



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 386**

51 Int. Cl.:
C12N 5/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04709560 .9**

96 Fecha de presentación : **10.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1594957**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **Células progenitoras procedentes de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano.**

30 Prioridad: **11.02.2003 US 446275 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2011

73 Titular/es: **John E. Davies**
285 Garden Avenue
Toronto, Ontario M6R 1J4, CA
Rahul Sarugaser,
Dolores Baksh,
Morris Hosseini y
Antony David Sutton Lickorish

72 Inventor/es: **Sarugaser, Rahul;**
Davies, John E.;
Lickorish, Antony David Sutton;
Baksh, Dolores y
Hosseini, Morris

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 351 386 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**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] Esta invención se centra en la recolección de una población de células humanas que proliferan rápidamente procedentes de tejido conjuntivo del cordón umbilical (CU); el cultivo de dichas células en condiciones osteogénicas o de formación de hueso; la demostración de un alto porcentaje de células dentro de estas poblaciones que son inmunológicamente incompetentes, como se muestra por su falta de antígenos de histocompatibilidad de superficie celular; y la capacidad de estas células para usarlas como una fuente de células para diferentes terapias basadas en células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El CU es una de las primeras estructuras que se forma después de la gastrulación (formación de las tres capas germinativas embrionarias). Cuando se inicia el plegado, el disco embrionario queda conectado por el intestino medio primitivo (origen embrionario) al saco vitelino primitivo (origen extraembrionario) por los vasos vitelinos y alantoideos que a su vez se desarrollan para formar los vasos umbilicales {Pereda, 2002 50/id} {Tuchmann-Duplessis, 1972 77/id} {Tuchmann-Duplessis, 1972 77/id} {Haynesworth, 1998 51/id}. Estos vasos están soportados en, y rodeados por lo que en general se considera un tejido mesenquimal primitivo de la derivación extraembrionaria primaria llamada gelatina de Wharton (WJ) {Weiss, 1983 80/id}. A partir de esta etapa temprana, el CU crece durante la gestación, para convertirse en el cordón de 30-50 cm observado en el nacimiento. Por lo tanto, se puede esperar que la GW (gelatina de Wharton) contenga no solo las células de tipo fibroblastos o de tipo miofibroblastos que se han descrito en la bibliografía (véase a continuación), sino también poblaciones de células progenitoras que pueden dar lugar a las células del volumen en expansión de la GW necesarias para soportar el crecimiento del cordón durante el desarrollo embrionario y fetal.

[0003] La GW fue descrita por primera vez por Thomas Wharton, que publicó su tratado *Adenographia* en 1956. Posteriormente se ha definido como un tejido conjuntivo gelatinoso, laxo, mucoso, compuesto de células dispersas en una sustancia triturada amorfa compuesta de proteoglicanos, incluyendo ácido hialurónico {Schoenberg, 1960 81/id}, y diferentes tipos de colágenos (Nanaev y col., 1997). Las células dispersas en la matriz se han descrito como de “tipo fibroblasto” que son de forma estrellada en el cordón colapsado y alargadas en el cordón distendido (Parry, 1970). Las células musculares lisas se observaron inicialmente en la matriz (Chacko y

Reynolds, 1954), aunque esto fue discutido por Parry (1970) quien las describió como “fibroblastos algo inusuales” que superficialmente se parecen a células musculares lisas. Después de esto, se hizo poco trabajo de caracterización de estas células hasta 1993 cuando Takechi y col. (1993) realizaron investigaciones inmunohistoquímicas sobre estas células. Describieron las células como de “tipo fibroblastos” que eran “fusiformes o de forma estrellada con procesos citoplasmáticos largos y una red ondulada de fibras de colágeno en una sustancia triturada amorfa” (Takechi y col., 1993). Para la tinción inmunohistoquímica usaron anticuerpos primarios contra actina y miosina (proteínas contráctiles citoplasmáticas), vimentina (característica de fibroblastos de origen mesenquimal embrionario) y desmina (específica de células de origen miógeno) con el fin de determinar qué tipos de miosina están asociados con los fibroblastos de la GW. Observaron niveles altos de actomiosina químicamente extraíble, y aunque los fibroblastos contienen actomiosina citoplasmática, no se tiñen para la actina y miosina, mientras que los fibroblastos de la GW se teñían positivamente para ambas. Además, se observaron tinciones positivas tanto para vimentina como para desmina conduciendo a la conclusión de que estos fibroblastos modificados en la GW derivaban de tejido mesenquimal primitivo (Takechi y col., 1993). Un estudio posterior más reciente de Nanaev y col. (1997) demostraba 5 etapas de diferenciación de las células progenitoras mesenquimales proliferativas en cordones prematuros. Sus descubrimientos apoyaban la sugerencia de que existen miofibroblastos en la matriz de la GW. La caracterización inmunohistoquímica de las células de la GW muestra notables similitudes con la de los pericitos que se sabe que son una fuente principal de células osteogénicas en la morfogénesis ósea y también forman nódulos óseos denominados unidades formadoras de colonias de osteoblastos (UFC-O) (Aubin, 1998) en cultivo (Canfield y col., 2000).

[0004] Publicaciones recientes han descrito procedimientos para recoger células del CU, en lugar de la sangre del CU. Mitchell y col. (Mitchell y col., 2003) describen un procedimiento en el que primero separan y descartan los vasos umbilicales para recoger el tejido restante. Este último, que incluirá tanto GW restante (parte de la cual se habrá descartado con los vasos, puesto que los vasos umbilicales están totalmente envueltos en GW) como epitelio amniótico, después se trocea para producir fragmentos de tejido pequeños que se transfieren a placas de cultivo tisular. Estos fragmentos de tejido después se usan como explantes primarios a partir de los cuales las células migran al sustrato de cultivo.

[0005] En otra publicación, Romanov y col. (Romanov y col., 2003) indican que

consiguieron aislar células de tipo células madres mesenquimales de vasculatura del cordón, aunque también indicaban que sus cultivos no contenían células de la GW. Específicamente, usan una sola digestión con colagenasa de 15 min de dentro de la vena umbilical, que da una población mixta de células endoteliales y subendoteliales vasculares. Romanov y col. mostraron que aparecía un escaso número de células de tipo fibroblastos de esta recolección de células después de 7 días.

[0006] Además, la patente de EE.UU. 5.919.702 describe un procedimiento para aislar “precondrocitos” de la GW de CU humano, y su uso para producir cartílago. En particular, el procedimiento comprende abrir longitudinalmente cortando una sección de 2,54 cm de cordón, separar por disección los vasos sanguíneos y la “envoltura”, que después se descartan, y recoger la GW en un envase estéril donde se corta en secciones de 2-3 mm² para el cultivo. En un procedimiento preferido, las células se aíslan poniendo una sección de 2-3 mm² de la GW en un portaobjetos de vidrio en la parte inferior de una placa Petri, cubriéndola con otro portaobjetos, y cultivándola durante 10-12 días con el fin de permitir que los “precondrocitos” migren al exterior de la superficie de la placa de cultivo.

[0007] Un objetivo de la presente invención es proporcionar una población de células que comprende células progenitoras humanas.

[0008] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una fuente a partir de la cual se puedan extraer células progenitoras humanas.

[0009] Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para aislar células progenitoras humanas.

[0010] Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar células osteoprogenitoras humanas útiles para la producción de tejido óseo.

[0011] Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar células progenitoras inmunoincompetentes humanas terapéuticamente útiles.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] No se ha ideado un procedimiento para extraer células de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano, que dé una población de células única caracterizada por la rápida proliferación, la presencia de células osteoprogenitoras y otras células progenitoras humanas, incluyendo células inmunoincompetentes que no presenten ninguno de los marcadores de histocompatibilidad mayor (doble negativo para el antígeno leucocitario humano (HLA)). La población de células es una fuente útil de células progenitoras a partir de las cuales cultivar hueso y otros tejidos conjuntivos, y para la transferencia autógena y alógena de células progenitoras a los

pacientes, para propósitos terapéuticos.

[0013] Más en particular, y según un aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto de gelatina de Wharton, en el que el extracto comprende células progenitoras humanas y se obtiene por digestión enzimática de la gelatina de Wharton próxima a la vasculatura del cordón umbilical humano, en una región llamada convenientemente la zona perivascular. El procedimiento de extracción da como resultado adecuadamente un extracto que carece esencialmente de células de la sangre del cordón umbilical, células epiteliales o células endoteliales del CU y células derivadas de la estructura vascular del cordón, en el que la estructura vascular se define como la túnica íntima, media y adventicia de los vasos arteriolares o venosos.

[0014] Según otro de sus aspectos, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener una célula progenitora humana, que comprende la etapa de aislar la célula del extracto de Wharton obtenido según la invención.

[0015] En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una población de células obtenida por cultivo de las células presentes en el extracto de la gelatina de Wharton. En unas realizaciones, se proporciona una población de células osteoprogenitoras. En otras realizaciones se proporciona una población de células progenitoras inmunoincompetentes.

[0016] La presente invención también proporciona una población de células osteoprogenitoras comprometidas caracterizadas por la propiedad de diferenciarse en células óseas cuando se cultivan en ausencia de complementos aparte de los requeridos para dicha diferenciación.

[0017] En otro de sus aspectos, la presente invención proporciona un procedimiento para producir tejido conjuntivo y en especial tejido óseo, que comprende la etapa de someter las células obtenidas del extracto de gelatina de Wharton a condiciones que conducen a la diferenciación de esas células en el fenotipo de tejido conjuntivo deseado. Con respecto a esto, la invención proporciona además el uso de dichas células en terapias basadas en células incluyendo el tratamiento mediado por trasplante de células de afecciones, enfermedades y trastornos médicos.

[0018] Estos y otros aspectos de la invención se describirán ahora con más detalle con referencia a los dibujos que acompañan, en los que:

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0019]

Figura 1. Es una micrografía óptica que representa las 3 zonas distintas de tejido representado en el CU humano.

Figura 2. Es una ilustración representativa del vaso en bucle en la disolución de colagenasa.

Figura 3. Es una micrografía óptica de las células aisladas de la GW que se han unido a la superficie de cultivo tisular de poliestireno.

5 **Figura 4.** Es una micrografía óptica que ilustra la formación inicial de una UFC-O.

Figura 5. Es una micrografía óptica que ilustra una UFC-O madura.

Figura 6. Muestra las UFC-O marcadas con tetraciclina con fluorescencia UV en una placa de cultivo tisular de poliestireno de 35 mm.

10 **Figura 7.** Ilustra una al lado de otra una micrografía óptica de contraste de fase y una micrografía de fluorescencia de la misma UFC-O marcada con tetraciclina.

