUTC	CMSP	hUTC	PBMC
MME (CD10)	+	-	+	-	+	-	Nd	Nd
ANPEP (CD13)	+	+	+	+	+	-	Nd	Nd
PTPRC (CD45)	-	+	-	+	-	+	Nd	Nd
LAMP1	+	+	+	+	-	-	+	-
NRP1	+	-	+	-	-	-	Nd	Nd
DKK3	+	-	+	-	Nd	Nd	++	+
LAMB1	+	+	+	-	Nd	Nd	Nd	Nd

EJEMPLO 4

Detección de hUTC en una mezcla de hUTC y CMSP humanos

[0157] Para demostrar la detección de hUTC en sangre, se mezclaron diversas concentraciones de hUTC con 1 millón de CMSP humanas. La mezcla se analizó luego mediante citometría de flujo usando CD45 (marcador positivo para CMSP), CD10 y CD13 (marcadores positivos para hUTC). En particular, la detección de hUTC en una mezcla que comprende hUTC (que varía de 1.500 células/ml a 110.000 células/ml) y CMSP humanas (1 millón de células/ml) se muestra en las Figuras 5A y 5B.

[0158] Los dos tipos de células se mezclaron en 1 ml de suero humano a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se analizaron alícuotas de la mezcla mediante citometría de flujo usando CD10 como marcador para hUTC y CD45 como marcador para CMSP. En la Figura 5A, la concentración de hUTC varió de 1.500 a 1.700 células/ml y la de las CMSP humanas fue de 1 millón de células/ml. En la Figura 5B, la concentración de hUTC varió de 1.700 a 110.000 células/ml y la de CMSP humanas fue de 1 millón de células/ml.

[0159] Como se puede ver en la Figura 5A, si la muestra contiene 1.700 o más hUTC/ml en presencia de 1 millón de CMSP humano, entonces la exactitud de la determinación mediante citometría de flujo es alta ($R^2 = 0,94$). Si la muestra contiene de 1.500 a 1.700 hUTC/ml en presencia de 1 millón de CMSP humanas (Figura 5B), entonces la precisión de la determinación mediante citometría de flujo es menor ($R^2 = 0,51$).

EJEMPLO 5

Aislamiento de hUTC

[0160] Aislamiento de células umbilicales. Los cordones umbilicales se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA). Los tejidos se obtuvieron después de administraciones 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 U/ml, estreptomycin a 100 mg/ml y anfotericina B a 0,25 µg/ml (Invitrogen Carlsbad, CA).

Entonces los tejidos fueron disociados mecánicamente en 150 cm² placas de cultivo de tejido en presencia de 50 ml de medio (DMEM de baja glucosa o DMEM-alta de glucosa; Invitrogen) hasta que el tejido se trocó en una pulpa fina. Los tejidos cortados se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml (aproximadamente 5 g de tejido por tubo).

5 **[0161]** El tejido se digiere entonces, ya sea en medio DMEM-glucosa baja o medio DMEM-glucosa alta, cada uno de penicilina que contiene a 100 U/ml, estreptomicina a 100 mg/ml, anfotericina B a 0,25 µg/ml y las enzimas de digestión. En algunos experimentos, se usó una mezcla enzimática de collagenasa y dispasa ("C:D") (collagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 U/ml y dispasa (Invitrogen), 50 U/ml, en medio DMEM-glucosa baja). En otros experimentos, se usó una mezcla de collagenasa, dispasa e hialuronidasa ("C:D:H") (C:D:H = collagenasa, 500 U/ml; dispasa, 50 U/ml; e hialuronidasa (Sigma), 5 U/ml, 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 horas.

15 **[0162]** 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 ml de medio de crecimiento (DMEM:glucosa baja (Invitrogen), suero fetal bovino al 15% (v/v) (FBS, suero bovino fetal definido, lote N° AND18475, Hyclone, Logan, UT), 0,001% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 100 U/ml, estreptomicina a 100 µg/ml y anfotericina B a 0,25 µg/ml (cada uno de Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un tamiz celular BD FALCON de nailon de 70 µm de longitud (BD Biosciences, San Jose, CA). Se pasó un enjuague adicional de 5 ml que comprendía medio de crecimiento a través del filtro. La suspensión celular se hizo pasar a continuación a través de un filtro de células de nailon de 40 µm (BD Biosciences, San Jose, CA) y se persiguió con un enjuague de 5 ml adicionales de medio de crecimiento.

25 **[0163]** El filtrado se resuspendió en medio de crecimiento (volumen total 50 ml) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 ml de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

30 **[0164]** Después de la centrifugación final, se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 5 ml 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.

35 **[0165]** Las células aisladas de tejidos de 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% 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% de dióxido de carbono a 37°C.

40 **[0166]** En algunos experimentos, se aislaron células de tejidos postparto en medio DMEM bajo en glucosa después de la digestión con LIBERASA (2,5 mg/ml, Blendzima 3, Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) y hialuronidasa (5 U/ml, 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 LIBERASA resultó en el aislamiento de las poblaciones celulares de los tejidos posparto que se expandieron fácilmente.

50 **[0167]** Los procedimientos se compararon para el aislamiento de células del cordón umbilical utilizando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión incluyeron: i) collagenasa; ii) dispase; 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) collagenasa: dispación: mezcla de hialuronidasa (C:D:H). Se observaron diferencias en el aislamiento celular utilizando estas diferentes condiciones de digestión enzimática (véase Tabla 5-1).

55 **[0168]** Se hicieron otros intentos de aislar grupos de células de 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.

60 **[0169]** 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. Las muestras (50 ml y 10,5 ml, respectivamente) de sangre de cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) se mezclaron con tampón de lisis (cloruro de amonio 155 mM esterilizado por filtro, bicarbonato de potasio 10 milimolar, EDTA 0,1 mM 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 a tampón de lisis. La suspensión celular resultante se sometió a agitación vorticial 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 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), glutamina 4 mM (Mediatech Herndon, VA), penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 µg/ml (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 recubiertos con laminina T75 o matraces revestidos con fibronectina T175 (ambos Becton Dickinson, Bedford, MA).

[0170] Para determinar si las poblaciones de células podrían ser aisladas en diferentes condiciones y expandidas bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células se digieren en medio de crecimiento con o sin el 0,001% (v/v) 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 U/ml y estreptomycin a 100 µg/ml. En todas las condiciones probadas, las células se unieron y se expandieron bien entre el paso 0 y 1 (Tabla 4-2). 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.

[0171] 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 collagenasa o hialuronidasa sola. No se intentó determinar si este resultado es específico de la collagenasa que se ensayó.

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)	+
se: hialuronidasa	+ (> 10 h)	+
Colagenasa: Dispasa: Hialuronidasa	+++ (<3 h)	+++
Clave: + = bueno, ++ = muy bueno, +++ = excelente, X = sin éxito		

[0172] Las células se unieron y se expandieron bien entre el pase 0 y 1 en todas las condiciones probadas para la digestión y el crecimiento de la enzima (Tabla 5-2). Las células en condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta cuatro pasadas después de la siembra, momento en el que se crioconservaron. Todas las células se crioconservaron para un análisis posterior.

Tabla 5-2: Aislamiento y expansión del cultivo de células posparto bajo condiciones variables

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

[0173] 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.

