

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 349**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/48** (2015.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2013 PCT/US2013/041002**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2013 E 13727699 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2854825**

54 Título: **Modulación de HUTC de mediadores pro-inflamatorios de enfermedades y transtornos de los pulmones y pulmonares**

30 Prioridad:

**14.05.2012 US 201213471095**

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

**28.02.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIHM, ANTHONY J.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 702 349 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

Modulación de HUTC de mediadores pro-inflamatorios de enfermedades y trastornos de los pulmones y pulmonares

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

**[0001]** La invención se refiere a una terapia basada en células para la modulación de mediadores proinflamatorios de enfermedades y trastornos de los pulmones y pulmonares.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0002]** Las enfermedades pulmonares (tanto crónicas como agudas), los trastornos y/o las lesiones siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la cuarta causa de muerte en el mundo (Spurzem y Rennard, Semin Respir Crit Care Med, 2005; 26: 142-153) y puede ser causada por el estrechamiento anatómico de las vías respiratorias o el bloqueo de éstas con moco que interfiere con la respiración normal. Además, la enfermedad pulmonar intersticial, también conocida como fibrosis pulmonar, se clasifica como una enfermedad restrictiva que incluye una variedad de trastornos pulmonares crónicos. El tratamiento de las enfermedades pulmonares crónicas incluye terapia con medicamentos, terapia con oxígeno, cirugía y rehabilitación pulmonar.

**[0003]** Mientras que el 90% de los pacientes con EPOC son fumadores, solo el 10% de los fumadores desarrollan la enfermedad, lo que sugiere que la predisposición genética puede ser un factor pronóstico importante (Siafakas y Tzortzaki, Respir Med, 2002; 96: 615-24). La enfermedad pulmonar del fumador se caracteriza por una inflamación crónica activa, hipersecreción de moco en las vías respiratorias y enfisema (MacNee, Proc Am Thorac Soc. 2005; 2: 258-66) y solo es parcialmente reversible al dejar de fumar (Spurzem y Rennard, Semin Respir Crit Care Med, 2005; 26: 142-153). La inflamación de las vías respiratorias y el parénquima pulmonar desempeña un papel importante en la patogénesis de la EPOC. Se ha demostrado que el humo del cigarrillo induce inflamación pulmonar y, en última instancia, conduce a la EPOC incluso si se detiene la exposición al humo del cigarrillo.

**[0004]** El enfisema es uno de los principales factores que determinan la morbilidad y la mortalidad en la EPOC. El enfisema se define como la ampliación del espacio aéreo periférico en el pulmón (incluidos los bronquiolos respiratorios y los alvéolos), que se acompaña de la destrucción de las estructuras de la pared alveolar, y se caracteriza, por ejemplo, por la pérdida de elasticidad del tejido pulmonar por la destrucción de estructuras que soportan los tejidos pulmonares como, por ejemplo, los alvéolos y la destrucción de los capilares que alimentan a los alvéolos. Las enzimas inflamatorias, como la elastasa, por ejemplo, pueden causar esta destrucción. La incidencia de enfisema ha aumentado debido al aumento de los contaminantes ambientales, fumar cigarrillos y otras exposiciones a sustancias nocivas. Actualmente, la única solución para el enfisema grave es el trasplante de pulmón. Por consiguiente, sigue existiendo una gran necesidad de un enfoque adecuado y útil para tratar, reparar y/o mejorar el daño pulmonar en pacientes con enfisema, tal como el enfisema inducido por elastasa.

**[0005]** La lesión pulmonar aguda (LPA) y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) son causas importantes de morbilidad y mortalidad en el entorno de cuidados intensivos y se caracterizan por la aparición repentina de hipoxemia con edema pulmonar difuso en respuesta a una lesión directa (por ejemplo, ahogamiento, neumonía, gases tóxicos inhalados y contusión pulmonar) o lesiones indirectas (p. ej., sepsis grave, transfusión, choque y pancreatitis). La ventilación mecánica y la atención de apoyo son tratamientos actuales para el LPA y el SDRA.

**[0006]** La enfermedad pulmonar restrictiva es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad y tiene tres etiologías primarias: cáncer de pulmón, neumonía y fibrosis pulmonar. La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad incapacitante caracterizada por una disnea progresiva y se asocia con una alta tasa de mortalidad fibrosis tisular progresiva, distorsión arquitectónica y pérdida de la función (Ortiz LA y otros, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 2003; 100 : 8407-11). Actualmente, no hay terapias efectivas disponibles para revertir o retrasar el curso de la FPI. La mayoría de los tratamientos, como los corticosteroides, los agentes inmunosupresores, inmunomoduladores o antifibróticos, buscan suprimir la inflamación, pero ninguno ha demostrado alterar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad significativa de terapias novedosas dirigidas a ralentizar o detener la fibrosis mientras que se mejora la reparación y regeneración pulmonares endógenas.

**[0007]** Se han implicado numerosos mediadores proinflamatorios en la patología de una enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar, tal como, por ejemplo, en una enfermedad respiratoria. Por ejemplo, en la fibrosis pulmonar, una forma crónica de neumonía intersticial fibrosa, un exceso de citoquinas profibróticas o una deficiencia de citoquinas antifibróticas se ha implicado en el proceso patológico de la enfermedad. (Zhao F. et al. Transplant Proceedings, 2008; 40 (5): 1700-1705).

**[0008]** Como tal, la reducción de la producción y/o la inhibición de estas citoquinas y mediadores proinflamatorios pueden reducir los síntomas y/o la patología de una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión. En consecuencia, actualmente existe una gran necesidad de tratamientos que reduzcan la producción o inhiban la producción de estos

mediadores proinflamatorios. Los tratamientos actuales de las enfermedades, trastornos y/o lesiones pulmonares, como por ejemplo, la EPOC, incluyen corticosteroides orales, inhalados, broncodilatadores y anticolinérgicos. Además, se ha estudiado el uso de antagonistas de la interleucina y anticuerpos contra las interleucinas, incluso en ensayos clínicos, por ejemplo para el asma. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos proporciona una reducción de la producción y/o inhibición de mediadores proinflamatorios involucrados en los síntomas y/o patología de una enfermedad, trastorno o lesión pulmonar.

**[0009]** El trasplante de células madre se puede utilizar como una herramienta clínica para reconstituir un tejido diana, restaurando así la funcionalidad fisiológica y anatómica. En el tratamiento de enfermedades pulmonares (tanto crónicas como agudas), trastornos y/o lesiones, el enfoque se ha centrado principalmente en el uso de tecnología de células madre para regenerar o reparar el tejido pulmonar dañado por enfermedades, trastornos y/o lesiones pulmonares.

**[0010]** Por lo tanto, existe la necesidad de una forma de tratar enfermedades, trastornos y/o lesiones pulmonares mediante la modulación de los mediadores asociados con la patología de la enfermedad, trastornos y/o lesiones pulmonares. En particular, lo que se necesita es un método para modular continuamente los mediadores proinflamatorios asociados con la patología de una enfermedad, trastorno o lesión pulmonar.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

**[0011]** La invención proporciona células derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) mediante la reducción de la producción de uno o más mediadores proinflamatorios implicados en la patología de la EPOC, en donde uno o más mediadores proinflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en TNF- $\alpha$ , RANTES, IL-1 $\beta$  y combinaciones de los mismos, y en donde las células se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa.

**[0012]** En este documento se describen métodos para modular (por ejemplo, reducir) la producción de un mediador proinflamatorio involucrado en la patología de una enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar en un paciente que tiene la enfermedad, trastornos y/o lesiones pulmonares. Dichas enfermedades, trastornos y/o lesiones incluyen, entre otras, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) (por ejemplo, bronquitis crónica, enfisema), fibrosis pulmonar, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y los daños asociados al mismo.

**[0013]** Una realización de la divulgación es un método para modular la producción de uno o más mediadores proinflamatorios involucrados en la patología de una enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar en un paciente que tiene la enfermedad, trastorno y/o enfermedad pulmonar o lesión que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de células derivadas de tejido del cordón umbilical. Otra realización es un método para reducir la producción de uno o más mediadores proinflamatorios involucrados en la patología de una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión en un paciente que tiene la enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de células derivadas de tejido del cordón umbilical (por ejemplo, en cantidad efectiva para reducir la producción de uno o más mediadores proinflamatorios).

**[0014]** Los métodos utilizan células aisladas del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, que son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 o CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. En una realización, las células carecen de producción de CD117 y CD45 y, opcionalmente, tampoco expresan hTERT y telomerasa. En otra realización, las células no expresan hTERT y telomerasa. En otra realización más, las células se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 o CD45, y no expresan hTERT o telomerasa y una o más de las siguientes características: expresar CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; no expresar CD31 o CD34; expresar, en relación a un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar.

**[0015]** Los métodos son adecuados para modular (por ejemplo, reducir) la producción de muchos de los mediadores proinflamatorios de enfermedades, trastornos y/o lesiones pulmonares. En una realización, los mediadores proinflamatorios son TNF- $\alpha$ , RANTES, MCP-1, IL-1 $\beta$  y combinaciones de los mismos. El mediador proinflamatorio puede estar involucrado en el progreso de la enfermedad pulmonar, el trastorno y/o la lesión.

**[0016]** En una realización, las células se administran con al menos otro tipo de célula y/o al menos otro agente. El otro tipo de célula puede ser una célula pulmonar tal como, por ejemplo, una célula progenitora, una célula de músculo liso vascular, una célula progenitora de músculo liso vascular, un pericito, una célula endotelial vascular, una célula progenitora de endotelio vascular u otra célula madre multipotente o pluripotente. El agente puede seleccionarse entre un agente antitrombogénico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un agente proangiogénico o un agente antiapoptótico.

5 [0017] En este documento también se describe un método para modular (por ejemplo, reducir) la producción de uno o más mediadores proinflamatorios de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (tal como, por ejemplo, enfisema o bronquitis crónica) en un paciente que tiene la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que comprende una cantidad efectiva de células derivadas de tejido del cordón umbilical, en donde dicho mediador proinflamatorio media el progreso de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y en donde las células están aisladas del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y la expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. Una realización es un método para reducir la producción de uno o más mediadores proinflamatorios de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (como por ejemplo, enfisema o bronquitis crónica) en un paciente que tiene la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que comprende una cantidad eficaz de tejido de células derivadas del cordón umbilical, en donde dicho mediador proinflamatorio media el progreso de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y en donde las células se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. Uno o más mediadores proinflamatorios pueden ser TNF- $\alpha$ , RANTES, MCP-1, IL-1 $\beta$  y combinaciones de los mismos.

10 [0018] En otra realización, las células pueden tener además una o más de las siguientes características: expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; no expresan CD31 o CD34; expresan, en relación a un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar.

15 [0019] En algunas realizaciones, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se formulan en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, las células se formulan en un kit que contiene un portador farmacéuticamente aceptable. Los métodos pueden inhibir la producción de uno o más mediadores proinflamatorios.

20 [0020] En este documento también se describe un método para inhibir la producción de uno o más mediadores proinflamatorios de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un paciente que tiene la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que comprende una cantidad eficaz de células derivadas de tejido del cordón umbilical. El uno o más mediadores proinflamatorios pueden seleccionarse del grupo que consiste en TNF- $\alpha$ , RANTES, MCP-1, IL-1 $\beta$  y combinaciones de los mismos. En una realización, la EPOC es una bronquitis crónica o enfisema.

25 [0021] Las células derivadas de tejido del cordón umbilical se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. Opcionalmente, las células tienen además una o más de las siguientes características: expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; no expresan CD31 o CD34; expresan, en relación a un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar.

30 [0022] En una realización, las células se administran en los sitios de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

35 [0023] En ciertas realizaciones, las células se inducen *in vitro* para diferenciarse en células de tejido pulmonar, tales como, por ejemplo, músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular, antes de la administración. En otras realizaciones, las células están diseñadas genéticamente para producir un producto genético que promueve el tratamiento de una enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar.

40 [0024] En algunas realizaciones de los métodos, las células se administran con al menos otro tipo de célula, que puede incluir células de tejido pulmonar, tales como, por ejemplo, células progenitoras de pulmón, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales, células progenitoras de endotelio vascular u otras células madre multipotentes o pluripotentes. El otro tipo de célula puede administrarse simultáneamente, antes o después de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

45 [0025] En otras realizaciones, las células se administran con al menos otro agente, que puede ser un agente antitrombótico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un agente proangiogénico o un agente antiapoptótico, por ejemplo. El otro agente puede administrarse simultáneamente, antes o después de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

50 [0026] Las células se administran preferiblemente en o cerca de los sitios de la enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar, pero también pueden administrarse en lugares distales a tales sitios. Se pueden administrar mediante inyección, infusión, un dispositivo implantado en el paciente o mediante la implantación de una matriz o soporte que contenga las células. Las células pueden ejercer un efecto trófico, como la proliferación, en el tejido pulmonar del paciente. Las células pueden inducir la migración de células del tejido pulmonar, tales como, por ejemplo, células del músculo liso vascular, células endoteliales vasculares, células progenitoras del pulmón, pericitos, células progenitoras del músculo liso vascular o células progenitoras del endotelio vascular al sitio o sitios de la enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesiones.

[0027] En este documento también se describe una composición farmacéutica para modular la producción de uno o más mediadores proinflamatorios implicados en la patología de una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión que comprende células derivadas de tejido del cordón umbilical, en las que las células se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. En una realización, la composición farmacéutica reduce la producción de uno o más mediadores proinflamatorios implicados en la patología de una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión que comprende células derivadas de tejido del cordón umbilical. En otra realización, la composición farmacéutica inhibe la producción de uno o más mediadores proinflamatorios involucrados en la patología de una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión que comprende células derivadas de tejido del cordón umbilical. Otros aspectos de la divulgación incluyen el tratamiento con composiciones farmacéuticas y kits que comprenden productos de las células derivadas de tejido del cordón umbilical.

[0028] La composición farmacéutica puede comprender un vehículo, diluyente y/o tampón farmacéuticamente aceptable. La enfermedad pulmonar puede ser una enfermedad pulmonar obstructiva crónica como, por ejemplo, bronquitis crónica o enfisema.

[0029] Otra realización más de la descripción es un kit para modular la producción de uno o más mediadores proinflamatorios implicados en la patología de una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y células derivadas de tejido del cordón umbilical. Otra realización es un kit para reducir la producción de uno o más mediadores proinflamatorios involucrados en la patología de una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y células derivadas de tejido del cordón umbilical. En una realización, las células derivadas de tejido del cordón umbilical se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. La enfermedad pulmonar puede ser una enfermedad pulmonar obstructiva crónica como, por ejemplo, bronquitis crónica o enfisema.

[0030] Otras características y ventajas de la invención se entenderán por referencia a la descripción detallada y los ejemplos siguientes.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0031] El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderán mejor cuando se lean junto con las figuras adjuntas. Con el fin de ilustrar la invención, las figuras demuestran realizaciones de la presente invención.

La figura 1 muestra la concentración de proteína total de BALF. La proteína total se midió utilizando el ensayo de proteínas Pierce BCA. Cada punto de datos representa medidas obtenidas de un solo animal. La línea horizontal representa el promedio de todas las mediciones. Se realizó el análisis de prueba t de Student. Los datos se muestran en forma de tabla a continuación en la Tabla 1.2. La Figura 2 muestra los resultados del análisis de citoquinas/quimioquinas. La Figura 2A muestra un análisis de citocinas/quimioquinas del homogeneizado de pulmón: se determinaron las concentraciones de veintidós citoquinas/quimioquinas diferentes para el homogeneizado de pulmón utilizando un kit de perlas de múltiplex de 22 ratones (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron utilizando la máquina BioRad Bioplex. Las barras de datos representan la media de seis muestras. Los datos se muestran en forma tabular en las Tablas 1-3 y 1-4. La Figura 2B muestra un análisis de citoquinas/quimioquinas de BALF. Las concentraciones de veintidós citoquinas/quimioquinas diferentes se determinaron para BALF (líquido de lavado broncoalveolar) utilizando un kit de perlas de múltiplex de ratón 22 (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron utilizando la máquina BioRad Bioplex. Las barras de datos representan la media de seis muestras. Los datos se muestran en forma tabular en las Tablas 1-5 y 1-6.

La Figura 3 muestra el efecto del tratamiento con infusión de hUTC y/o elastasa pancreática porcina (PPE) sobre la composición del fluido de lavado broncoalveolar (BAL) a los 1, 6, 10 y 14 días después de la administración de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (hUTC). La Figura 3A muestra los resultados para ratones NSG y la Figura 3B muestra los resultados para ratones BALB/c. Los controles negativos se infectaron/sensibilizaron de forma simulada con solución salina y/o vehículo. Se examinó el fluido BAL para determinar el número total de células. En cada caso, se evaluaron cinco (5) animales. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM del número de células. (\*, p <0,05, \*\*\*, p <0,001).

La Figura 4 muestra el efecto de la infusión de hUTC y/o el tratamiento con elastasa pancreática porcina (PPE) sobre la composición del fluido BAL a 1, 6, 10 y 14 días después de la administración de hUTC. Los controles negativos se sensibilizaron de forma simulada con solución salina y/o vehículo. Se examinó el fluido BAL para detectar la presencia de neutrófilos y macrófagos. En cada caso, se evaluaron cinco (5) animales. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM del número de células. (\*, p <0,05, \*\*\*, p <0,001).

La Figura 5 muestra el efecto de la infusión de hUTC y/o el tratamiento con elastasa pancreática porcina (PPE) en la composición de citocina sobrenadante de BAL a los 1, 6, 10 y 14 días después de la administración de hUTC a ratones NOD/SCIDy. La Figura 5A muestra la respuesta de citoquinas para MCP-1. La Figura 5B muestra la respuesta de citoquinas para TNF- $\alpha$ . La Figura 5C muestra la respuesta para TNF- $\alpha$  y la Figura 5D muestra la respuesta para IL-1 $\beta$ . Las respuestas se determinaron independientemente de cinco ratones por

grupo y se expresaron como medias  $\pm$  SEM (\*,  $p < 0,05$ ).

La Figura 6 muestra el efecto de la infusión de hUTC y/o el tratamiento con elastasa pancreática porcina (PPE) en la composición del sobrenadante de BAL a 1, 6, 10 y 14 días después de la administración de hUTC en ratones BALB/c. Las respuestas de citocinas se muestran para MCP-1 (véase Figura 6A) TNF- $\alpha$  (véase Figura 6B), RANTES (véase Figura 6C) e IL-1 $\beta$  (véase Figura 6D). Las respuestas se determinaron independientemente de cinco (5) ratones por grupo y se expresan como medias  $\pm$  SEM (\*,  $p < 0,05$ ).

La Figura 7 muestran la intercepción lineal media (A) y el número de alvéolos (B) medidos con un aumento de  $\times 100$  y expresados como media  $\pm$  SD de cinco (5) animales por grupo y período. Los símbolos indican los resultados del análisis estadístico: \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p, 0,005$ , \*\*\*  $p, 0,001$  en comparación con el grupo elastasa.

La Figura 8 muestra la detección de daño enfisematoso mediante la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones de pulmón fijas ( $n = 5$  por grupo) de ratones de control (PBS) o ratones que reciben tratamiento con Elastasa (E1), Elastasa + hUTC (E1+hUTC) o hUTC solo. Se muestran tres (3) diapositivas representativas para cada muestra. La ampliación original  $\times 100$ .

La Figura 9 muestra que hUTC redujo la extensión del enfisema inducido por elastasa en ratones inmunocomprometidos (NOD/SCI-Dy) en los días 1, 6, 10 y 14. Se detectó daño enfisematoso usando tinción de hematoxilina y eosina (H&E) de secciones pulmonares ( $n = 5$  por grupo). Ampliación original  $\times 100$ ,

La Figura 10 muestra que hUTC redujo la extensión del enfisema inducido por elastasa en ratones inmunocompetentes (BALB/c) en los días 1, 6, 10 y 14. Se detectó daño enfisematoso usando tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones pulmonares fijas ( $n = 5$  por grupo). Ampliación original  $\times 100$ ,

La Figura 11 muestra el efecto de la infusión de hUTC y/o el tratamiento con elastasa pancreática porcina (PPE) en la función pulmonar a los 1, 6, 10 y 14 días después de la administración de hUTC en ratones NOD/SCIDy (véase Figura 11A) y ratones BALB/c (véase Figura 11B). Los controles negativos se trataron de forma simulada con solución salina y/o vehículo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0032] Esta solicitud se basa en el descubrimiento de que las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano en un entorno *in vivo* modulan (p. ej., reducen) la producción de mediadores proinflamatorios involucrados en la patología de una enfermedad, trastorno y/o lesión pulmonar. como por ejemplo, la EPOC. En particular, los solicitantes han encontrado que la administración de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano resulta en la reducción o incluso en la inhibición de la producción de mediadores proinflamatorios de enfermedades respiratorias (por ejemplo, enfermedades pulmonares, trastornos y/o lesiones), tales como como por ejemplo TNF- $\alpha$ , RANTES, MCP-1 e IL-1 $\beta$ .

[0033] Por consiguiente, esta invención se refiere a métodos de uso de células derivadas de tejido umbilical en la modulación (por ejemplo, reducción) de la producción de mediadores proinflamatorios implicados en la patología de la EPOC en un paciente que padece EPOC. En una realización, la invención proporciona la reducción o incluso la inhibición de mediadores proinflamatorios implicados en la patología de la EPOC y, por lo tanto, provoca una reducción de los síntomas de la enfermedad. De manera óptima, la invención proporciona una modulación continua (por ejemplo, reducción) de la producción y/o inhibición de mediadores proinflamatorios involucrados en los síntomas y/o patología de la EPOC en particular en comparación con la farmacoterapia convencional, la terapia con oxígeno, la cirugía y la rehabilitación pulmonar.

### I. Definiciones

[0034] Se usan varios términos a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. Dichos términos deben recibir su significado corriente en la técnica, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de manera consistente con la definición que se proporciona en este documento.

[0035] El "tejido pulmonar" puede incluir, pero no se limita a, todas las estructuras de tejido pulmonar y tejidos asociados, que incluyen, pero no se limitan a, venas, arterias, vasos, capilares y células del tipo que forman parte, o se asocian con, tales estructuras; pulmón y tejido placentario; y linajes y/o fenotipos de músculo liso vascular, pericitos y endoteliales vasculares.

[0036] Como se usa en el presente documento, "enfermedades respiratorias o pulmonares, trastornos y lesiones" incluyen, pero no se limitan a, enfermedades pulmonares obstructivas, enfermedades pulmonares restrictivas, infecciones del tracto respiratorio (superior e inferior), tumores respiratorios, enfermedades de la cavidad pleural y enfermedades vasculares pulmonares. El daño al tejido pulmonar causado por estas enfermedades, trastornos y/o lesiones puede caracterizarse como daño pulmonar. Además, el tejido pulmonar dañado incluye todas las estructuras de tejido pulmonar y tejidos asociados, incluyendo venas, arterias, vasos, capilares y células del tipo que forman parte o están asociadas con dichas estructuras.

[0037] Las "enfermedades pulmonares obstructivas" pueden incluir enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) (por ejemplo, bronquitis crónica y enfisema), fibrosis quística, bronquiectasias, bronquiolitis y aspergilosis

broncopulmonares alérgicas. La EPOC, por ejemplo, es causada por partículas o gases nocivos (más comúnmente por fumar), que desencadenan una respuesta inflamatoria anormal en el pulmón. La respuesta inflamatoria en las vías respiratorias de mayor tamaño se conoce como bronquitis crónica, que se diagnostica clínicamente cuando las personas tosen regularmente el esputo. En los alvéolos, la respuesta inflamatoria causa la destrucción del tejido pulmonar, un proceso conocido como enfisema. Debe tenerse en cuenta que estas cuestiones son las asociadas con la EPOC en lo que se refiere a la presente invención. La etiología de la EPOC incluye, pero no se limita a, fumar tabaco, exposiciones ocupacionales a polvos de trabajo (por ejemplo, en la minería del carbón, la minería del oro, la industria textil del algodón y la industria química), la contaminación del aire y la genética.

**[0038]** "Enfermedades pulmonares restrictivas", como se usa en el presente documento, también se conoce como enfermedades pulmonares intersticiales (ILD). Muchos de estos son idiopáticos. Los ejemplos incluyen fibrosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial idiopática (de los cuales hay varios tipos), sarcoidosis, neumonía eosinofílica, linfangioleiomiomatosis, histiocitosis de células de Langerhans pulmonar y proteinosis alveolar pulmonar. Las ILD afectan el intersticio del pulmón: epitelio alveolar, endotelio capilar pulmonar, membrana basal, tejidos perivasculares y perilinfáticos. La mayoría de los tipos de ILD involucran fibrosis.

**[0039]** Los tumores respiratorios incluyen tumores tanto malignos como benignos. Los tumores malignos incluyen, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma indiferenciado de células grandes), linfoma, así como otros cánceres. Los tumores benignos son raros, pero pueden incluir hamartoma pulmonar y malformaciones congénitas, por ejemplo.

**[0040]** Como se usa en el presente documento, "lesión pulmonar aguda" (LPA) es una lesión pulmonar heterogénea difusa caracterizada por hipoxemia, edema pulmonar no cardiogénico, bajo cumplimiento pulmonar y fuga capilar generalizada. La LPA es causada por cualquier estímulo de inflamación local o sistémica. El síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) es más grave que la LPA. Como se usa en el presente documento, la LPA y el SDRA pueden caracterizarse por un inicio abrupto de hipoxemia con edema pulmonar difuso en respuesta a una lesión directa o una lesión indirecta. Como se usa en el presente documento, "lesión directa incluye", pero no se limita a, lesiones pulmonares derivadas de episodios de ahogamiento, neumonía, gases tóxicos inhalados y contusiones pulmonares. Como se usa en este documento, "lesión indirecta" puede ser por sepsis grave, transfusión, choque y pancreatitis, por ejemplo. Estas lesiones que conducen a LPA y SDRA provocan la interrupción de la interfaz alveolar-capilar, la fuga de líquido rico en proteínas hacia el intersticio y el espacio alveolar, la liberación extensa de citoquinas y la migración de neutrófilos.

**[0041]** Las enfermedades, trastornos y lesiones pulmonares descritas en el presente documento son conocidas en la técnica. Las características de cada uno, incluidas las complicaciones asociadas, las etiologías y los tratamientos, son conocidas por los expertos en la técnica. Esto incluye enfermedades pulmonares, trastornos y lesiones que no se tratan específicamente en este documento, ya que se aplicarían a enfermedades, trastornos y lesiones pulmonares obstructivas y restrictivas.

**[0042]** Las células usadas en la presente invención se denominan generalmente células posparto o células derivadas de posparto (PPDC). Las células son más específicamente "células derivadas del ombligo" o "células derivadas del cordón umbilical" (UDC), o "células derivadas del tejido del cordón umbilical" (UTC). Además, las células pueden describirse como células madre o progenitoras, y este último término se utiliza en sentido amplio. El término "derivado" se usa para indicar que las células se obtuvieron de su fuente biológica y se cultivaron o manipularon *in vitro* (p. ej., se cultivaron en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de células madre umbilicales y las características únicas de las células derivadas de ombligo de la presente invención se describen en detalle a continuación.

**[0043]** Las células madre son células indiferenciadas definidas por la capacidad de una célula única tanto para auto-renovarse como para diferenciarse para producir células progenie, incluidos los progenitores que se renuevan automáticamente, los progenitores no renovadores y las 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 contribuir sustancialmente para la mayoría, si no todos, los tejidos después de la inyección en blastocistos.

**[0044]** Las células madre se clasifican de acuerdo con su potencial de desarrollo como: (1) totipotente; (2) pluripotente; (3) multipotente; (4) oligopotente; y (5) unipotente. Las células totipotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Las células pluripotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias. Las células multipotentes incluyen aquellas capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todo dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico particular. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir progenie que incluye HSC (auto-renovación), progenitores oligopotentes restringidos a células sanguíneas y todos los tipos y elementos celulares (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre. Las células que son oligopotentes pueden dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotentes. Las células que son

unipotentes pueden dar lugar a un único linaje celular (p. ej., células madre espermatogénicas).

**[0045]** Las células madre también se clasifican en función de la fuente de la que se obtienen. Una célula madre adulta es generalmente una célula multipotente no diferenciada 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 tejido. Una célula madre embrionaria es una célula pluripotente de la masa celular interna de un embrión en etapa de blastocisto. 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 en el tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, es decir, el cordón umbilical. Se ha encontrado que estas células poseen características de las células madre pluripotentes, incluida la rápida proliferación y el potencial de diferenciación en muchos linajes celulares. Las células madre posparto pueden ser derivadas de la sangre (por ejemplo, como las que se obtienen de la sangre del cordón umbilical) o no derivadas de la sangre (por ejemplo, como se obtienen de los tejidos no sanguíneos del cordón umbilical).

**[0046]** Se usan varios términos para describir células en cultivo. "Cultivo celular" se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo "condición de cultivo" o "cultivadas". Un cultivo celular primario es un cultivo de células, tejidos u órganos extraídos 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, lo que da como resultado una mayor población de 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. Esto se conoce como "tiempo de duplicación".

**[0047]** El término "una línea celular" generalmente se refiere a una población de células formadas por una o más subcultivaciones de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivos se conoce como un pasaje. Cuando las células se subcultivan, se las denomina "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 celular cultivada que se ha pasado diez veces se puede referir como un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo que sigue al aislamiento de las células del tejido, se designa P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pasaje 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pasaje 2), y así sucesivamente. Los expertos en la técnica entenderán que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el período de pases; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es mayor que el número de pase. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el período entre pases depende de muchos factores, incluidos, entre otros, la densidad de siembra, el sustrato, el medio, las condiciones de crecimiento y el tiempo entre pases.

**[0048]** "Diferenciación" es el proceso mediante el cual una célula no especializada "no comprometida" o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, como una célula nerviosa o una célula muscular, por ejemplo. Una célula "diferenciada" es aquella que ha tomado una posición "comprometida" más especializada 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 donde, en circunstancias normales, continuará diferenciando en un tipo de célula específico o subconjunto de tipos de células, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o revertir a un tipo de célula menos diferenciado. "Desdiferenciación" se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en el presente documento, el "linaje" de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células provienen y a qué células pueden dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

**[0049]** En un sentido amplio, una "célula progenitora" es una célula que tiene la capacidad de crear una progenie que está más diferenciada que ella misma, y aún conserva la capacidad de reponer el grupo de progenitores. Según esa definición, las células madre 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 divulgación, como se describe con mayor detalle a continuación, se puede usar esta definición amplia de células progenitoras. En un sentido más estrecho, 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 es capaz de auto-renovarse. Por consiguiente, si se hace referencia a este tipo de célula en el presente documento, se lo denominará "célula progenitora no renovadora" o como "célula progenitora o precursora intermedia".