Figura 8. Es una micrografía electrónica de barrido de una UFC-O madura en la superficie de poliestireno del cultivo tisular.

15 **Figura 9.** Es una micrografía electrónica de barrido de un corte transversal de una UFC-O que expone la matriz subyacente.

Figura 10. Es una micrografía electrónica de barrido de las fibras de colágeno ligeramente mineralizadas situadas en el borde adelantado de la UFC-O.

20 **Figura 11.** Es una micrografía electrónica de barrido de la matriz no colagenosa (vista como glóbulos) dejada en la interfase de poliestireno por células osteogénicas en diferenciación.

Figura 12. Es una micrografía electrónica de barrido de colágeno muy mineralizado que comprende el centro de una UFC-O madura.

25 **Figura 13.** Ilustra los datos de citometría de flujo que demuestran que las células derivadas de la GW son 77,4% negativas para MHC I y MHC II.

Figura 14. Es una reproducción en blanco y negro de un corte transversal teñido de tricomas de Masson del nódulo óseo, que muestra la distribución de colágeno en cuyas células han quedado atrapados (osteocitos), y la formación de multicapas de células periféricas, algunas de las cuales han quedado rodeadas por la matriz extracelular elaborada.

30 **Figura 15.** Muestra la expansión potencial de la población de la GW perivascular adherente en relación con la expansión de la subpoblación osteoprogenitora comprometida y la subpoblación osteoprogenitora total.

35 **Figura 16.** Muestra la proliferación de células de la GW perivascular de 0-

144 horas que ilustra una curva de crecimiento normal con una fase lag de 0-24 h, fase log de 24-72 horas y fase estacionaria de 72-120 horas. El tiempo de duplicación durante el periodo de cultivo entero es de 24 horas, mientras que durante la fase log es de 16 horas.

- 5 **Figura 17.** Muestra la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las células de la GW a lo largo de 5 pases, el cambio en su expresión debido la descongelación libre, y la posterior expresión debida al cultivo de nuevo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 **[0020]** La presente invención proporciona un extracto de gelatina de Wharton (GW), como una fuente de una población de células que proliferan rápidamente que comprende células progenitoras humanas, incluyendo células osteoprogenitoras así como células inmunoincompetentes.

- 15 **[0021]** Como se usa en esta memoria, la expresión “células progenitoras” se refiere a células que se diferenciarán en condiciones controladas y/o definidas en células de un fenotipo dado. Por lo tanto, una célula osteoprogenitora es una célula progenitora que estará comprometida para el linaje de osteoblastos, y finalmente formará tejido óseo cuando se cultive en condiciones establecidas para dicho cometido y diferenciación. Una célula progenitora que es “inmunoincompetente” es una célula
20 que tiene un fenotipo que es negativo para los antígenos de superficie asociados con los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II. Dicha célula progenitora también se denomina en el presente documento como una doble negativa para HLA.

- 25 **[0022]** La población de células extraída de la GW también se caracteriza por una “rápida proliferación”, que se refiere a la velocidad a la que las células extraídas crecerán con respecto a otras poblaciones de células progenitoras conocidas, en condiciones que son estándar para la expansión de células progenitoras. Como se apreciará en los resultados experimentales presentados en el presente documento, y como se muestra en la figura 16, la presente población de células progenitoras puede
30 duplicarse en al menos aproximadamente 25 horas y tan rápido como 15 horas, y por lo tanto se expande más rápidamente que otras poblaciones de células osteoprogenitoras conocidas y otras poblaciones de células progenitoras extraídas de la GW.

- 35 **[0023]** Las células y poblaciones de células de la presente invención se pueden obtener por extracción de la GW de cordón umbilical humano. A diferencia de la

técnica anterior, y según la presente invención, dichas células se extraen de la GW que está asociada con, es decir, próxima a, la pared exterior de la vasculatura umbilical. La gelatina de Wharton que está asociada o muy próxima a la superficie exterior de la vasculatura del cordón está en una región denominada zona perivascular, y normalmente permanece asociada con la vasculatura cuando los vasos son extirpados del cordón, como se hace por ejemplo para extraer la gelatina de Wharton del cordón, o para extraer los vasos del cordón y la gelatina de Wharton asociada. Se ha encontrado notablemente que la gelatina de Wharton en esta zona perivascular, y que típicamente se ha desechado en la práctica de la técnica anterior, es una fuente rica de células progenitoras que tienen las características descritas en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención explota la gelatina de Wharton de esta zona perivascular como una fuente para células progenitoras humanas útiles.

[0024] Para extraer dicha gelatina de Wharton del cordón umbilical humano, en una realización preferida, se tiene cuidado durante el procedimiento de extracción para evitar extraer células de la sangre del cordón umbilical, células epiteliales o células endoteliales del CU, y células derivadas de la estructura vascular del cordón, donde la estructura vascular se define como la túnica íntima, media y adventicia de vasos arteriales y venosos. La obtención de un extracto que carece esencialmente de estas células no deseadas, se puede lograr por barrido con gases y lavado cuidadosos del cordón umbilical antes de la disección, seguido de la cuidadosa disección de los vasos de dentro del cordón. Los vasos también se pueden apartar con cuidado del tejido de cordón que los rodea, en cuyo caso la gelatina de Wharton perivascular se separa con los vasos. Se apreciará que, incluso teniendo cuidado para evitar extraer estas células no deseadas, todavía pueden estar presentes en pequeña medida en el extracto resultante. Esto es aceptable, con la condición de que se produzca con una frecuencia demasiado baja para interferir con los resultados observados presentados en el presente documento, es decir, observación de colonias de células derivadas de mesénquima y específicamente de origen mesodérmico, frecuencia y rapidez de formación de UFC-O y caracterización de fenotipos de HLA observados en la población cultivada.

[0025] La GW que está en la zona perivascular es la gelatina de Wharton próxima a la pared externa de la vasculatura umbilical, y está típicamente en una zona que se extiende hasta aproximadamente 3 mm desde la pared externa de los vasos. Adecuadamente, la zona objetivo de extracción pueden estar en aproximadamente 2 mm, p. ej., aproximadamente 1 mm desde la pared externa de cualquiera de los 3 vasos. La extracción de la GW de esta región se puede lograr fácilmente usando la

técnica descrita en los ejemplos. En esta técnica, los vasos se usan como un vehículo para la GW, y los vasos que llevan gelatina por sí mismos, se usan como el sustrato a partir del cual se extraen las células progenitoras. Por lo tanto, en realizaciones de la invención, los vasos del cordón que llevan un fino recubrimiento de GW se extirpan quirúrgica o manualmente del cordón umbilical reciente que se ha lavado bien para separar esencialmente todos los contaminantes de sangre del cordón. Los vasos que llevan la gelatina de Wharton cercana, o secciones de los mismos, después se incuban a aproximadamente 37°C en un medio de extracción tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene una enzima adecuada para digerir la matriz de colágeno de la GW en la que residen las células deseadas. Para este propósito, es adecuada la digestión con una colagenasa, con una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/ml a 1,0 mg/ml o más, p. ej., 0,5 mg/ml. Durante la extracción, se atan o se separan completamente los extremos de los vasos y se pueden suspender en el medio de extracción anterior para evitar la contaminación por agentes contenidos en los vasos. Por lo tanto, se apreciará que el presente extracto de gelatina de Wharton carece esencialmente de células de sangre del cordón y células endoteliales de vasos.

[0026] Después de aproximadamente 24 horas en el medio de extracción, p. ej., 12-36 horas, tal como 18-24 horas, se separan los vasos dejando el extracto de gelatina de Wharton que contiene las células progenitoras humanas. Estas células se expanden en condiciones estándar para la expansión de células progenitoras. Las células se pueden, por ejemplo, seleccionar sobre poliestireno para seleccionar células adherentes, tal como en placas o matraces de poliestireno y después mantener en un medio de cultivo adecuado. En una realización de la invención, las células extraídas se cultivan para la expansión, con o sin selección previa para las células adherentes, en condiciones de suspensión agitada, como describen por ejemplo Baksh y col. en el documento WO02/086104.

[0027] Las células presentes en el extracto se pueden clasificar, directamente o después de su expansión, usando técnicas establecidas para proporcionar subpoblaciones expandibles enriquecidas en células de un fenotipo dado. Por lo tanto, la presente invención proporciona poblaciones de células extraídas de GW que están enriquecidas en células osteoprogenitoras, poblaciones de células que están enriquecidas en células progenitoras inmunoincompetentes, y poblaciones de células que están enriquecidas en células osteoprogenitoras que son inmunoincompetentes.

[0028] Como se pone de manifiesto en la figura 17, se ha encontrado que la

distribución de marcadores de MHC en la población de células progenitoras es alterada por la congelación-descongelación. Después del pase de las células recientes, la frecuencia de células doble negativas para MHC es relativamente constante/aumenta de forma insignificante. Sin embargo, se ha encontrado, como se indica en los 5 ejemplos del presente documento, que la frecuencia de células doble negativas para el MHC en la población progenitora aumenta significativamente en células cultivadas después de congelar. Por lo tanto, en la presente población de células progenitoras, las células del fenotipo doble negativo para MHC se caracterizan además por la propensión a aumentar en frecuencia después de congelación. Dicha congelación se 10 lleva a cabo de la forma habitual, preparando primero una parte alícuota de células, y después almacenando la preparación de células durante el periodo deseado. Se apreciará, que dichas células se pueden almacenar durante muchos años, si se desea.

[0029] En una realización, la presente invención proporciona por lo tanto, un procedimiento para producir células progenitoras doble negativas para MHC, 15 obteniendo un extracto de gelatina de Wharton como se describe en el presente documento, o una fracción del mismo enriquecido en doble negativas para MHC, sometiendo el extracto o fracción del mismo a congelación, y después cultivando las células congeladas. Las células resultantes, como se ha indicado, son potencialmente útiles para inducir la formación o reparación de tejidos en sujetos humanos.

20 **[0030]** Las poblaciones de células obtenidas del extracto o de una fracción del mismo adecuadamente enriquecido, son útiles directamente o después de su expansión para proporcionar poblaciones de células diferenciadas. Todos los procedimientos adecuados para su fraccionamiento y enriquecimiento, y para su expansión están establecidos en la técnica anterior, y se ilustran en el presente documento. La 25 expansión se puede desarrollar, por ejemplo, en presencia de factores tales como IL-3 y factor de células madre, y agentes similares conocidos en la técnica. En una realización, la presente población de células, y en particular las células osteoprogenitoras contenidas en la misma, se someten a diferenciación usando condiciones establecidas para el crecimiento de tejido óseo a partir de las mismas. Es 30 notable que una subpoblación de células osteoprogenitoras que proceden del cultivo de la presente población de células progenitoras, denominadas osteoprogenitoras comprometidas, han mostrado la capacidad de diferenciarse en ausencia de complementos osteogénicos. Alternativamente, las células osteoprogenitoras se cultivan en medio complementado con uno o más agentes que estimulan la 35 osteogénesis, tales como dexametasona. Además, las células progenitoras también se

pueden cultivar con complementos adecuados para estimular la diferenciación en otros tejidos conjuntivos derivados de la mesénquima (Caplan, 1991), incluyendo cartílago, músculo, tendón, tejido adiposo, etc., todos según la práctica estándar en la técnica.