[0174] 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.

[0175] Podrían aislarse las poblaciones de células del tejido umbilical de manera eficiente usando la collagenasa de combinación enzimática (una metaloproteasa), dispasa (proteasa neutra) y hialuronidasa (enzima mucolítica que descompone el ácido hialurónico). También se puede usar LIBERASA, que es una mezcla de collagenasa y una proteasa neutra. Blendzima 3, que es collagenasa (4 Wunsch U/g) y termolisina (1714 caseína U/g), también se utilizó 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.

[0176] Las células también se aislaron de sangre residual en las cuerdas, pero no la sangre del cordón. La presencia de células en los coágulos sanguíneos 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

Análisis de cariotipo de células

[0177] Las líneas celulares utilizadas en la terapia de células son preferiblemente homogéneas y libres 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 de ombligo que son homogéneas y están libres de células de origen de tejido no umbilical, se analizaron cariotipos de muestras de células.

[0178] UTC a partir de tejido después del parto de un neonato masculino se cultivaron 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).

[0179] 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 exhibieron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) que indica la presencia de células derivadas tanto de origen neonatal como materno (cuadro 6-1). Cada una de las muestras de células se caracterizó como homogénea. (Tabla 6-1).

Tabla 6-1: Resultados de cariotipo de hUTC

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

[0180] El análisis cromosómico identificado derivado del ombligo UTC cuyos cariotipos parecen normales tal como se interpreta por un laboratorio de citogenética clínica. El análisis del cariotipo también identificó líneas celulares libres de células maternas, según lo determinado por cariotipo homogéneo.

EJEMPLO 7

Evaluación por citometría de flujo de marcadores de superficie celular

[0181] La caracterización de proteínas de superficie celular o "marcadores" por citometría de flujo se puede usar para determinar la identidad de una línea celular. La consistencia de la expresión se puede determinar a partir de

múltiples donantes y en células expuestas a diferentes procesos y condiciones de cultivo. Las líneas celulares de posparto aisladas del ombligo se caracterizaron por citometría de flujo, proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

[0182] Las células se cultivaron en medio de crecimiento, en T75 tratada con plasma, T150, T225 y matraces de cultivo tisular (Corning, Corning, NY) hasta la confluencia. 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.

[0183] 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 FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1×10^7 1 ml. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se añadió anticuerpo al marcador de superficie celular de interés (véase a continuación) a 100 ml 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 µl 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).

[0184] Se usaron los siguientes anticuerpos para marcadores de superficie celular.

Tabla 7-1: Anticuerpos utilizados en la caracterización de marcadores de superficie celular de CDU.		
Anticuerpo	Fabricante	Número de catalogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen	555394
CD31	BD Pharmingen	555446
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45RA	BD Pharmingen	555489
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
PDGFr-alpha	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

[0185] Las células derivadas del ombligo se analizaron en los pasajes 8, 15 y 20.

[0186] Para comparar las diferencias entre los donantes, se compararon entre sí las células derivadas de tejido de cordón umbilical de diferentes donantes. Las células derivadas del ombligo cultivadas en matraces recubiertos de gelatina también se compararon con células derivadas de ombligo cultivadas en matraces no revestidos.

[0187] Se compararon cuatro tratamientos utilizados para el aislamiento y preparación de células. Se compararon células derivadas de tejido posparto por tratamiento con: 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispasa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispasa.

[0188] Se expresaron células derivadas del cordón umbilical en el paso 8, 15, y 20 se analizaron por citometría de flujo CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, indicados por aumento de la fluorescencia con respecto 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.

[0189] Células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes independientes analizadas por citometría de flujo se mostraron positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFR-alfa y HLA-A, B, C, que se refleja en el aumento de 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.

[0190] Las células derivadas del cordón umbilical expandidas en matraces recubiertos de gelatina y sin recubrir analizadas por citometría de flujo fueron todas positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, 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.

[0191] 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, CD117, 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 del histograma de valores de fluorescencia individuales y se observaron 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

EJEMPLO 8

Análisis de células por matriz de oligonucleótidos

[0192] Matrices de oligonucleótidos se utilizaron para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas derivadas del ombligo y derivadas de placenta con fibroblastos, células madre mesenquimatosas humanas, y otra línea celular derivada de la médula ósea humana. Este análisis proporcionó una caracterización de las células derivadas del posparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

[0193] *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 en matraces de cultivo de tejidos de plástico recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

[0194] *Fibroblastos.* Los fibroblastos dérmicos humanos se adquirieron en 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 plástico estándar tratado con cultivo de tejidos.

[0195] *Células madre mesenquimales 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.

[0196] *Células de médula ósea de cresta iliac humanas (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 de 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 al 5% de O₂. 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.

[0197] Los cultivos en crecimiento activo de las células se retiraron de los frascos con un raspador de células en solución salina fría tamponada con fosfato (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. El sobrenadante se eliminó 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 se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con matrices de oligonucleótidos Affymetrix GENECHIP HG-U133A (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. EE.UU. 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 World Wide Web en el sitio web del profesor Tibshirani en el Departamento de Estadísticas, Stanford University.

[0198] Catorce poblaciones diferentes de células se analizaron en este estudio. Las células, junto con la información del paso, el sustrato de cultivo y los medios de cultivo se enumeran en la Tabla 8-1. 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.

Tabla 8-1: Células analizadas por el estudio de microensayos.			
Población Celular	Paso	Sustrato	Medios
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, 2-BME
ICBM (070203) (5% O ₂)	3	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (estándar O ₂)	5	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (5% O ₂)	5	Plástico	MEM 10% FBS
hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (lote 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10% de FBS
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10% de FBS

[0199] 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.

[0200] La Tabla 8-2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclidianas se basaron en la comparación de las células 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. La distancia euclidiana se calculó para los tipos de células usando estos 290 genes expresados diferencialmente entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclidiana.

Tabla 8-2: Las distancias euclidianas para los pares celulares.	
Par de células	Distancia euclidiana
ICBM-hMSC	24,71
Placenta-umbilical	25,52
ICBM-Fibroblasto	36,44
ICBM-placenta	37,09
Fibroblasto-MSC	39,63
ICBM-Umbilical	40,15
Fibroblasto-Umbilical	41,59
MSC-Placenta	42,84
MSC-Umbilical	46,86
ICBM-placenta	48,41

[0201] Las tablas 8-3, 8-4 y 8-5 muestran la expresión de genes aumentados en células derivadas de placenta (Tabla 8-3), aumentadas en células derivadas de cordón umbilical (Tabla 8-4) y reducidas en el cordón umbilical y las células derivadas de la placenta (Tabla 8-5).

Tabla 8-3: Genes que aumentan específicamente en expresión en las células derivadas de placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

ID de conjunto de sonda	Nombre de gen	Número de acceso NCBI
209732_at	Lectina de tipo C (dependiente del calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro de la superfamilia 2 (inducido por activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor de Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	familia de deshidrogenasa de aldehído 1, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina) 1	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGEN: 4179671, ARNm, cds parcial	AF070642
202178_at	quinasa de proteína C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	regulado negativamente en el cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 8-4: genes que aumentan específicamente la expresión en células derivadas del cordón umbilical en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

ID de conjunto de sonda	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	quimiocina (C-X-C motivo) ligando 1 (actividad estimuladora de crecimiento melanoma)	NM_001511
206336_at	quimiocina (C-X-C motivo) ligando 6 (proteína quimotáctica de granulocitos 2)	NM_002993
207850_at	Quemocina (C-X-C motivo) ligando 3	NM_002090
203485_at	reticulón 1	NM_021136
202644_s_at	factor de necrosis tumoral, proteína inducida alfa 3	NM_006290

Tabla 8-5: Genes que disminuyeron su expresión en el cordón umbilical y las células placentarias en comparación con las otras líneas celulares analizadas.