**[0050]** En el presente documento se usan varios términos con respecto al trasplante de células o tejidos o a la terapia de reemplazo celular. Los términos "transferencia autóloga", "trasplante autólogo", "autoinjerto" y similares se refieren al tratamiento en el que el donante de trasplante es también la célula o el receptor del trasplante. Los términos "transferencia alogénica", "trasplante alogénico", "aloinjerto" y similares se refieren a trasplante en el que el donante de trasplante es de la misma especie que el receptor del trasplante, pero no es el receptor. Un trasplante de células en el que las células del donante se han combinado histocompatiblemente con un receptor se denomina a veces transferencia singénica. Los términos transferencia xenogénica, trasplante xenogénico, xenoinjerto y similares

se refieren a trasplante en el que el donante de trasplante es de una especie diferente que el receptor de trasplante.

5 [0051] Las expresiones "portador farmacéuticamente aceptable" o "medio farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse indistintamente con los términos "portador biológicamente compatible" o "medio biológicamente compatible" generalmente se refieren a reactivos, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que no solo son compatibles con las células y otros agentes para ser administrados terapéuticamente, sino que también son adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otra complicación acorde con una razonable relación beneficio/riesgo.

10 [0052] Un "medio condicionado" es un medio en el que una célula o población específica de células se ha cultivado y luego se ha eliminado. Cuando las células se cultivan en un medio, pueden secretar factores celulares que pueden proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio condicionado.

15 [0053] En general, un "factor trófico" se define como una sustancia que promueve la supervivencia, el crecimiento, la proliferación y/o la maduración de una célula, o que estimula el aumento de la actividad de una célula.

20 [0054] Como se usa en el presente documento, el término "medio de crecimiento" generalmente se refiere a un medio suficiente para el cultivo de células derivadas del posparto. En particular, un medio actualmente preferido para el cultivo de las células de la invención comprende los Medios Esenciales Modificados de Dulbecco (DMEM). Particularmente preferido es DMEM-bajo en glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, California). El DMEM-LG se complementa preferiblemente con suero, lo más preferiblemente suero fetal bovino o suero humano. Por lo general, se agrega suero fetal bovino al 15% (v/v) (por ejemplo, suero fetal bovino definido, Hyclone, Logan Utah), junto con  
25 antibióticos/antimicóticos (preferiblemente 100 unidades/mililitro de penicilina, 100 miligramos/mililitro de estreptomycin y 0,25 ml) crogram/mililitro de anfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, California) y 0,001% (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis Mo.). En algunos casos, se utilizan diferentes medios de crecimiento o se proporcionan diferentes suplementos, que normalmente se indican en el texto como suplementos al medio de crecimiento. En ciertos medios químicamente definidos, las células pueden crecer sin suero presente en absoluto. En tales casos, las células pueden requerir ciertos factores de crecimiento, que pueden agregarse al medio para sostener y sostener las células. Los factores preferidos actualmente que se añaden para el crecimiento en medios sin suero incluyen uno o más de bFGF, EGF, IGF-I y PDGF. En realizaciones más preferidas, dos, tres o los cuatro factores se agregan a medios libres de suero o químicamente definidos. En otras realizaciones, se añade LIF a un medio sin suero para apoyar o mejorar el crecimiento de las células.

35 [0055] El término "condiciones de crecimiento estándar", como se usa en el presente documento, se refiere al cultivo de células a 37 °C, en una atmósfera estándar que comprende 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa mantenida en aproximadamente el 100%. Si bien las condiciones anteriores son útiles para el cultivo, debe entenderse que tales condiciones pueden ser modificadas por el experto en la técnica que apreciará las opciones disponibles en la técnica para el cultivo de células.

40 [0056] Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones del  $\pm 20\%$  o del  $\pm 10\%$ , más preferiblemente del  $\pm 5\%$ , incluso más preferiblemente  $\pm 1\%$ , y aún más preferiblemente  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

50 [0057] El término "cantidad eficaz" se refiere a una concentración o cantidad de un compuesto, material o composición, como se describe en el presente documento, que es eficaz para lograr un resultado biológico particular. Tales resultados incluyen, pero no se limitan a, la regeneración, reparación o mejoría del tejido esquelético, la mejora del flujo sanguíneo y/o la estimulación y/o el apoyo de la angiogénesis en pacientes con daño pulmonar debido a esas enfermedades, trastornos y lesiones. Dicha actividad efectiva se puede lograr, por ejemplo, administrando las células y/o composiciones a pacientes con daño pulmonar como se describe en el presente documento. Con respecto a la administración de UTC a un paciente *in vivo*, una cantidad efectiva puede variar desde varios cientos o menos hasta varios millones o más. En realizaciones específicas, una cantidad efectiva puede variar de aproximadamente 10<sup>3</sup> a aproximadamente 10<sup>11</sup>, más específicamente, al menos aproximadamente 10<sup>4</sup> células. Se apreciará que el número de células a administrar variará dependiendo de las características específicas del mediador proinflamatorio involucrado en la patología de la enfermedad pulmonar, el trastorno o la lesión a modular, incluyendo, entre otros, el tamaño o volumen total/área de superficie a tratar, y la proximidad del sitio de administración a la ubicación de la región a tratar, entre otros factores familiares para el biólogo medicinal.

60 [0058] Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refieren a cualquier éxito o indicios de éxito en la atenuación o mejora de una lesión, patología o afección, incluido cualquier parámetro objetivo o subjetivo, como la reducción, remisión, disminución de síntomas o hacer que la lesión, patología o afección sea más tolerable para el paciente, disminuyendo la velocidad de degeneración o disminución, haciendo que el punto final de degeneración sea menos debilitante, mejorando el bienestar físico o mental de un sujeto, o prolongando la duración de supervivencia. El tratamiento o la mejora de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos;

Incluyendo los resultados de un examen físico, o examen neurológico.

**[0059]** Los términos "período efectivo", "período efectivo de tiempo" o "condiciones efectivas" se refieren generalmente a un período de tiempo u otras condiciones controlables (por ejemplo, temperatura, humedad para métodos *in vitro*), necesarias o preferidas para un agente o composición farmacéutica para lograr el resultado deseado.

**[0060]** Los términos "individuo", "paciente" o "sujeto" se usan de manera intercambiable en este documento, y se refieren a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente seres humanos, que se tratan con las composiciones farmacéuticas o terapéuticas o de acuerdo con los métodos descritos aquí.

**[0061]** El término "matriz", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a materiales biodegradables y/o bioabsorbibles que se administran con las células a un paciente. La matriz puede actuar como un andamio temporal hasta que sea reemplazada por células recién desarrolladas, como músculo esquelético, pericitos, músculo liso vascular o tejido endotelial vascular. En algunas realizaciones, la matriz puede proporcionar la liberación sostenida de facturas tróficas u otros agentes utilizados junto con las células y puede proporcionar una estructura para desarrollar el crecimiento de tejido en el paciente. En otras realizaciones, la matriz simplemente proporciona un andamio temporal para el tejido en desarrollo. La matriz puede estar en forma de partículas (macropartículas de más de 10 micrones de diámetro o micropartículas de menos de 10 micrones de diámetro), o puede estar en forma de un implante tridimensional estructuralmente estable (por ejemplo, un andamio). La matriz puede ser una suspensión, hidrogel o una estructura tridimensional, como un cubo, cilindro, tubo, bloque, película, lámina o una forma anatómica apropiada.

**[0062]** El término "andamio" como se usa en este documento generalmente se refiere a una estructura porosa tridimensional que proporciona una plantilla para el crecimiento celular. Un andamio está hecho de materiales biodegradables y/o bioabsorbibles que se degradan con el tiempo dentro del cuerpo. El tiempo que tarda el andamio en degradarse puede depender del peso molecular de los materiales. Por lo tanto, un material de mayor peso molecular puede dar como resultado andamios poliméricos, que conservan su integridad estructural durante largos períodos de tiempo; mientras que los pesos moleculares más bajos dan como resultado una liberación más lenta y vidas más cortas en los andamios. El andamio se puede hacer por cualquier medio conocido en la técnica. Los ejemplos de polímeros que pueden usarse para formar el andamio incluyen polímeros naturales y sintéticos.

**[0063]** El término "aislado", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a una célula, que se ha separado de su entorno natural. Este término incluye la separación física bruta de su entorno natural, por ejemplo, la eliminación del animal donante. En realizaciones preferidas, una célula aislada no está presente en un tejido, es decir, la célula se separa o se disocia de las células vecinas con las que normalmente está en contacto. Preferiblemente, las células se administran como una suspensión celular. Como se usa en el presente documento, la frase "suspensión celular" incluye células que están en contacto con un medio y que se han disociado, por ejemplo, sometiendo un trozo de tejido a una trituración suave.

**[0064]** El término "modular" como se usa en este documento generalmente significa ajustar o regular la producción, actividad y/o cantidades del mediador proinflamatorio involucrado en la patología (por ejemplo, la manifestación de la enfermedad, como por ejemplo, los cambios en el tejido pulmonar) de una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión. En una realización, el término modular abarca la reducción de la producción del mediador proinflamatorio. En otra realización, el término modular abarca la inhibición de la producción del mediador proinflamatorio.

**[0065]** En sus diversas realizaciones descritas en el presente documento, en el presente documento se describen métodos y composiciones farmacéuticas para modular (por ejemplo, reducir o inhibir) la producción de mediadores proinflamatorios involucrados en la patología de enfermedades, trastornos y/o lesiones pulmonares que utilizan progenitores. Las células y las poblaciones de células derivadas de los tejidos posparto, en particular el tejido del ombligo. Estos métodos y composiciones farmacéuticas están diseñados para modular (reducir e/o inhibir) la producción de dichos mediadores proinflamatorios. Además, pueden diseñarse opcionalmente para estimular y apoyar la angiogénesis, mejorar el flujo sanguíneo, regenerar, reparar y mejorar el tejido pulmonar dañado por una enfermedad pulmonar, trastorno y/o lesión, y/o para proteger el tejido pulmonar de tales enfermedades, trastornos y/o lesiones.

**[0066]** Las células, poblaciones celulares y preparaciones que comprenden lisados celulares, medios acondicionados y similares, usados en las preparaciones farmacéuticas y métodos descritos en este documento se describen en detalle en las Patentes de EE.UU. nºs 7.524.489 y 7.510.873, y en la sol. de publicación de EE.UU. Nº 2005/0058634 y también aquí.

## II. Aislamiento y crecimiento de células derivadas de tejido umbilical.

**[0067]** De acuerdo con los métodos descritos en este documento, un cordón umbilical de mamífero se recupera después de la interrupción de un embarazo a término o antes del término, por ejemplo, después de la expulsión o después del nacimiento. El tejido posparto se puede transportar desde el lugar de nacimiento hasta un laboratorio en

un recipiente estéril como un matraz, un vaso de precipitados, una placa de cultivo, o bolsa. El contenedor puede tener una solución o medio, que incluye pero no se limita a una solución salina, como Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (también conocido como Medio Esencial Mínimo de Dulbecco) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier solución utilizada para el transporte de órganos utilizados para trasplantes, como la solución de la Universidad de Wisconsin o la solución perfluoroquímica. Se pueden agregar al medio o tampón uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos, tales como, entre otros, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina. El tejido posparto puede enjuagarse con una solución anticoagulante como la solución que contiene heparina. Es preferible mantener el tejido entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 10 °C antes de la extracción de UTC. Es incluso más preferible que el tejido no se congele antes de la extracción de UTC.

**[0068]** El aislamiento de la UTC se produce preferiblemente en un entorno aséptico. El cordón umbilical puede separarse de la placenta por medios conocidos en la técnica. La sangre y los residuos se extraen preferiblemente del tejido posparto antes del aislamiento de UTC. Por ejemplo, el tejido posparto puede lavarse con una solución tampón, que incluye, entre otros, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado también puede comprender uno o más agentes antimicóticos y/o antibióticos, que incluyen, entre otros, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

**[0069]** El tejido posparto que comprende un cordón umbilical, o un fragmento o sección del mismo, se desagrega preferiblemente por fuerza mecánica (fuerzas de picado o de corte). En una realización actualmente preferida, el procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. Se sabe que muchas enzimas son útiles para el aislamiento de células individuales a partir de matrices de tejidos complejos para facilitar el crecimiento en cultivo. Las enzimas de digestión varían desde débilmente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) hasta fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina), y están disponibles comercialmente. Una lista no exhaustiva de dichas enzimas incluye actividades de enzimas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, proteasas de serina (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa) y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, se sabe que las colagenasas son útiles para aislar diversas células de tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir el ADN de una sola hebra y minimizar el agrupamiento de células durante el aislamiento. Los métodos preferidos incluyen el tratamiento enzimático con colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa y hialuronidasa. El experto en la materia apreciará que muchos de estos tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para aislar células de diversas fuentes de tejido, y están bien equipados para evaluar enzimas nuevas o adicionales o combinaciones de enzimas por su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Los tratamientos con enzimas preferidos pueden durar entre aproximadamente 0,5 y 2 horas o más. En algunas realizaciones, el tejido se incuba a aproximadamente 37°C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disociación. En algunas realizaciones, el tejido posparto se separa en secciones que comprenden diversos aspectos del tejido, como los aspectos neonatales, neonatales/maternos y maternos de la placenta, por ejemplo. Las secciones separadas se disocian luego por disociación mecánica y/o enzimática de acuerdo con los métodos descritos en este documento. Las células de linaje neonatal o materno pueden identificarse por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante análisis de cariotipo o hibridación in situ para un cromosoma Y.

**[0070]** Las células aisladas se pueden usar para iniciar, o semillas, cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a vasos de cultivo tisular estériles, no recubiertos o recubiertos con una matriz extracelular o ligandos como la laminina, el colágeno (nativo, desnaturalizado o reticulado), la gelatina, la fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular. Las células se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de sostener el crecimiento de la célula tal como, entre otros, DMEM (alta o baja glucosa), 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 mesenquimatosas (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640, y medio sin suero/medio vendido con el nombre comercial CELL-GRO-FREE (Mediatech, Inc., Herndon, Va.). El medio de cultivo puede complementarse 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 alrededor de 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF) 1, factor inhibidor de leucocitos (LIF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, como por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solos o en combinación. El medio de cultivo comprende preferiblemente medio de crecimiento (por ejemplo, DMF-M-glucosa baja, suero, BME y un agente antibiótico).

**[0071]** Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular. En una realización, las células se cultivan de aproximadamente 0 por ciento a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO<sub>2</sub> en el aire. En algunas otras realizaciones, las células se cultivan en aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 25 por ciento de O<sub>2</sub> en aire, preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 20 por ciento de O<sub>2</sub> en aire. Las células se cultivan preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 25°C 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. Los UTC se cultivan preferiblemente con un estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con la adición de glutatión, vitamina C, catalasa, vitamina E, N-acetilcisteína). "Bajo estrés oxidativo", como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de daño radical mínimo o nulo a las células cultivadas.

5 **[0072]** Los métodos para la selección del medio de cultivo más apropiado, la preparación del medio y las técnicas de cultivo celular son bien conocidas en la técnica y se describen en una variedad de fuentes, incluyendo Doyle et al., (Eds.), 1995, Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, Animal Cell Bioreactors, Butterworth-Heinemann, Boston.

10 **[0073]** En algunas realizaciones, los UTC son pasados o retirados a un recipiente de cultivo separado que contiene medio fresco del mismo tipo o diferente al utilizado inicialmente, en donde la población de células puede expandirse mitóticamente. Las células de la invención se pueden usar en cualquier punto entre el pasaje 0 y la senescencia. Las células se pasan preferiblemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, más preferiblemente se pasan aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferiblemente se pasan 10 u 11 veces. La clonación  
15 y/o la subclonación se pueden realizar para confirmar que se ha aislado una población de células clonales.

**[0074]** Los diferentes tipos de células presentes en el tejido posparto se pueden fraccionar en subpoblaciones a partir de las cuales se puede aislar el UTC. El fraccionamiento o la selección se pueden lograr usando técnicas estándar para la separación celular, que incluyen, entre otras, el tratamiento enzimático para disociar el tejido  
20 posparto en sus células componentes, seguido de la clonación y selección de tipos celulares específicos, incluida, entre otras, la selección basada en marcadores morfológicos y/o 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 como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la  
25 población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente); separación por gravedad unitaria; distribución en contra-corriente; electroforesis; y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

**[0075]** El medio de cultivo se cambia según sea necesario, p. ej., aspirando cuidadosamente el medio del plato con una pipeta y rellenando con medio fresco. La incubación continúa hasta que se acumula una cantidad o densidad suficiente de células en la placa. A partir de entonces, cualquier sección de tejido explantado original que exista puede eliminarse y las células restantes se pueden separar de la tripsinización de la placa utilizando técnicas estándar o utilizando un raspador de células. Después de la tripsinización, las células se recogen, se extraen a un  
30 medio fresco y se incuban como anteriormente. En algunas realizaciones, el medio se cambia al menos una vez aproximadamente 24 horas después de la tripsinización para eliminar cualquier célula flotante. Las células que permanecen en cultivo se consideran UTC.

**[0076]** La UTC puede ser crioconservada. Por consiguiente, en una realización preferida que se describe con mayor detalle a continuación, el UTC para la transferencia autóloga (para la madre o el niño) puede derivarse de los tejidos  
40 postparto apropiados después del nacimiento de un niño, luego crioconservado para que esté disponible en el caso de que más tarde sean necesarios para el trasplante.

### III. Características de las células derivadas del tejido umbilical.

45 **[0077]** Los ejemplos de UTC derivados de tejido umbilical, que son adecuados para su uso en los métodos reivindicados, usos, composiciones farmacéuticas y kits, se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC) (10801 University Blvd., Manassas, VA). 20110) el 10 de junio de 2004, y se les asignaron los números de acceso de ATCC de la siguiente manera: (1) la designación de cepa UMB 022803 (P7) se asignó al número de  
50 acceso PTA-6067; y (2) a la designación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el número de acceso PTA-6068.

**[0078]** La UTC puede caracterizarse, por ejemplo, por 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  
55 inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos), perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices de chips de genes; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteínas (por ejemplo, mediante ensayo de coagulación plasmática o análisis de medio condicionado con PDC, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), reacción mixta de linfocitos (por ejemplo, como medida de la estimulación de PBMC) y/u otros métodos conocidos. en la técnica.

60 **[0079]** Como tales, UTC se define por una combinación de una o más de las siguientes características: (1) características de crecimiento; (2) producción de ciertas proteínas; (3) la expresión génica, la cual, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, aumenta para ciertos genes; (4) caracterizada por la expresión génica, que en relación con una célula  
65 humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, se reduce para ciertos genes; (5) secreción o falta de secreción de factores tróficos; (6) falta de expresión hTERT o

telomerasa.

**[0080]** En una realización, la UTC puede caracterizarse por poseer una o más de las siguientes características de crecimiento: requieren L-valina para el crecimiento en cultivo; son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno de aproximadamente 5% a aproximadamente 20%; tienen el potencial de al menos alrededor de 40 duplicaciones en el cultivo antes de alcanzar la senescencia; y se adhieren y expanden en los vasos de cultivo de tejidos que no están recubiertos, o que están recubiertos con gelatina, laminina, colágeno, polirrotina, vitronectina o fibronectina. En ciertas realizaciones, el UTC también puede poseer un cariotipo normal, que se mantiene a medida que se pasan las células. Los métodos de cariotipo están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica.

**[0081]** En otras realizaciones, la UTC puede caracterizarse por la producción de ciertas proteínas, que incluyen (1) la producción de al menos uno de factor tisular, vimentina y actina de músculo alfa liso; y (2) producción de al menos uno de los marcadores de superficie de células CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C, según se detectó mediante citometría de flujo. En otras realizaciones, el UTC puede caracterizarse por la falta de producción de al menos uno de los marcadores de la superficie celular CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ, según lo detectado por citometría de flujo. En una realización, las células se caracterizan por la falta de producción de CD45 y CD117. En algunas realizaciones, las células producen al menos dos de factor tisular, vimentina y actina del músculo liso alfa. En otras realizaciones, las células producen las tres proteínas, el factor tisular, la vimentina y la actina del músculo liso alfa.

**[0082]** En otras realizaciones, la UTC puede caracterizarse por la expresión génica, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, aumenta para un gen que codifica al menos uno de interleuquina 8; reticulon 1; quimioquina (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimulante del crecimiento del melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C-X-C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3; factor de necrosis tumoral, proteína inducida por alfa 3. En una realización, el UTC puede caracterizarse por la expresión génica, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimática o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, aumenta para un gen que codifica al menos uno de interleucina 8, reticulón 1 y quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3; factor de necrosis tumoral.

**[0083]** En otra realización más, el UTC también puede caracterizarse por la expresión génica, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, se reduce para un gen que codifica al menos uno de: homeobox 2 de baja estatura; choque térmico 27 kDa proteína 2; quimioquina (motivo C-X-C) ligando 12 (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supra valvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm del homo sapiens; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); mesénquima homeo box 2 (caja homeo específica de detención de crecimiento); homólogo 1 de homeobox de sine oculis (Drosophila); cristalina, alfa B; activador asociado desordenado de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a la neuralina 1; tetranectina (proteína de unión al plasminógeno); src homología tres (SH3) y dominio rico en cisteína; colesterol 25-hidroxilasa; factor de transcripción relacionado con el runt 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de pro-colágeno C-endopeptidasa; homólogo frizzled 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabrachion); proteína 5 homeobox iroquois; hephaestina; 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; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar al receptor de citocinas; canal de potasio intermedio/conductivo con calcio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); homólogo 2 de homeobox de sine oculis (Drosophila); proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a la vesícula (myobrevin); proteína 1 de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta temprana de crecimiento 3; caja de homeo distal 5; proteína hipotética FLJ20373; aldo-ceto reductasa familia 1, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II); biglicano coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ); fibronectina 1; proencefalina; integrina, tipo 1 beta (con dominios de repetición similares al EGF); homo sapiens ARNm de inserción completa clon de ADNc EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C del péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C del péptido atrionatriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm del homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222); BCL<sub>2</sub>/adenovirus E1B de tipo 19 kDa que interactúa con la proteína 3; proteína de unión a AE 1; y el polipéptido 1 de la subunidad VIIa del citocromo c oxidasa (músculo).

**[0084]** En otras realizaciones, el UTC puede caracterizarse por la secreción de al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1 $\beta$ , 1309, MDC, RANTES y TIMP, según se detectaron cuando las células se cultivaron *in vitro* en cultivo. En algunas realizaciones, el UTC puede caracterizarse por la falta de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1 $\alpha$  y VEGF, según se detecta, por ejemplo, mediante ELISA, cuando las células se cultivan *in vitro* en cultivo.

**[0085]** En realizaciones preferidas, las células no expresan hTERT o telomerasa. Por consiguiente, una realización de la divulgación consiste en células derivadas del ombligo que no expresan hTERT o telomerasa (hTert) y que tienen una o más de las características descritas en el presente documento.

**[0086]** En realizaciones preferidas, las células comprenden dos o más de las características enumeradas anteriormente. Más preferidas son las células que comprenden, tres, cuatro, cinco o más de las características. Aún más preferidos son UTC que comprenden seis, siete, ocho, nueve, diez, once o más de las características. Aún más preferidas son las células que comprenden todas las características anteriores.

5  
**[0087]** En una realización, los UTC se derivan de tejido del cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, requieren L-valina para el crecimiento, pueden crecer en al menos aproximadamente 5% de oxígeno y comprenden al menos una de las siguientes características: (1) el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; (2) la capacidad de adherirse y expandirse en un recipiente de cultivo de tejidos sin recubrimiento o uno recubierto con gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina; (3) producción de vimentina y actina del músculo liso alfa; (4) producción de CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y (5) la expresión de un gen, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, aumenta para un gen que codifica la interleucina 8 y el reticulón 1. En algunas realizaciones, tales UTC no produce CD45 y CD 117.

15  
**[0088]** En una realización, los UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 y no expresan hTERT o telomerasa. El UTC opcionalmente (i) expresa el receptor 1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD31, CD34 o CD45; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iv) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (v) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90,

25  
**[0089]** En otra realización, los UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 o CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. Estos UTC expresan opcionalmente el receptor 1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la 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 la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90,

35  
**[0090]** En otra realización, los UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. Estos UTC opcionalmente (i) expresan el receptor 1 de lipoproteína oxidada de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD31 o CD34; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iv) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (v) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90,

40  
**[0091]** En una realización alternativa, los UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaz de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT y telomerasa. Estos UTC opcionalmente (i) expresan el receptor 1 de lipoproteína oxidada de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD31 o CD34; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iv) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (v) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90,

50  
**[0092]** En otra realización, las células se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117, CD34, CD31 y no expresan hTERT o telomerasa. Estos UTC opcionalmente (i) expresan el receptor 1 de lipoproteína oxidada de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD45; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iv) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (v) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.

60  
**[0093]** En otra realización más, las UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117, CD45, CD34, CD31, y no expresan hTERT o telomerasa. El UTC opcionalmente (i) expresa el receptor 1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimáticas o células de la médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iii) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (iv) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.

**[0094]** En una realización alternativa, los UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117, CD45, CD34, CD31, y no expresan hTERT y telomerasa. El UTC opcionalmente (i) expresa el receptor 1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimáticas o células de la médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iii) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (iv) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.

**[0095]** En otra realización más, las UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo y tienen las siguientes características: carecen de producción de CD117 y CD45; carecen de expresión de hTERT o telomerasa; expresan el receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidada, reticulón, ligando 3 del receptor de quimiocinas; expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En otra realización, los UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo y tienen las siguientes características: falta de producción de CD117 y CD45; carecen de expresión de hTERT o telomerasa; expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.

**[0096]** En otra realización más, las UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo y tienen las siguientes características: carecen de producción de CD117 y CD45; carecen de expresión de hTERT o telomerasa; carecen, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimales o células de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En otra realización más, las UTC se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, y tienen las siguientes características: potencial para al menos 40 duplicaciones en el cultivo; producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90. PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; carecen de producción de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G, y HLA-DR, DP, DQ, según lo detectado por citometría de flujo; expresión incrementada de interleucina 8, reticulón 1 y quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimática o una célula de médula ósea de cresta ilíaca; y no expresan hTERT o telomerasa

**[0097]** Las UTC descritas anteriormente se pueden usar en métodos para modular (por ejemplo, reducir e/o inhibir) la producción de mediadores proinflamatorios de una enfermedad pulmonar en un paciente que padece la enfermedad pulmonar. También se pueden usar en composiciones farmacéuticas para modular (reducir e/o inhibir) la producción de mediadores proinflamatorios de enfermedades pulmonares en un paciente que padece la enfermedad pulmonar, por ejemplo, en donde dichas composiciones comprenden las células que tienen estas características y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y puede usarse en kits para hacer, usar y practicar tales métodos y composiciones farmacéuticas como se describe y ejemplifica en el presente documento. Además, la UTC como se describe anteriormente se puede usar para hacer preparaciones tales como extractos celulares y fracciones subcelulares que se pueden usar para hacer, usar y practicar tales métodos y composiciones farmacéuticas como se describe y ejemplifica en el presente documento.

**[0098]** Ciertas células que tienen el potencial de diferenciarse a lo largo de líneas que conducen a diversos fenotipos son inestables y, por lo tanto, pueden diferenciarse espontáneamente. Actualmente se prefieren para uso con la invención los UTC que no se diferencian espontáneamente, por ejemplo, a lo largo de líneas de mioblastos, músculos esqueléticos, músculos vasculares lisos, pericitos, hemangiogénicos, angiogénicos, vasculogénicos o vasculogénicos, o endoteliales vasculares. Las células preferidas, cuando se cultivan en un medio de crecimiento, son sustancialmente estables con respecto a los marcadores celulares producidos en su superficie y con respecto al patrón de expresión de varios genes, por ejemplo, según se determina usando una prueba de diagnóstico médico vendida con el nombre comercial GENECHIP (Affymetrix, Inc., Santa Clara, California). Las células permanecen sustancialmente constantes, por ejemplo, en sus características de marcador de superficie sobre el paso y a través de múltiples duplicaciones de población.

#### IV. Poblaciones de células derivadas de tejido umbilical

**[0099]** En este documento también se describe el uso de poblaciones de UTC descritas anteriormente para reducir la producción (o incluso para inhibir la producción) de mediadores proinflamatorios en un paciente que tiene una enfermedad pulmonar. 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% de 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 homogénea, es decir, comprende sustancialmente solo la UTC (preferiblemente al menos aproximadamente el 96%, 97%, 98%, 99% o más UTC). Las poblaciones de células homogéneas de la divulgación están compuestas por células derivadas del ombligo. Las poblaciones homogéneas de células derivadas del ombligo están preferiblemente libres de células de linaje materno. La homogeneidad de una población celular puede lograrse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante clasificación celular (por ejemplo, citometría de flujo) o por expansión clonal de acuerdo con métodos conocidos. Las poblaciones UTC homogéneas pueden comprender una línea de células clonales de células derivadas del posparto. Dichas poblaciones son particularmente útiles cuando se ha aislado un clon celular con una funcionalidad altamente deseable.

**[0100]** En una realización, se usa una población sustancialmente homogénea de UTC. En una realización, esta población sustancialmente homogénea comprende UTC, que se aísla del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, es capaz de auto-renovación y expansión en el cultivo, carece de la producción de CD117 y no expresa hTERT o telomerasa. Las UTC opcionalmente (i) expresan el receptor 1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD31, CD34 o CD45; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iv) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (v) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En otra realización, la población comprende UTC, que se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45 y no expresan hTERT o telomerasa. Las UTC opcionalmente (i) expresan el receptor 1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD31 o CD34; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iv) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (v) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En otra realización, la población comprende UTC, que están aisladas del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117, CD34 y CD31, y no expresan hTERT o telomerasa. En otra realización más, la población comprende UTC, que se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y carecen de la producción de CD117, CD45, CD34, CD31 y/o telomerasa. En una realización alternativa, la población sustancialmente homogénea de células derivadas del ombligo se aísla del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, es capaz de auto-renovación y expansión en el cultivo, y tiene las siguientes características: potencial para al menos 40 duplicaciones en la cultura; producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90. PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; falta de producción de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ; aumento de la expresión de interleucina 8, reticulón 1 y quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula troncalumática o una célula de médula ósea de cresta ilíaca; y no expresa hTERT o telomerasa.