[0031] Como una alternativa práctica al cultivo *in vitro* de células en la presente población de células, se apreciará que las células se pueden trasplantar *in vivo* para inducir la formación de un tejido deseado en un paciente. Por esta vía, se proporciona la formación *in situ* de hueso implantando osteoprogenitoras, para el beneficio de pacientes que padecen diferentes afecciones, enfermedades y trastornos óseos, en particular incluyendo la fractura ósea y la osteoporosis. Las células progenitoras inmunoincompetentes presentes en la población de células son particularmente valiosas a este respecto, dada la respuesta de rechazo sustancialmente reducida que se puede esperar después de su implantación.

[0032] En los siguientes ejemplos se describen realizaciones de la invención.

Recolección de células progenitoras de gelatina de Wharton humana

[0033] Se recogieron los CU de bebés de la sección de cesáreas de recién nacidos a término inmediatamente tras el parto en el Sunnybrook & Women's College Hospital, Toronto, Canadá. El cirujano transfirió el CU a recipientes estériles que contenían medio (α -MEM al 75%, suero bovino fetal (FBS) al 15%, antibióticos al 10%), y se transportaron inmediatamente a los laboratorios de los autores de la invención en el Institute of Biomaterials & Biomedical Engineering, University of Toronto.

[0034] A partir de este punto, todos los procedimientos se llevaron a cabo de forma aséptica en cabinas de seguridad biológica. El CU se lavó en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) ($-\text{Mg}^{2+}$, $-\text{Ca}^{2+}$) 3 veces para separar toda la sangre posible del CU, y se volvió a transferir a un envase con medio. Se cortó una longitud de aproximadamente 6 cm de cordón con tijeras estériles y se puso en una plancha de disección de corcho estéril. El reto del cordón (30-45 cm) se devolvió al envase lleno de medio y se puso en un incubador a 37°C. La sección de 6 cm se "retorció" contra su hélice, y se sujetó en ambos extremos para poner de manifiesto una superficie lisa y recta del epitelio del CU. Usando tijeras finas el CU se cortó 1-2 mm de profundidad a lo largo de su longitud para poner de manifiesto la GW. Empezando por cada "solapa" de epitelio cortado, la GW se separó de su superficie interior usando el extremo romo de un escalpelo, y el epitelio separado (aproximadamente 0,5 mm de grosor) se fijó con alfileres. Este procedimiento dio como resultado que la GW quedara expuesta, y sus 3 vasos insertados en la misma iban de un extremo al otro en lugar de en hélice a lo

largo de su eje longitudinal. Se tuvo cuidado de bañar constantemente la sección en PBS a 37°C. Se aisló uno de los extremos de un vaso con pinzas, se separó de la GW a lo largo de su longitud hasta que quedó libre de la masa de la matriz de GW. Alternativamente, se podía diseccionar el medio del vaso de la matriz, sujetar con pinzas y separarlo de la matriz en cada dirección hacia su extremo. Una vez liberado por cualquiera de los procedimientos, el vaso estaba rodeado con aproximadamente 1-2 mm de la matriz de GW que lleva células. El vaso diseccionado después se sujetó por ambos extremos con una pinza quirúrgica, pinza mosquito o se suturaron para crear un “bucle”, bloqueando el paso de fluido hacia dentro o hacia fuera del vaso. El “bucle” se puso inmediatamente junto con las tijeras en un tubo de 15 ml que contenía disolución de colagenasa 0,5 mg/ml con PBS (-Mg²⁺, -Ca²⁺), y se puso en un incubador a 37°C. Los otros dos vasos restantes se diseccionaron de una forma similar, se hizo un bucle y se pusieron también en la disolución de colagenasa en el incubador. Después de separar los vasos, se podían diseccionar fácilmente tiras de GW del epitelio y ponerlas en tubos de 15 ml con la disolución de colagenasa. Después, el resto de la capa epitelial se desechó en un recipiente de residuos biopeligrosos. Se usó el mismo protocolo con los 30-45 cm restantes de CU, produciendo 15 a 25 tubos con “bucles” o tiras de GW.

Inicio de los cultivos de células progenitoras de la gelatina de Wharton

20 **[0035]** Después de 18-24 horas, los “bucles” se sacaron con la ayuda de su pinza de suspensión unida o sutura y una pipeta, y el resto de las suspensiones se cultivaron directamente en placas de poliestireno de cultivo tisular T-75 cm², y se dejaron reposar durante 72 horas con el fin de permitir que las células se unieran a la superficie de poliestireno. Después se cambió el medio cada dos días.

25 **[0036]** Las células unidas se pasaron de cultivo usando disolución de tripsina al 1% después de 7 días, momento en el que presentaban 80-90% de confluencia, observado por microscopía óptica, y había pruebas de formación de agregados “mineralizados, puesto de manifiesto por microscopía de fase, e indicado por los cambios esperados en las propiedades ópticas. Tras el pase, las células se cultivaron en 30 placas de poliestireno de cultivo tisular de 35 mm o placas de 6 pocillos con 1x10⁴ células/cm² en α -MEM al 75%, FBS al 15%, antibióticos al 10% y se trataron con Dex 10⁻⁸ M, β -GP 5 M y ácido ascórbico 50 μ g/ml para ensayar la capacidad osteogénica de estas células. Se observó en estas placas los días 2, 3, 4 y 5 de cultivo las UFC-O, denominado también formación de “nódulo óseo”.

35 **[0037]** Se ha adoptado otro procedimiento útil para obtener los cultivos de células

progenitoras de gelatina de Wharton, usando el siguiente protocolo:

1. Obtener cordón umbilical (CU) estéril de paciente de la sección de cesáreas y transportarlo a una cabina de seguridad biológica en medio (α -MEM al 80%, antibióticos al 20%).
- 5 2. Lavar el CU 2x en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril a 37°C.
3. Cortar el CU en secciones de aproximadamente 2,5-5 cm con unas tijeras afiladas.
4. Lavar cada sección de CU 2x en PBS estéril a 37°C para separar toda la
10 sangre residual posible del cordón umbilical (SCU).
5. Aislar una de las secciones de CU en una placa estéril y seca.
6. Usando dos juegos de fórceps, coger el epitelio con aproximadamente 2 mm de separación, y tirar separando uno de otro, arrancando el epitelio.
7. Sujetar el epitelio a lo largo de la longitud de la sección de CU,
15 continuar arrancando el epitelio, exponiendo la GW bajo el mismo.
8. De forma similar a la etapa 6, continuar arrancando el epitelio en “tiras” hasta que se haya rasgado aproximadamente la mitad del epitelio.
9. Los vasos umbilicales deberían estar muy claramente visibles a través de la GW, y los extremos sueltos en los bordes cortados de la sección de CU.
- 20 10. Sujetando una parte restante del epitelio con un juego de fórceps, y el extremo de un vaso con el otro, se puede tirar del vaso de la masa de GW con la GWPV que lo rodea.
11. Este procedimiento se repite con cada vaso, hasta que los tres están libres de la matriz de GW subyacente.
- 25 12. Una vez liberados, cada vaso se pone en PBS a 37°C.
13. Las etapas 5-12 se repiten con cada sección de CU hasta que se han aislado todos los vasos en un vaso de precipitados lleno de PBS a 37°C.
14. Después, poniendo cada vaso individualmente en una superficie limpia y estéril, los extremos se pueden ligar entre sí en un “bucle” con una sutura usando un
30 doble nudo.
15. Una vez que se han ligado todos los vasos en bucles, los bucles se ponen en una disolución de colagenasa 1 mg/ml en un tubo estéril de 50 ml.
16. El tubo de 50 ml se pone en un rotor en un incubador con CO₂ al 5% a 37°C durante la noche.
- 35 17. Al día siguiente, la colagenasa se inactiva con 1 ml de suero bovino

fetal (FBS) y los bucles se sacan de la suspensión.

18. La suspensión que queda se diluye con PBS, se centrifuga a 1150 rpm durante 5 minutos, y se separa el líquido sobrenadante.

19. Las células restantes en el sedimento se vuelven a suspender en medio complementado (SM) (α -MEM al 75%, FBS al 15%, antibióticos al 20%) y se hace el recuento de una parte alícuota en un hemocitómetro.

20. La suspensión de células después se cultiva en un matraz de poliestireno de cultivo tisular T-25, y se deja proliferar.

21. El SM se cambia cada 2 días hasta que las células alcanzan la subconfluencia (1-2 semanas), momento en el se subcultivan (pases).

ENSAYOS DE DE CÉLULAS PROGENITORAS

Ensayo de proliferación celular

[0038] Durante el procedimiento de pase semanal (que se producía cada 6 días), se cultivaron partes alícuotas de 2×10^5 células en 20 matraces de poliestireno de cultivo tisular T-25 cm². Los días 2, 4, 6, 10 y 12 de cultivo, cuatro de los matraces T-25 se pasaron y se contaron las células. Se representó gráficamente la expansión exponencial de estas células y se calculó el tiempo medio de duplicación de las células en estos cultivos. Los resultados se muestran en la figura 16. Se observará que el tiempo de duplicación para el cultivo de células GWPV es aproximadamente 24 horas a lo largo de todo el periodo de cultivo. Durante la fase log, el tiempo de duplicación es, notablemente, de 16 horas. Esto se compara con los tiempos de duplicación descritos en la bibliografía de aproximadamente 33 horas para las células mesenquimales de médula ósea (Conget, P., J.J. Minguell, 1999, Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells: *Journal of Cell Physiology*, v. 181, pág. 67-73.), y aproximadamente 3,2 días para células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Sen, A., *J. Cell Biochem.*, v. 81, pág. 312-319).