ID de conjunto de sonda	Nombre de gen	Nº de acceso ACBI
210135_s_at	homeobox de estatura corta 2	AF022654.1
205824_at	choque térmico 27kDa proteína 2	NM_001541.1
209687_at	quemocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor 1 derivado de célula estromal)	U19495.1
203666_at	quemocina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor 1 derivado de célula estromal)	NM_000609.1
212670_at	elastina (estenosis aórtica supraavicular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	homeobox 2 mesénquima (homeobox específico de detención del crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	Sine oculis homeobox homólogo 1 (<i>Drosophila</i>)	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador asociado de la morfogénesis 2	BF513244
213488_at	Proteína DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	similar a la neuralina 1	AL049176
205200_at	Tetranectina (proteína de unión al plasminógeno)	NM_003278.1
205743_at	src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	Gen 1 de translocación de células B, antiproliferativo	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción relacionado con runt 3	AA541630
219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	Receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512.1
202465_at	Potenciador de colágeno C-endopeptidasa	NM_002593.2
203706_s_at	Frizzled homólogo 7 (<i>Drosophila</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	iroquois homeobox proteína 5	U90304.1
203903_s_at	Hefesto	NM_014799.1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	glicoproteína sináptica vesícula 2	NM_014849.1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	factor 1 similar al receptor de citoquina	NM_004750.1
204401_at	canal de potasio intermedio/conductancia pequeña activado por calcio, subfamilia N, miembro 4	NM_002250.1
216331_at	integrina, alfa 7	AK022548.1
209663_s_at	integrina, alfa 7	AF072132.1
213125_at	Proteína DKFZP586L151	AW007573
202133_at	coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
206511_s_at	Sine oculis homeobox homólogo 2 (<i>Drosophila</i>)	NM_016932.1
213435_at	Proteína KIAA1034	AB028957.1
206115_at	respuesta de crecimiento temprano 3	NM_004430.1
213707_s_at	homeobox 5 no distal	NM_005221.3
218181_s_at	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792.1
209160_at	familia aldo-ceto reductasa 1, miembro C3 (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, 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

Tabla 8-5: Genes que disminuyeron su expresión en el cordón umbilical y las células placentarias en comparación con las otras líneas celulares analizadas.

ID de conjunto de sonda	Nombre de gen	Nº de acceso ACBI
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
213791_at	Proencefalina	NM_006211.1
205422_s_at	Integrina, tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF)	NM_004791.1
214927_at	Homo sapiens ARNm inserción completa clonación de ADNc EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	Proteína KIAA0367	AB002365.1
219789_at	péptido natriurético receptor C/guanilato ciclasa C (receptor péptido atrionatriurético C)	AI628360
219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína de membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina)	NM_006634.1
201843_s_at	Proteína de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 1	NM_004105.2
221478_at	BCL2/adenovirus E1B proteína de interacción de 19kDa tipo 3	AL132665.1
201792_at	AE proteína de unión 1	NM_001129.2
204570_at	citocromo c oxidasa subunidad VIIa polipéptido 1 (músculo)	NM_001864.1
201621_at	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380.1
202718_at	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 2, 36 kDa	NM_000597.1

[0202] Las tablas 8-6, 8-7 y 8-8 muestran la expresión de genes aumentados en fibroblastos humanos (Tabla 8-6), células ICBM (Tabla 8-7) y MSC (Tabla 8-8).

Tabla 8-6: genes que se incrementaron en expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

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

Tabla 8-6: genes que se incrementaron en expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2
supuesta proteína de retinopatía ligada a X

Tabla 8-7: Genes que se incrementaron en expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

- 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 la queratina 1-1
- similar a la hipocalcina 1
- dentado 1 (síndrome de Alagille)
- Proteoglicano 1, gránulo secretor

Tabla 8-8: genes que se incrementaron en expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

- interleucina 26
- maltasa-glucoamilasa (α -glucosidasa)
- subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2
- homólogo de oncogén viral del osteosarcoma murino v-fos FBJ
- 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
- homeoproteína de clase emparejada de cartilago 1
- *Homo sapiens* ADNc FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
- *Homo sapiens* ADNc FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
- jun B proto-oncogen
- CLL de células B/linfoma 6 (proteína de dedo de cinc 51)
- proteína con dedos de zinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

[0203] Este 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.

[0204] 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.

EJEMPLO 9**Caracterización inmunohistoquímica de los fenotipos celulares**

5 **[0205]** Los fenotipos de las células encontradas dentro del tejido del cordón umbilical humano se analizaron mediante inmunohistoquímica.

10 **[0206]** Se recogió el tejido del cordón umbilical humano y la inmersión fija en 4% (p/v) de paraformaldehído durante la noche a 4°C. La inmunohistoquímica se realizó usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (véase la Tabla 8-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, contra conejo; Sigma; o 1:300, levantado contra el ratón; Chemicon, Temecula, CA), actina del músculo liso alfa (SMA; 1:400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1:400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1:200; Sigma) y CD34 (humano CD34 Clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores: GROalpha-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 anti-NOGO-A humana (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 luego (10 µm de espesor) usando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para tinción.

20 **[0207]** 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 Tritón al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a los antígenos intracelulares. En los casos en que el epítipo de interés estaría ubicado 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 de cabra anti-ratón Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/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 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

35 **[0208]** Tras la tinción inmune, 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).

45 **Tabla 9-1:** 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
actina de músculo liso alfa (SMA)	1:400	Sigma
Citoqueratina 18 (CK18)	1:400	Sigma
factor von Willebrand (vWF)	1:200	Sigma
CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA
GROalpha-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

60 **[0209]** 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 positivas (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.

[0210] Ninguno de estos marcadores se observó dentro del cordón umbilical (datos no mostrados).

[0211] Vimentina, desmina, alfa-actina de músculo liso, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD 34 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 de células derivadas 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 10

Secreción de factores tróficos

[0212] Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de UTC. 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); interleucina-8 (IL-8) (Li y col., J. Immunol., 2003; 170: 3369-76); factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (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-EGF); factor 1alfa derivado del estroma (SDF-1alfa), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng et al., 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 macrofágica inflamatoria (MIP1alfa); proteína 1 macrófaga inflamatoria (MIP1beta); quimioattractante 1 de monocitos (MCP-1); Rantes (estimulado en la activación, células T normales expresadas y secretadas); 1309; timo y quimioquina regulada por activación (TARC); Eotaxina; quimioquina derivada de macrófagos (MDC); y (IL-8).