**[0101]** En otra realización, se usa una población homogénea de UTC. En una realización, esta población homogénea comprende UTC aislada de tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, carecen de la producción de CD117 y no expresan hTERT o telomerasa. La población opcionalmente (i) expresa el receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidada, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD31, CD34 o CD45; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iv) tiene el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (v) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En otra realización, la población UTC homogénea se aísla del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa. La población opcionalmente (i) expresa el receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidada, el reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocinas y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) no expresan CD31 o CD34; y/o (iii) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o (iv) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar; y/o (v) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90. En una realización alternativa, la población UTC homogénea se aísla del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo y carecen de la producción de CD117, CD34, CD31 y/o telomerasa. En otra realización más, la población homogénea se aísla del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, carecen de la producción de CD117, CD45, CD34 y CD31, y no expresan hTERT o telomerasa. En una realización alternativa, la población sustancialmente homogénea de células derivadas del ombligo se aísla del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, es capaz de auto-renovación y expansión en el cultivo, y tiene las siguientes características: potencial para al menos 40 duplicaciones en cultura; producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90. PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C; carecen de producción de CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ; expresión incrementada de interleucina 8, reticulón 1 y quimioquina (motivo C-X-C) ligando 3, en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimática o una célula de médula ósea de cresta ilíaca; y no expresan hTERT o telomerasa.

[0102] También se proporciona en el presente documento el uso de poblaciones de células incubadas en presencia de uno o más factores, o en condiciones, que estimulan la diferenciación de células madre a lo largo de un músculo liso vascular, endotelio vascular o vía de pericitos. Dichos factores son conocidos en la técnica y el experto en la materia apreciará que la determinación de las condiciones adecuadas para la diferenciación se puede realizar con la experimentación rutinaria. La optimización de tales condiciones se puede lograr mediante el diseño y análisis estadístico experimental, por ejemplo, la metodología de superficie de respuesta permite la optimización simultánea de múltiples variables en un cultivo biológico. Los factores actualmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento o tróficos, quimiocinas, citoquinas, productos celulares, agentes desmetilantes y otros estímulos que ahora se conocen o se determinan más tarde para estimular la diferenciación, por ejemplo, de células madre a lo largo de angiogénicos, hemangiogénicos, vasculogénicos, músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o vías o linajes endoteliales vasculares.

#### V. Modificaciones genéticas de células derivadas de tejido del cordón umbilical

[0103] Las UTC también pueden modificarse genéticamente para producir productos génicos terapéuticamente útiles, como por ejemplo para producir agentes angiogénicos para facilitar o apoyar la formación o el crecimiento adicional de vasos sanguíneos, o para producir factores para reclutar células progenitoras endoteliales en el área de daño pulmonar. Las células progenitoras endoteliales facilitan la vasculogénesis y el flujo sanguíneo, particularmente después de un evento isquémico (Urbich C y Dimmeler S., *Circ. Res.*, 2004; 95: 343-53). Los factores que juegan un papel en el reclutamiento de células endoteliales incluyen, pero no se limitan a VEGF, factor 1 derivado de estroma (SDF-1), eritropoyetina (EPO), G-CSF, estatinas, estrógeno, PPAR- $\gamma$ , C-X-CR4, FGF, y HGF. La modificación genética se puede realizar utilizando cualquiera de una variedad de vectores que incluyen, pero no se limitan a, vectores virales integradores, por ejemplo, vectores retrovirus o vectores virales adenoasociados; vectores de replicación no integrantes, por ejemplo, vectores de virus de papiloma, vectores de SV40, vectores de adenovirus, o vectores virales defectuosos de replicación. Otros métodos para introducir ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, una pistola de partículas o mediante inyección directa de ADN.

[0104] Las células huésped se transforman o transfectan preferiblemente con ADN controlado por o en asociación operativa con uno o más elementos de control de expresión apropiados tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, entre otros, y un marcador seleccionable. Se puede usar cualquier promotor para dirigir la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen, pero no se limitan al promotor/potenciador de CMV, SV40, virus de papiloma, virus de Epstein-Barr o promotor del gen de la elastina. En algunas realizaciones, los elementos de control utilizados para controlar la expresión del gen de interés pueden permitir la expresión regulada del gen de modo que el producto se sintetice solo cuando se necesita *in vivo*. Si se desea una expresión transitoria, los promotores constitutivos se usan preferiblemente en un vector no integrante y/o defectuoso en la replicación. Alternativamente, los promotores inducibles podrían usarse para dirigir la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados con metalotioneína y proteínas de choque térmico.

[0105] Tras la introducción del ADN extraño, las células modificadas pueden crecer en medios enriquecidos y cambiarse a los medios selectivos. El marcador seleccionable en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, en sus cromosomas y crecer para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en las líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan el producto genético.

[0106] Las células de la invención pueden ser modificadas genéticamente para "eliminar" o "derribar" la expresión de factores que promueven la inflamación o el rechazo en el sitio del implante. Las técnicas moduladoras negativas para la reducción de los niveles de expresión del gen diana o los niveles de actividad del producto del gen diana se analizan a continuación. "Modulación negativa", como se usa en este documento, se refiere a una reducción en el nivel y/o actividad del producto génico diana en relación con el nivel y/o actividad del producto génico diana en ausencia del tratamiento modulador. La expresión de un gen nativo de una célula del músculo esquelético, una célula del músculo liso vascular, un pericito, una célula endotelial vascular o sus células progenitoras puede reducirse o eliminarse utilizando una serie de técnicas que incluyen, por ejemplo, la inhibición de la expresión inactivando el gen, utilizando la técnica de recombinación homóloga. Típicamente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 5' en esa región) es interrumpido por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo, neo, que evita la producción de ARNm normal del gen diana y que resulta en la inactivación del gen. Un gen también puede inactivarse creando una eliminación en parte de un gen, o eliminando el gen completo. Al usar una construcción con dos regiones de homología con el gen diana que están muy separadas en el genoma, las secuencias que intervienen en las dos regiones se pueden eliminar (Mombaerts et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 3084-87). También se pueden usar antisentido, ADNzimas, ribozimas, ARN interferente pequeño (ARNip) y otras moléculas similares que inhiben la expresión del gen diana para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, se ha demostrado que las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de complejos de genes de histocompatibilidad principales (HLA) son más versátiles con respecto a las respuestas inmunitarias. Aún más, las moléculas de triple hélice pueden utilizarse para reducir el nivel de actividad del gen diana.

#### VI. Lisados celulares y fracciones solubles en células preparadas a partir de células derivadas de tejido

**umbilical.**

[0107] En este documento también se describen lisados celulares y fracciones solubles en células preparadas a partir de una UTC, o poblaciones de células heterogéneas u homogéneas que comprenden una UTC, así como una UTC o poblaciones de la misma que se han modificado genéticamente o que se han estimulado para diferenciarse a lo largo de un músculo esquelético, músculo liso vascular, pericito o vía del endotelio vascular. Tales lisados y fracciones de los mismos tienen muchas utilidades. El uso de la fracción soluble en lisado UTC (es decir, sustancialmente libre de membranas) *in vivo*, por ejemplo, permite que el medio intracelular beneficioso se use de forma alogénica en un paciente sin introducir una cantidad apreciable de proteínas de la superficie celular con mayor probabilidad de desencadenar el rechazo, u otras respuestas inmunológicas adversas. Los métodos para lisar células son bien conocidos en la técnica e incluyen diversos medios de rotura mecánica, rotura enzimática, o ruptura química, o combinaciones de los mismos. Dichos lisados celulares pueden prepararse a partir de células directamente en su medio de crecimiento y, por lo tanto, contienen factores de crecimiento secretados y similares, o pueden prepararse a partir de células lavadas sin medio en, por ejemplo, PBS u otra solución. Las células lavadas pueden resuspenderse en concentraciones mayores que la densidad de población original.

[0108] En una realización, los lisados celulares completos se preparan, por ejemplo, rompiendo las células sin la posterior separación de las fracciones celulares. En otra realización, una fracción de membrana celular se separa de una fracción soluble de las células por métodos rutinarios conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración o métodos similares.

[0109] Los lisados celulares o las fracciones solubles en células preparadas a partir de poblaciones de células derivadas del posparto pueden usarse como tales, concentrarse adicionalmente, por ejemplo, por ultrafiltración o liofilización, o incluso secarse, parcialmente purificado, combinado con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables como son conocidos en la técnica, o combinados con otros compuestos tales como productos biológicos, por ejemplo, composiciones de proteínas farmacéuticamente útiles. Los lisados celulares o sus fracciones se pueden usar *in vitro* o *in vivo*, solos o, por ejemplo, con células vivas autólogas o singénicas. Los lisados, si se introducen *in vivo*, pueden introducirse localmente en un sitio de tratamiento, o de forma remota para proporcionar, por ejemplo, los factores de crecimiento celular necesarios a un paciente. El uso de lisados celulares *in vivo* es conocido en la técnica, y un experto en la técnica conocerá los pasos necesarios para usar los lisados.

**VII. Composiciones farmacéuticas y matrices que comprenden células derivadas de tejido umbilical.**

[0110] En otro aspecto, en el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que utilizan las poblaciones, componentes y productos UTC, UTC y productos de UTC en diversos métodos para la modulación de mediadores proinflamatorios involucrados en la patología de una enfermedad pulmonar, trastornos y/o lesión. Ciertas realizaciones abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas (UTC sola o mezclada con otros tipos de células). Otras realizaciones abarcan composiciones farmacéuticas que comprenden componentes celulares UTC (por ejemplo, lisados celulares, fracciones de células solubles, medio condicionado, ECM o componentes de cualquiera de los anteriores) o productos (por ejemplo, factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por el UTC o mediante modificación genética, medio acondicionado del cultivo UTC). Los componentes y productos UTC que se pueden usar en la presente invención se describen en las patentes de EE.UU. n<sup>os</sup> 7.524.489 y 7.510.873, y en la sol. de publicación de EE.UU. N<sup>o</sup> 2005/0058634. En cualquier caso, la composición farmacéutica puede comprender además otros agentes activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores miotróficos o miorregenerativos o fármacos mioprotectores conocidos en la técnica.

[0111] En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden hUTC y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) y materiales sólidos (por ejemplo, armazones y matrices celulares, láminas de tubos y otros materiales similares conocidos en la técnica y descritos con mayor detalle en el presente documento). Estos materiales semisólidos y sólidos pueden diseñarse para resistir la degradación dentro del cuerpo (no biodegradable) o pueden diseñarse para degradarse dentro del cuerpo (biodegradable, bioerosionable). Un material biodegradable también puede ser biodegradable o bioabsorbible, es decir, puede disolverse y absorberse en fluidos corporales (los implantes solubles en agua son un ejemplo), o degradarse y finalmente eliminarse del cuerpo, ya sea por conversión en otros materiales o por descomposición y eliminación a través de vías naturales. La tasa de biodegradación puede variar según la tasa de liberación deseada una vez implantada en el cuerpo.

[0112] Las composiciones farmacéuticas que comprenden células UTC vivas se formulan típicamente como líquidos, semisólidos (por ejemplo, geles) o sólidos (por ejemplo, matrices, soportes y similares, según sea apropiado para la ingeniería del tejido vascular o pulmonar). Las composiciones líquidas se formulan para su administración por cualquier vía aceptable conocida en la técnica para lograr el suministro de células vivas a los tejidos vasculares o pulmonares diana. Típicamente, estos incluyen inyección o infusión, ya sea de manera difusa, o dirigidos al sitio de lesión pulmonar, daño o angustia, por una vía de administración que incluye, entre otros, la administración intramuscular, intravenosa o intraarterial mediante jeringas con agujas y/o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

**[0113]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden células vivas en un vehículo semisólido o sólido se formulan típicamente para la implantación quirúrgica en el sitio de lesión pulmonar, daño o angustia. Se apreciará que las composiciones líquidas también pueden administrarse por procedimientos quirúrgicos. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas semisólidas o sólidas pueden comprender geles semipermeables, celosías, andamios celulares y similares, que pueden ser no biodegradables o biodegradables. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede ser deseable o apropiado secuestrar las células exógenas de su entorno, pero permitir que las células secreten y liberen moléculas biológicas (por ejemplo, factores miotróficos, factores angiogénicos o factores de reclutamiento de células progenitoras endoteliales) a tejido pulmonar circundante o células vasculares. En estas realizaciones, las células pueden formularse como implantes autónomos que comprenden una UTC viva o una población celular que comprende una UTC rodeada por una barrera permeable selectivamente no degradable que separa físicamente las células trasplantadas del tejido huésped. Dichos implantes a veces se denominan "inmunoprotectores", ya que tienen la capacidad de evitar que las células inmunes y las macromoléculas destruyan las células trasplantadas en ausencia de inmunosupresión inducida farmacológicamente.

**[0114]** En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden utilizar diferentes variedades de geles y redes degradables. Por ejemplo, los materiales degradables particularmente adecuados para formulaciones de liberación sostenida incluyen polímeros biocompatibles, tales como ácido poli(láctico), ácido poli(láctico-ácido co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y similares.

**[0115]** En otras realizaciones, puede ser deseable o apropiado suministrar las células en un soporte o matriz biodegradable, preferiblemente biorreabsorbible o bioabsorbible. Estos biomateriales típicamente tridimensionales contienen las células vivas unidas al andamio, dispersas dentro del andamio, o incorporadas en una matriz extracelular atrapada en el andamio. Una vez implantados en la región objetivo del cuerpo, estos implantes se integran con el tejido huésped, en donde las células trasplantadas se establecen gradualmente (véase, por ejemplo, Tresco, PA, et al., Adv. Drug Delivery Rev., 2000; 42: 3-27; véase también Huttmacher, DW, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 2001; 12: 107-174).

**[0116]** La matriz biocompatible puede comprender polímeros biodegradables naturales o sintéticos modificados naturales, incluidos homopolímeros, copolímeros y polímeros de bloque, y combinaciones de los mismos. Se observa que un polímero se nombra generalmente en función del monómero a partir del cual se sintetiza.

**[0117]** Los ejemplos de polímeros biodegradables adecuados o clases de polímeros incluyen fibrina, colágeno, elastina, gelatina, vitronectina, fibronectina, laminina, trombina, poli(aminoácido), celulosa oxidada, tropoelastina, seda, ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos, proteínas, polinucleótidos, matrices reconstituidas de membrana basal, almidones, dextranos, alginatos, hialurón, quitina, quitosán, agarosa, polisacáridos, ácido hialurónico, ácido poli(láctico), ácido poli(glicólico), polietilenglicol, tejido descelerizado, péptidos auto-ensamblables, polipéptidos, glicosaminoglicanos, sus derivados y mezclas de los mismos. Tanto para el ácido glicólico como para el ácido láctico, un dímero cíclico intermedio se prepara y purifica típicamente antes de la polimerización. Estos dímeros intermedios se denominan glicolida y lactida, respectivamente. Otros polímeros biodegradables útiles o clases de polímeros incluyen, sin limitación, poliésteres alifáticos, poli(oxalatos de alquileno), policarbonatos derivados de tirosina, poliiminocarbonatos, poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amina, poli(propileno) fumarato, policarioxanonas, policarbonatos, poli(alfa-hidroxiácidos), poli(ésteres), poliuretano, poli(éster uretano), poli(éter uretano), polianhídridos, poliacetatos, policaprolactonas, poli(ortoésteres), poliaminoácidos, poliamidas y mezclas y copolímeros de los mismos. Polímeros biodegradables útiles adicionales incluyen, sin limitación, estereopolímeros de ácido L y D láctico, copolímeros de bis(para-carboxifenoxi)propano y ácido sebácico, copolímeros de ácido sebácico, copolímeros de caprolactona, copolímeros de ácido poli(láctico)/ácido poli(glicólico)/polietilenglicol, copolímeros de poliuretano y ácido poli(láctico), copolímeros de alfa-aminoácidos, copolímeros de alfa-aminoácidos y ácido caproico, copolímeros de alfa-bencilo glutamato y polietilenglicol, copolímeros de succinato y poli(glicoles), polifosfazeno, poli(hidroxicarbonatos) y mezclas de los mismos. También se contemplan sistemas binarios y ternarios.

**[0118]** En general, un polímero biodegradable adecuado para uso como matriz está configurado de manera deseable de modo que: tenga propiedades mecánicas que sean adecuadas para la aplicación prevista; permanece suficientemente intacto hasta que el tejido ha crecido y se ha curado; No invoca una respuesta inflamatoria o tóxica; se metaboliza en el cuerpo después de cumplir su propósito; se procesa fácilmente en el producto final que se desea formar; demuestra una vida útil aceptable; y se esteriliza fácilmente.

**[0119]** En un aspecto de la invención, el polímero biocompatible usado para formar la matriz está en forma de un hidrogel. En general, los hidrogeles son materiales poliméricos reticulados que pueden absorber más del 20% de su peso en agua mientras que mantienen una estructura tridimensional distinta. Esta definición incluye polímeros reticulados secos que se hincharán en ambientes acuosos, así como materiales hinchados por el agua. Una gran cantidad de polímeros hidrófilos se pueden reticular para producir hidrogeles, ya sea que el polímero sea de origen biológico, semisintético o totalmente sintético. El hidrogel se puede producir a partir de un material polimérico sintético. Dichos polímeros sintéticos pueden adaptarse a una gama de propiedades y una uniformidad predecible lote a lote, y representan una fuente confiable de material que generalmente está libre de preocupaciones de inmunogenicidad. Las matrices pueden incluir hidrogeles formados a partir de péptidos autoensamblados, como los

discutidos en la Patente de EE.UU. n<sup>os</sup> 5.670.483 y 5.955.343, sol. de pub. de patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 2002/0160471, y sol. de publicación PCT. N<sup>o</sup> WO 02/062969, cuyas descripciones se refieren a péptidos autoensamblables que forman hidrogel.

5 **[0120]** Las propiedades que hacen que los hidrogeles sean valiosos en aplicaciones de administración de fármacos incluyen el grado de hinchamiento en equilibrio, la cinética de sorción, la permeabilidad de los solutos y sus características de rendimiento *in vivo*. La permeabilidad de los compuestos depende en parte del grado de hinchamiento o del contenido de agua y de la velocidad de biodegradación. Dado que la resistencia mecánica de un gel disminuye en proporción directa al grado de hinchamiento, también está bien dentro de la contemplación de la presente invención que el hidrogel se pueda unir a un sustrato de manera que el sistema compuesto mejore la resistencia mecánica. En algunas realizaciones, el hidrogel puede impregnarse dentro de un sustrato poroso, para obtener la resistencia mecánica del sustrato, junto con las propiedades de administración útiles del hidrogel.

15 **[0121]** Los ejemplos no limitantes de andamiaje o matriz (a veces denominados colectivamente como "armazón") que se pueden usar en la presente invención incluyen estructuras textiles tales como tejidos, tejidos, trenzas, mallas, no tejidos y tejidos combados; las espumas porosas, espumas semiporosas, películas u hojas perforadas, micropartículas, esferas y esferas y estructuras compuestas son una combinación de las estructuras anteriores. Las esteras no tejidas pueden formarse, por ejemplo, utilizando fibras compuestas de un copolímero sintético absorbible de ácidos glicólico y láctico (PGA/PLA), vendidos bajo el nombre comercial de suturas VICRYL (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Las espumas, compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(épsilon-caprolactona)/ácido poli(glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos como la liofilización, como se describe en la patente de EE.UU. n<sup>o</sup> 6.355.699, también puede ser utilizado. También se pueden usar hidrogeles tales como péptidos de autoensamblaje (por ejemplo, RAD16). Las redes degradables que se forman *in situ* también son adecuadas para su uso en la invención (véase, por ejemplo, Anseth, KS et al., J. Controlled Release, 2002; 78: 199-209; Wang, D. et al., Biomaterials, 2003 ; 24: 3969-3980; Publicación de EE.UU. N<sup>o</sup> 2002/0022676). Estos materiales formadores *in situ* se formulan como fluidos adecuados para inyección, y luego pueden inducirse para formar un hidrogel por una variedad de medios, como el cambio de temperatura, el pH y la exposición a la luz *in situ* o *in vivo*.

30 **[0122]** En otra realización, el marco es un fieltro, que puede estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de un material bioabsorbible, por ejemplo, copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL o ácido hialurónico. El hilo se hace en un fieltro usando técnicas de procesamiento textil estándar que consisten en rizado, corte, cardado y punzonado. En otra realización, las células se siembran en andamios de espuma que pueden ser estructuras compuestas.

35 **[0123]** En muchas de las realizaciones mencionadas anteriormente, la estructura puede moldearse en una forma útil, tal como la de un vaso sanguíneo. Además, se apreciará que el UTC puede cultivarse en dispositivos quirúrgicos o implantables preformados, no degradables, por ejemplo, de una manera correspondiente a la utilizada para preparar bobinas endovasculares de GDC que contienen fibroblastos, por ejemplo (Marx, WF et al., Am. J. Neuroradiol., 2001; 22: 323-333).

40 **[0124]** La matriz, el armazón o el dispositivo pueden tratarse antes de la inoculación de las células para mejorar la unión celular. Por ejemplo, antes de la inoculación, las matrices de nailon pueden tratarse con ácido acético 0,1 molar e incubarse en polilisina, PBS y/o colágeno para recubrir el nailon. El poliestireno puede tratarse de manera similar utilizando ácido sulfúrico. Las superficies externas de un marco también pueden modificarse para mejorar la unión o el crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, como mediante el recubrimiento con plasma del marco o la adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (p. ej., sulfato de heparina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), materiales genéticos como citoquinas y factores de crecimiento, una matriz celular y/u otros materiales, incluyendo, pero no limitado a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, entre otros factores que afectan la supervivencia y diferenciación celular.

50 **[0125]** Los armazones que contienen UTC se preparan de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden crecer libremente en un recipiente de cultivo hasta la confluencia, levantarse del cultivo e inocularse en el marco. Los factores de crecimiento se pueden agregar al medio de cultivo antes, durante o después de la inoculación de las células para desencadenar la diferenciación y la formación de tejido, si se desea. Alternativamente, los propios armazones pueden modificarse de modo que se incremente el crecimiento de las células en los mismos, o de manera que se reduzca el riesgo de rechazo del implante. Por lo tanto, uno o más compuestos biológicamente activos, incluidos, entre otros, compuestos antiinflamatorios, inmunosupresores o factores de crecimiento, pueden agregarse al marco para la liberación local.

60 **[0126]** Una UTC, partes de una UTC, o poblaciones celulares que comprenden una UTC, o componentes o productos producidos por una UTC, pueden usarse en una variedad de formas para apoyar y facilitar la reparación, regeneración y mejora de las células pulmonares. y tejidos, para mejorar el flujo sanguíneo y para estimular y/o apoyar la angiogénesis, especialmente en pacientes con enfermedad pulmonar. Dichas utilidades abarcan métodos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

65 **[0127]** Las realizaciones específicas se dirigen a la reparación, regeneración o sustitución directa, o al soporte de la

reparación, regeneración o sustitución de vasos sanguíneos para el tratamiento de lesión o daño pulmonar.

**[0128]** La UTC puede administrarse sola (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células. Como se describió anteriormente, la UTC puede administrarse como se formuló en una preparación farmacéutica con una matriz o armazón, o con vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables. Cuando las UTC se administran con otras células, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con las otras células (antes o después de las otras células). Las células que pueden administrarse junto con la UTC incluyen, pero no se limitan a, miocitos, células del tejido pulmonar, células progenitoras del músculo esquelético, células del músculo liso vascular, células progenitoras del músculo liso vascular, pericitos, células endoteliales vasculares o células progenitoras del endotelio vascular y/u otras células madre multipotentes o pluripotentes. Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con la UTC inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cultivarse conjuntamente durante un período de tiempo previo a la administración.

**[0129]** La UTC puede administrarse con otros fármacos beneficiosos o moléculas biológicas, u otros agentes activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores de crecimiento, factores angiogénicos o fármacos mioregenerativos o mioprotectores como se conoce en técnica. Cuando las UTC se administran con otros agentes, pueden administrarse juntos en una sola composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (ya sea antes o después de la administración de los otros agentes). Los otros agentes pueden ser parte de un régimen de tratamiento que comienza ya sea antes del trasplante y continúa a lo largo del curso de la recuperación, o puede iniciarse en el momento del trasplante, o incluso después del trasplante, según lo considere adecuado un médico experto en la materia.

**[0130]** En una realización, las UTC se administran como células no diferenciadas, es decir, se cultivan en medio de crecimiento. Alternativamente, la UTC se puede administrar después de la exposición en el cultivo a condiciones que estimulan la diferenciación hacia un fenotipo de tejido pulmonar deseado, por ejemplo, los fenómenos de músculo liso vascular, pericito o endotelio vascular.

**[0131]** Las células de la invención pueden implantarse, inyectarse, administrarse quirúrgicamente (por ejemplo, por medio de un catéter, jeringa, derivación, stent, microcatéter o bomba), o administrarse de otra manera directa o indirectamente al sitio de la lesión pulmonar, daño, o angustia. Las vías de administración de las células de la invención o las composiciones de las mismas incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratecal, intracisternal, o mediante jeringas con agujas o catéteres con o sin dispositivos de bombeo.

**[0132]** Cuando las células se administran en dispositivos semisólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en una ubicación precisa en el cuerpo suele ser un medio adecuado de administración. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas pueden administrarse a través de la sangre o directamente en el tejido pulmonar afectado (por ejemplo, en un área afectada difusamente, como sería el caso de LPA difuso o SDRA). La migración de la UTC puede ser guiada por señales químicas, factores de crecimiento o calpaínas.

**[0133]** Las células derivadas del tejido del cordón umbilical o las composiciones y/o matrices que comprenden las células derivadas del tejido del cordón umbilical se pueden administrar en el sitio mediante un microcatéter, intracateterización o mediante una minibomba. El excipiente o vehículo del vehículo puede ser cualquiera de los que se sabe que son farmacéuticamente aceptables para la administración a un paciente, particularmente localmente en el sitio en el que se induce la diferenciación celular. Los ejemplos incluyen medios líquidos, por ejemplo, medio de Eagle Modificado Dulbeccos (DMEM), solución salina estéril, solución salina tamponada con fosfato estéril, medio de Leibovitz (L15, Invitrogen, Carlsbad, California), dextrosa en agua estéril y cualquier otro líquido fisiológicamente aceptable.

**[0134]** Otras realizaciones abarcan métodos de modulación de mediadores proinflamatorios implicados en la patología de una lesión o daño pulmonar mediante la administración de composiciones terapéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y componentes celulares UTC (por ejemplo, lisados celulares o componentes de los mismos) o productos (por ejemplo, Factores tróficos y otros factores biológicos producidos naturalmente por la UTC o por modificación genética, medio condicionado del cultivo UTC, o medio de crecimiento UTC o productos purificados a partir del medio de crecimiento). En algunas realizaciones, los factores biológicos son FGF y HGF. Estos métodos pueden comprender además administrar otros agentes activos, tales como factores de crecimiento, factores angiogénicos o fármacos mioregenerativos o mioprotectores como se conoce en la técnica.

**[0135]** Las formas de dosificación y los regímenes para administrar la UTC o cualquiera de las otras composiciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrollan de acuerdo con una buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición del paciente individual, por ejemplo, la naturaleza y el alcance de la lesión o daño por el daño al pulmón, edad, sexo, peso corporal y condición médica general, y otros factores conocidos por los médicos. Por lo tanto, la cantidad efectiva de una composición farmacéutica para ser administrada a un paciente se determina por estas consideraciones como se conoce en la técnica.

5 [0136] Se ha demostrado que la UTC no estimula PBMC alogénicas en una reacción de linfocitos mixtos. En consecuencia, el trasplante alogénico, o incluso xenogénico, de una UTC puede ser tolerado en algunos casos. En algunas realizaciones, la propia UTC proporciona un efecto inmunosupresor, evitando así el rechazo del huésped de la UTC trasplantada. En tales casos, la inmunosupresión farmacológica durante la terapia celular puede no ser necesaria.

10 [0137] Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto se puede lograr mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o se puede lograr entregando las células en un dispositivo encapsulado, como se describió anteriormente. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, la UTC puede modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad, como se mencionó anteriormente.

15 [0138] La supervivencia de la UTC trasplantada en un paciente vivo se puede determinar mediante el uso de una variedad de técnicas de exploración, por ejemplo, tomografía axial computarizada (CAT o CT), imágenes de resonancia magnética (MRI) o tomografía por emisión de positrones (PET) exploraciones. La determinación de la supervivencia del trasplante también se puede hacer post mortem extrayendo el tejido pulmonar o vascular y examinándolo visualmente o con un microscopio. Alternativamente, las células pueden tratarse con tinciones que son específicas para las células del tejido pulmonar, por ejemplo, células del músculo liso vascular, pericitos o células endoteliales vasculares. Las células trasplantadas también se pueden identificar mediante la incorporación previa de tintes trazadores como las microesferas marcadas con rodamina o fluoresceína, azul rápido, micropartículas férricas, bisbenzamida o productos genéticos informadores introducidos genéticamente, como la beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

25 [0139] En otro aspecto, en el presente documento se describen kits que utilizan las poblaciones, componentes y productos UTC, UTC y productos de la UTC en diversos métodos para estimular y/o apoyar la angiogénesis, para mejorar el flujo sanguíneo, para regenerar, reparar y mejorar el pulmón. Tejido lesionado o dañado por un evento que daña los pulmones, como se describe anteriormente. Cuando se usan para el tratamiento del daño o lesión causada por una enfermedad pulmonar, trastornos y/o lesiones u otro tratamiento programado, los kits pueden incluir una o más poblaciones de células, incluyendo al menos la UTC y un portador farmacéuticamente aceptable (líquido, semisólido o sólido). Los kits también pueden incluir opcionalmente un medio para administrar las células, por ejemplo mediante inyección. Los kits adicionales pueden incluir instrucciones para el uso de las células. Los kits preparados para uso en hospitales de campo, como el uso militar, pueden incluir suministros de procedimientos completos que incluyen andamios de tejido, suturas quirúrgicas y similares, donde las células se usarán junto con la reparación de lesiones agudas. Los kits para ensayos y métodos *in vitro* como se describen en este documento pueden contener uno o más de: (1) una UTC o componentes o productos de la UTC; (2) reactivos para practicar el método *in vitro*; (3) otras células o poblaciones celulares, según corresponda; y (4) instrucciones para realizar el método *in vitro*.