[0039] Como se muestra en la figura 15, las células progenitoras derivadas de la gelatina de Wharton perivascular (GWPV) comprenden diferentes subpoblaciones de células progenitoras. Dentro de esta población, hay también las llamadas células osteoprogenitoras “comprometidas” caracterizadas por la capacidad de formar nódulos óseos, como se muestra en el presente documento, en ausencia de complementos de cultivo normalmente necesarios para inducir dicha diferenciación, tal como cultivo en presencia de dexametasona. Estas células osteoprogenitoras comprometidas se diferencian, por lo tanto, de forma espontánea para formar nódulos óseos. También dentro de la población progenitora de la GWPV hay células osteoprogenitoras que

pueden ser inducidas para formar nódulos óseos, cuando se cultivan en presencia de los factores requeridos, tales como dexametasona, β -glicerofosfato y ácido ascórbico. Por lo tanto, la subpoblación “osteoprogenitora total” representada gráficamente en la figura 15 incluye la población “osteoprogenitora comprometida” así como la población “osteoprogenitora no comprometida”, y pone de manifiesto el número total de células que se pueden inducir para diferenciar el linaje osteogénico. La relación real entre población “comprometida” y “no comprometida” es aproximadamente 1:1, y por lo tanto la relación entre la población “osteoprogenitora total” y la población “osteoprogenitora comprometida” es aproximadamente 2:1. El análisis de las propiedades de formación de hueso de las células progenitoras se llevó a cabo como se indica a continuación.

Ensayo de UFC-O

[0040] Durante el procedimiento de pase semanal, se cultivaron directamente partes alícuotas de las poblaciones de células de ensayo en poliestireno de cultivo tisular en medio de formación de hueso que contenía α -MEM al 75%, FBS al 15% (lote de células madre n^o: S13E40), disolución madre de antibióticos al 10% que contenía penicilina G (167 unidades/ml), gentamicina (50 μ g/ml) y anfotericina B (0,3 μ g/ml), y Dex (10^{-8} M), β -glicerofosfato (5 mM) y ácido L-ascórbico (50 μ g/ml), con una densidad de siembra celular de 1×10^4 células/cm². Los cultivos se volvieron a alimentar cada dos días durante un periodo de 12 días. Los cultivos se mantuvieron hasta que se observaron áreas nodulares mineralizadas, detectadas como nódulos óseos (normalmente 3 días) momento en el que se volvió a alimentar a los cultivos con medio que contenía tetraciclina en la última realimentación del cultivo, después se fijaron en fijador Karnovsky y se prepararon para el análisis. Se usó un microscopio Leitz Aristoplan (Esselte Leitz GmbH & Co KG, Stuttgart, Alemania) para visualizar los cultivos marcados con tetraciclina, con fase de contraste, así como la fluorescencia UV y un microscopio electrónica de barrido Hitachi S-2000 con un voltaje de aceleración de 15 kV para generar imágenes para demostrar la presencia de matriz ósea identificable por morfología.

30 ANÁLISIS DE DATOS

Tinción de tetraciclina

[0041] Se añadió tetraciclina (9 μ g/ml) a los cultivos antes de terminar. Al terminar, las células se fijaron en fijador de Karnovsky durante la noche y después se examinaron por generación de imágenes de fluorescencia con excitación UV para el marcaje de la tetraciclina del componente mineral de las zonas nodulares.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

[0042] Se prepararon muestras representativas de cultivos de UFC-O para la SEM poniéndolas primero en etanol al 70%, 80%, 90% y 95% durante 1 hora, seguido de inmersión en etanol al 100% durante 3 horas. Después se secaron hasta punto crítico.

5 Se aplicó una capa de revestimiento por pulverización catódica de oro de aproximadamente 3 nm con un sistema de revestimiento SEM Polaron SC515 SEM, sobre las muestras, las cuales después se examinaron con diferentes aumentos en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2000 con un voltaje de aceleración de 15 kV. Las imágenes generadas se usan para demostrar la presencia de matriz ósea
10 identificable por morfología.

Citometría de flujo para la clasificación de HLA

[0043] Se lavaron poblaciones de células de ensayo de $>1 \times 10^5$ células en PBS que contenía FBS al 2% (Lote de células madre n°: S13E40) y se volvieron a suspender en PBS + FBS al 2% con concentraciones de saturación (dilución 1:100) de
15 las siguientes IgG1 de ratón conjugadas con HLA-A,B,C-PE y HLA-DR,DP, DQ-FITC durante 30 minutos a 4°C. La suspensión de células se lavó dos veces con PBS + FBS al 2%, se tiñó con 7-AAD 1 µg/ml (BD Biosciences) y se volvió a suspender en PBS + FBS al 2% para el análisis en un citómetro de flujo (XL, Beckman-Coulter, Miami, FL) usando el software ExpoADCXL4 (Beckman-Coulter). La tinción positiva
20 se definió como la emisión de una señal de fluorescencia que superaba los niveles obtenidos por >99% de las células de la población de control teñida con anticuerpos de isotipo emparejado (IgG1 de ratón conjugada con FITC- y PE, referencias de isotipo monoclonal κ , BD Biosciences). Para cada muestra, se recogieron al menos 10.000 sucesos de modo lista. Todas las gráficas se generaron con el software de análisis
25 EXPO 32 ADC.

RESULTADOS**Micrografías ópticas de colonias de nódulos óseos**

[0044] Las figuras 3, 4 y 5 ilustran las UFC-O que estaban presentes en los cultivos el día 3 y el día 5. Demostraban la capa confluyente de células de “tipo
30 fibroblástico” que rodea una zona nodular representada por una “agregado” de células poligonales que producían la matriz ósea. Estas UFC-O se observaron en cultivos tanto Dex(+) como Dex(-), y presentaban una morfología similar después de sucesivos pases.

Marcaje de tetraciclina de los cultivos de UFC-O

35 [0045] El marcaje con tetraciclina de los cultivos se usó para marcar el fosfato de

calcio recién formado asociado con la fase mineral biológica del hueso. El marcaje de tetraciclina de los cultivos coincide con las zonas nodulares mineralizadas, que se visualizan exponiendo los cultivos a luz UV. Las figuras 6 y 7 representan cultivos de UFC-O marcadas con tetraciclina el día 3 y el día 5 de cultivos de células progenitoras de la GW. Estas imágenes se generaron por imágenes de fluorescencia con excitación UV, y se fotografiaron.

Microscopía electrónica de barrido

[0046] Se observó en las UFC-O mediante SEM la formación de matriz de colágeno mineralizado que demuestra la formación de las UFC-O desde las etapas iniciales de formación de colágeno hasta la matriz densamente mineralizada en las UFC-O maduras. Las figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 14 representan micrografías electrónicas de barrido de las UFC-O.

Citometría de flujo y clasificación de HLA

[0047] La citometría de flujo, que identifica antígenos de superficie celular que representan ambos complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), demostró 77,4% de población de células aisladas como MHC-/. La figura 13 ilustra los resultados de la citometría de flujo en relación con el control negativo. La figura 17 muestra el impacto de la congelación-descongelación en la frecuencia de células MHC-/- en la población progenitora. El efecto de la congelación-descongelación se estudió como sigue:

[0048] Se lavaron poblaciones de células de ensayo de $>1 \times 10^5$ células en PBS que contenía FBS al 2% y se volvieron a suspender en PBS + FBS al 2% con concentraciones de saturación (dilución 1:100) de las siguientes IgG1 de ratón conjugadas con HLA-A,B,C-PE PE (BD Biosciences n° 555553, Lote M076246) (MHC I), HLA-DR,DP,DQ-FITC (BD Biosciences n° 555558, Lote M074842) (MHC II) y CD45-Cy-Cychrome (BD Biosciences n° 555484, Lote 0000035746) durante 30 minutos a 4°C. La suspensión de células se lavó 2 veces con PBS + FBS al 2%, para el análisis en un citómetro de flujo (XL, Beckman-Coulter, Miami, FL) usando el software ExpoADCXL4 (Beckman-Coulter). La tinción positiva se definió como la emisión de una señal de fluorescencia que superaba los niveles obtenidos por >99% de las células de la población de control teñida con anticuerpos de isotipo emparejado (IgG1 de ratón conjugada con FITC-, PE y Cy-cychrome, referencias de isotipo monoclonal κ , BD Biosciences), que se confirmó por fluorescencia positiva de muestras BM humanas. Para cada muestra, se recogieron al menos 10.000 sucesos de modo lista. Todas las gráficas se generaron con el software de análisis EXPO 32 ADC.

Subcultivo y siembra de células

[0049] Las células unidas se subcultivaron (pases) usando disolución de tripsina al 0,1% después de 7 días, momento en el que presentaban 80-90% de confluencia observado por microscopía óptica. Tras el pase, se observó en las células de la GWPV (gelatina de Wharton perivascular) la expresión de MHC-A,B,C, MHC-DR,DP, DQ, y CD45. Después se cultivaron en matraces de poliestireno de cultivo tisular T-75 con 4×10^3 células/cm² en SM, y se trataron con Dex 10^{-8} M, β -GP 5 mM y ácido ascórbico 50 μ g/ml para ensayar la capacidad osteogénica de estas células. Se observó en los matraces los días 2, 3, 4, 5 y 6 de cultivo la formación de UFC-O o nódulo óseo.

10 Cualesquiera células residuales del procedimiento de pases también se crioconservaron para su uso futuro.

Crioconservación de células

[0050] Se prepararon partes alícuotas de 1×10^6 células de la GWPV en 1 ml de volumen total que contenía FBS al 90%, dimetilsulfóxido al 10% (DMSO) (Sigma D-2650, Lote nº 11K2320), y se añadió con pipeta a crioviales de polipropileno de 1 ml. Los viales se pusieron en un congelador a -70°C durante la noche, y al día siguiente se transfirieron a un congelador a -150°C para el almacenamiento a largo plazo. Después de 1 semana de crioconservación, las células de GWPV se descongelaron y se observó por citometría de flujo la expresión de MHC-A,B,C, MHC-DR,DP,DQ, y CD45. Se usó un segundo protocolo en el que se descongelaron las células de GWPV después de 1 semana de crioconservación, se volvieron a cultivar durante 1 semana, se subcultivaron y se volvió a analizar por citometría de flujo la expresión de MHC-A,B,C, MHC-DR,DP,DQ, y CD45.

15
20

[0051] Los resultados se presentan en la figura 17. Se observará que la frecuencia de MHC-/- en la población de células reciente se mantiene a través de varios pases. Cuando las células recientes se congelan después de los pases, a -150°C durante 1 semana y después se analiza inmediatamente el fenotipo de MHC, esta población analizada presenta una frecuencia notablemente potenciada de células de fenotipo MHC-/. Por lo tanto, y según una realización de la presente invención, las células del fenotipo MHC-/- se pueden enriquecer de forma útil a partir de una población de células de GWPV por congelación. Se realiza todavía más enriquecimiento mediante el pase de los cultivos de las células previamente congeladas. Las células de GWPV congeladas son por sí mismas potencialmente muy útiles en terapia humana, dada su inmunoincompetencia.