[0213] Las células derivadas de cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células se criopreservaron en el paso 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 ml de medio de crecimiento y se contaron las células. Las células se sembraron a 5.000 células/cm² en matraces T75 que contenían cada uno 15 ml de medio de cultivo y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio libre de suero (DMEM de baja glucosa (Gibco), 0,1% (p/v) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml, Gibco)) durante 8 horas. Se recogió medio libre de suero acondicionado al final de la incubación mediante centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20°C.

[0214] Para estimar el número de células en cada matraz, se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron usando 2 ml de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de tripsina se inhibió mediante la adición de 8 ml 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 ml de medio de crecimiento. El número de células se estimó con un hemocitómetro.

[0215] Las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ y el oxígeno atmosférico. La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, 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 ml por millón de células (n = 2, sem).

[0216] Quimioquinas (MIP1alfa, MIP1beta, MCP-1, Rantes, 1309, TARC, Eotaxina, MDC, IL8), BDNF y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGFbb, TPO, HB-EGF se midió utilizando SearchLight Proteome Arrays (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteoma son ELISA sándwich multiplexadas para la medición cuantitativa de dos a dieciséis proteínas por pocillo. Las matrices se producen detectando un patrón de 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 tipo sándwich, 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.

[0217] MCP-1 e IL-6 fueron secretados por PPDC derivados de ombligo y fibroblastos dérmicos (Tabla 10-1). 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 ningún tipo de célula por ELISA.

Tabla 10-1. Resoluciones de ELISA: Detección de factores tróficos							
	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
Fibroblasto	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
Umbilical (022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
Umbilical (071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND
Clave: ND: No detectado, =/- sem							

[0218] El ensayo ELISA Multiplexado Searchlight™. TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1beta, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC e IL-8 se secretaron a partir de PPDC derivados de ombligo (Tablas 10-2 y 10-3). No se detectaron Ang2, VEGF o PDGFbb.

Tabla 10-2. Resultados del ensayo ELISA Multiplexado Searchlight™										
	TIMP1	ANG2	PDG Fbb	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 (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivado de ombligo (022803)), U3 (PPDC derivado de ombligo (071003)), ND: No detectado.										

Tabla 10-3. Resultados del ensayo ELISA Multiplexado Searchlight™									
	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	1309	TARC	Eotaxin	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 (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivado de ombligo (022803)), U3 (PPDC derivado de ombligo (071003)), ND: No detectado									

[0219] Las células derivadas del ombligo 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 11

Ensayo de actividad de telomerasa

[0220] 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 (hTER) y la transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT). La regulación de la telomerasa se determina mediante la transcripción de hTERT pero no hTER. 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

[0221] 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 anteriores y los ejemplos expuestos en la Patente de EE.UU. N° 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 e 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. Un carcinoma embrional testicular humano pluripotente (teratoma) línea celular de células nTera-2

(NTERA-2 cl.DI) (Véase, Plaia et al., Stem Cells, 2006; 24 (3): 531-546) se adquirió de ATCC (Manassas, VA) y se cultivó de acuerdo con los métodos expuestos en la Patente de EE.UU. N° 7.510.873.

Aislamiento total de ARN

[0222] Se extrajo el ARN de las células usando RNeasy® kit (Qiagen, Valencia, Ca.). El ARN se eluye con 50 µl de agua tratada por DEPC y se almacenó a -80°C. El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

PCR en tiempo real

[0223] 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 7.000 con software ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguidos 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.

[0224] Se ensayaron las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (ATCC N° de Acceso PTA-6067), fibroblastos y células madre mesenquimales para hTERT y 18S ARN. Como se muestra en la Tabla 11-1, no se detectó hTert, y por lo tanto, telomerasa en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

Tabla 11-1		
	hTert	ARN 18S
Células umbilicales (022803)	ND	+
Fibroblastos	ND	+
ND- no detectado; + señal detectada		

[0225] Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (aislado 022803, ATCC N° de acceso PTA-6067) se sometieron a ensayo y las células NTERA-2 y los resultados no mostraron expresión de la telomerasa en dos lotes de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, mientras que la línea celular de teratoma reveló un alto nivel de expresión (Tabla 11-2).

Tabla 11-2					
Tipo de célula	hTert		GAPDH		Norma hTert
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	
nTera2	25,85	27,31	16,41	nTera2	25,85
022803	-	-	22,97	022803	-

[0226] Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas de tejido umbilical humano como se describe en este documento no expresan telomerasa.

Tabla 11-2					
Tipo de célula	hTert		GAPDH		Norma hTert
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	
nTera2	25,85	27,31	16,41	nTera2	25,85
022803	-	-	22,97	022803	-

[0227] Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas de tejido umbilical humano como se describe en este documento no expresan telomerasa.

[0228] Aunque la invención se ha descrito e ilustrado en esta memoria mediante referencias a diversos materiales, procedimientos y ejemplos específicos, se entiende que la invención no está restringida a las combinaciones particulares de material y procedimientos seleccionados para ese fin. Numerosas variaciones de tales detalles pueden implicarse como apreciarán los expertos en la materia. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren como ejemplares, únicamente, con el verdadero alcance y espíritu de la invención indicados por las siguientes reivindicaciones. Todas las referencias, patentes y solicitudes de patente a las que se hace referencia en esta solicitud se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar células terapéuticas alogénicas circulantes en una muestra de sangre que comprende:

- a. ensayar células terapéuticas alogénicas circulantes y células mononucleares de sangre periférica humana para identificar uno o más marcadores positivos para células terapéuticas alogénicas y uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica del paciente;
- b. comparar el uno o más marcadores positivos para células terapéuticas alogénicas circulantes y el uno o más marcadores positivos para células mononucleares de sangre periférica del paciente para identificar uno o más marcadores únicos que distinguen las células terapéuticas alogénicas de las células mononucleares de sangre periférica del paciente;
- c. analizar una muestra de sangre de un paciente que ha sido tratado con células terapéuticas alogénicas usando un método de ensayo para detectar uno o más marcadores únicos positivos para las células terapéuticas alogénicas circulantes; y
- d. distinguir entre las células mononucleares de sangre periférica del paciente y las células terapéuticas alogénicas circulantes basadas en la detección de uno o más marcadores únicos; en donde las células terapéuticas alogénicas circulantes son células derivadas de tejido de cordón umbilical humano, y en donde uno o más marcadores únicos para células derivadas de tejido de cordón umbilical humanas circulantes comprende CD10, CD13, NRP1, LAMP1, DKK3 o LAMB1.

2. El método de la reivindicación 1, en el que uno o más marcadores positivos para las células mononucleares de sangre periférica del paciente comprende CD45.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el método de ensayo en el paso b. se selecciona del grupo que consiste en citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica, detección de ácidos nucleicos, PCR y combinaciones de los mismos.

4. El método de la reivindicación 1, que comprende además realizar una etapa de enriquecimiento entre las etapas (c) y (d).

5. El método de la reivindicación 4, en el que la etapa de enriquecimiento es tecnología de captura magnética.

6. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de distinguir comprende diferenciar entre células terapéuticas alogénicas circulantes administradas al paciente y células mononucleares de sangre periférica del paciente.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el paciente es un primate no humano, ratón, rata, hámster, cobayo, perro o cerdo humano.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el marcador positivo para las células mononucleares de sangre periférica del paciente es CD45 y el marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humanas circulantes es CD10.

9. El método de la reivindicación 8, que comprende además CD13 como el marcador positivo para células humanas circulantes derivadas de tejido de cordón umbilical.