40 [0140] Además, tal como se utiliza en los siguientes ejemplos y en otras partes de la especificación, la UTC útil en la invención se puede aislar y caracterizar de acuerdo con las descripciones de las patentes de EE.UU. n<sup>os</sup> 7.524.489 y 7.510.873, y la sol. de publicación de EE.UU. N<sup>o</sup> 2005/0058634, que se relacionan con la descripción, el aislamiento y la caracterización de hUTC.

#### 45 EJEMPLO 1

##### **Eficacia protectora pulmonar en un modelo de ratón de lesión pulmonar aguda inducida por hiperoxia**

50 [0141] Este ejemplo ilustra la efectividad de una UTC humana (el aislamiento y la caracterización de hUTC se pueden encontrar en los Ejemplos 6 a 16) para mejorar la reparación y regeneración pulmonar en un modelo de lesión pulmonar inducida por hiperoxia.

##### Cultivo de células umbilicales y aislamiento

55 [0142] Las células derivadas de cordón umbilical (UDC, hUTC) se prepararon como se describe en las patentes de EE.UU. n<sup>os</sup> 7.524.489 y 7.510.873 y en la sol. de publicación de EE.UU. N<sup>o</sup> 2005/0058634. Las células se cultivaron hasta el pasaje deseado y luego se conservaron criogénicamente.

##### Modelo animal

60 [0143] Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembras (siete semanas de edad) de Ace Animals (Boyertown, PA). Inmediatamente antes de la inyección, los hUTC se descongelaron a 37 °C (baño de agua) y se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Las células se contaron utilizando un hemocitómetro. La viabilidad celular se determinó por exclusión de colorante azul tripán. Las células se reconstituyeron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células en 200  $\mu$ l de PBS.

[0144] El resumen del estudio se resume en la Tabla 1-1 a continuación. En el día 0, las células ( $1 \times 10^6$  hUTC en 200  $\mu$ l de PBS) o el vehículo de PBS se administraron lentamente a los ratones mediante inyección intravenosa en la vena de la cola con una jeringa de 1 mL y una aguja de calibre 26 y los animales se expusieron a aire ambiente o 90% de O<sub>2</sub>. La exposición al 90% de O<sub>2</sub> se logró colocando los animales en una cámara BioSpherix (BioSpherix, LTD, Lacona, NY) que se preparó y se equilibró a 90% de O<sub>2</sub> durante 1 hora. Se proporcionaron cuidados de apoyo (soporte térmico y NutriCal) diariamente para estos animales. Las observaciones de los animales, la mortalidad, la supervivencia y las concentraciones porcentuales de oxígeno para cada tanque se registraron dos veces al día. En el cuarto día posterior al tratamiento, los animales se sometieron a eutanasia utilizando 50 mg/mL de nembutal (pentobarbital).

**Tabla 1-1. Diseño experimental.**

Grupo de tratamiento	Tratamiento atmosférico	Tratamiento	Número de animales
1	Room Air	PBS	12
2	90% de O <sub>2</sub>	PBS	12
3	90% de O <sub>2</sub>	1e <sup>6</sup> hUTC	12

Análisis de proteínas totales del fluido de lavado broncoalveolar (BALF)

[0145] Para determinar la proteína total en cada muestra, se analizó el BALF libre de células usando un ensayo de proteína BCA (Pierce). El análisis se completó con el programa Softmax 4.0 y los datos se graficaron con el software Graph Pad Prism.

Citoquinas BALF y homogeneizadas de pulmón/análisis de quimiocinas

[0146] Para preparar BALF, se sacrificaron seis (6) animales por grupo de tratamiento y se lavaron los pulmones una vez con 1,0 mL de PBS estéril (Invitrogen) y se colocaron los tubos en hielo húmedo. El BALF se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos y el líquido sobrenadante se eliminó y se usó para un análisis adicional.

[0147] Para preparar homogeneizados de pulmón, se sacrificaron seis (6) animales por grupo, se sometieron a perfusión de cuerpo entero con PBS y se diseccionaron los pulmones izquierdos y se colocaron en hielo en tubos Lysing Matrix D y luego se centrifugaron en un instrumento FastPrep® a Velocidad de 4.0 durante 40 segundos.

[0148] Los niveles de citocina/quimiocina en sobrenadante de homogeneizado de pulmón y BALF se determinaron utilizando un kit de perlas de múltiplex de ratón 22 (Millipore) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron utilizando la máquina BioRad Bioplex. Los resultados se graficaron y analizaron con el software GraphPad Prism.

Detección de células humanas

[0149] El ARN total se aisló de tejidos de ratón por Asuragen, Inc., de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la compañía. La pureza y la cantidad de las muestras de ARN total se determinaron mediante lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV NanoDrop ND-1000, La integridad del ARN se evaluó utilizando un bioanalizador Agilent.

[0150] Se usaron ensayos específicos de humano para ARNm de GAPDH (Hs99999905\_m1\_GAPDH) para estimar el número de hUTC dentro del tejido pulmonar del ratón. Asuragen, Inc. procesó muestras para el análisis cuantitativo de RT-PCR (qRT-PCR) utilizando ensayos TaqMan® de un solo tubo (Applied Biosystems), de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de la compañía. Las diluciones de ARN total se transcribieron de manera inversa utilizando el kit de síntesis de ADNc de alta capacidad TaqMan® (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y en un volumen de reacción total de 20 microlitros por dilución. Luego se analizaron 50 ng de ADNc de entrada por PCR. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado en un termociclador ABI 7500 en tiempo real validado. Después de la incubación a 95 °C durante 10 minutos, las muestras se amplificaron en 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, luego a 60 °C durante 1 minuto. El número total de hUTC dentro de los pulmones del ratón se estimó basándose en una curva estándar generada al analizar cantidades conocidas de ARN total de hUTC purificado.

Proteína Total BALF

[0151] La exposición al 90% de O<sub>2</sub> durante 4 días dio como resultado un aumento en el contenido de proteína total de BALF en comparación con los animales de control de aire ambiente ( $p < 0,01$ , Figura 1, Tabla 1-2). Además, hubo una disminución estadísticamente significativa en la proteína BALF total en el grupo de tratamiento con HUTC con O<sub>2</sub> al 90% en comparación con el grupo de tratamiento con PBS con O<sub>2</sub> al 90% ( $p < 0,05$ ).

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

Grupo de tratamiento	Número de animales	Concentración de proteína total BALF (µg/dl)
1	1	401,89
1	2	1006,68
1	3	660,67
1	4	494,49
1	5	1432,64
1	6	76,23
Media: 678,77 Des. Est.: 437,77		
2	1	1701,60
2	2	1438,46
2	3	1197,13
2	4	2823,95
2	5	4482,76
2	6	3174,32
Media: 2469,70 Des. Est.: 1260,74		
3	1	984,87
3	2	691,20
3	3	1172,41
3	4	893,28
3	5	695,56
3	6	1359,95
Media: 966,21 Des. Est.: 265,37		

Análisis de citocinas BALF y homogeneizado de pulmón

**[0152]** Las tablas 1-3 a 1-6 muestran el análisis de quimiocina/citoquina del homogeneizado de pulmón (tablas 1-3 y 1-4) y BALF (líquido de lavado broncoalveolar) (tablas 1-5 y 1-6). Los datos que se muestran en los datos también se muestran como gráficos (Figura 2A y 2B). Se observó una disminución estadísticamente significativa del factor queratinocítico (KC) BALF, la citoquina inducible por interferón gamma (IP-10), la interleucina 1α (IL-1α) y el factor quimiotáctico de monocitos homogenado de pulmón (MCP-1) en animales tratados con hUTC y expuesto a 90% de O<sub>2</sub> en comparación con animales tratados con vehículo PBS y expuesto a 90% de O<sub>2</sub> (p <0,02). (Figuras 2A y 2B, Tablas 1-3 y 1-4). (nd = no detectado).

**Tabla 1-3: Análisis de citoquinas de homogenizado pulmonar**

Grupo de tratamiento	Número de animales	MIP-1 $\alpha$	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IF $\gamma$	IL-1 $\beta$	IL-1 $\alpha$	GCSF	IP-10	IL-2
1	1	0	0	0	53	36	52	22	0	6	840	0
1	2	0	0	0	77	18	76	17	10	6	720	0
1	3	0	0	0	45	24	59	14	29	4	524	9
1	4	0	0	0	67	28	58	31	34	7	621	9
1	5	0	0	0	101	14	83	20	0	6	824	25
1	6	0	0	0	66	32	63	14	198	7	755	16
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>68</b>	<b>25</b>	<b>65</b>	<b>20</b>	<b>45</b>	<b>6</b>	<b>714</b>	<b>10</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>76</b>	<b>1</b>	<b>122</b>	<b>10</b>
2	1	0	0	139	149	9	70	13	37	23	1315	8
2	2	0	0	526	555	4	51	4	18	171	1146	5
2	3	0	0	111	103	9	62	24	56	8	712	7
2	4	0	0	143	322	0	34	8	9	59	503	0
2	5	0	0	143	334	7	68	11	28	20	1783	8
2	6	0	0	295	303	4	39	9	11	75	619	4
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>226</b>	<b>294</b>	<b>5</b>	<b>54</b>	<b>11</b>	<b>27</b>	<b>59</b>	<b>1013</b>	<b>5</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>161</b>	<b>160</b>	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>7</b>	<b>18</b>	<b>60</b>	<b>492</b>	<b>3</b>
3	1	0	0	0	115	7	50	16	30	16	1121	8
3	2	0	0	0	163	11	50	9	38	20	1105	8
3	3	0	0	0	157	13	56	7	25	24	1465	7
3	4	0	0	0	161	16	59	8	24	12	1647	7
3	5	0	0	0	337	7	41	16	26	49	711	8
3	6	0	0	88	318	17	40	9	15	45	1839	8
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>209</b>	<b>12</b>	<b>49</b>	<b>11</b>	<b>27</b>	<b>27</b>	<b>1315</b>	<b>8</b>

**Tabla 1-3: Análisis de citoquinas de homogeneizado pulmonar**

Grupo de tratamiento	Número de animales	MIP1- $\alpha$	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IF $\gamma$	IL-1 $\beta$	IL-1 $\alpha$	GCSF	IP-10	IL-2
DesEst:		0	0	36	94	4	8	4	8	15	413	1
Prueba t		nd	nd	0.02	0.26	0.08	0.57	0.86	1.00	0.28	0.45	0.10

**Tabla 1-4: Análisis de citoquinas de homogeneizado pulmonar**

Grupo de tratamiento	Número de animales	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-12p70	TNF- $\alpha$	IL-9	IL-13	IL-15	IL-17
1	1	1	11	1	0	27	9	0	82	8	0	0
1	2	1	7	8	0	46	13	0	113	14	27	0
1	3	1	12	5	0	31	15	0	82	10	0	0
1	4	1	16	9	16	51	13	0	135	11	22	0
1	5	1	15	34	0	42	23	0	105	22	24	4
1	6	1	17	14	0	37	24	0	100	15	28	0
<b>Media:</b>		<b>1</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>39</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>103</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>1</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>1</b>
2	1	1	30	69	0	39	12	0	96	18	0	0
2	2	1	13	448	0	20	0	0	62	7	0	0
2	3	1	14	33	0	37	4	0	82	8	0	0
2	4	1	11	91	0	26	4	0	63	6	0	0
2	5	1	11	47	0	30	4	0	106	8	28	0
2	6	1	11	121	0	27	5	0	54	0	0	0
<b>Media:</b>		<b>1</b>	<b>15</b>	<b>135</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>77</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>7</b>	<b>156</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>0</b>
3	1	1	15	31	0	34	15	0	79	15	0	0
3	2	1	16	36	0	28	6	0	65	9	0	0
3	3	1	16	53	0	36	9	0	68	9	0	0
3	4	1	14	26	0	24	5	0	90	12	21	0
3	5	1	13	54	0	25	13	0	60	6	0	0
3	6	2	14	34	0	24	11	0	73	6	0	0
<b>Media:</b>		<b>1</b>	<b>15</b>	<b>49</b>	<b>0</b>	<b>29</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>72</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>0</b>
<b>Prueba t</b>		<b>0.18</b>	<b>0.96</b>	<b>0.25</b>	<b>nd</b>	<b>0.63</b>	<b>0.01</b>	<b>nd</b>	<b>0.68</b>	<b>0.31</b>	<b>0.86</b>	<b>nd</b>

**Tabla 1-5: Análisis de citoquinas de homogenizado BALF fluido de lavado broncoalveolar**

Grupo de tratamiento	Número de animales	MIP1- $\alpha$	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IF $\gamma$	IL-1 $\beta$	IL-1 $\alpha$	GCSF	IP-10	IL-2
1	1	0	0	0	8	0	162	0	8	0	113	0
1	2	0	0	0	8	0	174	0	15	0	195	0
1	3	0	0	0	7	0	131	0	0	0	95	0
1	4	0	0	0	8	0	195	4	9	0	176	0
1	5	0	0	0	12	0	197	0	14	0	216	0
1	6	0	0	0	0	0	79	0	6	0	53	0
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>156</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>141</b>	<b>0</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>45</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>64</b>	<b>0</b>
2	1	0	0	0	276	0	101	0	0	59	351	0
2	2	0	0	0	425	0	127	0	0	65	381	0
2	3	0	0	0	390	0	183	0	7	64	435	0
2	4	0	0	0	533	0	107	0	0	284	453	0
2	5	0	0	0	322	0	140	0	0	70	568	0
2	6	0	0	0	501	0	104	0	0	234	554	0
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>408</b>	<b>0</b>	<b>127</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>129</b>	<b>457</b>	<b>0</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>31</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>102</b>	<b>89</b>	<b>0</b>
3	1	0	0	0	175	0	151	0	6	50	346	0
3	2	0	0	0	256	0	108	0	5	45	201	0
3	3	0	0	0	331	0	169	0	7	51	403	0
3	4	0	0	0	222	0	134	0	12	37	246	0
3	5	0	0	0	175	0	140	0	14	33	347	0
3	6	0	0	0	252	0	156	0	9	44	292	0
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>235</b>	<b>0</b>	<b>143</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>43</b>	<b>306</b>	<b>0</b>

**Tabla 1-5: Análisis de citoquinas de homogeneizado BALF (fluido de lavado broncoalveolar)**

Grupo de tratamiento	Número de animales	MIP1- $\alpha$	GMCSF	MCP-1	KC	RANTES	IF $\gamma$	IL-1 $\beta$	IL-1 $\alpha$	GCSF	IP-10	IL-2
DesEst:		0	0	0	59	0	21	0	3	7	74	0
Prueba t		nd	nd	nd	0.01	nd	0.26	nd	0.01	0.10	0.02	nd

**Tabla 1-6: Análisis de citoquinas de homogeneizado BALF (fluido de lavado broncoalveolar)**

Grupo de tratamiento	Número de animales	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-10	IL-12p70	TNF- $\alpha$	IL-9	IL-13	IL-15	IL-17
1	1	0	0	1	0	39	0	0	63	6	0	0
1	2	0	0	1	0	19	0	0	170	4	0	0
1	3	0	0	0	0	26	0	0	62	0	0	0
1	4	0	0	1	0	35	4	0	175	5	0	0
1	5	0	0	1	0	39	0	0	221	6	0	0
1	6	0	0	1	0	11	0	0	82	4	0	0
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>28</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>132</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>65</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
2	1	0	4	24	0	14	0	0	41	4	0	0
2	2	0	0	36	0	24	0	0	46	5	0	0
2	3	1	0	27	0	35	0	0	102	7	0	0
2	4	0	4	384	0	14	0	0	49	0	0	0
2	5	0	0	84	0	23	0	0	84	11	0	0
2	6	0	4	347	0	13	0	0	121	7	0	0
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>2</b>	<b>150</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>74</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>2</b>	<b>169</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
3	1	0	0	67	0	32	0	0	60	0	0	0
3	2	0	0	33	0	23	0	0	41	4	0	0
3	3	0	0	37	0	35	4	0	110	6	0	0
3	4	0	0	61	0	24	0	0	69	4	0	0
3	5	0	4	150	0	25	0	0	76	4	0	0
3	6	0	0	35	0	28	0	0	77	4	0	0
<b>Media:</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>64</b>	<b>0</b>	<b>28</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>72</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DesEst:</b>		<b>0</b>	<b>2</b>	<b>45</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>23</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Prueba t</b>		<b>0.36</b>	<b>0.40</b>	<b>0.29</b>	<b>nd</b>	<b>0.08</b>	<b>0.36</b>	<b>nd</b>	<b>0.88</b>	<b>0.27</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>

Injerto de células humanas

**[0153]** En el cuarto día posterior al tratamiento, se sacrificaron los animales, se recogieron los pulmones y se aisló el ARN total para la detección de células humanas. Los resultados mostraron la presencia de hUTC en los pulmones de los animales tratados con hUTC, pero ausentes en los pulmones de los animales tratados con PBS (Tabla 1-3).

**[0154]** La tabla 1-7 muestra los resultados de la detección de células humanas. La presencia de hUTC dentro de los pulmones del ratón en el día cuatro después del tratamiento se determinó midiendo los transcritos de ARNm de GAPDH específicos humanos utilizando PCR en tiempo real. Los valores de umbral de ciclo (CT) menores a 34 indican que hUTC están presentes dentro del tejido pulmonar del ratón. No se detectaron transcripciones de ARNm de hUTC en el tejido pulmonar del ratón (Ausente). Transcripciones de ARNm de hUTC detectadas en tejido pulmonar de ratón (Presente).

**Tabla 1-7. Detección de células humanas.**

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

[0155] Se evaluó el efecto de la administración profiláctica intravenosa de hUTC sobre el desarrollo de lesión pulmonar aguda inducida por hiperoxia en ratones. El nivel reducido de proteína total en el BALF, tras la administración de hUTC en ratones expuestos al 90% de O<sub>2</sub>, sugiere que la hUTC pudo reducir la fuga/edema vascular inducida por hiperoxia en el pulmón. Además, los datos mostraron que la hUTC causó una reducción en los niveles de tres quimiocinas importantes, lo que sugiere una inflamación reducida en el pulmón. Estos datos proporcionan evidencia de que hUTC podría ser un agente terapéutico importante para el tratamiento de la enfermedad pulmonar.

**EJEMPLO 2**

**Evaluación de la eficacia protectora de las células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC) en un modelo murino novelo humanizado de enfisema inducido por elastasa**

[0156] Este ejemplo evaluó la eficacia de las células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC) en un modelo nuevo y clásico de EPOC (enfisema). Estos modelos se basaron en el suministro de elastasa a las vías respiratorias que conducen a una destrucción enfisematosa. El modelo clásico utilizó ratones BALB/c; el nuevo modelo usó ratones nulos de la cadena gamma del receptor NOD/SCID/Citoquina (NOD/SCIDy) (en lo sucesivo "NSG"), que se han desarrollado como un banco de pruebas para ensayar terapias de células humanas.

Diseño del estudio

[0157] Los ratones se anestesiaron por inhalación de isofluorano y se administraron seis administraciones intranasales de elastasa pancreática porcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en el transcurso de catorce días (1x 30 µg cada 3 veces a la semana). Los ratones de control recibieron administración intranasal de solución salina sola. Dos horas después del primer tratamiento con elastasa, se administraron 0,5 x 10<sup>6</sup> células de tejido umbilical humano (hUTC) mediante inyección en la vena de la cola. Los hUTC se administraron como una dosis única en un volumen total de 100 µl. El vehículo solo se administró de una manera similar a la de los grupos de tratamiento de hUTC.

[0158] El estudio abarcó el análisis bioquímico/de proteínas (Parte 1) y (2) pruebas de histología y función pulmonar (pletismografía) (Parte 2).

[0159] Para este estudio, a los ratones se les inyectó elastasa pancreática porcina (PPE) por vía intranasal (i.n.) y hUTC por vía intravenosa (i.v.) en el día 0, En los días 2, 5, 7, 9 y 11, los ratones recibieron inyecciones adicionales de PPE. El día 1, se recogieron 6, 10 y 14 ratones para un análisis adicional. Se utilizaron 320 ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad la cepa/especie: NOD/SCIDy (160) o de tipo salvaje (BALB/C) *Mus musculus* (160). La tabla 2-1 resume el diseño experimental.

**Tabla 2-1: Resumen de diseño experimental**

Nº de grupo	Nº de Animales	Material de prueba
1	20 (n=5 @ 4 puntos de tiempo)	Tipo silvestre: Salina i.n. + vehículo
2	20	Tipo silvestre: elastasa i.n. + vehículo
3	20	Tipo silvestre: elastasa i.n. + hUTC

5

Nº de grupo	Nº de Animales	Material de prueba
4	16 (n=4 @ 4 puntos de tiempo)	Tipo silvestre: Saline i.n. + hUTC
5	4 (recogida el día 14)	Sin tratamiento
6	20	NOD/SCID $\odot$ : Salina i.n. + vehículo
7	20	NOD/SCID $\odot$ : elastasa i.n. + vehículo
8	20	NOD/SCID $\odot$ : elastasa i.n.+ hUTC

10

15

#### Cultivo y aislamiento de células umbilicales

20 **[0160]** Las células derivadas de cordón umbilical ("UDC" o "hUTC") se prepararon como se describe en las patentes de EE.UU. n<sup>os</sup> 7.524.489 y 7.510.873 y en la sol. de publicación de EE.UU. N<sup>o</sup> 2005/0058634. Las células se cultivaron hasta el pasaje deseado y luego se conservaron criogénicamente.

#### Preparación de la dosis

25

30 **[0161]** Inmediatamente antes de la inyección, los hUTC se descongelaron a 37°C (baño de agua). Las células se contaron utilizando un hemocitómetro. La viabilidad celular se determinó por exclusión de colorante azul tripán. Las células debían tener una viabilidad del 80% o más en el momento de la inyección. Si la viabilidad era inferior al 80%, las células se descartaron. Las células se ajustaron a la concentración apropiada con vehículo, hasta 100  $\mu$ l. Las células suspendidas en el vehículo se administraron mediante inyección en la vena de la cola utilizando una bomba de jeringa, una jeringa adecuada de pequeño volumen y una aguja de calibre 28. Las células se administraron lentamente durante 8 a 9 minutos para administrar las células a aproximadamente 0,33 mL/min/kg con el registro de los tiempos de administración. La administración celular se produjo dentro de los 80 minutos de la preparación. Las células se mantuvieron en hielo húmedo antes de la administración y se registraron los tiempos de administración.

35

#### Procedimientos

40 **[0162]** Como se discutió anteriormente, los animales en la Parte 1 del estudio se dedicaron al análisis bioquímico/de proteínas, mientras que los animales en la Parte 2 se dedicaron a pruebas de histología y función pulmonar (pletismografía).

45 **[0163]** Para el análisis bioquímico/proteico (Parte 1), en los días 1, 6, 10 y 14 después de las inyecciones de vehículo o hUTC, se sacrificaron cuatro o cinco animales de cada grupo. El fluido de lavado broncoalveolar (BALF) se obtuvo de cada animal y se almacenó a -70 °C hasta el momento de los análisis de citoquinas presentes en BALF. Los pulmones, el hígado y el bazo se congelaron instantáneamente y se almacenaron en RNAlater $\text{\textcircled{R}}$  (Life Technologies, Grand Island, NY) a -70 °C para la posterior extracción de ARN. Se almacenaron alícuotas de hígado y bazo en RNAlater $\text{\textcircled{R}}$  para un análisis transcripcional adicional.

50

#### *Análisis de factores tróficos en BALF*

55 **[0164]** Los niveles de celularidad y citocina/quimiocina (MCP-1 murino, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , RANTES) en BALF y sobrenadante de homogeneizado de pulmón se determinaron utilizando un kit de matriz de perlas múltiplex de ratón (Becton Dickinson) siguiendo el protocolo del fabricante y se analizaron mediante citometría de flujo en matriz de perlas. Las dianas murinas seleccionadas como foco están en la reducción de los mecanismos patológicos. Los objetivos efectores humanos candidatos incluían HGF humano, IL-1RA humano y VEGF. Los factores humanos se analizaron en material agrupado en un momento determinado solo por viabilidad. La proteína total en BALF se cuantificó utilizando un ensayo de proteínas BCATM (Pierce, Rockford, ILO) para permitir la normalización dentro de los grupos de muestra.

60

#### *Análisis de factores tróficos en homogeneizado de pulmón.*

65 **[0165]** Se evaluó una muestra de células del homogeneizado de pulmón mediante RT-PCR cuantitativa para MCP-1 murino, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , RANTES y HGF humano, IL-1RA humano y VEGF para evaluar marcadores de patología (MCP-1), 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y RANTES) o indicadores de actividad terapéutica (HGF humano, IL-1RA o VEGF). La RT-PCR para IL-1RA y VEGF humanos en homogeneizados de tejido pulmonar no mostró detección de ninguna citocina en ningún momento.

**[0166]** La Parte 2 replicó la Parte 1, pero las lecturas explotadas no son compatibles con los procedimientos de la Parte 1. En los días 1, 6, 10 y 14 después de las inyecciones de vehículo o hUTC, se realizó una pletismografía restringida en animales de cada grupo. Además, se sacrificaron cuatro o cinco ratones en cada punto de tiempo y se tomaron muestras de los pulmones como se describe a continuación.

5

*Pletismografía*

**[0167]** La pletismografía se realizó en ratones en cada punto de tiempo y al final del experimento. Brevemente, la función pulmonar se midió mediante métodos restringidos para determinar la frecuencia respiratoria, el volumen corriente, el tiempo de relajación, el flujo inspiratorio y espiratorio máximo, el EF50 y el cambio en el volumen pulmonar. Esto indica el impacto de la terapia celular en la función pulmonar en diferentes momentos.

10

*Histopatología*

**[0168]** Se obtuvieron los pulmones de cada grupo de tratamiento en cada punto de tiempo. Los pulmones se fijaron con solución de tampón neutro con formaldehído al 10%, se deshidrataron en una serie graduada de etanol, se incrustaron en parafina y se cortaron en rodajas a 4 µm. Las secciones de parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para el análisis histopatológico. Las secciones de histología fueron evaluadas por lesión. El área de la superficie alveolar se determinó utilizando imágenes histopatológicas analizadas con el software Image J disponible en línea en el Instituto Nacional de Salud. Para cada sección de pulmón, se midió el área superficial de los alvéolos dentro de cinco campos aleatorios y se calculó el área superficial media. Es bien sabido que una reducción en el tamaño del espacio alveolar en un pulmón lesionado se correlaciona con una mejor elasticidad y cumplimiento alveolar, y esto indica el impacto de la terapia celular en estos parámetros.

15

20

Resultados

25

*Reconstitución de células para inyección.*

**[0169]** De los 10 viales de hUTC utilizados en este experimento, ninguno se descartó según los criterios de calidad. La viabilidad fue >80% en cada caso. Los detalles de recuperación de las células se muestran en las Tablas 2-2 y 2-3 a continuación. La recuperación fue alta y superó ligeramente el 100% del valor esperado (probablemente debido a la recuperación de un volumen ligeramente mayor al esperado de los viales).

30

35

<b>Tabla 2-2 Detalles de la recuperación</b>					
	Por lote FV23L10B	Nº de células en vial (x10 <sup>6</sup> )	Fecha	Tiempo descongelado	Tiempo contado
1	267	5	12-APR	11,43	11,55
2	252	5	12-APR	11,43	11,55
3	288	5	12-APR	11,43	11,55
4	265	5	12-APR	11,43	11,55
5	257	5	12-APR	11,43	11,55
TOTAL		25			

40

45

<b>Tabla 2-3 Detalles de la recuperación</b>					
	Por lote FV23L10B	Nº de células en vial (x10 <sup>6</sup> )	Fecha	Tiempo descongelado	Tiempo contado
1	249	5	19-APR	10,15	10,2
2	264	5	19-APR	10,15	10,2
TOTAL		10			
3	260	5	19-APR	11,57	12,03
4	278	5	19-APR	11,57	12,03
5	263	5	19-APR	11,57	12,03
TOTAL		15			

50

55

*Informes y observaciones de animales*

60

**[0170]** Algunas colas de ratón mostraron parches blancos durante la inyección intravenosa. Esto no estaba relacionado con la terapia celular, pero se colocó mal la aguja de administración durante el parto. Cuando esto ocurrió, se retiró la aguja y se insertó correctamente en la vena y se continuó con la administración de células/vehículo. Ningún animal murió como resultado del tratamiento con elastasa o el suministro celular. No se observaron efectos adversos detectables en ningún animal como resultado de la administración de hUTC.

65

*Análisis del líquido de lavado broncoalveolar (BALF)*

[0171] En cada punto de tiempo, los ratones se sacrificaron por inyección letal de pentobarbital sódico y se recogió BALF. Se realizaron leucocitos totales (Figura 3) y recuentos celulares diferenciales (Figura 4) en el sedimento celular. El sobrenadante resultante se recuperó para un análisis adicional de la actividad de las citoquinas (Figuras 5 y 6) y los niveles totales de proteínas (Tablas 2.4 a 2.7).

*Leucocitos totales en BALF.*

[0172] Los ratones de control mostraron una infiltración celular mínima en el lavado broncoalveolar, mientras que la administración de elastasa produjo una infiltración significativa de la célula. La infiltración celular total disminuyó en los ratones tratados con elastasa que recibieron hUTC en ambas cepas de ratón.

*Tinción de células diferenciales de BALF.*

[0173] Las citospinas se llevaron a cabo en BALF y se tiñeron usando un protocolo de tinción de Giemsa modificado. Las muestras fueron analizadas para detectar la presencia de linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Se contaron cien células por citospin y se corrigieron los recuentos para el volumen de BALF. Los resultados se expresaron como errores estándar media  $\pm$ . Las comparaciones entre tres o más grupos fueron hechas por ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$ .

[0174] Resumen de análisis de tinción diferencial. En ratones NSG, la terapia con hUTC dio como resultado una disminución significativa de los macrófagos en el día 10 en ratones tratados con elastasa en comparación con los ratones tratados con elastasa que no recibieron hUTC. De manera similar, se observó una reducción marcada de los neutrófilos en los días 6 y 10 en ratones tratados con elastasa que recibieron hUTC. En contraste, no se observó una disminución significativa en los macrófagos o los neutrófilos en ratones de tipo salvaje tratados con elastasa que recibieron hUTC en cualquier momento.

*Análisis de citocinas.*

[0175] Se extrajeron BALF y el homogeneizado de tejido pulmonar y se analizaron mediante una matriz de perlas múltiple para los mediadores inflamatorios MCP-1, TNF- $\alpha$ , RANTES e IL-1 $\beta$ , ya que estos desempeñan funciones bien definidas en la hipersecreción de moco, destrucción del parénquima de las vías respiratorias, fibrosis, daño tisular e inflamación asociada a la EPOC.