25
30

[0052] Como se ha indicado, la población de células progenitoras de GWPV

35

también se puede explotar para dar lugar a células mesenquimales y tejidos distintos del óseo, mediante cultivo en condiciones adecuadas para dicha diferenciación. Para generar adipocitos, por ejemplo, las células progenitoras se preparan en una concentración de 10^4 células/cm² y se cultivan en placas de cultivo tisular de 35 mm.

5 Las células se mantienen en medio de preadipocitos (PM) (DMEM/F-10 de Ham (1:1, vol/vol), suero de ternero fetal al 10%, HEPES 15 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml) durante 3 días. Después de 3 días, se separa el medio PM y las células se alimentan con medio adipogénico (caldo nutriente DMEM/ F-10 de Ham, 1:1, vol/vol; tampón HEPES (15 mM); suero bovino fetal (al 3%); Biotina (33 µM), Pantotenato (17 µM), insulina humana (100 nM), dexametasona (0,5 µM), agonista PPAR γ (1 µM) y antibióticos), y se cultivaron durante 3 días. Después del día 3 de inducción, se separa el medio angiogénico, y los cultivos se mantienen en medio de adipocitos (AM) (DMEM/F-10 de Ham (1:1, vol/vol), suero de ternero fetal al 3%, dexametasona 1 µM, insulina humana 100 nM,

10 D-biotina 33 µM, pantotenato Na 17 µM, HEPES 15 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml), con alimentación regular cada 3 días, asegurándose de separar solo la mitad del medio, rellenando con un volumen igual de AM ya que los adipocitos flotarán si se separa todo el medio. Después de 4 alimentaciones (12 días), las células aparecen redondas con gotitas de lípidos. La

20 identificación positiva de las células mesenquimales diferenciadas en adipocitos se puede confirmar por tinción con Oil Red O y Nile Red.

[0053] Igualmente, se pueden generar condrocitos usando suspensiones celulares preparadas con una concentración de 10^4 células/cm² y cultivadas en placas de cultivo tisular de 35 mm. Para la estimulación, las células condrogénicas se cultivan sin suero

25 y con factor de crecimiento transformante β 3. Los sedimentos celulares desarrollan una morfología rica en matriz de multicapas y presentan histológicamente una mayor matriz extracelular rica en proteoglicanos durante el cultivo.

[0054] Para generar mioblastos, las suspensiones celulares se preparan en una concentración de 10^4 células/cm² y se cultivan en placas de cultivo tisular de 35 mm.

30 Las células se mantienen en medio MCDB 120 completado con suero bovino fetal (FBS) al 15% durante 1 semana (medio de proliferación de mioblastos, MPM). Después de 1 semana, el nivel de suero en el medio basal (MPM) se reduce a 2% (medio de diferenciación de mioblastos, MDM) y los cultivos se terminan después de 7 días. Los cultivos se vuelven a alimentar 3 veces por semana con el medio de cultivo

35 adecuado.

[0055] Se apreciará por lo tanto, que la presente invención proporciona células progenitoras humanas que tienen propiedades útiles en la producción de diferentes tejidos conjuntivos, incluyendo el hueso, y además proporciona células progenitoras que son inmunoincompetentes e ideales para el trasplante a pacientes humanos para
5 tratar afecciones del tejido conjuntivo, incluyendo enfermedades y trastornos óseos. Las células progenitoras humanas se generan a partir de extractos de una zona particular de la gelatina de Wharton de cordón umbilical humano, denominada zona perivascular, que se extiende desde cerca de la pared externa de los vasos del cordón. La población de células extraída de esta zona presenta propiedades notables,
10 incluyendo la rápida proliferación, cambios en la morfología celular, constatado por la formación de colonias de células que se producen antes del día 7 en todos los matraces subcultivados (aproximadamente 7-10 duplicaciones) y el aspecto de la formación del nódulo óseo sin la adición de complementos osteogénicos al medio de cultivo, así como la relativamente alta frecuencia de células doble negativas para MHC, cuya
15 frecuencia aumenta tras el cultivo de las células que han sido congeladas.

Referencias:

[0056]

- Aubin, J.E., 1998, Bone stem cells: *J. Cell Biochem. Suppl.*, v. 30-31, pág. 73-82.
- 20 Beckstead, J.H., D.F. Bainton, 1980, Enzyme histochemistry on bone marrow biopsies: reactions useful in the differential diagnosis of leukemia and lymphoma applied to 2-micron plastic sections: *Blood*, v. 55, pág. 386-394.
- Beckstead, J.H., P.S. Halverson, C.A. Ries, D.F. Bainton, 1981, Enzyme histochemistry and immunohistochemistry on biopsy specimens of pathologic human
25 bone marrow: *Blood*, v. 57, pág. 1088-1098.
- Canfield, A.E., M.J. Doherty, B.A. Ashton, 2000, Osteogenic potential of vascular pericytes, en JE Davies (ed), *Bone Engineering*: Toronto, EM Squared, Inc., pág. 143-151.
- Caplan, A.I., 1991, Mesenchymal stem cells: *J. Orthop. Res.*, v. 9, pág.
30 641-650.
- Chacko, A.W., S.R.M. Reynolds, 1954, Architecture of distended and nondistended human umbilical cord tissues, with special reference to the arteries and veins.: *Carnegie Institution of Washington, Contributions to Embryology*, v. 35, pág. 135-150.
- 35 Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, N.N. Kulagina, 1976, Fibroblast

precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs: *Exp. Hematol.*, v. 4, pág. 267-274.

Mitchell, K.E., M.L. Weiss, B.M. Mitchell, P. Martin, D. Davis, L. Morales, B. Helwig, M. Beerenstrauch, K. Abou-Easa, T. Hildreth, D. Troyer, 2003, Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia: *Stem Cells*, v. 21, pág. 50-60.

Nanaev, A.K., G. Kohnen, A.P. Milovanov, S.P. Domogatsky, P. Kaufmann, 1997, Stromal Differentiation and Architecture of the Human Umbilical Cord: *Placenta*, v. 18, pág. 53-64.

10 Parry, E.W., 1970, Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord: *Journal of Anatomy*, v. 107, pág. 505-518.

Pereda, J., P.M. Motta, 2002, New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac: *Medical Electron*
15 *Microscopy*, v. 32, pág. 67-78.

Romanov, Y.A., V.A. Svintsitskaya, V.N Smirnov, 2003, Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord: *Stem Cells*, v. 21, pág. 105-110.

Schoenberg, M.D., A. Hinman, R.D. Moore, 1960, Studies on connective
20 tissue V, Feber formation in Wharton's Jelly.: *Laboratory Investigation*, v. 9, pág. 350-355.

Takechi, K., Y. Kuwabara, M. Mizuno, 1993, Ultrastructural and Immunohistochemical Studies of Wharton's Jelly Umbilical Cord Cells: *Placenta*, v. 14, pág. 235-245.

25 Tuchmann-Duplessis, H., G. David, P. Haegel, 1972, Illustrated Human Embryology, New York, Springer-Verlag, pág. 54-61.

Weiss, L., 1983, Histology: cell and tissue biology, New York, *Elseiver Biomedical*, pág. 997-998.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener una población de células progenitoras humanas, que comprende la etapa de extraer dicha población de la gelatina de Wharton
5 en la zona perivascular del cordón umbilical humano, en el que la población comprende células osteoprogenitoras comprometidas y células progenitoras que tienen un fenotipo doble negativo para MHC, y además en el que dicha población se expande más rápidamente que otras poblaciones de células progenitoras extraídas de la gelatina de Wharton.
10
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de extracción se lleva a cabo en vasos diseccionados del cordón umbilical.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que
15 dicha gelatina de Wharton se somete a digestión enzimática en un medio de extracción de células adecuado.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la digestión enzimática da como resultado la liberación de células de la matriz de colágeno de
20 dicha gelatina de Wharton.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la etapa de extracción de células se lleva a cabo a 37°C en disolución salina tamponada con fosfato y colagenasa de 0,1 a 1,0 mg/ml, durante un periodo de 12 a 36 horas.
25
6. Un procedimiento para producir una población de células que comprende células progenitoras humanas, que comprende la etapa de cultivar células obtenidas por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 7. El procedimiento según cualquier reivindicación precedente, que comprende la etapa adicional de tratar dicha población de células para enriquecerla en células osteoprogenitoras.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que
35 comprende la etapa adicional de tratar dicha población para el enriquecimiento en

células progenitoras que tienen un fenotipo doble negativo para MHC.

9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha población se somete a una etapa de congelación/descongelación para el enriquecimiento en células
5 progenitoras que tienen el fenotipo doble negativo para MHC.

10. Una población de células aisladas que comprende células progenitoras humanas, en la que la población de células (1) se puede extraer de la gelatina de Wharton en la zona perivascular del cordón umbilical humano, (2) se expande más
10 rápidamente que otras poblaciones de células progenitoras extraídas de la gelatina de Wharton, (3) comprende células osteoprogenitoras comprometidas, y (4) comprende células progenitoras que tienen un fenotipo doble negativo para MHC.

11. Una población de células que es una subpoblación de la población de
15 células según la reivindicación 10, en la que dicha subpoblación está enriquecida en células progenitoras que tienen un fenotipo doble negativo para MHC.

12. Una población de células según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a
20 11, en un estado criconservado.

13. Un procedimiento para producir células óseas, que comprende la etapa de cultivar una población de células según la reivindicación 10, en condiciones para inducir su diferenciación en células óseas.

25 14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que dichas células se cultivan en ausencia de complementos osteogénicos.

15. Un procedimiento para producir adipocitos, que comprende la etapa de cultivar una población de células según la reivindicación 10, en condiciones para
30 inducir su diferenciación en adipocitos.

16. Un procedimiento para producir mioblastos, que comprende la etapa de cultivar una población de células según la reivindicación 10, en condiciones para inducir su diferenciación en mioblastos.

35

17. El uso de una población de células según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección, enfermedad o trastorno médico.

5 18. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la etapa adicional de tratar dicha población para enriquecerla en células progenitoras que tienen un fenotipo alterado para MHC.

19. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9 y 13 a 18, en el que la población de células progenitoras humanas carece esencialmente de células derivadas
10 de la estructura vascular del cordón.

20. Una población de células aisladas según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que la población carece esencialmente de células derivadas de la estructura vascular del cordón.