10. El método de la reivindicación 8, que comprende además uno o más de NRP1, DKK3 y LAMP1 como el marcador positivo para las células derivadas de tejido de cordón umbilical humanas en circulación.

11. Un método para detectar células circulantes derivadas del tejido del cordón umbilical en una muestra de sangre, que comprende las etapas de:

- a. aislar las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de sangre periférica de una muestra de sangre que contiene células derivadas humanas circulantes de tejido de cordón umbilical;
- b. eliminar cualquier plasma;
- c. analizar células derivadas de tejido del cordón umbilical humano/fracción de células mononucleares de sangre periférica por citometría de flujo para CD45 como un marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica y CD13 como un marcador positivo para células derivadas humanas circulantes de tejido de cordón umbilical; y
- d. detectar la presencia de células mononucleares de sangre periférica humana y células humanas derivadas de tejido de cordón umbilical basadas en la detección de CD45 como marcador positivo para células mononucleares de sangre periférica humana y CD13 como marcador positivo para células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

12. El método de la reivindicación 11, que comprende además analizar para CD10 como un marcador positivo para células humanas derivadas de tejido de cordón umbilical.

- 5 **13.** El método de la reivindicación 8 u 11, en el que las células derivadas humanas circulantes de tejido de cordón umbilical se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovación y expansión en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse y tienen las características siguientes: (1) expresan CD10, CD13, CD44, CD90 y HLA-ABC; (2) no expresan CD31, CD34, CD45, HLA-DR y CD117; (3) no expresan hTERT o telomerasa; (4) expresan el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocina y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y (4) expresan, en relación con un fibroblasto humano, célula madre mesenquimal o célula de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1.

ETIQUETA	Nombre	Línea celular
R52550	Donante 1 PDL=11.80	HUTC-DCB
R52551	Donante 1 PDL=20.26	Umb 041505
R52552	Donante 1 PDL=30.06	Umb 041505
R52553	Donante 1 PDL=33.58	Umb 041505
R52554	Donante 1 PDL=36.78	Umb 041505
R52555	Donante 1 PDL=40.03	Umb 041505
R52556	Donante 1 PDL=43.00	Umb 041505
R52557	Donante 1 PDL=44.98	Umb 041505
R52559	Donante 2 PDL=11.30	Umb 072804A
R52560	Donante 2 PDL=20.92	Umb 072804A
R52561	Donante 2 PDL=30.29	Umb 072804A
R52562	Donante 2 PDL=31.13	Umb 072804A
R52563	Donante 2 PDL=32.66	Umb 072804A
R52564	Donante 2 PDL=33.01	Umb 072804A
R52565	Donante 2 PDL=33.81	Umb 072804A
R52568	Donante 2 PDL=5.00	Umb 072804A
R52567	Donante 3 PDL=10.79	Umb 083105
R52568	Donante 3 PDL=20.12	Umb 083105
R52569	Donante 3 PDL=30.03	Umb 083105
R52570	Donante 3 PDL=30.46	Umb 083105
R52571	Donante 3 PDL=31.16	Umb 083105
R52572	Donante 3 PDL=31.47	Umb 083105
R52573	Donante 3 PDL=31.69	Umb 083105
R52566	Donante 3 PDL=5.00	Umb 083105
R52575	Donante 4 PDL=10.71	Umb 090304A
R52576	Donante 4 PDL=14.66	Umb 090304A
R52577	Donante 4 PDL=19.55	Umb 090304A
R52578	Donante 4 PDL=25.06	Umb 090304A
R52579	Donante 4 PDL=27.25	Umb 090304A
R52580	Donante 4 PDL=28.60	Umb 090304A
R52581	Donante 4 PDL=30.15	Umb 090304A
R52574	Donante 4 PDL=5.00	Umb 090304A