[0176] Las respuestas de citoquinas moduladas por hUTC en líquido de lavado broncoalveolar (BALF) sobrenadante en ratones NSG (NOD/SCIDy) tratados con elastasa (Figura 5). Los ratones de control no tratados con elastasa mostraron poco o nada de MCP-1, TNF- $\alpha$ , RANTES e IL-1 $\beta$ , mientras que los ratones tratados con elastasa exhibieron aumentos típicos en todas las citoquinas diana en cada momento. Sin embargo, se observó una reducción significativa en los mediadores inflamatorios (\*  $p < 0,05$ ) en BALF en aquellos ratones que recibieron hUTC (véase Figura 5) para el día 1/10 de RANTES; IL-1 $\beta$  día 1; TNF- $\alpha$  día (d) 1, 6, 10; MCP-1 día 1, día 10,

[0177] Se determinaron las respuestas de hUTC y citoquinas en el sobrenadante del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) para ratones de la cepa BALB/c de tipo salvaje tratados con elastasa (Figura 6). Se muestra el efecto del tratamiento con infusión de hUTC y/o elastasa pancreática porcina (PPE) sobre la composición del sobrenadante de BAL a los 1, 6, 10 y 14 días después de la administración de hUTC. En resumen, las respuestas fueron más variables en esta cepa y no se observaron diferencias consistentes o significativas.

*Concentración total de proteínas.*

[0178] La concentración de proteína total en BALF recuperado y en el homogeneizado de tejido pulmonar se determinó utilizando el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA), que se estandarizó utilizando albúmina de suero bovino (BSA) (consulte las Tablas 2-4 a 2.7 a continuación).

**Tabla 2-4 Concentraciones de proteína en BALF de ratones NSG**

	Proteína total ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SEM				
	<i>n</i>	d1	d6	d10	d14
PBS	5	1,051 $\pm$ 0,173	1,040 $\pm$ 0,167	1,505 $\pm$ 0,121	0,600 $\pm$ 0,140
Elastasa	5	1,512 $\pm$ 0,284	0,852 $\pm$ 0,0453	1,929 $\pm$ 0,213	0,542 $\pm$ 0,188
Elastasa + hUTC	5	1,571 $\pm$ 0,353	1,639 $\pm$ 0,236	1,232 $\pm$ 0,259	1,037 $\pm$ 0,180
hUTC	4	0,880 $\pm$ 0,1028	1,201 $\pm$ 0,144	1,129 $\pm$ 0,265	0,692 $\pm$ 0,013

5

Tabla 2-5 Concentraciones de proteína en BALF de ratones BALB/c

10

Proteína total ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SEM					
	<i>n</i>	d1	d6	d10	d14
PBS	5	9,302 $\pm$ 1,401	7,446 $\pm$ 0,189	4,632 $\pm$ 0,239	3,993 $\pm$ 0,156
Elastasa	5	9,872 $\pm$ 0,317	7,058 $\pm$ 0,0444	3,604 $\pm$ 0,530	3,226 $\pm$ 0,765
Elastasa + hUTC	5	8,844 $\pm$ 0,989	6,340 $\pm$ 0,361	3,617 $\pm$ 0,677	3,514 $\pm$ 0,309
hUTC	4	5,388 $\pm$ 0,560	4,581 $\pm$ 0,123	3,755 $\pm$ 0,306	2,165 $\pm$ 0,198

15

20

Tabla 2-6 Concentraciones de proteína en el homogeneizado de tejido pulmonar de ratones NSG

25

Proteína total ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SEM					
	<i>n</i>	d1	d6	d10	d14
PBS	5	0,558 $\pm$ 0,157	2,845 $\pm$ 0,749	2,272 $\pm$ 0,346	2,171 $\pm$ 0,756
Elastasa	5	0,309 $\pm$ 0,031	1,623 $\pm$ 0,458	2,360 $\pm$ 0,522	2,298 $\pm$ 0,425
Elastasa + hUTC	5	0,602 $\pm$ 0,094	1,730 $\pm$ 0,448	3,465 $\pm$ 0,549	1,592 $\pm$ 0,525
hUTC	4	0,872 $\pm$ 0,180	0,403 $\pm$ 0,147	2,491 $\pm$ 0,647	1,214 $\pm$ 0,481

30

Tabla 2-7 Concentraciones de proteínas en el homogeneizado de tejido pulmonar de ratones BALB/c

Proteína total ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SEM					
	<i>n</i>	d1	d6	d10	d14
PBS	5	1,277 $\pm$ 0,403	0,955 $\pm$ 0,281 0,852 $\pm$	0,428 $\pm$ 0,089	0,283 $\pm$ 0,074 <sup>b</sup>
Elastasa	5	1,781 $\pm$ 0,424	0,0453	0,897 $\pm$ 0,248	0,250 $\pm$ 0,037
Elastasa + hUTC	5	1,057 $\pm$ 0,256	1,639 $\pm$ 0,236	0,624 $\pm$ 0,070	0,198 $\pm$ 0,068
hUTC	4	1,399 $\pm$ 0,318	1,201 $\pm$ 0,144	0,461 $\pm$ 0,111	0,192 $\pm$ 0,069

40

[0179] No se detectó una diferencia significativa en la proteína total entre los grupos de tratamiento en ninguna de las cepas.

#### 45 Histología

[0180] *Análisis cuantitativo.* Se extrajeron los pulmones de ratones sin lavado y se fijaron en formalina/PBS al 10% (v/v), se empaparon en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E) (véase Figura 7). Se cuantificó la ampliación del espacio aéreo. Se midieron las intercepciones lineales de los alvéolos y se usó la intersección lineal media (Lm) como un parámetro morfométrico de enfisema. De cada muestra de pulmón, se seleccionaron tres (3) campos no superpuestos representativos. Se superpuso una cuadrícula distribuida al azar sobre la imagen de la sección teñida con H&E. Se calcularon las siguientes medidas cuantitativas: intercepción lineal media (Lm); y número de alvéolos. Lm representa el tamaño medio de los alvéolos. Bronquios y vasos sanguíneos fueron excluidos de las mediciones.

55

#### Histopatología

[0181] Se eliminaron los pulmones de ratones sin lavado y se fijaron en formalina/PBS al 10% (v/v), se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E). La figura 8 muestra fotomicrografías representativas de cada grupo de tratamiento en el día 1. Los ratones tratados con elastasa que posteriormente recibieron hUTC mostraron una patología significativamente reducida en comparación con los ratones tratados con elastasa que recibieron solución salina en el mismo momento. La ampliación del espacio aéreo debido al tratamiento con elastasa se atenuó por la administración de hUTC (Figura 8 y leyenda asociada p17). La Figura 9 muestra que hUTC redujo la extensión del enfisema inducido por elastasa en ratones inmunocomprometidos (NOD/SCIDy) en los días 1, 6, 10 y 14. La Figura 10 muestra que hUTC redujo la extensión del enfisema inducido por elastasa en los ratones inmunocompetentes (BALB/c) en los días 1, 6, 10 y 14.

65

*Función pulmonar*

5 [0182] Se realizó una pletismografía en cada ratón en cada punto de tiempo y al final del experimento como se describe en el estudio anterior. La función pulmonar se evaluó mediante métodos restringidos para determinar la frecuencia respiratoria, el volumen corriente, el tiempo de relajación, el flujo inspiratorio y espiratorio máximo, el EF50 y el cambio en el volumen pulmonar. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos (análisis estadístico por ANOVA de una vía). Todos los parámetros se presentan en las Figuras 11A y 11B.

10 *Análisis de factores tróficos en homogeneizado de pulmón.*

[0183] Se evaluó una muestra de células del homogeneizado de pulmón mediante RT-PCR cuantitativa para medir el ARNm de HGF humano, IL-1RA y VEGF para evaluar los indicadores de actividad terapéutica. No se detectaron HGF, VEGF o IL-1RA humanos en el homogeneizado de pulmón utilizando los métodos descritos aquí.

15 Conclusión

[0184] Este estudio evaluó la eficacia de hUTC en modelos murinos estándar o novedosos de enfisema, un tipo de enfermedad pulmonar crónica. La elastasa se instiló en los pulmones de ambas cepas de ratón, produciendo cambios característicos del enfisema humano y experimental: alveolos más grandes, pero menos reducidos, y área de superficie alveolar reducida debido a la destrucción de las paredes alveolares; aumento de la producción de mediadores inflamatorios; flujo de tipos de células inflamatorias en el fluido de lavado broncoalveolar. El tratamiento con hUTC inhibió estos efectos en los modelos, previniendo o remediando el enfisema (es decir, la EPOC) y sugiriendo la posibilidad de un efecto similar en los humanos.

20 [0185] Estos datos tienen una serie de implicaciones. Primero, las hUTC son efectivas en la prevención de las características enfisematosas clave de la EPOC en un modelo novedoso humano en el ratón. hUTC inhibió la producción de mediadores proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , RANTES, MCP-1 e IL-1 $\beta$ ) típicamente asociados con la patología en el modelo NSG. Más importante aún, hUTC redujo significativamente la extensión del enfisema inducido por la elastasa en los pulmones murinos, y los ratones con EPOC tratados con hUTC (ambos modelos) mostraron una intercepción lineal media (Lm) significativamente más corta entre los alvéolos (es decir, menos destrucción) que los controles empiáticos no tratados. Del mismo modo, el tratamiento con hUTC conservó un mayor número de alvéolos y redujo el infiltrado de células inflamatorias en el fluido BAL en el modelo NSG humanizado de la EPOC. Por lo tanto, hUTC efectivamente interrumpe las características clave de la patología.

25 [0186] El modelo NSG también es un banco de pruebas útil para examinar la terapéutica de células humanas y brinda la oportunidad de realizar trabajos futuros que respalden la hUTC como una terapia celular efectiva. Este modelo también brinda oportunidades para un examen más fundamental de los mecanismos de acción terapéutica y, de hecho, preguntas sobre el momento y la frecuencia de la administración.

30 [0187] En general, las diferencias en la patología y la reducción de los mediadores inflamatorios después de una única administración de hUTC respaldan en gran medida la eficacia de hUTC en el nuevo modelo.

35 [0188] Por lo tanto, los hallazgos clave de este experimento fueron los siguientes:

[0189] La hUTC inhibe la producción de mediadores proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , RANTES, MCP-1 e IL-1 $\beta$ ) en un modelo de EPOC (NSG) y no modula estas respuestas de citoquinas en el modelo murino inmunocompetente.

40 [0190] La hUTC redujo significativamente la extensión del enfisema inducido por elastasa en los pulmones murinos en ambos modelos.

45 [0191] Los ratones EPOC tratados con hUTC (ambos modelos) mostraron una intercepción lineal media (Lm) significativamente más corta entre alvéolos (es decir, menos destrucción) que los controles enfisematosos no tratados. Asimismo, el tratamiento con hUTC conservó un mayor número de alvéolos.

50 [0192] La hUTC redujo el infiltrado celular en el fluido BAL en el modelo de EPOC humanizado (NSG).

**EJEMPLO 3**

55 Aislamiento de células

[0193] **Aislamiento de células umbilicales.** Los cordones umbilicales se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA). Los tejidos se obtuvieron después de partos normales. Se realizaron los protocolos de aislamiento celular asépticamente en un flujo laminar. Para eliminar la sangre y los residuos, el cordón se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de penicilina a 100 unidades/mililitro y estreptomycin a 100 miligramos/mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro (Invitrogen

Carlsbad, CA). Los tejidos se separaron luego mecánicamente en placas de cultivo de tejido de 150 cm<sup>2</sup> en presencia de 50 mililitros de medio (DMEM-glucosa baja o DMEM-glucosa alta; Invitrogen), hasta que el tejido se cortó en una pulpa fina. Los tejidos cortados se transfirieron a tubos cónicos de 50 mililitros (aproximadamente 5

5  
10  
15  
[0194] El tejido se digirió luego en medio DMEM con bajo contenido de glucosa o en medio DMEM con alto contenido de glucosa, cada uno con penicilina a 100 Unidades/mililitro, estreptomycin a 100 miligramos/mililitro, anfotericina B a 0,25 microgramos/mililitro y enzimas de la digestión. En algunos experimentos se utilizó una mezcla enzimática de colagenasa y dispasa ("C:D") (colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 unidades/mililitro; y dispasa (Invitrogen), 50 unidades/mililitro, en medio de DMEM-baja glucosa). En otros experimentos se utilizó una mezcla de colagenasa, dispasa y hialuronidasa ("C:D:H") (C:D:H = colagenasa, 500 unidades/mililitro; dispasa, 50 unidades/mililitro; y hialuronidasa (Sigma), 5 Unidades/mililitro, en DMEM-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.

20  
25  
[0195] Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 mililitros de medio de crecimiento (DMEM: Nivel bajo de glucosa (Invitrogen), 15 por ciento (v/v) de suero bovino fetal (FBS; suero bovino fetal definido; Lote #AND 18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 100 Unidades por mililitro, estreptomycin a 100 microgramos por mililitro, y anfotericina B a 0,25 microgramos por mililitro (cada uno de Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un colador de células BD FALCON de nylon de 70 micrones (BD Biosciences, San Jose, CA). Un enjuague adicional de 5 mililitros que comprende medio de crecimiento se pasó a través del filtro. La suspensión celular se pasó luego a través de un filtro de células de nylon de 40 micrómetros (BD Biosciences, San José, CA) y se persiguió con un enjuague de 5 mililitros adicionales de medio de crecimiento.

30  
[0196] El filtrado se resuspendió en medio de crecimiento (volumen total 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de medio de crecimiento fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

35  
[0197] Después de la centrifugación final, se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 5 mililitros de medio de crecimiento fresco. El número de células viables se determinó usando tinción con azul de tripano. Las células fueron cultivadas bajo condiciones estándar.

40  
45  
[0198] Las células aisladas de tejidos del cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T-75 recubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento. Después de dos días, se aspiraron las células pasadas y sin adherir de los matraces. Las células adherentes se lavaron con PBS tres veces para eliminar los residuos y las células derivadas de la sangre. 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 los pasajes posteriores (del paso 1 a 2, etc.), las células alcanzaron la sub-confluencia (confluencia del 75-85 por ciento) en 4-5 días. Para estos pasajes posteriores, las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup>. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con dióxido de carbono al 5 por ciento a 37 °C.

50  
55  
[0199] En algunos experimentos, las células se aislaron de tejidos posparto en medio DMEM con bajo contenido de glucosa después de la digestión con LIBERASE (2,5 miligramos por mililitro, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) e hialuronidasa (5 Unidades/mililitro, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue como se describe para otras digestiones de proteasas anteriores, sin embargo, se usó la mezcla LIBERASE/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C:D o C:D:H. La digestión de tejidos con LIBERASE dio como resultado el aislamiento de poblaciones celulares de tejidos posparto que se expandieron fácilmente.

60  
[0200] Se compararon los procedimientos para aislar células del cordón umbilical utilizando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión incluyeron: colagenasa; dispasa; hialuronidasa; colagenasa:mezcla de dispasa (C:D); colagenasa: mezcla de hialuronidasa (C:H); dispasa: mezcla de hialuronidasa (D:H); y colagenasa: dispasa: mezcla de hialuronidasa (C:D:H). Se observaron diferencias en el aislamiento celular utilizando estas diferentes condiciones de digestión enzimática (Tabla 3-1).

65  
[0201] Se hicieron otros intentos para aislar grupos de células del cordón umbilical mediante 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.

[0202] Las células también se han aislado a partir de muestras de sangre del cordón umbilical obtenidas de NDRI. El protocolo de aislamiento utilizado fue el de la solicitud de patente internacional PCT/US2002/029971 de Ho et al. Se mezclaron muestras (50 mililitros y 10,5 mililitros, respectivamente) de sangre de cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) con tampón de lisis (cloruro de amonio 155 milimolar esterilizado por filtro, bicarbonato de potasio 10 milimolar, EDTA 0,1 milimolar tamponado a pH 7,2 (todos los componentes Sigma, St. Louis, MO)). Las células

se lisaron en una proporción de 1:20 de sangre de cordón umbilical a tampón de lisis. La suspensión celular resultante se agitó en vórtex durante 5 segundos y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 x g). El sedimento celular se resuspendió en Medio Minimal Esencial Completo (Gibco, Carlsbad CA) que contenía suero bovino fetal al 10 por ciento (Hyclone, Logan UT), penicilina a glutamina (Mediatech Herndon, VA) 4 milimolar (Mediatech Herndon, VA) a 100 Unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro (Gibco, Carlsbad, CA). Las células resuspendidas se centrifugaron (10 minutos a 200 x g), el sobrenadante se aspiró 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 recubiertos con fibronectina T175 (ambos Becton Dickinson, Bedford, MA).

**[0203]** Para determinar si las poblaciones de células podrían aislarse en diferentes condiciones y expandirse en una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células se digirieron en medio de crecimiento con o sin 0,001 por ciento (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), utilizando la combinación de enzimas de C:D:H, de acuerdo con los procedimientos proporcionados anteriormente. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina a 100 Unidades por mililitro y estreptomycin a 100 microgramos por mililitro. En todas las condiciones probadas, las células se unieron y se expandieron bien entre el pasaje 0 y 1 (Tabla 2-2). Se demostró que las células en las condiciones 5-8 y 13-16 proliferaban bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se sometieron a crioconservación.

**[0204]** 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 3-1). No se logró una población celular expandible utilizando colagenasa o hialuronidasa sola. No se intentó determinar si este resultado es específico de la colagenasa que se analizó.

**Tabla 3-1:** Aislamiento de células del tejido del cordón umbilical utilizando diferentes combinaciones de enzimas

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

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

**[0205]** Las células se unieron y se expandieron bien entre los pases 0 y 1 en todas las condiciones probadas para la digestión y el crecimiento de enzimas (Tabla 3-2). Las células en condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se sometieron a crioconservación. Todas las células se crioconservaron para un análisis adicional.

**Tabla 3-2:** Aislamiento y expansión del cultivo de células posparto en diferentes condiciones:

Condición	Medio	15% FBS	BME	Gelatina	20% O <sub>2</sub>	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

5 [0206] Las células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron por citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas por digestión enzimática.

[0207] Las preparaciones contenían glóbulos rojos y plaquetas. Sin células nucleadas unidas y divididas 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.

10 [0208] Las poblaciones de células podrían aislarse del tejido umbilical de manera eficiente utilizando la combinación enzimática colagenasa (una metaloproteasa), dispasa (proteasa neutra) y hialuronidasa (enzima mucolítica que descompone el ácido hialurónico). También se puede usar LIBERASE, que es una mezcla de colagenasa y una proteasa neutra. Blendzyme 3, que es colagenasa (4 unidades de Wunsch/gramo) y termolisina (1714 Unidades de caseína/gramo), también se usó junto con hialuronidasa para aislar células. Estas células se expandieron fácilmente en muchos pasajes cuando se cultivaron en un medio de expansión de crecimiento sobre plástico recubierto de gelatina.

15 [0209] Las células también se aislaron de la sangre residual en los cables, pero no en la sangre del cordón umbilical. La presencia de células en los coágulos de sangre lavados del tejido, que se adhieren y crecen en las condiciones utilizadas, puede deberse a la liberación de células durante el proceso de disección.

#### 20 EJEMPLO 4

##### 25 Características de crecimiento de las células

[0210] El potencial de expansión celular de las células derivadas del ombligo se comparó con otras poblaciones de células madre aisladas. El proceso de expansión celular a la senescencia se denomina límite de Hayflick (Hayflick L., J. Am. Geriatr. Soc., 1974; 22 (1): 1-12; Hayflick L., Gerontologist, 1974; 14 (1) : 37-45).

30 [0211] Se recubrieron matraces de plástico de cultivo tisular agregando 20 mililitros de gelatina al 2% (p/v) (Tipo B: 225 Bloom; Sigma, St Louis, MO) a un matraz T75 (Corning Inc., Corning, NY) durante 20 Minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de gelatina, se agregaron 10 mililitros de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y luego se aspiró.

35 [0212] Para la comparación del potencial de expansión del crecimiento, se utilizaron las siguientes poblaciones celulares; i) células madre mesenquimales (MSC; Cambrex, Walkersville, MD); ii) células derivadas de tejido adiposo (Patente de EE.UU. N° 6.555.374; Publicación de EE.UU. N° 2004/0058412); iii) fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD); y iv) células derivadas del ombligo. Las células se sembraron inicialmente a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos de gelatina en medio de crecimiento. Para los pasajes posteriores, los cultivos celulares se trataron del siguiente modo. Después de la tripsinización, se contaron las células viables después de la tinción con azul de tripano. La suspensión celular (50 microlitros) se combinó con azul de tripano (50 microlitros, Sigma, St. Louis MO). Se estimaron números de células viables usando un hemocitómetro.

40 [0213] Después del recuento, las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T 75 recubiertos de gelatina en 25 mililitros de medio de crecimiento fresco. Las células se cultivaron en una atmósfera estándar (5 por ciento de dióxido de carbono (v/v)) a 37 °C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 85 por ciento de confluencia fueron pasadas; este proceso se repitió hasta que las células alcanzaron la senescencia.

45 [0214] En cada paso, las células se tripsinizaron y se contaron. Se calcularon el rendimiento celular viable, las duplicaciones de población [ $\ln$  (células finales/células iniciales)/ $\ln 2$ ] y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo/duplicación de la población). Con el fin de determinar la expansión celular óptima, el rendimiento celular total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total del paso anterior por el factor de expansión para cada paso (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales).

50 [0215] También se ensayó el potencial de expansión de las células almacenadas en el paso 10, se utilizó un conjunto diferente de condiciones. Se analizaron los fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844; Cambrex, Walkersville, MD) y las células derivadas del ombligo. Estas poblaciones de células se habían acumulado en el paso 10 anteriormente, y se habían cultivado a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en cada paso hasta ese punto. Se determinó el efecto de la densidad celular en las poblaciones celulares después del deshielo celular en el paso 10, Las células se descongelaron en condiciones estándar y se contaron usando tinción con azul tripano. Las células descongeladas se sembraron luego a 1.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se pasaron ya que alcanzaron aproximadamente el 85% de confluencia. Las células se pasaron posteriormente hasta la senescencia, es decir, hasta que no pudieron expandirse más. Las células se tripsinizaron y se contaron en cada

paso. El rendimiento celular, la duplicación de la población ( $\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$ ) y el tiempo de duplicación (tiempo en cultivo)/se duplicó la población). El rendimiento celular total por pase se determinó multiplicando el rendimiento total del paso anterior por el factor de expansión para cada paso (es decir, factor de expansión = células final/células inicial).

[0216] El potencial de expansión de cultivos de células derivadas de ombligo recién aislados en condiciones de baja siembra de células se probó en otro experimento. Las células derivadas del cordón umbilical se aislaron como se describe en un ejemplo anterior. Las células se sembraron a 1.000 células/cm<sup>2</sup> y se pasaron como se describe anteriormente hasta la senescencia. Las células se cultivaron en condiciones atmosféricas estándar a 37°C. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana. Las células se pasaron a medida que alcanzaron aproximadamente el 85% de confluencia. En cada paso, las células se tripsinizaron y se contaron mediante tinción con azul de tripano. Se calcularon el rendimiento celular, la duplicación de la población ( $\ln(\text{células finales}/\text{células iniciales})/\ln 2$ ) y el tiempo de duplicación (tiempo en el cultivo/duplicación de la población) para cada paso. El rendimiento celular total por paso se determinó multiplicando el rendimiento total del paso anterior por el factor de expansión para cada paso (es decir, factor de expansión = células finales/células iniciales). Las células se cultivaron en gelatina y matraces no recubiertos de gelatina.

[0217] Se ha demostrado que las condiciones de cultivo de células con bajo O<sub>2</sub> pueden mejorar la expansión celular en ciertas circunstancias (Publicación de EE.UU. N° 2004/0005704). Con el fin de determinar si la expansión celular de las células derivadas del ombligo podría mejorarse alterando las condiciones del cultivo celular, los cultivos de células derivadas del ombligo se cultivaron en condiciones de bajo oxígeno. Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento en matraces recubiertos de gelatina. Las células se cultivaron inicialmente en condiciones atmosféricas estándar a través del pase 5, momento en el que se transfirieron a condiciones de cultivo con bajo contenido de oxígeno (5% de O<sub>2</sub>). En otros experimentos, las células se expandieron en placas no recubiertas, recubiertas con colágeno, recubiertas con fibronectina, recubiertas con laminina y recubiertas con matrigel. Se ha demostrado que los cultivos se expanden bien en estas matrices diferentes.

[0218] Las células derivadas del cordón umbilical se expandieron durante más de 40 pases generando rendimientos celulares de >1E17 células en 60 días. En contraste, las MSC y los fibroblastos se detectaron después de <25 días y <60 días, respectivamente. Aunque tanto las células adiposas como las omentales se expandieron durante casi 60 días, generaron rendimientos celulares totales de 4.5E12 y 4.24E13 respectivamente. Por lo tanto, cuando se sembraron a 5,000 células/cm<sup>2</sup> en las condiciones experimentales utilizadas, las células derivadas del ombligo se expandieron mucho mejor que los otros tipos de células que crecieron en las mismas condiciones (Tabla 4-1).

**Tabla 4-1:** Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células crecidas hasta la senescencia

Tipo de célula	Senescencia	Duplicados de la población total	Rendimiento (células totales)
MSC	24 d	8	4.72 E7
Célula derivada de adiposa	57 d	24	4.50 E12
Fibroblastos	53 d	26	2.82 E13
Umbilical	65 d	42	6.15 E17

[0220] Las células derivadas del cordón umbilical y fibroblastos se expandieron durante más de 10 pases generando rendimientos celulares de >1E11 células en 60 días (Tabla 4-2). En estas condiciones, tanto los fibroblastos como las poblaciones de células derivadas del ombligo senescieron después de 80 días, completando >50 y >40 duplicaciones de población respectivamente.

**Tabla 4-2:** Características de crecimiento para diferentes poblaciones de células que utilizan expansión de crecimiento de baja densidad desde el paso 10 hasta la senescencia

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

[0221] Las células se expandieron bien en condiciones de oxígeno reducido; sin embargo, el cultivo en condiciones de bajo oxígeno no parece tener un efecto significativo en la expansión celular para las células derivadas del posparto. Estos resultados son preliminares en el sentido de que cualquier conclusión final que se haga con respecto al efecto del oxígeno reducido se extraerá mejor de los experimentos en células en crecimiento en oxígeno bajo del aislamiento inicial. Las condiciones atmosféricas estándar ya han demostrado ser exitosas para el

crecimiento de un número suficiente de células, y no se requiere un bajo cultivo de oxígeno para el crecimiento de las células derivadas del posparto.

[0222] Las condiciones actuales de expansión celular de cultivar células derivadas de ombligo aisladas a densidades de aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup>, en medio de crecimiento en matraces recubiertos de gelatina o no recubiertos, bajo oxígeno atmosférico estándar, son suficientes para generar un gran número de células en el paso 11. Además, los datos sugieren que las células pueden expandirse fácilmente utilizando condiciones de cultivo de densidad más baja (por ejemplo, 1.000 células/cm<sup>2</sup>). Expansión celular derivada del ombligo en condiciones de bajo oxígeno también facilita la expansión celular, aunque aún no se ha observado una mejora incremental en el potencial de expansión celular cuando se utilizan estas condiciones para el crecimiento. Actualmente, se prefiere el cultivo de células derivadas de ombligo en condiciones atmosféricas estándar para generar grandes grupos de células. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo se alteran, la expansión celular derivada del ombligo también puede alterarse. Esta estrategia puede usarse para mejorar la capacidad proliferativa y diferenciadora de estas poblaciones celulares.

[0223] En las condiciones utilizadas, mientras que el potencial de expansión de MSC y las células derivadas de tejido adiposo es limitado, las células derivadas del cordón umbilical se expanden fácilmente a grandes números.

## EJEMPLO 5

### Crecimiento de células en medio que contiene D-valina

[0224] Se ha informado que se puede usar un medio que contenga D-valina en lugar de la L-valina normal para inhibir selectivamente el crecimiento de células similares a fibroblastos en cultivo (Hongpaisan, J. Cell Biol. Int., 2000; 24: 1-7; Sordillo et al., Cell Biol. Int. Rep., 1988; 12: 355-64). Se realizaron experimentos para determinar si las células derivadas del ombligo podrían crecer en un medio que contiene D-valina.

[0225] Se sembraron células derivadas del cordón umbilical (P5) y fibroblastos (P9) a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 recubiertos de gelatina (Corning, Corning, NY). Después de 24 horas, se retiró el medio y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) para eliminar el medio residual. El medio se reemplazó con un medio de crecimiento modificado (DMEM con D-valina (Gibco de orden especial), suero bovino fetal dializado al 15% (v/v) (Hyclone, Logan, UT), betamercaptoetanol al 0,001% (v/v) (Sigma), penicilina a 50 Unidades/mililitro y estreptomycin a 50 miligramos/mililitro (Gibco)).

[0226] Las células derivadas del cordón umbilical y las células de fibroblastos sembradas en el medio que contiene D-valina no proliferaron, a diferencia de las células sembradas en un medio de crecimiento que contiene suero dializado. Las células de los fibroblastos cambiaron morfológicamente, aumentando de tamaño y cambiando de forma. Todas las células murieron y finalmente se separaron de la superficie del matraz después de cuatro semanas. Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas de tejido del cordón umbilical requieren L-valina para el crecimiento celular y para mantener la viabilidad a largo plazo. La L-valina preferiblemente no se elimina del medio de crecimiento para células derivadas de tejido del cordón umbilical.

## EJEMPLO 6

### Análisis cariotipo de células

[0227] Las líneas celulares usadas en terapia celular son preferiblemente homogéneas y están 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 del ombligo que son homogéneas y libres de células de origen tisular no umbilical, se analizaron los cariotipos de muestras celulares.

[0228] UTC a partir de tejido posparto de un recién nacido masculino se cultivaron en medios de crecimiento. Se seleccionó tejido posparto de un neonato masculino (X,Y) para permitir la distinción entre células derivadas de neonatos y 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 a 80% de confluencia. Un matraz T25 que contenía células se llenó hasta el cuello con medios de crecimiento. Las muestras se enviaron a un laboratorio de citogenética clínica por mensajería (el tiempo estimado de transporte de laboratorio a laboratorio es de una hora). El análisis de cromosomas fue realizado por el Center for Human & Molecular Genetics at the New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De las veinte células en metafase contadas, cinco se analizaron para determinar 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 metafásicas adicionales cuando se identificó un número de cariotipo heterogéneo (cuatro).