15

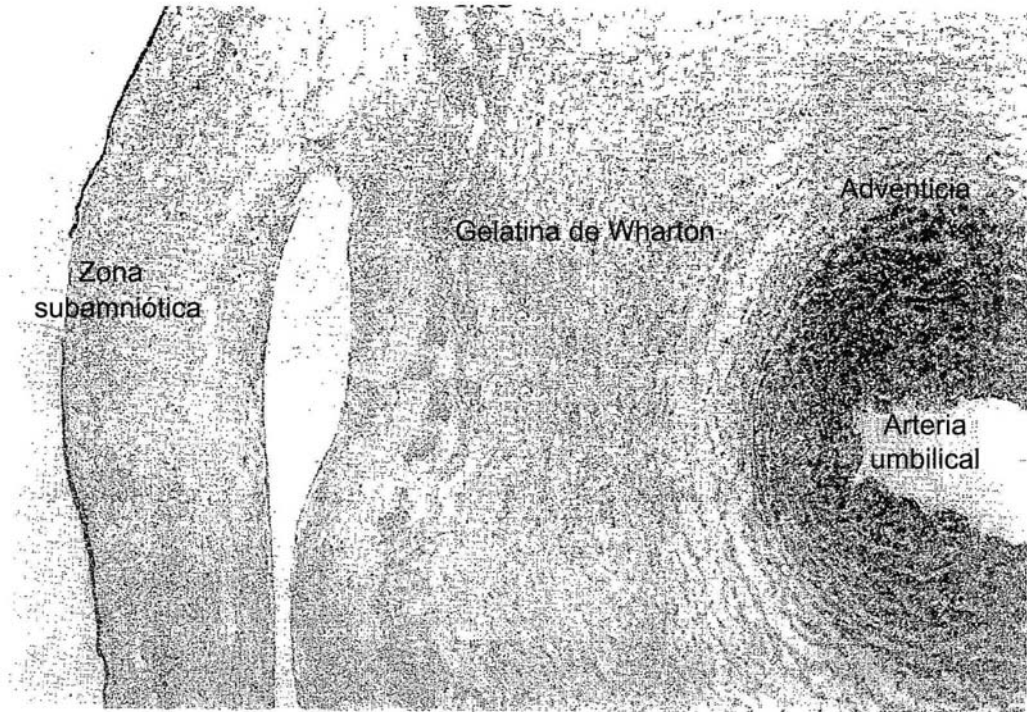


Figura 1

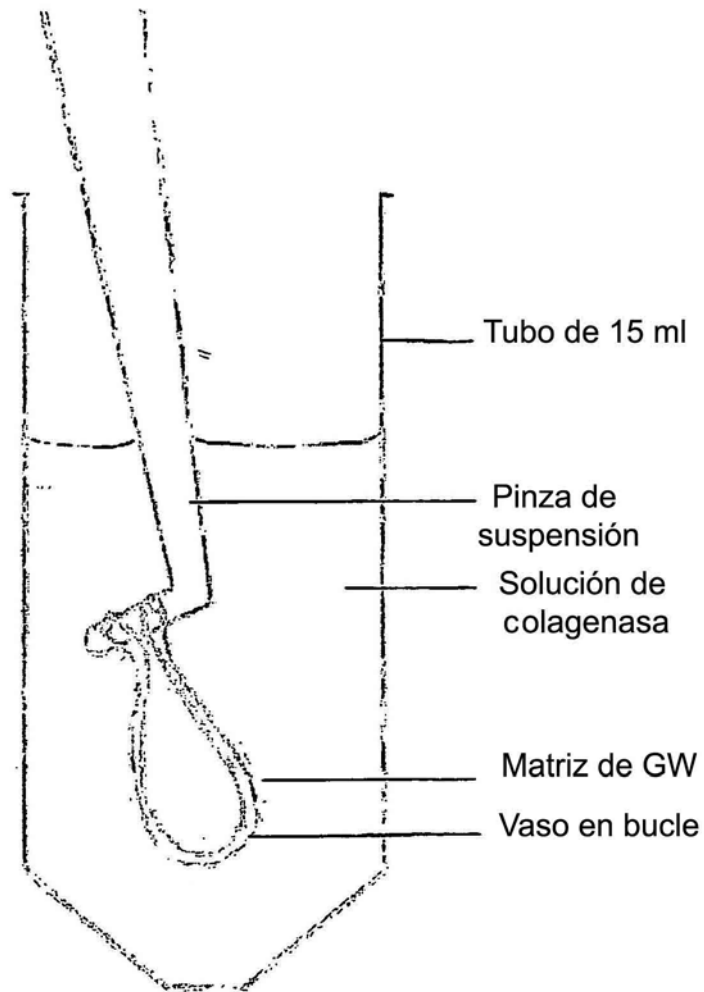


Figura 2

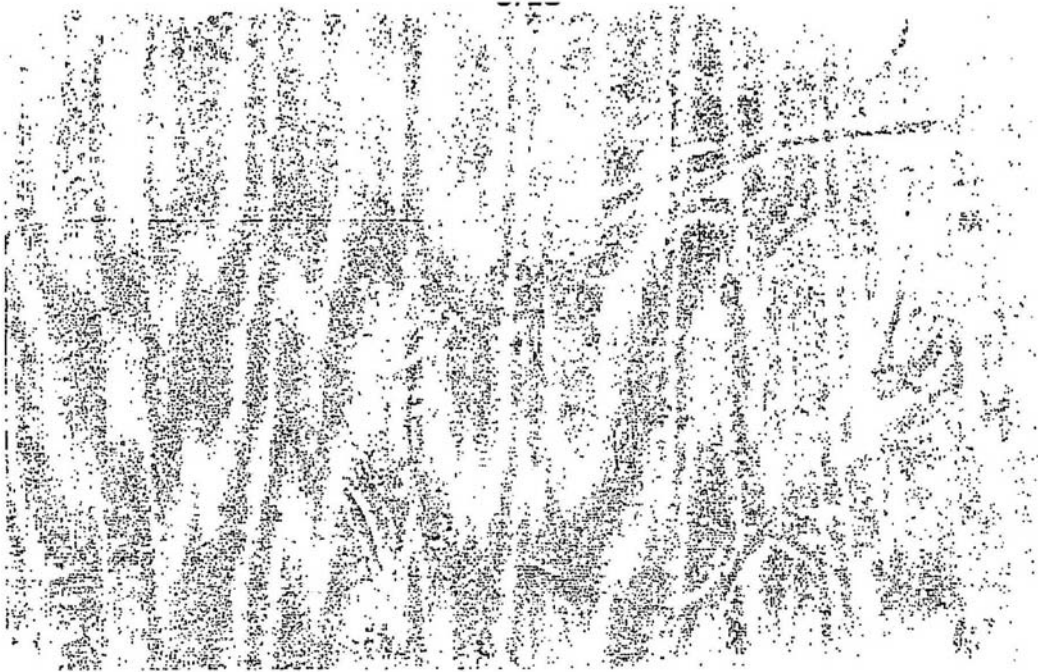


Figura 3



Figura 4

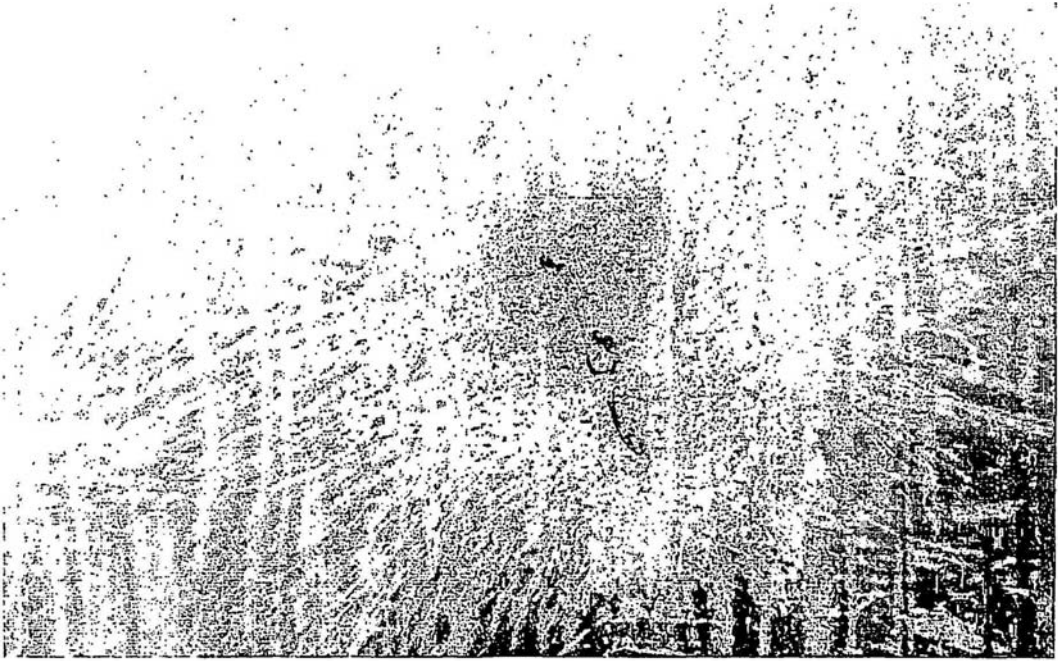