Figura 1A

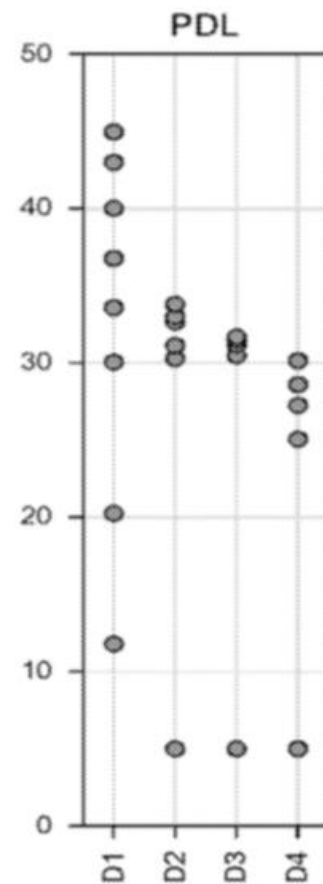


Figura 1B

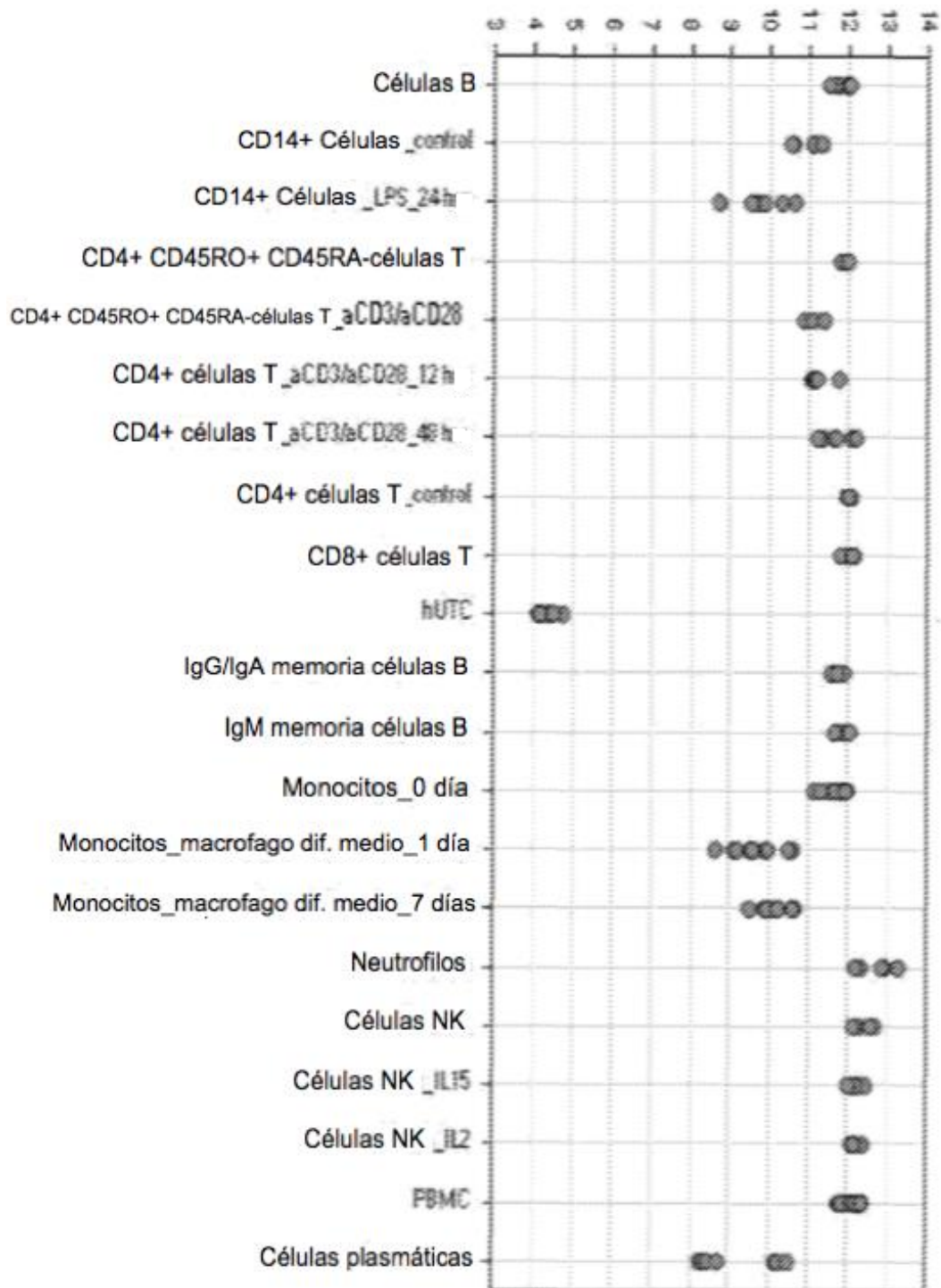


Figura 2A

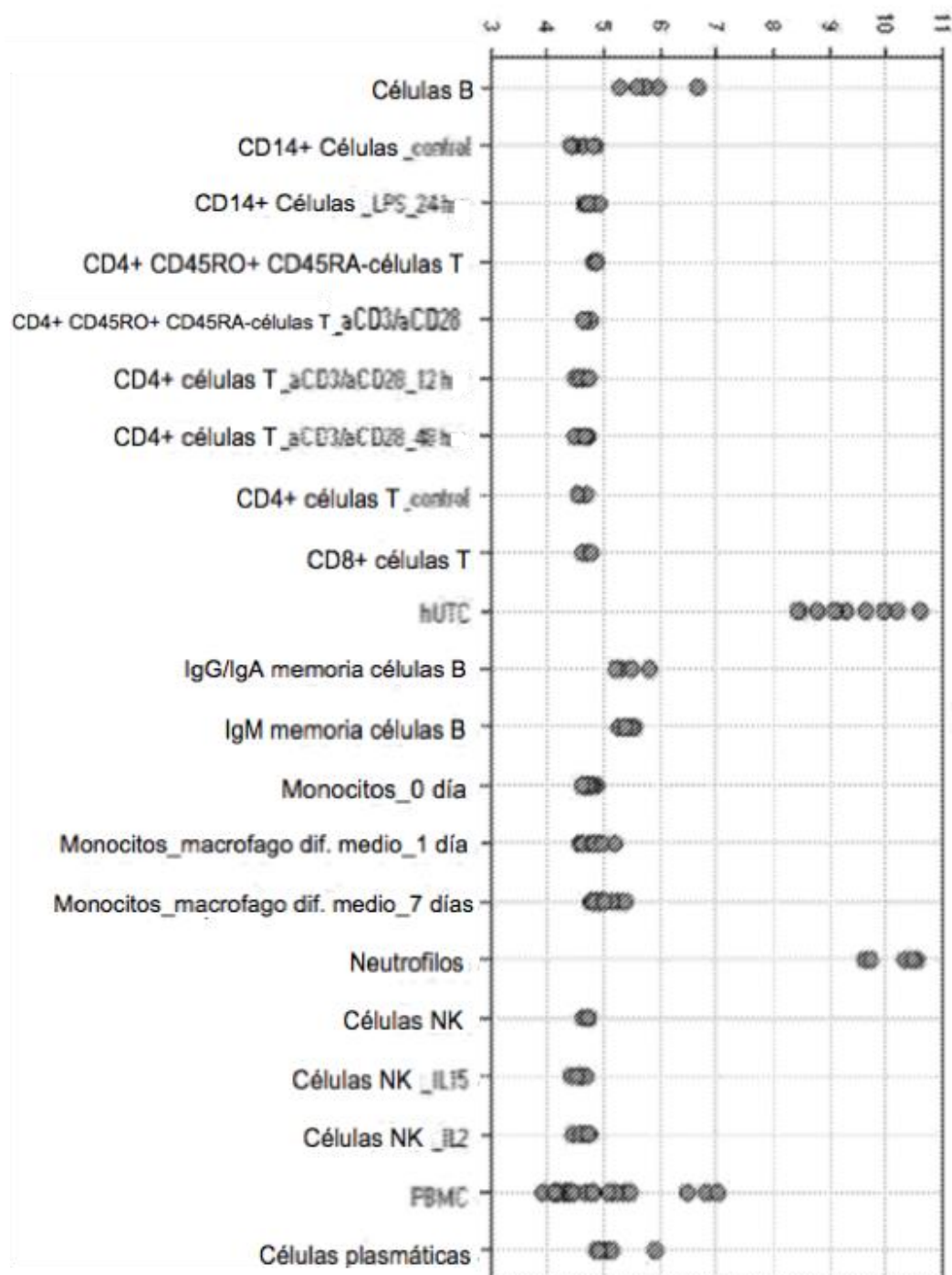


Figura 2B