[0229] Todas las muestras de células enviadas para el análisis de cromosomas fueron interpretadas por el personal del laboratorio de citogenética por exhibir un aspecto normal. Tres de las dieciséis células analizadas mostraron un

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

**Table 6-1. Resultados de cariotipo de UTC.**

Tejido	Paso	Células de metafase contadas	Células de metafase analizadas	Nº de cariotipos	ISCN Cariotipo
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Umbilical	3	20	5	2	46, XX

[0230] El análisis de cromosomas identificó la UTC derivada del ombligo cuyos cariotipos parecen normales según lo interpretado por un laboratorio clínico citogenético. El análisis del cariotipo también identificó líneas celulares libres de células maternas, según lo determinó el cariotipo homogéneo.

**EJEMPLO 7**

**Evaluación citométrica de flujo de marcadores de superficie celular**

[0231] La caracterización de las proteínas de la superficie celular o "marcadores" por citometría de flujo puede usarse 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 condiciones de procesamiento y cultivo. Las líneas celulares posparto aisladas del ombligo se caracterizaron por citometría de flujo, proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

[0232] Las células se cultivaron en medio de crecimiento, en matraces de cultivo de tejidos T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta 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.

[0233] Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, MO) y se desprendieron con tripsina/EDTA (Gibco). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS en una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, el anticuerpo para el marcador de superficie celular de interés (véase más abajo) se agregó a 100 microlitros de suspensión celular y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se utilizaron los siguientes anticuerpos para los marcadores de la superficie celular (consulte la Tabla 7-1).

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

Anticuerpo	Fabricación	Nº de catálogo
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

[0234] Las células derivadas del cordón umbilical se analizaron en los pases 8, 15 y 20. Para comparar las diferencias entre donantes, se compararon entre sí umbilical de diferentes donantes. Las células derivadas del cordón umbilical cultivadas en matraces recubiertos de gelatina se compararon con las umbilicus cultivadas en matraces sin recubrimiento.

[0235] Se compararon cuatro tratamientos usados para el aislamiento y la preparación de células. Células derivadas de tejido posparto por tratamiento con 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispasa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) se compararon colagenasa/hialuronidasa/dispasa.

[0236] Las células derivadas del cordón umbilical en los pases 8, 15 y 20 analizadas por citometría de flujo expresaron todas CD10, CD13, CD44, CD73, CD 90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicadas por un aumento de fluorescencia relativa para el 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.

[0237] Las células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes separados 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, reflejadas en los valores incrementados de fluorescencia relativos al 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 compatibles con el control de IgG.

[0238] Las células derivadas del cordón umbilical expandidas en gelatina y matraces no recubiertos analizados 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 aumento de los valores de fluorescencia en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

[0239] El análisis de la citometría de flujo derivado del cordón umbilical se ha establecido de una identidad de estas líneas celulares. Las células derivadas del cordón umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-A, B, C y negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad fue consistente entre las variaciones en las variables que incluyen el donante, el pase, el revestimiento de la superficie del vaso de cultivo, las enzimas de digestión y la capa placentaria. Se observaron algunas variaciones en las medias y rangos de las curvas de histograma de valores de fluorescencia individuales, pero todas las curvas positivas en todas las condiciones probadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia mayores que el control de IgG, lo que confirma que las células comprenden una población homogénea que tiene una expresión positiva de los marcadores.

## EJEMPLO 8

### Análisis de células por ensayo de oligonucleótidos

[0240] Se usaron matrices de oligonucleótidos para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas de la placenta y del ombligo con fibroblastos, células madre mesenquimáticas humanas y otra línea celular derivada de médula ósea humana. Este análisis proporcionó una caracterización de las células derivadas del posparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

[0241] *Células derivadas del tejido posparto.* Los cordones umbilicales humanos y la placenta se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) de entregas normales a término completo con el consentimiento del paciente. Los tejidos se recibieron y las células se aislaron como se describe en el Ejemplo 6 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 CO<sub>2</sub>.

[0242] *Fibroblastos.* Los fibroblastos dérmicos humanos se adquirieron de Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Lote n° 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero fetal bovino al 10% (v/v) (Hyclone) y penicilina/estreptomina (Invitrogen)). Las células se cultivaron en plástico tratado con tejido estándar.

[0243] *Células madre mesenquimales humanas (hMSC).* Los hMSC se adquirieron en Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; Lote n°s 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en medios MSCGM (Cambrex). Las células se cultivaron en plástico cultivado en tejido estándar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

[0244] *Células de la médula ósea de cresta ilíaca humana (ICBM).* Se recibió médula ósea de la cresta ilíaca humana de NDRI con el consentimiento del paciente. La médula se procesó de acuerdo con el método descrito por Ho, et al. (WO 03/025149). La médula se mezcló con tampón de lisis (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub> y 0,1 mM EDTA, pH 7,2) en una proporción de 1 parte de médula ósea a 20 partes de tampón de lisis. La suspensión celular se agitó en vórtex, 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) suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) y 4 mM glutamina. Las células se centrifugaron de nuevo y el sedimento celular se resuspendió en medio fresco. Las células mononucleares viables se contaron utilizando la exclusión de azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en frascos de cultivo de tejidos de plástico a  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> atmosférico estándar o en 5% de O<sub>2</sub>. 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.

**[0245]** Los cultivos de células en crecimiento activo se retiraron de los matraces con un raspador de células en solución salina tamponada con fosfato frío (PBS). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El sobrenadante se eliminó y las células fueron resuspendidas en PBS fresco y centrifugado 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 cRNA y se marcó con biotina. El ARNm 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. Los análisis de los datos se realizaron utilizando el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Tusher, VG et al., 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 internet en el sitio web del profesor Tibshirani en el Departamento de Estadísticas, Universidad de Stanford ([www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/](http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/)).

**[0246]** Se analizaron catorce poblaciones diferentes de células en este estudio. Las células junto con la información del pase, 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 pase en el momento del análisis, el sustrato de crecimiento celular y los medios de crecimiento.

**Tabla 8-1.** Células analizadas por el estudio de micromatriz.

Población de células	Pase	Sustrato	Medios
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15% FBS, @ME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, @ME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, @ME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15% FBS, @ME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15% FBS, @ME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15% FBS, @ME
ICBM (070203) (5% O <sub>2</sub> )	3	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (std O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (5% O <sub>2</sub> )	5	Plástico	MEM 10% FBS

**[0247]** Los datos se evaluaron por análisis de componentes de principio con el software SAM como se describe anteriormente. El análisis reveló 290 genes que se expresaron en diferentes cantidades relativas en las células analizadas. Este análisis proporcionó comparaciones relativas entre las poblaciones.

**[0248]** 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 en función de 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 utilizando los 290 genes que se expresaron de manera diferencial 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 de células.**

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

[0249] 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 cordón umbilical y células derivadas de placenta (tabla 8-5).

**Tabla 8-3. Genes que se incrementan específicamente en la expresión en las células derivadas de placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas. (Genes aumentados en células derivadas de placenta)**

ID de Conjunto de sonda	Nombre de gen	Nº de acceso NCBI
209732_at	Lectina de tipo C (dependiente de calcio, dominio de reconocimiento de carbohidratos), miembro de la superfamilia 2 (inducido por activación)	AF070642
206067_s_at	Tumor Wilms 1	NM_024426
207016_s_at	familia de deshidrogenasa de aldehído 1, miembro A2	AB015228
206367_at	Renina	NM_000537
210004_at	lipoproteína de baja densidad oxidizada (tipo lectina) receptor 1	AF035776
214993_at	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGE:4179671, ARNm, cds parcial	AF070642
202178_at	proteína cinasa C, zeta	NM_002744
209780_at	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_at	regulado a la baja en cancer ovárico 1	NM_014890
213542_at	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp547K1113 (de clon DKFZp547K1113)	AI246730

**Table 8-4. Genes que aumentan específicamente en expresión en células derivadas del cordón umbilical en comparación con otras líneas celulares ensayadas. (Genes aumentados en células derivadas del cordón umbilical)**

ID de Conjunto de sonda	Nombre de gen	Nº 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 (motivo C-X-C) ligando 1 (actividad estimuladora del crecimiento de melanoma)	NM_001511
206336_at	quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (proteína granulocítica quimiotáctica 2)	NM_002993
207850_at	Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 3	NM_002090
203485_at	reticulón 1	NM_021136
202644_s_at	factor de tumor necrosis, proteína inducida alfa 3	NM_006290

<b>Tabla 8-5. Genes que disminuyeron en la expresión en el cordón umbilical y las células de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas. (Genes disminuidos en células derivadas del cordón umbilical y placenta)</b>		
<b>ID de conjunto de sonda</b>	<b>Nombre de gen</b>	<b>Nº de acceso NCBI</b>
210135_s_at	estatura corta homeobox 2	AF022654.1
205824_at	choque térmico 27kDa proteína 2	NM_001541.1
209687_at	Quimiocina (motivo CXC) ligando 12 (factor 1 derivado de células estromales)	U19495.1
203666_at	Quimiocina (motivo CXC) ligando 12 (factor 1 derivado de células estromales)	NM_000609.1
212670_at	Elastina (estenosis aórtica supraavalvular, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_at	ARNm del <i>homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_at	mesénquima homeobox 2 (homeobox específico de detención de crecimiento)	NM_005924.1
205817_at	Seno oculis homólogo de homeobox 1 ( <i>Drosophila</i> )	NM_005982.1
209283_at	cristalina, alfa B	AF007162.1
212793_at	activador asociado desordenado 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	Homología src tres (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149.1
200921_s_at	Gen de translocación de células B 1, antiproliferativo	NM_001731.1
206932_at	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956.1
204198_s_at	factor de transcripción relacionado con el runt 3	AA541630
219747_at	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	Interleucina 11 receptor, alfa	NM_004512.1
202465_at	Procolágeno C-endopeptidasa potenciador	NM_002593.2
203706_s_at	Homólogo Frizzled 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	proteína homeobox iroquois 5	U90304.1
203903_s_at	Hefaestina	NM_014799.1
205816_at	integrina, beta 8	NM_002214.1
203069_at	vesícula sináptica glicoproteína 2	NM_014849.1
213909_at	<i>Homo sapiens</i> ADNc FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_at	Factor 1 similar al receptor de citoquinas	NM_004750.1
204401_at	Canal de potasio intermedio/conductancia pequeña activada 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_en	Seno oculis homólogo de homeobox 2 ( <i>Drosophila</i> )	NM_016932.1
213435_at	Proteína KIAA1034	AB028957.1
206115_at	respuesta temprana de crecimiento 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	aldo-ceto reductasa familia 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
214701_s_at	fibronectina 1	AJ276395.1
213791_at	Proencefalina	NM_006211.1

**Tabla 8-5. Genes que disminuyeron en la expresión en el cordón umbilical y las células de la placenta en comparación con las otras líneas celulares ensayadas. (Genes disminuidos en células derivadas del cordón umbilical y placenta)**

ID de conjunto de sonda	Nombre de gen	Nº de acceso NCBI
205422_s_at	Integrin, tipo beta 1 (con dominios de repetición de tipo EGF)	NM_004791.1
214927_at	Homo sapiens ARNm inserto de longitud completa clon de ADNc EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
206070_s_at	Efph3	AF213459.1
212805_at	Proteína KIAA0367	AB002365.1
219789_at	Receptor de péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor de péptido atrionatriurético C)	Ai628360
219054_at	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	ARNm del homo sapiens ; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	proteína 5 de membrana asociada a la vesícula (miobrevina)	NM_006634.1
201843_s_at	Proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibulina que contiene EGF	NM_004105.2
221478_at	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa que interactúa con la proteína 3 similar	AL132665.1
201792_at	Proteína de unión a AE 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 de tipo insulínico 2, 36 kDa	NM_000597.1

[0250] 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 aumentaron su expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas. (Genes aumentados en fibroblastos)**

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

**Tabla 8-7. Genes que aumentaron en la expresión en las células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.**

**Genes aumentados en células ICBM**

- 5 • proteína repetida 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
- 10 • SRY (región determinante del sexo Y)-box 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)
- proteína 1-1 asociada a la queratina
- hipocalcina 1
- dentado 1 (síndrome de Alagille)
- proteoglicano 1, gránulo secretor

15

**Tabla 8-8. Genes que aumentaron su expresión en las células MSC en comparación con las otras líneas celulares ensayadas. (Genes aumentados en células MSC)**

- interleucina 26
- 20 • maltasa-glucoamilasa (alfa-glucosidasa)
- Subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
- V-fos FBJ homólogo de oncogén de osteosarcoma viral murino
- proteína hipotética DC42
- Subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2
- 25 • FBJ osteosarcoma homólogo oncogénico viral B
- WNT1 inducible vía de señalización de la proteína 1
- Secuencia transformadora derivada de línea celular MCF.2
- Canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
- homeoproteína 1 de clase pareada de cartílago
- 30 • ADNc de Homo sapiens FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
- ADNc de Homo sapiens FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
- jun B protooncogén
- célula B CLL/linfoma 6 (proteína 51 de dedo de zinc)
- proteína 36 de dedo de zinc, tipo C3H, homólogo (ratón)

35

40 **[0251]** El presente ejemplo se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células derivadas de cordón umbilical y 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 mesenquimáticas y tres líneas de células de la médula ósea de cresta ilíaca. El ARNm que fue expresado por estas células se analizó en una matriz de oligonucleótidos GENECHIP que contenía sondas de oligonucleótidos para 22.000 genes.

45 **[0252]** El análisis reveló que las transcripciones para 290 genes estaban presentes en diferentes cantidades en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen diez genes que se incrementan 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 tienen niveles de expresión específicamente más bajos en células derivadas de placenta y de tejido umbilical derivadas de tejido.

50 **[0253]** La expresión de genes seleccionados se ha confirmado por PCR, como se muestra en el Ejemplo 9. Células derivadas del posparto en general, y las células derivadas del ombligo, en particular, tienen distintos perfiles de expresión génica, por ejemplo, en comparación con otras células humanas como las células derivadas de la médula ósea y los fibroblastos ensayados aquí.

55 **EJEMPLO 9**

**Marcadores celulares**

60 **[0254]** Los perfiles de expresión génica de células derivadas del cordón umbilical humano y de la placenta humana se compararon con los de células derivadas de otras fuentes utilizando un Affymetrix GENECHIP. Se identificaron seis genes "distintivos": receptor de LDL oxidado 1, interleucina-8 (IL-8), renina, reticulón, ligando 3 del receptor de quimiocina (C-X-C ligando 3) y proteína 2 quimiotáctica de granulocitos (GCP-2). Estos genes "distintivos" se expresaron a niveles relativamente altos en células derivadas del ombligo.

65 **[0255]** Los procedimientos descritos en este ejemplo se realizaron para verificar los datos de micromatrices y

comparar los datos para la expresión de genes y proteínas, así como para establecer una serie de ensayos confiables para la detección de identificadores únicos para células derivadas del ombligo.

5 **[0256]** Células derivadas del cordón umbilical (cuatro aislamientos), células derivadas de placenta (tres aislamientos, incluyendo un aislado predominantemente neonatal identificado por análisis de cariotipo) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; neonatal y adulto) se cultivaron en frascos T75 de medio de crecimiento en gelatina recubiertos. Las células madre mesenquimales (MSC) se cultivaron en el kit de bala del medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM; Cambrex, Walkersville, MD).

10 **[0257]** Para experimentos de IL-8, las células se descongelaron de nitrógeno líquido y se colocaron en matraces recubiertos de gelatina a 5.000 células/cm<sup>2</sup>, se cultivaron durante 48 horas en medio de crecimiento y luego se cultivaron durante 8 horas en 10 mililitros de medio de privación de suero [DMEM: glucosa baja (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (50 Unidades/mililitro), estreptomycin (50 microgramos/mililitro) (Gibco) y 0,1% (p/v) Albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO)]. Luego se extrajo el ARN y los sobrenadantes se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos para eliminar los residuos celulares. Los sobrenadantes se congelaron a -80 °C hasta el análisis ELISA.

20 **[0258]** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical, las células derivadas de tejido placentario, así como los fibroblastos humanos derivados de prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de crecimiento en matraces T75 recubiertos de gelatina. Las células se congelaron en el paso 11 en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mililitros. Después de la centrifugación a 150 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio de cultivo de 4 mililitros y se contaron. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> que contenía 15 mililitros de medio de crecimiento a 375,000 células/matraz durante 24 horas. El medio se cambió a un medio de privación de suero durante 8 horas. El medio de inanición sérica se recogió al final de la incubación, se centrifugó a 14.000 x g durante 5 minutos (y se almacenó a -20 °C).

30 **[0259]** Para estimar el número de células en cada matraz, se agregaron 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) a cada matraz. Después de que las células se separaron del matraz, la actividad de la tripsina se neutralizó con 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mililitros y se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mililitro de medio de crecimiento a cada tubo para resuspender las células. El número de células se determinó con un hemocitómetro.

35 **[0260]** La cantidad de IL-8 secretada por las células en el medio de privación de suero se analizó usando ensayos ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

40 **[0261]** Se extrajo ARN de células derivadas de cordón umbilical confluentes y fibroblastos, o para la expresión de IL-8, de células tratadas como se describe anteriormente. Las células se lisaron con 350 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy® Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). El ARN se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA) y se sometió a un tratamiento con ADNasa (2,7 unidades/muestra) (Sigma St. Louis, MO). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80 °C. El ARN también se extrajo del cordón umbilical humano. El tejido (30 miligramos) se suspendió en 700 microlitros de tampón RLT que contenía beta-mercaptoetanol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente y la extracción de ARN se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ARN se extrajo con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80 °C.

50 **[0262]** El ARN se transcribió de forma inversa utilizando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

55 **[0263]** Los genes identificados por la micromatriz de ADNc están regulados de forma única en células del cordón umbilical y células placentarias (genes característicos, incluidos el receptor de LDL oxidado, interleuquina-8, renina y reticulón), se investigaron adicionalmente utilizando PCR en tiempo real y convencional.

60 **[0264]** La PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando productos de expresión génica vendidos con el nombre comercial ASSAYS-ON-DEMAND (Applied Biosystems) de productos de expresión génica. Receptor de LDL oxidado (Hs00234028); renina (Hs00166915); reticulón (Hs00382515); C-X-C ligando 3 (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103); y GAPDH se mezclaron con ADNc y TaqMan® Universal PCR master mix según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) utilizando un sistema de detección de secuencias 7000 con el software ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, 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 (Boletín de usuario nº 2 de Applied Biosystems para el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700).

65

[0265] La PCR convencional se realizó utilizando un ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, MA) para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real. La PCR se realizó con 2 microlitros de solución de ADNc (13 polimerasa Taq (nombre comercial AMPLITAQ GOLD), mezcla de reacción universal, tampón de reacción de PCR (Applied Biosystems) y desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. La amplificación se optimizó para cada conjunto de cebadores. Para IL-8, Ligando C-X-C 3 y reticulón (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 30 ciclos); para renina (94 °C durante 15 segundos, 53 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 38 ciclos); para el receptor de LDL oxidado y GAPDH (94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 33 ciclos). Los cebadores utilizados para la amplificación se enumeran en Tabla 9-1. La concentración de cebadores en la reacción de PCR final fue de 1 micromolar, excepto para GAPDH que fue de 0,5 micromolar. Los cebadores de GAPDH fueron los mismos que para la PCR en tiempo real, excepto que la sonda TaqMan® del fabricante no se agregó a la reacción de PCR final. Las muestras se separaron en gel de agarosa al 2% (p/v) y se tificaron con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, Las imágenes fueron capturadas en una película 667 (Universal Twinpack, VWR International, South Plainfield, NJ) utilizando una cámara POLAROID de distancia focal fija (VWR International, South Plainfield, NJ).

**Tabla 9-1:** Cebadores utilizados

Nombre de cebador	Cebadores	
Receptor LDL oxidizado	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3'	(SEQ ID NO: 1)
	A: 5'-AGAATGGAAAACCTGGAATAGG-3'	(SEQ ID NO: 2)
Renina	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3'	(SEQ ID NO: 3)
	A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3'	(SEQ ID NO: 4)
Reiculón	S: 5'-TTACAAGCAGTGCGAGAAAACC-3'	(SEQ ID NO: 5)
	A: 5'-AGTAAACATTGAAACACAGCC-3'	(SEQ ID NO: 6)
Interleucina-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3'	(SEQ ID NO: 7)
	A: 5'-CTTCAAAAACCTCTCCACAACC-3'	(SEQ ID NO: 8)
Quimiocina (CXC) ligando 3	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3'	(SEQ ID NO: 9)
	A: 5'-TCCTGTGCGATTGGTGTCTCC-3'	(SEQ ID NO: 10)

[0266] Células derivadas del cordón umbilical y células derivadas de tejido placentario se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un aislamiento de cada una de las células derivadas del cordón umbilical en el paso 0 (P0) (directamente después del aislamiento) y el paso 11 (P11) (dos aislamientos de células derivadas del cordón umbilical) y fibroblastos (P11). La inmunocitoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos: vimentina (1:500, Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150; Sigma alzada contra el conejo; o 1:300; Chemicon, Temecula, CA alzada contra el ratón,) 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 (CD34 humano) Clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpintería, CA). Además, se ensayaron los siguientes marcadores en el paso 11 de las células derivadas del cordón umbilical: GROalfa antihumana - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 antihumano (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), el receptor LDL oxidado antihumano 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech), y la NOGA-A antihumana (1:100; Santa Cruz, Biotech).

[0267] Los cultivos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución bloqueadora de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y 0,3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos para acceder a los antígenos intracelulares. Cuando el epítomo de interés estaba ubicado en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió Triton X-100 en todas las etapas del procedimiento para evitar la pérdida del epítomo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se produjo contra la cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el proceso. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, se aplicaron luego a los cultivos durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpos primarios se eliminaron y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpos secundarios (1 hora a temperatura ambiente) que contenían un bloque junto con IgG anti-ratón de cabra - Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG anti-conejo de cabra - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o IgG anti-cabra de burro - FITC (1:150, Santa Cruz Biotech). Luego se lavaron los cultivos y se aplicaron DAPI (Molecular Probes) 10 micromolar durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

[0268] Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando un filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epi-fluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). En todos los casos, la tinción positiva representó la señal de fluorescencia por encima de la tinción de control, donde se siguió todo el procedimiento descrito anteriormente, con la excepción de la aplicación de una solución de anticuerpo primario (sin control de 1°). Las imágenes representativas se capturaron utilizando una cámara de video digital en color y el software Image-Pro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para las muestras con tinción triple, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión a la vez. Luego se prepararon los montajes en capas utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

**[0269]** Las células adherentes en matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$ /mililitro. Se entregaron alícuotas de cien microlitros a tubos cónicos. Las células teñidas para los antígenos intracelulares se permeabilizaron con tampón de Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se añadió anticuerpo a las partes alícuotas según las especificaciones del fabricante, y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo. Las células que requerían un anticuerpo secundario se resuspendieron en 100 microlitros de FBS al 3%. El anticuerpo secundario se añadió según las especificaciones del fabricante y las células se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las células lavadas se resuspendieron en 0,5 mililitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: receptor LDL oxidado 1 (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 de ratón kappa (P-4685 y M-5284; Sigma), y Burro contra IgG de cabra (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.). El análisis de citometría de flujo se realizó con FACScalibur (Becton Dickinson San Jose, CA).

**[0270]** Resultados de la PCR en tiempo real para genes "distintivos" seleccionados realizados en el ADNc de células derivadas de cordón umbilical humano, tejido placentario humano, fibroblastos adultos y neonatales y células madre mesenquimales (MSC) indican que la expresión de reticulón era mayor que células derivadas del ombligo en comparación con otras células. Los datos obtenidos de la PCR en tiempo real se analizaron mediante el método  $\Delta\Delta CT$  y se expresaron en una escala logarítmica. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de CXC ligando 3 y GCP-2 entre las células posparto y los controles. Los resultados de la PCR en tiempo real fueron confirmados por PCR convencional. La secuenciación de los productos de PCR validó aún más estas observaciones. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión del CXC ligando 3 entre las células posparto y los controles utilizando los cebadores de CXC ligando 3 convencionales de PCR enumerados en la Tabla 9-1.

**[0271]** La expresión de la citoquina, IL-8 en células del cordón umbilical se elevó tanto en células derivadas del cordón umbilical cultivadas en medio de cultivo como en suero de hambre. Todos los datos de PCR en tiempo real se validaron con PCR convencional y mediante la secuenciación de los productos de PCR.

**[0272]** Después del crecimiento en medios sin suero, los medios condicionados se examinaron para determinar la presencia de IL-8. La Tabla 9-2 muestra los resultados del ensayo ELISA para interleucina-8 (IL-8) realizado en células derivadas de placenta y cordón umbilical, así como en fibroblastos de piel humana. Los valores que se presentan aquí son picogramas/millón células, n = 2, sem. ND: No detectado.

**[0273]** Las mayores cantidades de IL-8 se detectaron en medios en los que se habían cultivado células umbilicales (Tabla 9-2). No se detectó IL-8 en un medio en el que se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos.

<b>Tabla 9-2: Expresión de proteína IL-8 medida por ELISA</b>	
<b>Tipo de célula</b>	<b>IL-8</b>
Fibroblastos humanos	ND
Aislado de placenta 1	ND
Aislado UMBC 1	2058,42+144,67
Aislado de placenta 2	ND
Aislado UMBC 2	2368,86+22,73
Aislado de placenta 3 (O <sub>2</sub> normal)	17,27+8,63
Aislado de placenta 3 (O <sub>2</sub> bajo, W/O BME)	264,92+9,88

**[0274]** Las células derivadas del cordón umbilical humano en el paso 0 se sondaron para la producción de proteínas seleccionadas mediante análisis inmunocitoquímico. Inmediatamente después del aislamiento (paso 0), las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se expusieron a anticuerpos para seis proteínas: Factor von Willebrand, CD34, citoqueratina 18, desmina, actina del músculo liso alfa y vimentina. Las células derivadas del cordón umbilical fueron positivas para la actina del músculo liso alfa y la vimentina, con un patrón de tinción consistente en el paso 11.

**[0275]** La producción de GROalfa, GCP-2, el receptor 1 de LDL oxidado y el reticulón (NOGO-A) en células derivadas de cordón umbilical en el paso 11 se investigó mediante inmunocitoquímica. Las células derivadas de cordón umbilical fueron GCP-2 positivas, pero la producción de alfa GRO no se detectó por este método. Además, las células eran NOGO-A positivas.

**[0276]** El acuerdo entre los niveles de expresión génica medidos por micromatrices y PCR (tanto en tiempo real como convencional) se ha establecido para cuatro genes: receptor 1 de LDL oxidado, renina, reticulón e IL-8. La

expresión de estos genes fue regulada diferencialmente a nivel de ARNm en células derivadas de cordón umbilical, con IL-8 también regulada diferencialmente a nivel de proteína. La expresión diferencial de GCP-2 y CXC ligando 3 no se confirmó a nivel de ARNm. Aunque este resultado no admite los datos obtenidos originalmente del experimento de micromatrices, esto puede deberse a una diferencia en la sensibilidad de las metodologías.

5 [0277] Las células derivadas del cordón umbilical humano en el paso 0 se sondaron para la expresión de la actina del músculo liso alfa y la vimentina, y fueron positivas para ambos. El patrón de tinción se conservó a través del pase 11.

10 [0278] En conclusión, los datos de ARNm completos verifican al menos parcialmente los datos obtenidos de los experimentos de micromatrices.

## EJEMPLO 10

### 15 Caracterización inmunohistoquímica de fenotipos celulares.

[0279] Los fenotipos de las células encontradas en el tejido del cordón umbilical humano se analizaron mediante inmunohistoquímica.

20 [0280] Se recogió tejido del cordón umbilical humano y se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v) durante la noche a 4 °C. La inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (consulte la Tabla 10-1): vimentina (1:500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1:150, producida contra el conejo; Sigma; o 1:300,alzada 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 (CD34 humano Clase III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores: anti-humano GROalfa-PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-humano GCP-2 (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor LDL oxidado antihumano 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) y NOGO-A antihumano (1:100; Santa Cruz Biotech). Las muestras fijas se recortaron con un escalpelo y se colocaron dentro del compuesto de inclusión OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. Luego se seccionaron los bloques congelados (10 micrones de espesor) utilizando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para la tinción.

35 [0281] La inmunohistoquímica se realizó de forma similar a estudios previos (por ejemplo, Messina, et al. *Exper. Neurol.*, 2003; 184: 816-829). Las secciones de tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución bloqueadora de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Triton al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a los antígenos intracelulares. En los casos en que el epítomo de interés se ubicaría en la superficie celular (CD34, ox-LDL R1), se omitió el tritón en todas las etapas del procedimiento para evitar la pérdida del epítomo. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se produjo contra la 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 luego a las secciones durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Las soluciones de anticuerpos primarios se eliminaron y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de soluciones de anticuerpos secundarios (1 hora a temperatura ambiente) que contenían un bloque junto con IgG-Texas Red anti-ratón de cabra (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG anti-conejo de cabra Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) o IgG-FITC anti-cabra de burro (1:150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron y se aplicó DAPI (Molecular Probes) de 10 micromolar durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

50 [0282] Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epifluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representó por la 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 las muestras con tinción triple, cada imagen se tomó usando solo un filtro de emisión a la vez. Luego se prepararon los montajes en capas utilizando el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

55

60

65

**Tabla 10-1:**Resumen del proveedor de concentración de anticuerpos primarios utilizados

	<b>Anticuerpo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Proveedor</b>
5	Vimentina	1:500	Sigma, St. Louis, MO
	Desmina (rb)	1:150	Sigma
	Desmina (m)	1:300	Chemicon, Temecula, CA
	Actina del músculo liso alfa (SMA)	1:400	Sigma
10	Citoqueratina 19 (CK18)	1:400	Sigma
	Factor de von Willebrand (vWF)	1:200	Sigma
	CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA
	GROalfa-PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
15	GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
	Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
	NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

20 **[0283]** 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 cuerda. Las células CD34+ estaban en la capa más interna (lado del lumen). La expresión de vimentina se encontró en toda la matriz y en los vasos sanguíneos del cordón. La SMA se limitó a la matriz y las paredes externas de la arteria y vena, pero no se contuvo con los propios vasos. La CK18 y la desmina se observaron solo dentro de los vasos, la desmina se restringió a las capas media y externa.