Figura 5

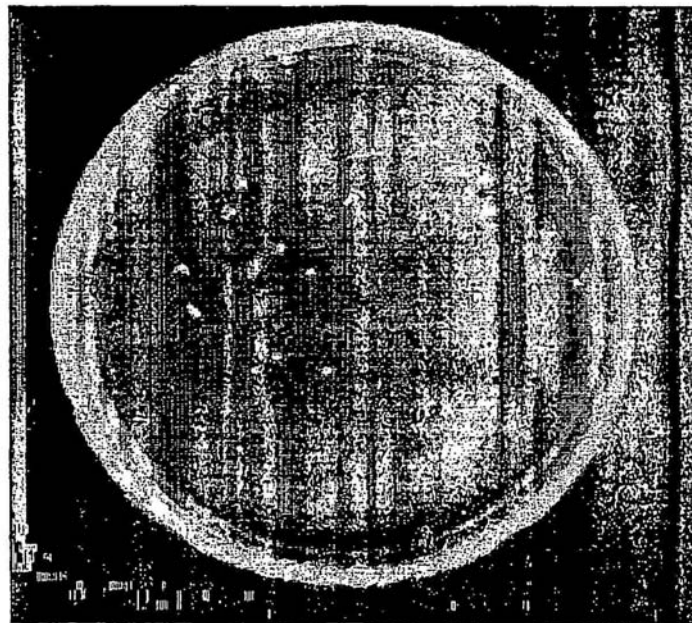


Figura 6

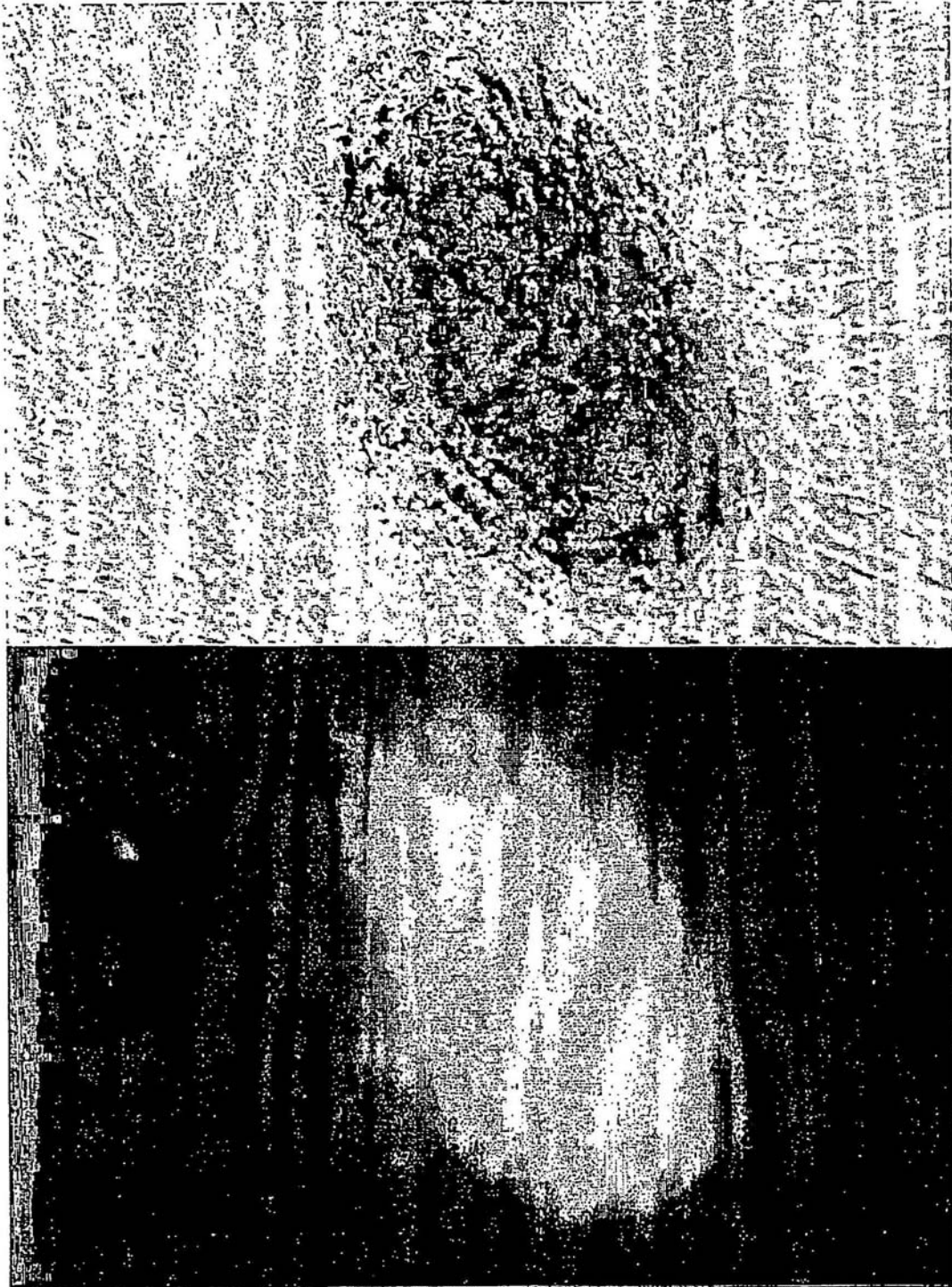


Figura 7



Figura 8

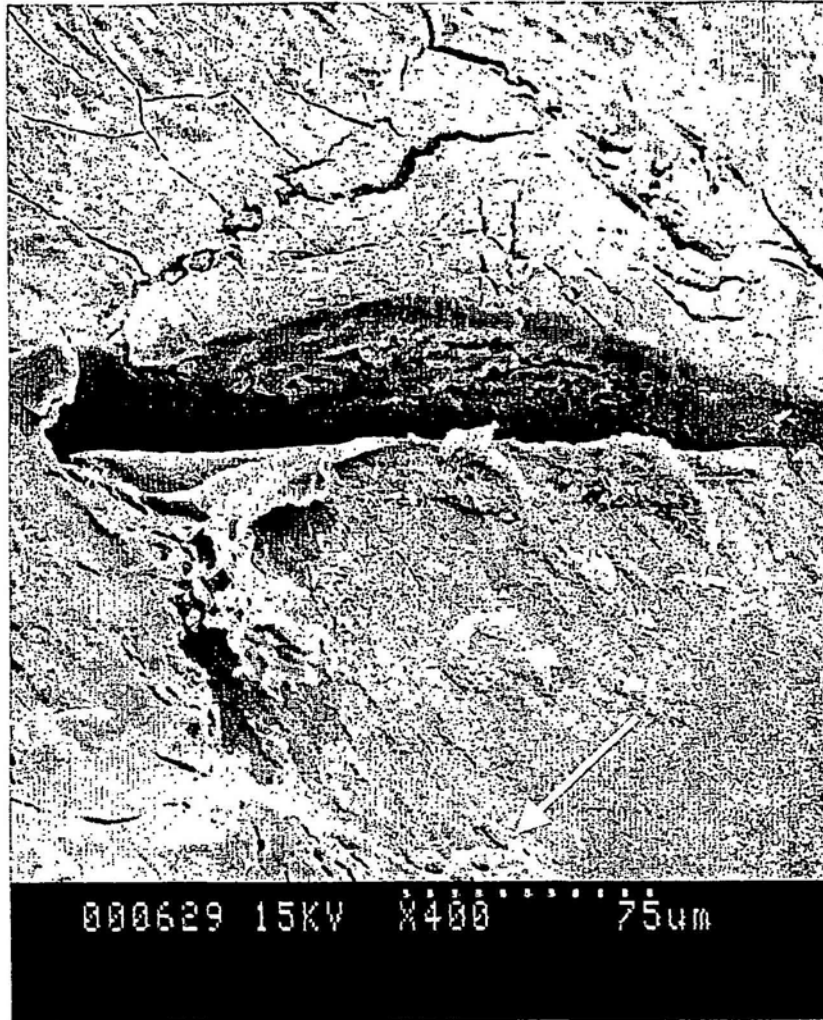


Figura 9

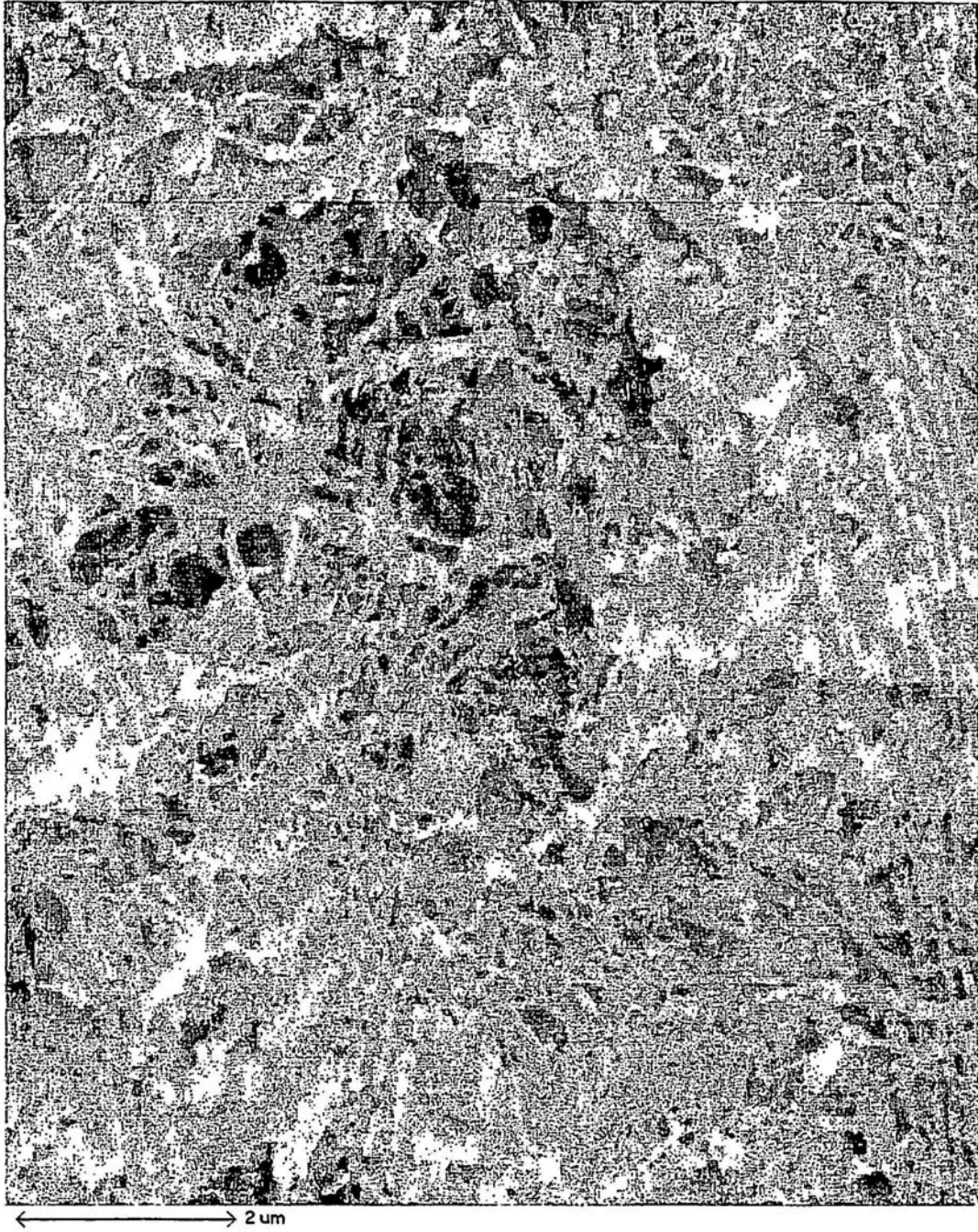