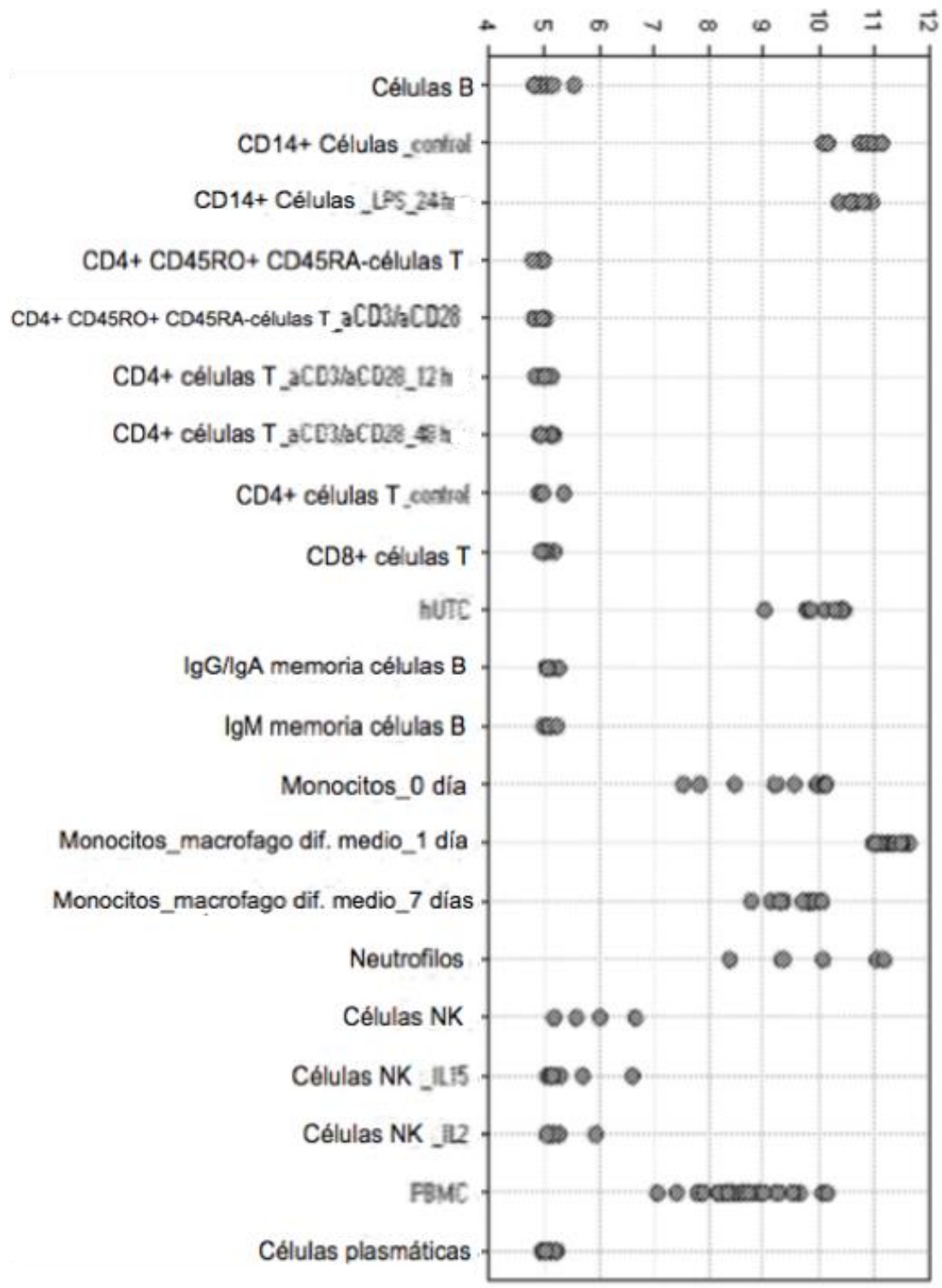


Figura 2C

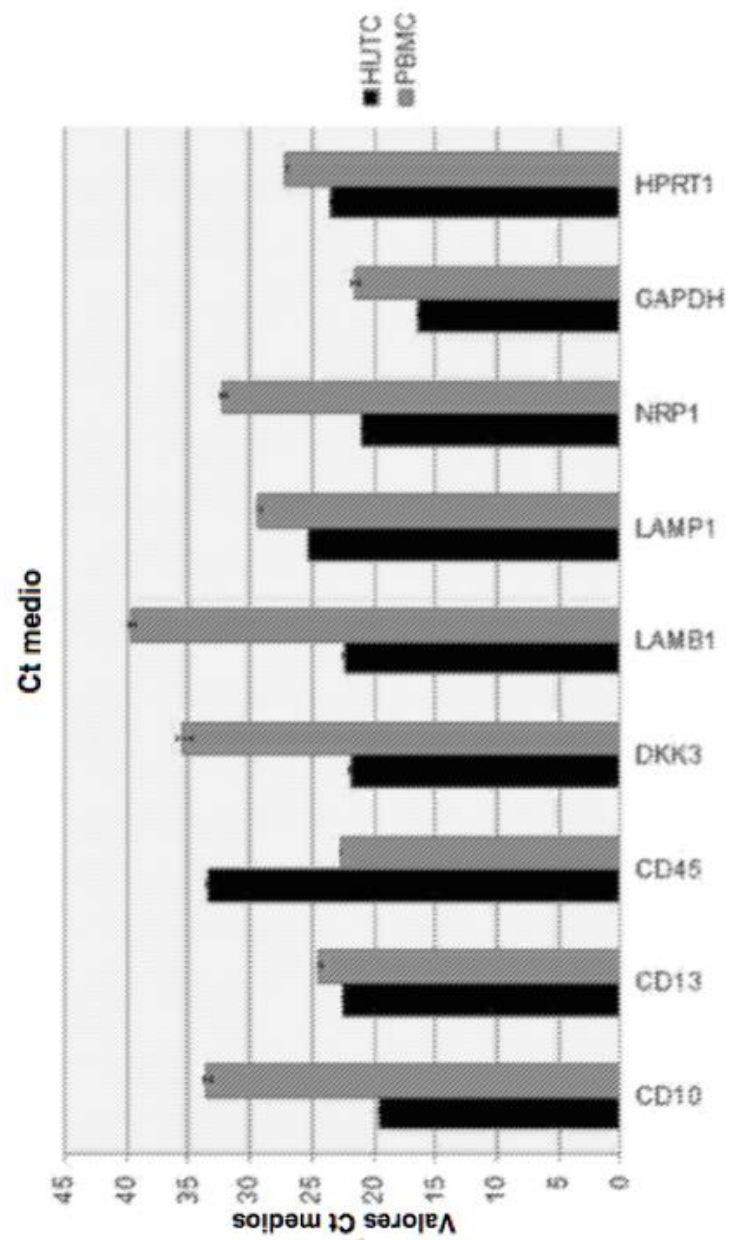


Figura 3

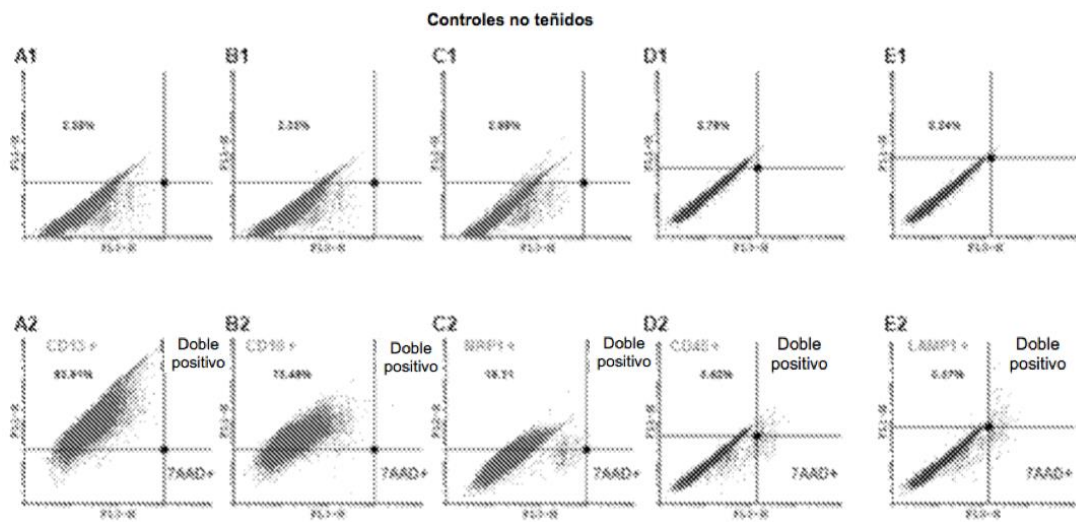


Figura 4A

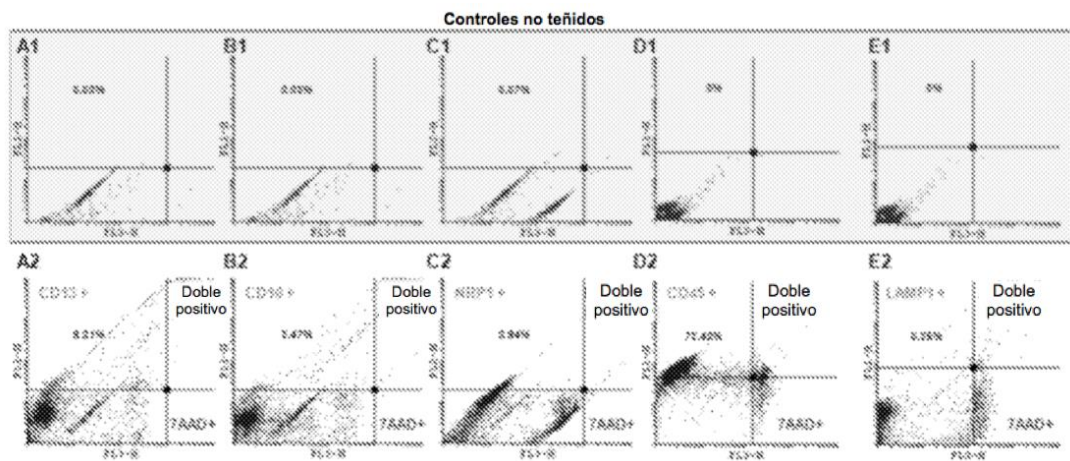