**[0284]** Ninguno de estos marcadores se observó dentro del cordón umbilical (datos no mostrados).

30 **[0285]** Se expresan vimentina, desmina, actina del músculo liso alfa, citoqueratina 18, factor de von Willebrand y CD 34 en las células del cordón umbilical humano. Sobre la base de estudios de caracterización *in vitro* que muestran que solo se expresan la vimentina y la actina del músculo liso alfa, los datos sugieren que el proceso actual de aislamiento de células derivadas del cordón umbilical extrae una subpoblación de células o que las células aisladas cambian la expresión de los marcadores para expresar la vimentina y actina del músculo liso alfa.

### 35 EJEMPLO 11

#### Secreción de factores tróficos cuando UTC crece en cultivo

40 **[0286]** Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados a partir de células derivadas de ombligo cultivadas en cultivo. Se seleccionaron factores que tienen actividad angiogénica (es decir, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen et al. Ciba Found. Symp. 1997; 212: 215-26), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (también conocida como quimioatrayente-1 de monocitos) (MCP)-1) (Salcedo et al. Blood, 2000; 96; 34-40), interleucina-8 (IL-8) (Li et al. J. Immunol., 2003; 170: 3369-76), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes et al. Ann. Thorac. Surg., 2004 77: 812-8), inhibidor tisular de la matriz metaloproteínasa 1 (TIMP1), angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFbb), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng et al. Dev Biol., 2003; 258; 319-33), factor 1alfa derivado de estroma (SDF-1alfa), interleucina-6 (IL-6), proteína-2 quimiotáctica de granulocitos (GCP-2), factor de crecimiento transformante beta2 (TGFbeta2)), o actividad de quimioquinas (proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1 alfa (MIP1 $\alpha$ )), macrófagos en proteína inflamatoria beta 1 (MIP1beta (MIP1 $\beta$ )), RANTES (regulada en la activación, células T normales expresadas y secretadas), 1309, timo y quimiocina regulada por activación (TARC), Eotaxina, quimiocina derivada de macrófagos (MDC).

55 **[0287]** Las células derivadas del cordón umbilical, así como los fibroblastos humanos derivados del prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de crecimiento en matraces de T75 recubiertos de gelatina. Las células se crioconservaron 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 mililitros y centrifugación de las células a 150 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en medio de crecimiento de 4 mililitros y se contaron las células. Las células se sembraron a 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T75 que contenían cada uno 15 mililitros de medio de crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio sin suero (DMEM-glucosa baja (Gibco), albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) (Sigma), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomocina (50 microgramos/mililitro, Gibco)) durante 8 horas. El medio acondicionado sin suero acondicionado se recogió al final de la incubación mediante centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20 °C.

[0288] Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron utilizando 2 mililitros de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de la tripsina se inhibió mediante la adición de 8 mililitros de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio de crecimiento de 1 mililitro. El número de células se estimó con un hemocitómetro.

[0289] Las células se cultivaron a 37°C en dióxido de carbono al 5% y oxígeno atmosférico. La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1alfa, GCP-2, IL-8 y TGF-beta2 producida por cada muestra 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 picoogramas por mililitro por millón de células (n = 2, sem).

[0290] Quimiocinas (MIP1alfa (MIP1α), MIP1beta (MIP1β), MCP-1, RANTES, 1309, TARC, Eotaxina, MDC, IL-8), BDNF, y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGFbb, TPO, HB-EGF se midieron utilizando matrices de proteoma SearchLight™ (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices de proteoma son ELISA de tipo sándwich multiplexado para la medición cuantitativa de dos a dieciséis proteínas por pocillo. Las matrices se producen manchando un patrón 2 x 2, 3 x 3 o 4 x 4 de cuatro a dieciséis anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de un procedimiento ELISA 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.

[0291] MCP-1 e IL-6 fueron secretadas por PPDC derivadas de ombligo y fibroblastos dérmicos (Tabla 11-1). Los fibroblastos secretaron SDF-1 alfa (SDF-1α) y GCP-2. GCP-2 e IL-8 fueron secretados por PPDC derivados del ombligo. TGF-beta2 no se detectó en ninguno de los dos tipos de células mediante ELISA.

**Table 11-1. Resultados ELISA: Detección de factores tróficos**

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1	GCP-2	IL-8	TGF-beta2
<b>Fibroblasto</b>	17±1	61±3	29±2	19±1	21±1	ND	ND
<b>Umbilical (022803)</b>	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
<b>Umbilical (071003)</b>	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND

Clave: ND: No detectado., +/- sem

[0292] Ensayo ELISA multiplexado Searchlight™. TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1beta, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC e IL-8 se secretaron de los PPDC derivados del ombligo (véanse las tablas 11-2 y 11-3 a continuación) cuando crezcan en cultivo. No se detectaron Ang2, VEGF ni PDGFbb.

**Tabla 11-2. Resultados del ensayo ELISA multiplexado de Searchlight™**

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

Clave: hFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivado del ombligo (022803)), U3 (PPDC derivado del ombligo (071003)). ND: No detectado.

**Tabla 11-3. Resultados del ensayo ELISA multiplexado de Searchlight™**

	MIP1α	MIP1β	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
<b>hFB</b>	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
<b>U1</b>	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
<b>U3</b>	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

Clave: hFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivado del ombligo (022803)), U3 (PPDC derivado del ombligo (071003)). ND: No detectado.

[0293] Las células derivadas del cordón umbilical secretaron una serie de factores tróficos cuando se cultivaron. Algunos de estos factores tróficos, como HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, desempeñan funciones importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, como BDNF e IL-6, tienen funciones importantes en la regeneración o protección neuronal.

## EJEMPLO 12

### Inmunología *in vitro*

[0294] Las líneas celulares del cordón umbilical se evaluaron *in vitro* por sus características inmunológicas en un

esfuerzo por predecir la respuesta inmunológica, en su caso, que estas células obtendrían tras el trasplante *in vivo*. Las líneas celulares posparto se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2. Estas proteínas se expresan mediante células presentadoras de antígeno (APC) y se requieren para la estimulación directa de células T CD4 + ingenuas (Abbas y Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 5ª ed. (2003) Saunders, Filadelfia, p. 171). Las líneas celulares también se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de HLA-G (Abbas & Lichtman, supra), CD178 (Coumans, et al., (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196), y PD L2 (Abbas & Lichtman, supra; Brown, et al. The Journal of Immunology 170, 2003; 1257-1266). Para predecir hasta qué punto las líneas celulares derivadas del ombligo después del parto provocan una respuesta inmune *in vivo*, las líneas celulares se analizaron en una reacción de linfocitos mixtos (MLR) de una vía. Las células se cultivaron en medios de crecimiento en matraces T75 (Corning, Corning, NY) recubiertos con gelatina al 2% (Sigma, St. Louis, MO) hasta su confluencia.

[0295] Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) y se separaron con tripsina/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de  $1 \times 10^7$  por mililitro. El anticuerpo (Tabla 12-1) se agregó a cien microlitros de suspensión celular según las especificaciones del fabricante y 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 quinientos microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tabla 12-1. Anticuerpos		
Anticuerpo	Fabricación	Nº de catálogo
HLA-DR,DP,DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen	557227
CD86	BD Pharmingen	555665
B7-H2	BD Pharmingen	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen	557846
IgG2alfa de ratón	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG1kappa de ratón	Sigma	P-4685

[0297] Los viales crioconservados de PPDC derivadas del ombligo del paso 10 marcados como línea celular "A" se empaquetaron en hielo seco y se enviaron a CTBR (Senneville, Quebec) para llevar a cabo una reacción de linfocitos mixtos utilizando CTBR SOP Nº CAC-031. Se recolectaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de múltiples donantes voluntarios masculinos y femeninos. Se seleccionaron seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un solo donante alogénico que mostró una respuesta de proliferación robusta en una reacción mixta de linfocitos con los otros cinco donantes de sangre. Este donante fue seleccionado como el donante de control positivo alogénico. Los cinco donantes de sangre restantes fueron seleccionados como receptores. Las PBMC alogénicas estimulantes (donante), las PBMC autólogas y las líneas celulares posparto se trataron con mitomicina C. Se añadieron células estimuladoras autólogas y tratadas con mitomicina C a las PBMC respondedoras (receptoras) y se cultivaron durante 4 días. Después de la incubación, se añadió [3H] timidina a cada muestra y se cultivó durante 18 horas. Tras la recolección de las células, se extrajo el ADN radiomarcado y se midió la incorporación de [3H]-timidina utilizando un contador de centelleo. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando placas de cultivo de dos células con tres receptores por placa

[0298] El índice de estimulación para el donante alogénico (SIAD) se calculó como la proliferación media del receptor más el donante alogénico tratado con mitomicina C dividido por la proliferación de referencia del receptor. El índice de estimulación de las células posparto se calculó como la proliferación media del receptor más la línea celular posparto tratada con mitomicina C dividida por la proliferación inicial del receptor.

[0299] Se seleccionaron seis donantes de sangre voluntarios humanos para identificar un único donante alogénico que exhibirá una respuesta de proliferación robusta en una reacción de linfocitos mixtos con los otros cinco donantes de sangre. Este donante fue seleccionado como el donante de control positivo alogénico. Los cinco donantes de sangre restantes fueron seleccionados como receptores. El donante de control positivo alogénico y las líneas celulares derivadas del cordón umbilical fueron tratadas con mitomicina C y se cultivaron en una reacción mixta de linfocitos con los cinco receptores alogénicos individuales. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando dos placas de cultivo celular con tres receptores por placa (Tabla 12-2). El índice de estimulación promedio varió de 6,5 (placa 1) a 9 (placa 2) y los controles positivos de donantes alogénicos variaron de 42,75 (placa 1) a 70 (placa 2) (Tabla 12-3).

**Tabla 12-2.** Datos de reacción de linfocitos mixtos: línea celular A (Umbilicus)

<b>DPM para el ensayo de proliferación (placa 1)</b>							
Nº analítico	Sistema de cultivo	Reproducir exactamente			Medi a	DE	CV
		1	2	3			
IM04-2478	Proliferación basal del receptor,	10 74	40 6	391	623, 7	390, 07	62,5
	Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	67 2	51 0	1402	861, 3	475, 19	55,2
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratamiento con mitomicina C)	43 77 7	48 39 1	3823 1	4346 6,3	508 7,12	11,7
	MLR con línea celular (tipo de célula A tratada con mitomicina C)	29 14	56 22	6109	4881 ,7	172 1,36	35,3
SI (donante)					70		
SI (línea celular)					8		
IM04-2479	Proliferación basal del receptor,	53 0	50 8	527	521, 7	11,9 3	2,3
	Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	70 1	56 7	1111	793, 0	283, 43	35,7
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratamiento con mitomicina C)	25 59 3	24 73 2	2270 7	2434 4,0	148 1,61	6,1
	MLR con línea celular (tipo de célula A tratada con mitomicina C)	50 86	39 32	1497	3505 ,0	183 2,21	52,3
Analítico	Sistema de cultivo	Reproducir exactamente			Medi a	DE	CV
	SI (donante)					47	
SI (línea celular)					7		
IM04-2480	Proliferación basal del receptor,	1192	85 4	1330	1125 ,3	244, 90	21,8
	Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	2963	99 3	2197	2051 ,0	993, 08	48,4
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratamiento con mitomicina C)	25416	29 72 1	2375 7	2629 8,0	307 8,27	11,7
	MLR con línea celular (tipo de célula A tratada con mitomicina C)	2596	50 76	3426	3699 ,3	126 2,39	34,1
SI (donante)					23		
SI (línea celular)					3		
IM04-2481	Proliferación basal del receptor,	69 5	45 1	555	567, 0	122, 44	21,6
	Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	73 8	12 52	464	818, 0	400, 04	48,9

Analítico	Sistema de cultivo	Replicado			Media	DE	CV
		1	2	3			
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratamiento con mitomicina C)	13177	24885	15444	17835,3	6209,52	34,8
	MLR con línea celular (tipo de célula A tratada con mitomicina C)	4495	3671	4674	4280,0	534,95	12,5
SI (donante)					31		
SI (línea celular)					8		
<b>DPM para el ensayo de proliferación (placa 2)</b>							
N° analítico	Sistema de cultivo	Replicados			Media	DE	CV
		1	2	3			
IM04-2482	Proliferación basal del receptor	432	533	274	413,0	130,54	31,6
	Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1459	633	598	896,7	487,31	54,3
	Donante alogénico MLR IM04-2477 (tratamiento con mitomicina C)	24286	30823	31346	28818,3	3933,82	13,7
	MLR con línea celular (tipo de célula A tratada con mitomicina C)	2762	1502	6723	3662,3	2724,46	74,4
SI (donante)					70		
SI (línea celular)					9		
IM04-2477 (donante alogénico)	Proliferación basal del receptor	312	419	349	360,0	54,34	15,1
	Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	567	604	374	515,0	123,50	24,0
Línea celular tipo A	Proliferación basal del receptor	5101	3735	2973	3936,3	1078,19	27,4
	Control de la autoestimulación (células autólogas tratadas con mitomicina C)	1924	4570	2153	2882,3	1466,04	50,9

**Tabla 12-3. Índice de estimulación promedio de células umbilicales y un donante alogénico en una reacción mixta de linfocitos con cinco receptores alogénicos individuales**

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

**[0300]** Los histogramas de células derivadas de cordón umbilical analizadas por citometría de flujo muestran una expresión negativa de HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 y B7-H2, como se indica por el valor de fluorescencia consistente con el control de IgG, lo que indica que las líneas celulares derivadas del cordón umbilical carecen de las moléculas de la superficie celular necesarias para estimular directamente las PBMC alogénicas (p. ej., células T CD4<sup>+</sup>).

**[0301]** Las células umbilicales analizadas por citometría de flujo fueron positivas para la expresión de PD-L2, como se refleja en el aumento de la fluorescencia en relación con el control de IgG. Las células fueron negativas para la expresión de CD178 y HLA-G, como se observó por los valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

**[0302]** En las reacciones de linfocitos mixtos realizadas con líneas celulares umbilicales, el índice de estimulación promedio varió de 6,5 a 9, mientras que el de los controles positivos alogénicos varió de 42,75 a 70. Las líneas celulares umbilicales no expresaron cantidades detectables de las proteínas estimulantes HLA. DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 y B7-H2, medidas por citometría de flujo. Las líneas celulares umbilicales tampoco expresaron las proteínas inmunomoduladoras HLA-G y CD178, pero la expresión de PD-L2 se detectó mediante citometría de flujo. Las PBMC de donantes alogénicos contienen células presentadoras de antígenos que expresan HLA-DR, DQ, CD8, CD86 y B7-H2, lo que permite la estimulación de linfocitos alogénicos. La ausencia en las células derivadas del ombligo de las moléculas de la superficie celular presentadora de antígeno requeridas para la estimulación directa

de las células T CD4<sup>+</sup> ingenuas, así como la presencia de PD-L2, una proteína inmunomoduladora, podría explicar el bajo índice de estimulación mostrado por estas células. en un MLR en comparación con los controles alogénicos.

### EJEMPLO 13

5

#### Ensayo de la actividad de la telomerasa

[0303] La telomerasa funciona para sintetizar repeticiones de telómeros que sirven para proteger la integridad de los cromosomas y para prolongar la vida replicativa de las células (Liu, K, et al., PNAS, 1999; 96: 5147-5152). La telomerasa consta de dos componentes, el molde de ARN de la telomerasa (hTER) y la transcriptasa inversa de la telomerasa (hTERT). La regulación de la telomerasa se determina mediante la transcripción de hTERT pero no de hTER. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) para el ARNm de hTERT es un método aceptado para determinar la actividad telomerasa de las células.

#### Aislamiento celular

[0304] 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 Estados Unidos N° 7.510.873. En general, los cordones umbilicales obtenidos del National Disease Research Interchange (Filadelfia, PA) después de un parto normal se lavaron para eliminar la sangre y los desechos y se disociaron mecánicamente. El tejido se incubó luego con enzimas de digestión que incluyen colagenasa, dispasa y hialuronidasa en medio de cultivo a 37 °C. Las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano se cultivaron de acuerdo con los métodos expuestos en los ejemplos de la aplicación '012. Se obtuvieron células madre mesenquimáticas y fibroblastos dérmicos normales (cc-2509 lote n° 9F0844) de Cambrex, Walkersville, Md. Una célula celular de carcinoma embrionario testicular humano (teratoma) ntera-2 (NTERA-2 cl.DI) (véase, Plaia et al., Stem Cells, 2006; 24 (3): 531-546) se adquirió de ATCC (Manassas, Virginia) y se cultivó de acuerdo con los métodos establecidos en la patente de EE.UU. n° 7.510.873.

#### Aislamiento total de ARN

[0305] Se extrajo ARN de las células utilizando el kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, Ca.). El ARN se eluyó con 50 microlitros de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80 °C. El ARN se transcribió de manera inversa utilizando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

#### PCR en tiempo real

[0306] La PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando los Applied Biosystems Assays-On-Demand™ (también conocidos como TaqMan® Gene Expression Assays) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems). Este kit comercial se usa ampliamente para ensayar la telomerasa en células humanas. Brevemente, se mezclaron hTert (gen de la telomerasa humana) (Hs00162669) y GAPDH humano (un control interno) con ADNc y TaqMan® Universal PCR master mix utilizando un sistema de detección de secuencias de 7000 con el software ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

[0307] Los datos de la PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (N° de acceso ATCC PTA-6067), fibroblastos y células madre mesenquimáticas se analizaron para hTert y ARN 18S. Como se muestra en la Tabla 13-1, hTert, y por lo tanto la telomerasa, no se detectó en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

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

[0308] Se analizaron células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (aislado 022803, ATCC N° de registro PTA-6067) y nTera-2 y los resultados no mostraron expresión de la telomerasa en dos lotes de células derivadas de tejido del cordón umbilical humano mientras la línea celular de teratoma reveló un alto nivel de expresión (Tabla 13-2).

65

Tipo de célula	hTert		GAPDH		norma hTert
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	
nTera2	25,85	27,31	16,41	16,31	0,61
022803	-	-	22,97	22,79	-

5

**[0309]** Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas de tejido umbilical humano de la presente invención no expresan telomerasa.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0310]**

15

<110> KIHM, ANTHONY J.  
 <120> MODULACIÓN HUTC DE MEDIADORES INFLAMATORIOS DE ENFERMEDADES Y TRASTORNOS DE LOS PULMONES Y PULMONARES  
 <130> 18668-329484

20

<160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.5

25

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

30

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

35

<400> 1  
 gagaaatcca aagagcaaat gg 22

40

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

45

<400> 2  
 agaattgaaa actggaatag g 21

50

<210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

55

<400> 3  
 tcttcgatgc ttcgattcc 20

60

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

65

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

<400> 4  
 gaattctcgg aatctctgtt g 21

5 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

10 <400> 5  
 ttacaagcag tgcagaaaac c 21

15 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

20 <400> 6  
 agtaaacatt gaaaccacag cc 22

25 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético  
 <400> 7  
 tctgcagctc tgtgtgaagg 20

35 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 8  
 ctcaaaaac ttctccacaa cc 22

45 <210> 9  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

55 <400> 9  
 cccagccac gctctcc 17

60 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

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

65 <400> 10  
 tctgtcagt tgggtctcc 19

**REIVINDICACIONES**

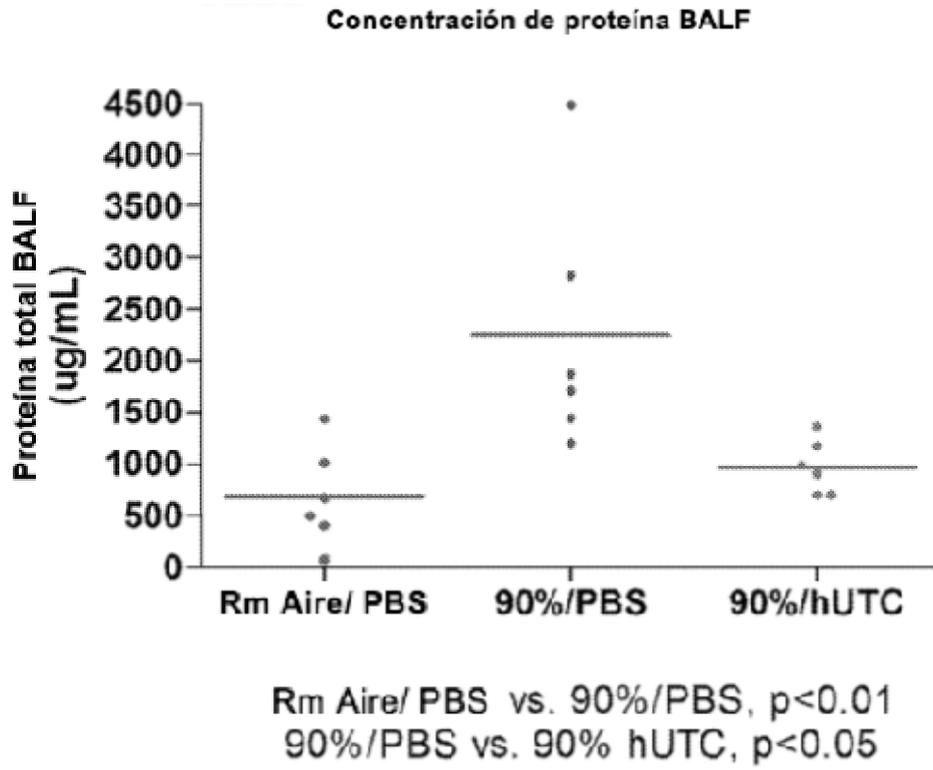
- 5 **1.** Células derivadas de tejido del cordón umbilical para uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) mediante la reducción de la producción de uno o más mediadores proinflamatorios involucrados en la patología de la EPOC, en donde uno o más mediadores proinflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en TNF- $\alpha$ , RANTES, IL-1 $\beta$  y combinaciones de los mismos, y en donde las células se aíslan del tejido del cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de auto-renovación y expansión en el cultivo, carecen de la producción de CD117 y CD45, y no expresan hTERT o telomerasa.
- 10 **2.** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es bronquitis crónica o enfisema.
- 3.** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células comprenden además una o más de las siguientes características:
- 15 (a) expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90;  
 (b) no expresan CD31 o CD34;  
 (c) expresan, en relación con un fibroblasto humano, una célula madre mesenquimática o una célula de la médula ósea de la cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y  
 20 (d) tienen el potencial de diferenciarse en células de al menos un tejido pulmonar.
- 4.** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la reducción comprende administrar las células derivadas de tejido del cordón umbilical con al menos otro tipo de célula y/o al menos otro agente.
- 25 **5.** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el otro tipo de célula es una célula de tejido pulmonar seleccionada de células progenitoras de pulmón, células de músculo liso vascular, células progenitoras de músculo liso vascular, pericito, células endoteliales vasculares, célula progenitora de endotelio vascular, u otra célula madre multipotente.
- 30 **6.** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente es un agente antitrombogénico, un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente inmunomodulador, un agente proangiogénico o un agente antiapoptótico.
- 35 **7.** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en las que la modulación comprende administrar las células mediante inyección, infusión, un dispositivo implantado en el paciente o mediante la implantación de una matriz o armazón que contiene las células.
- 40 **8.** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en las que las células ejercen un efecto trófico sobre el tejido pulmonar, el músculo liso vascular o el endotelio vascular del paciente.
- 45 **9.** Las células derivadas de tejido del cordón umbilical para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la reducción comprende administrar las células derivadas de tejido del cordón umbilical en los sitios de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