Figura 4B

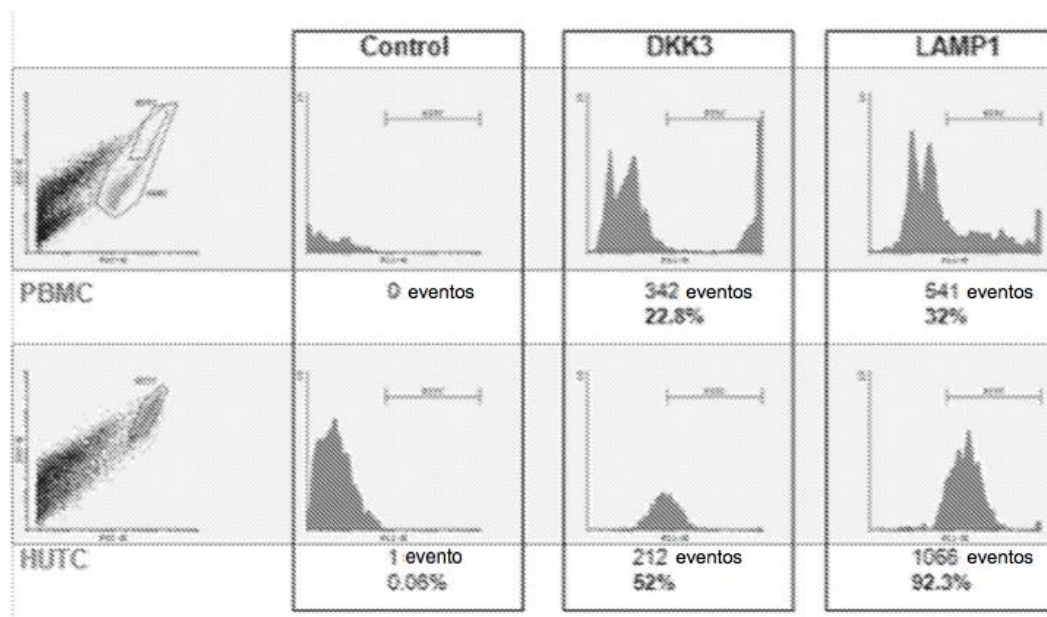


Figura 4C

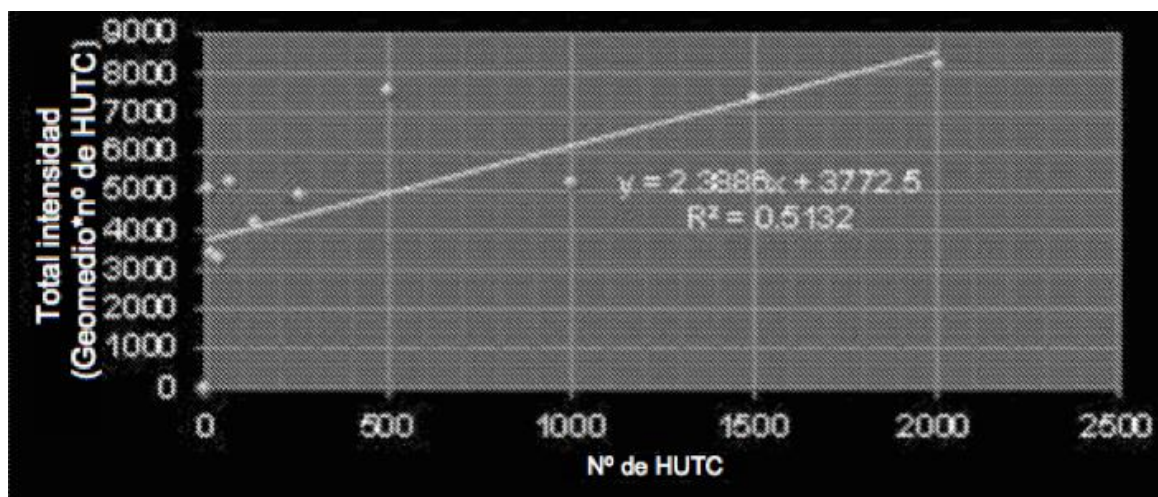


Figura 5A

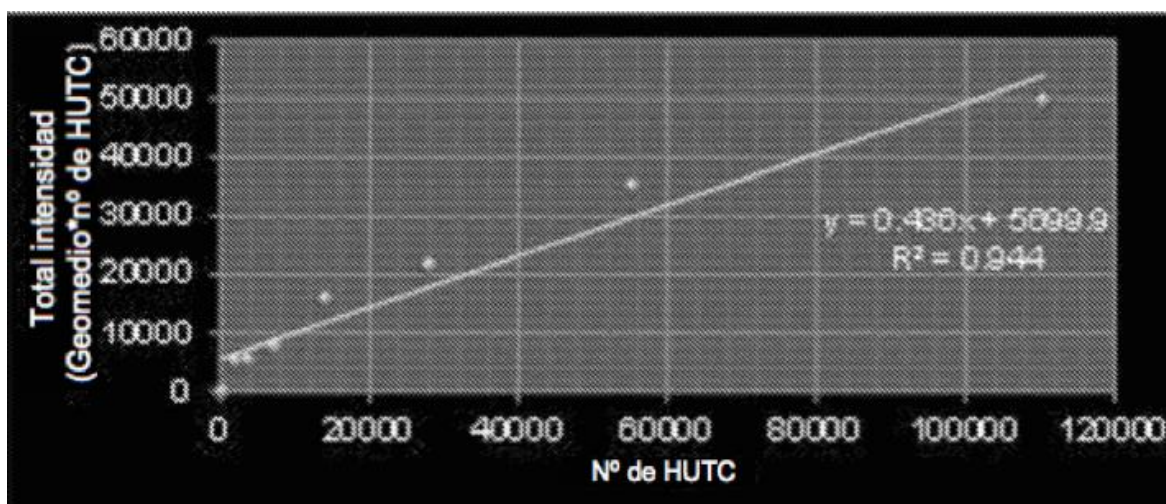


Figura 5B