50

55

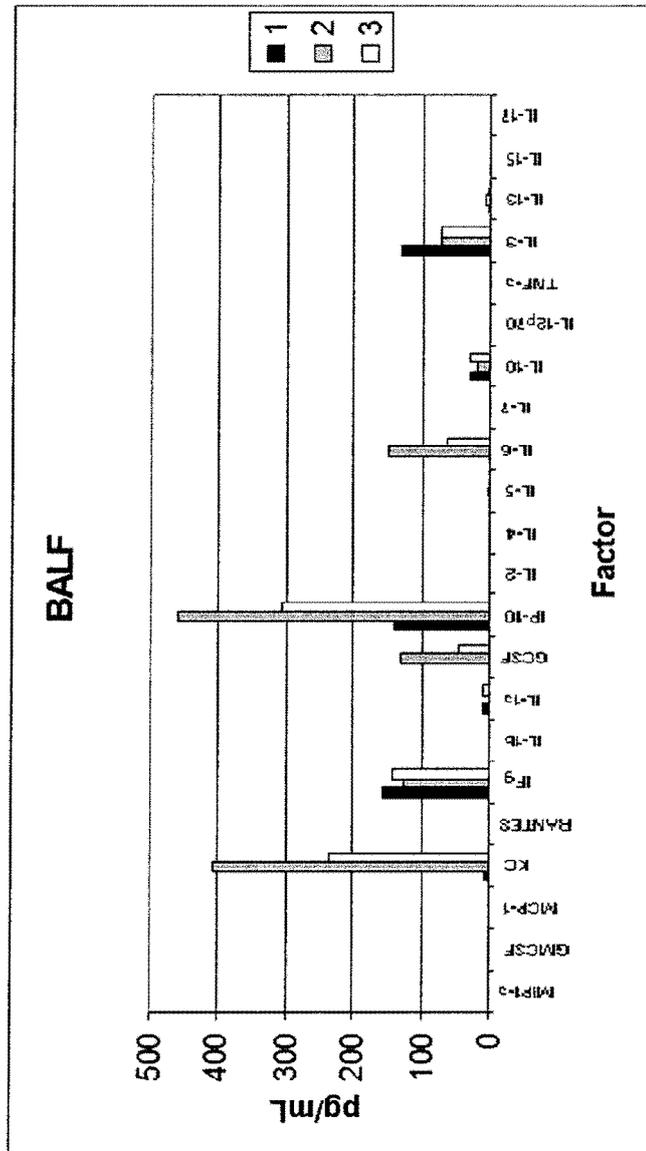
60

65



**Figura 1**





**B**  
**Figura 2**

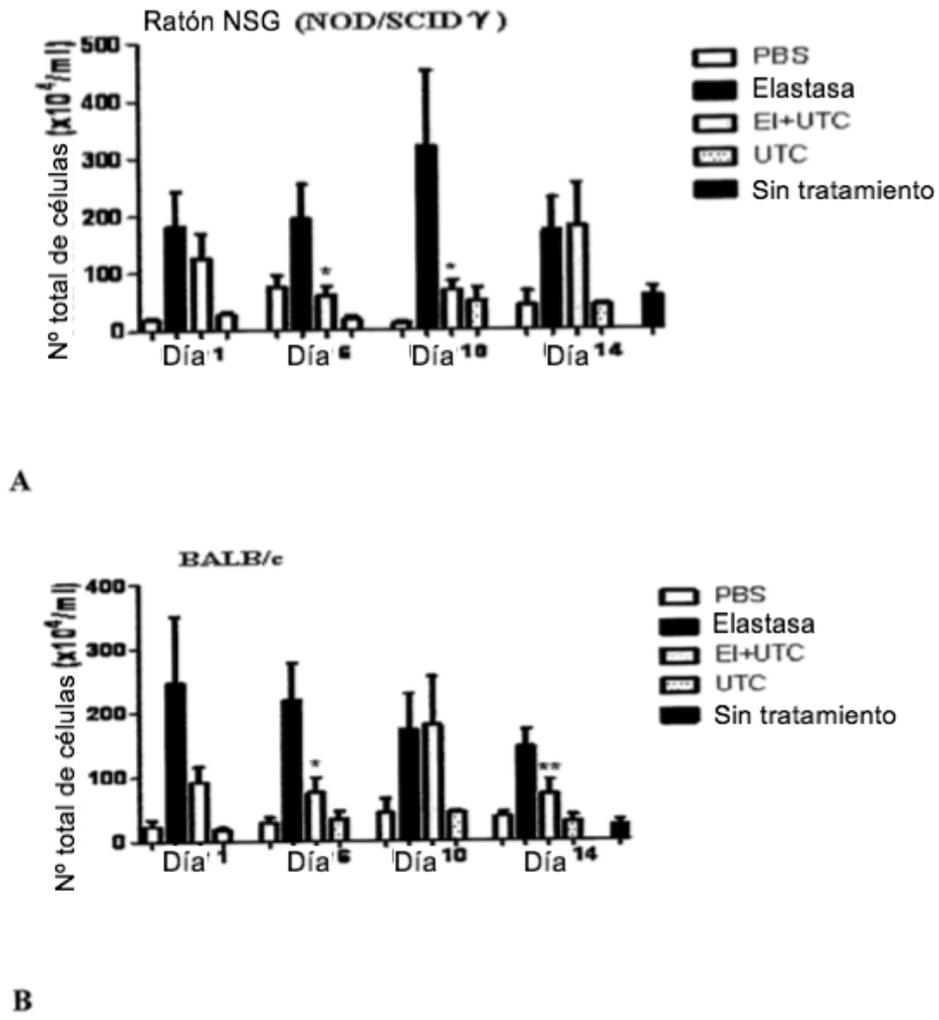


Figura 3

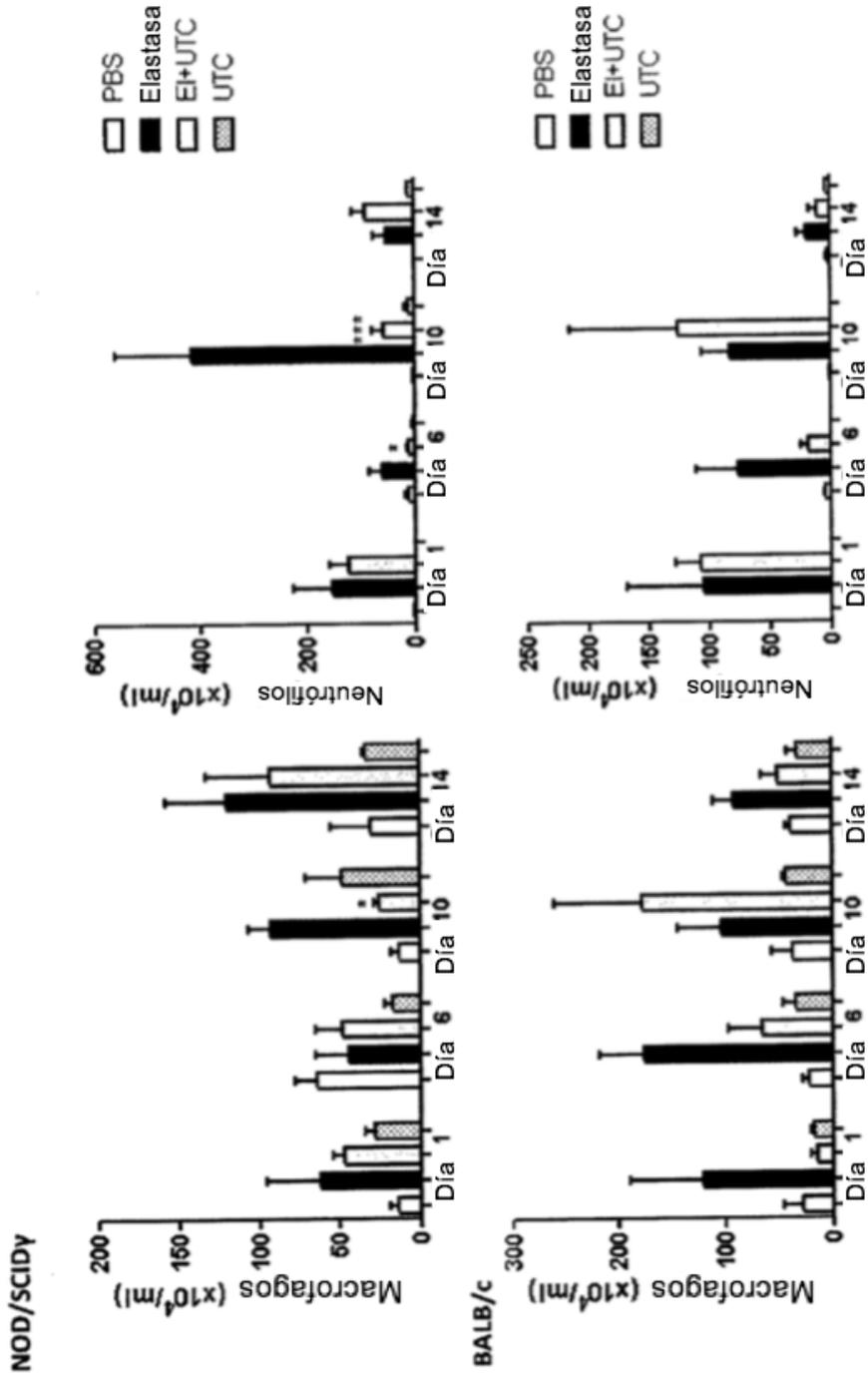


Figura 4

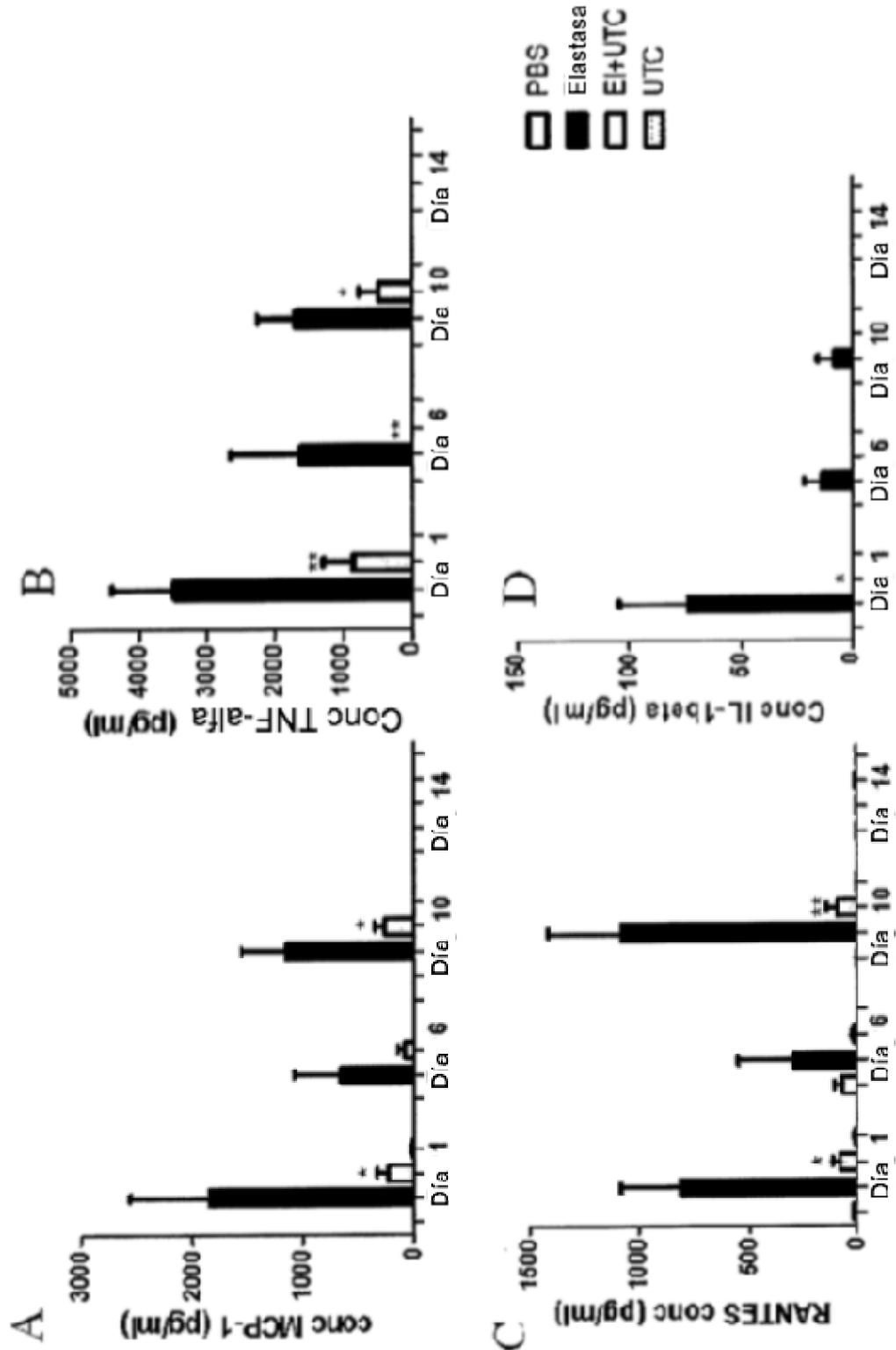


Figura 5

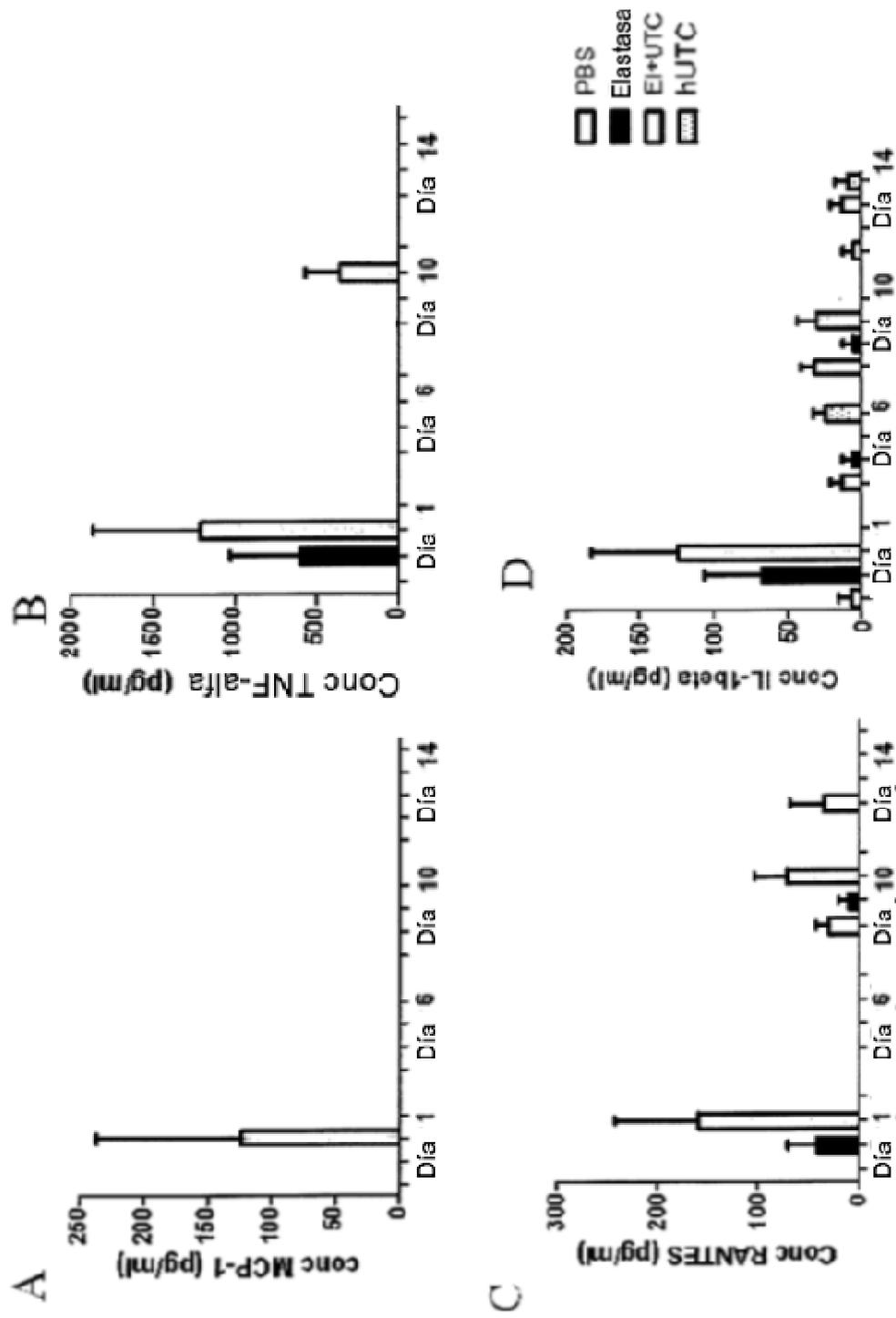


Figura 6

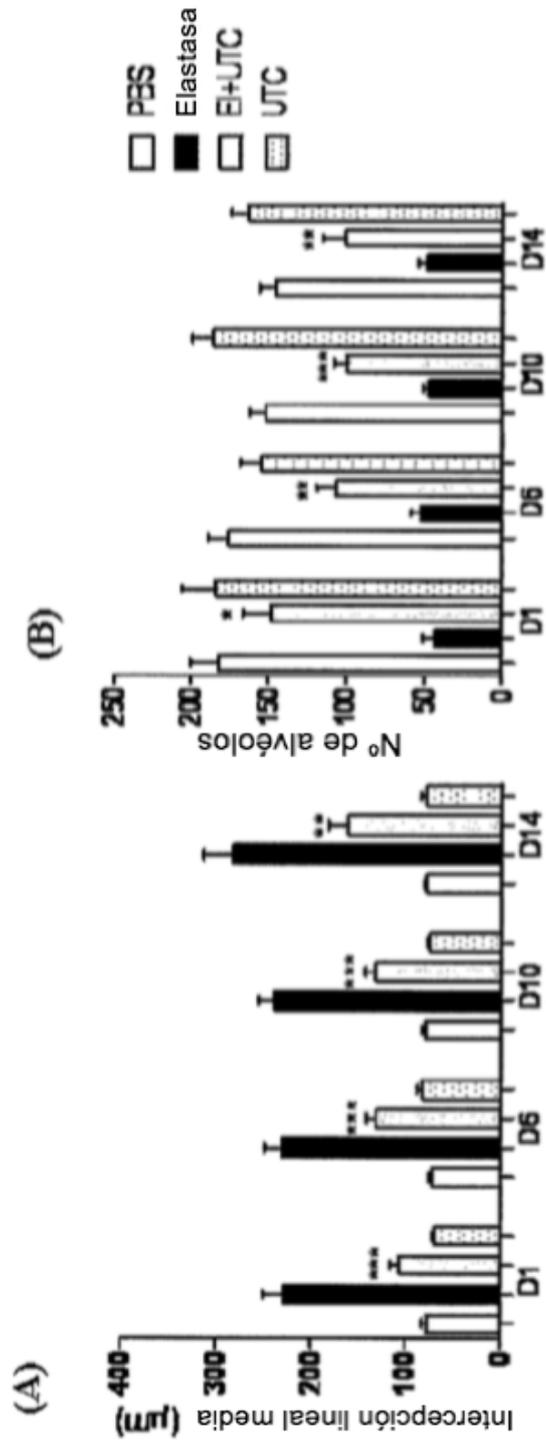
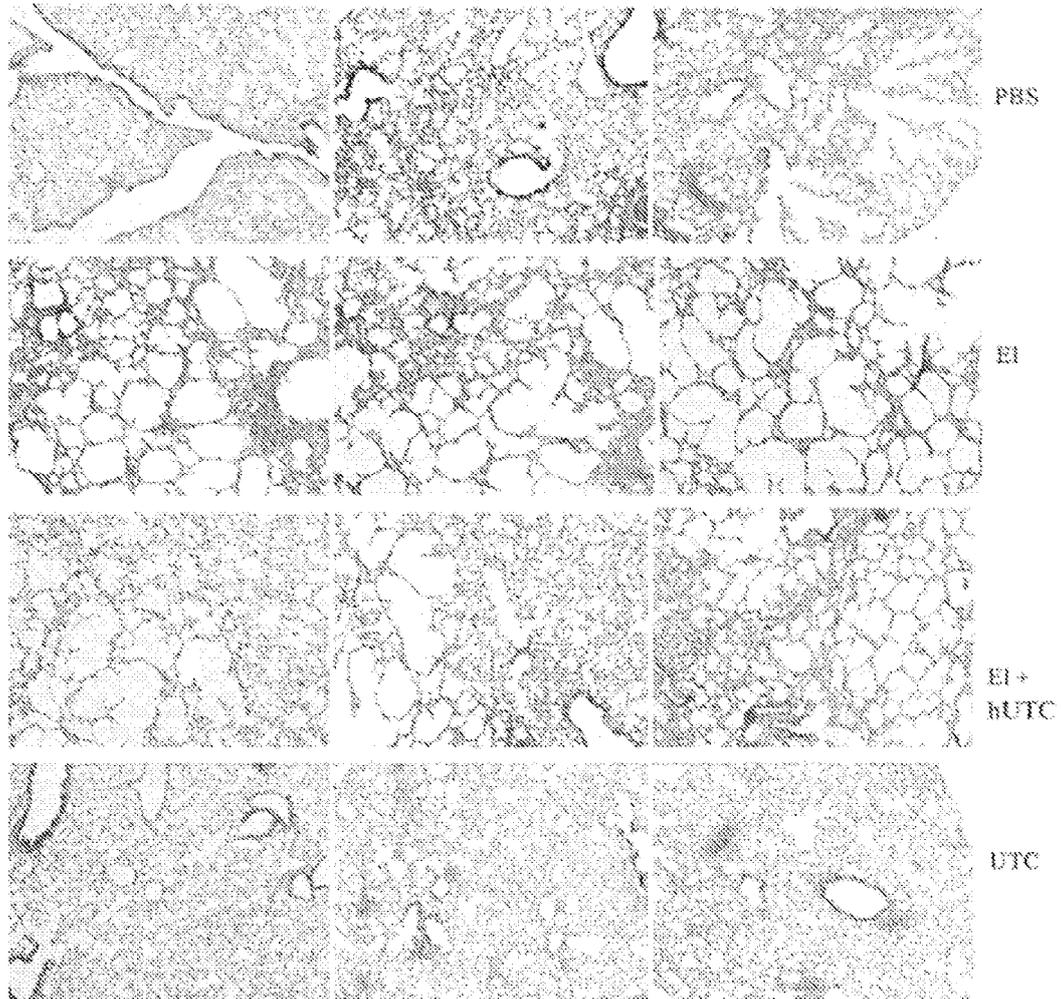
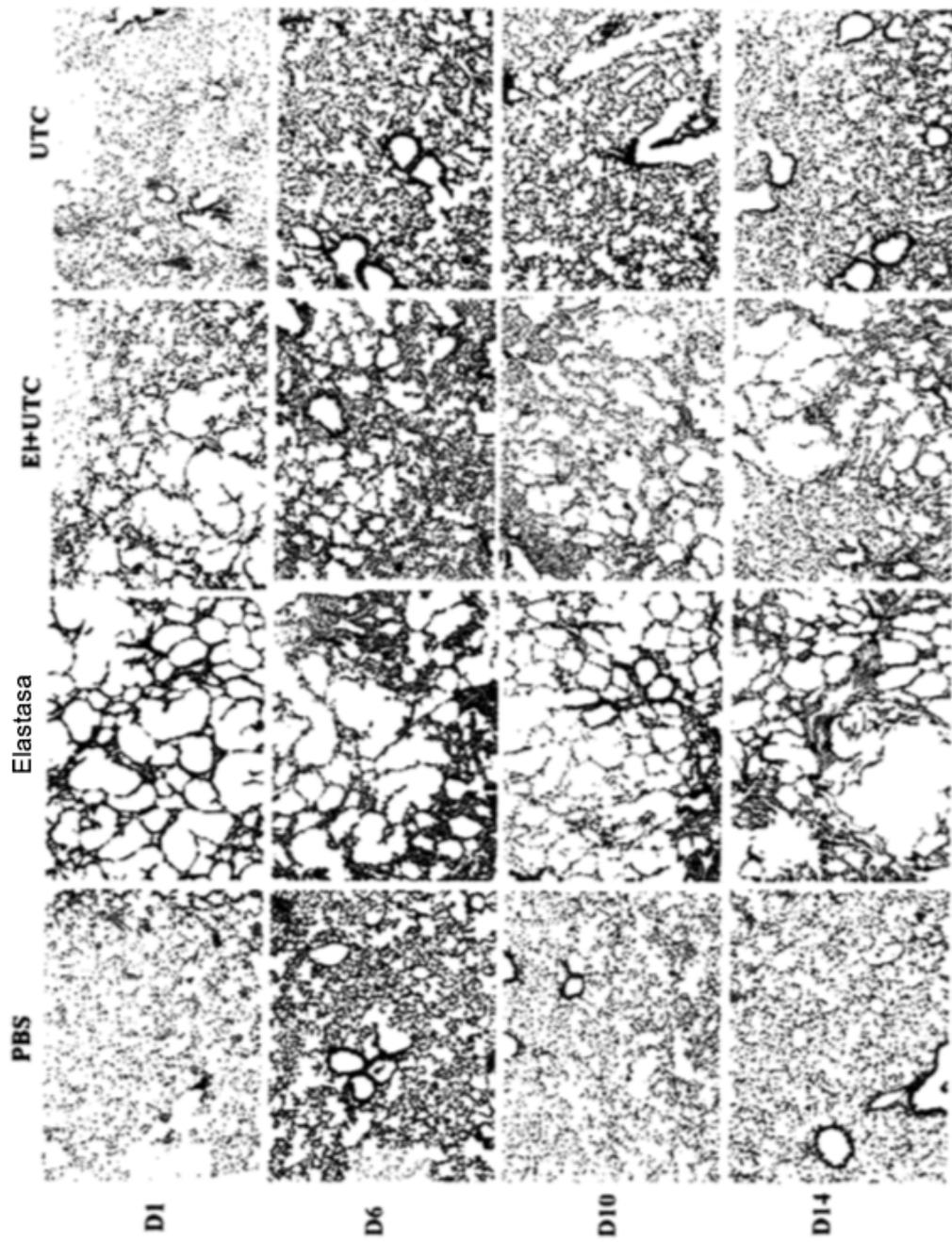


Figura 7



**Figura 8**



**Figura 9**

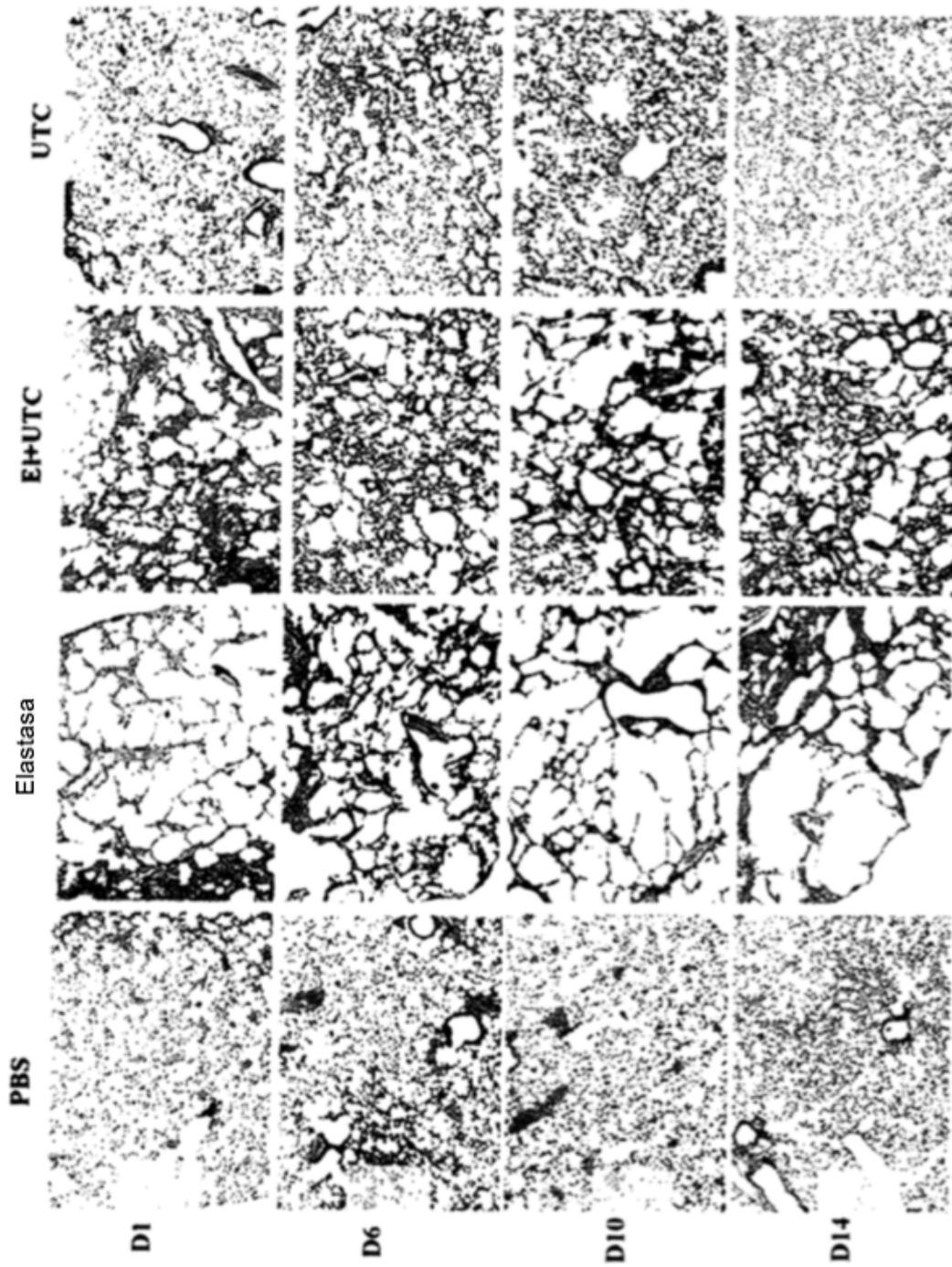
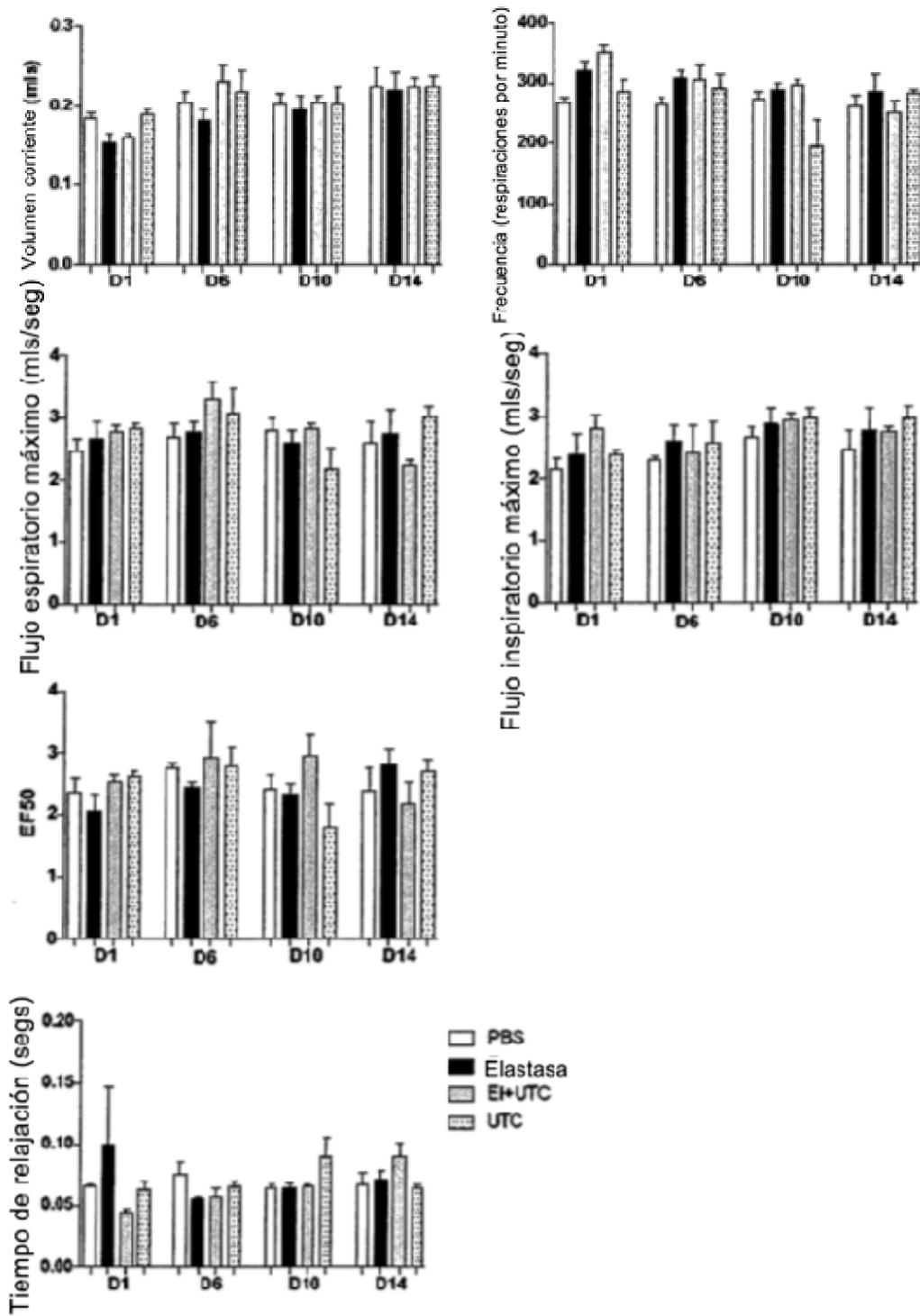
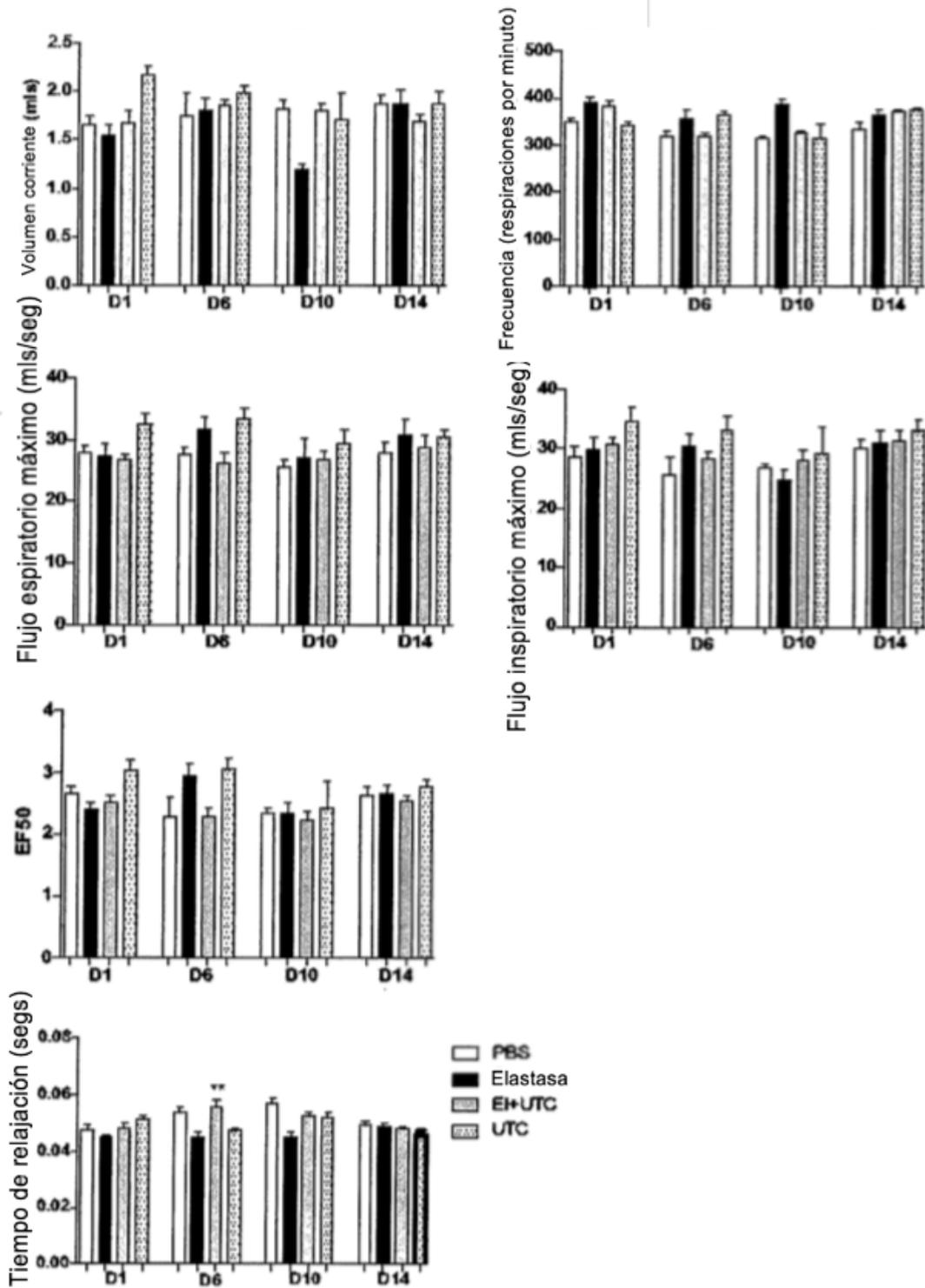


Figura 10



A

Figura 11



**B**  
**Figura 11**