Figura 10

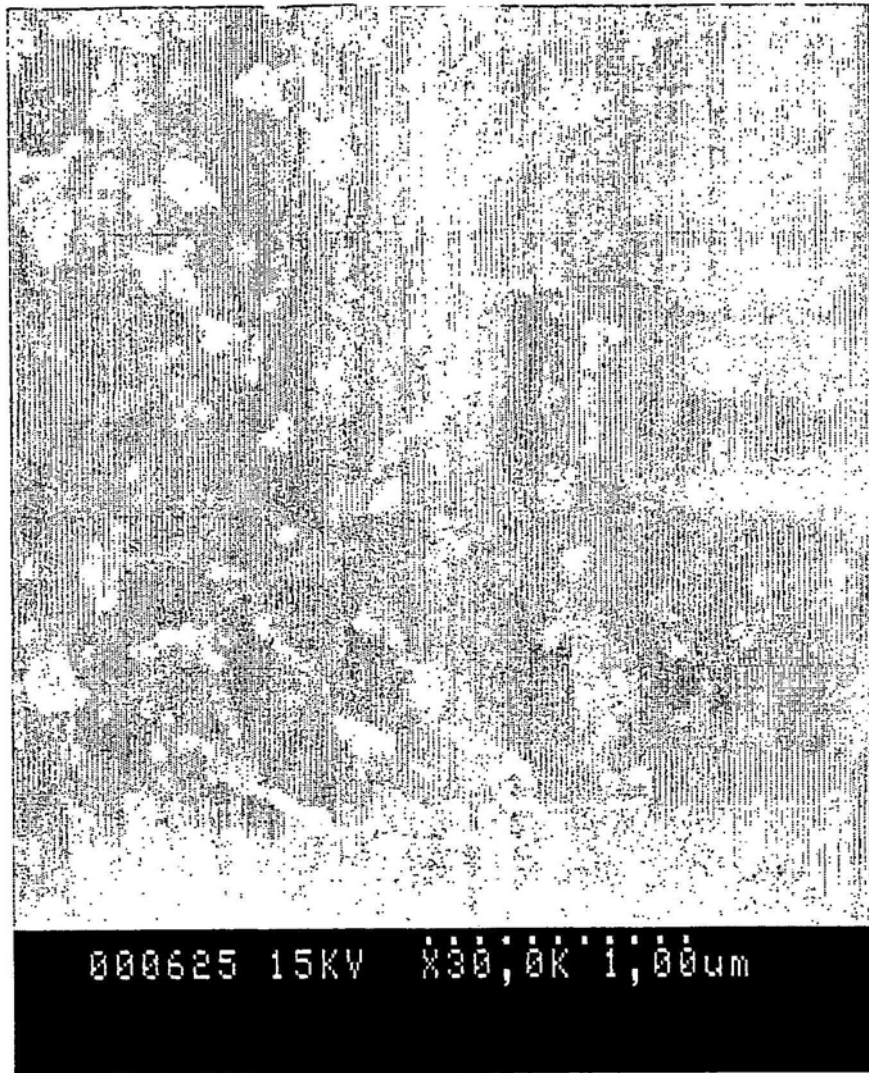


Figura 11

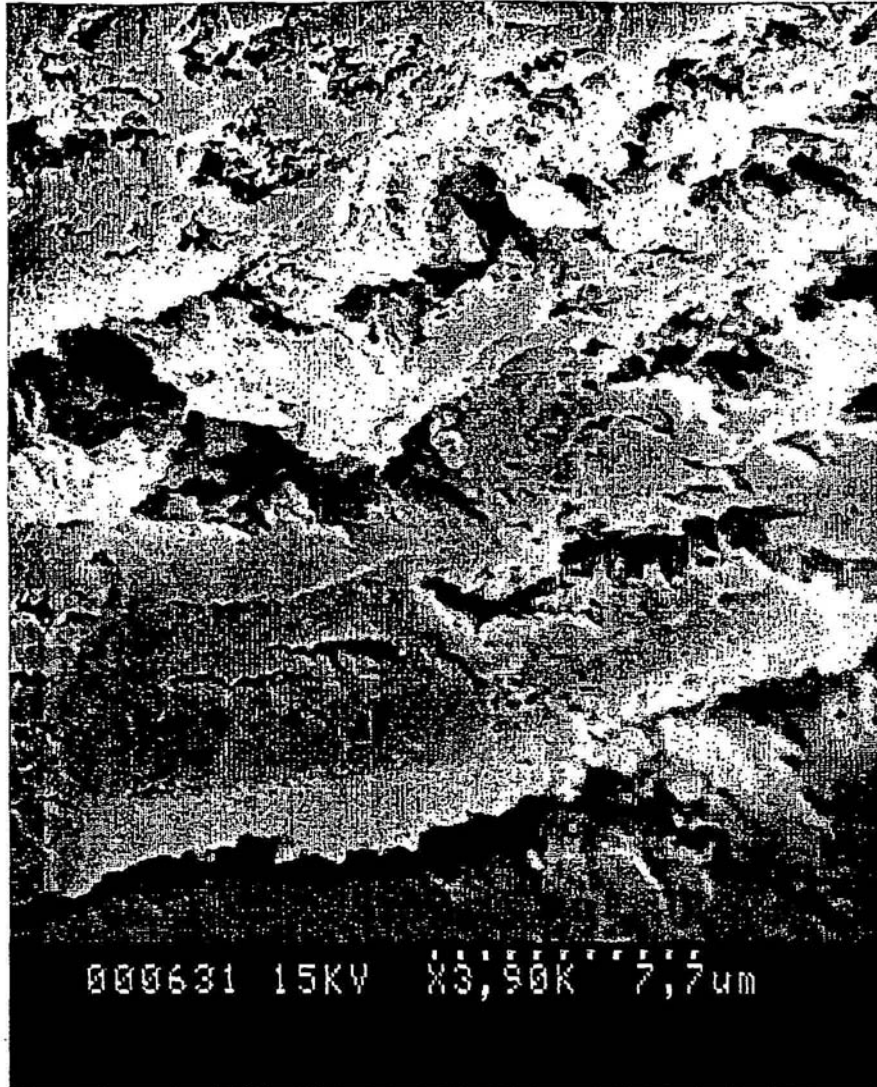


Figura 12

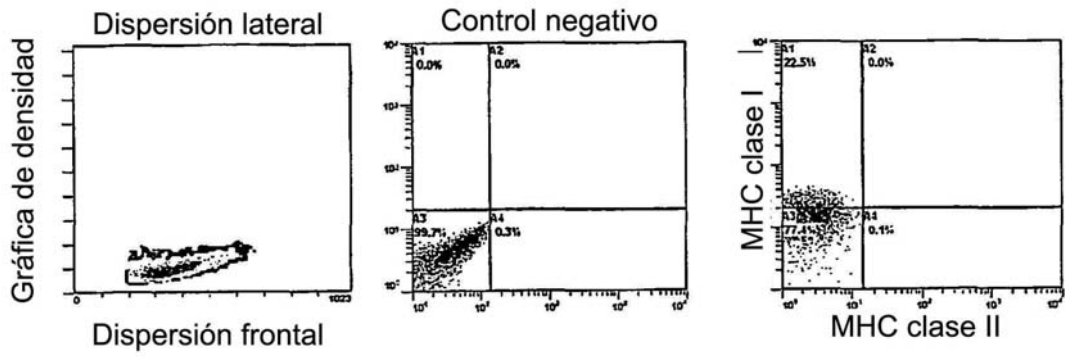


Figura 13

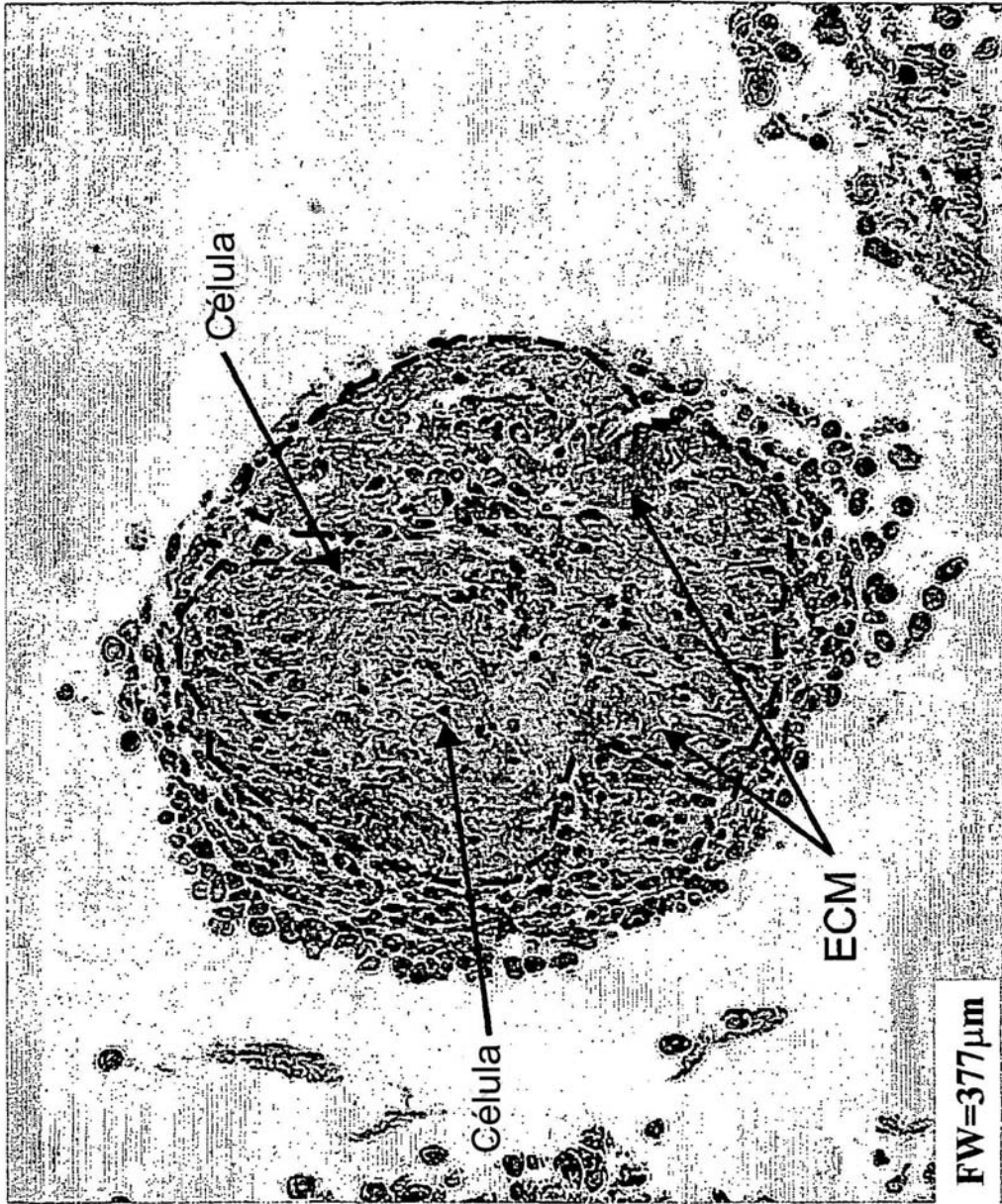


Figura 14

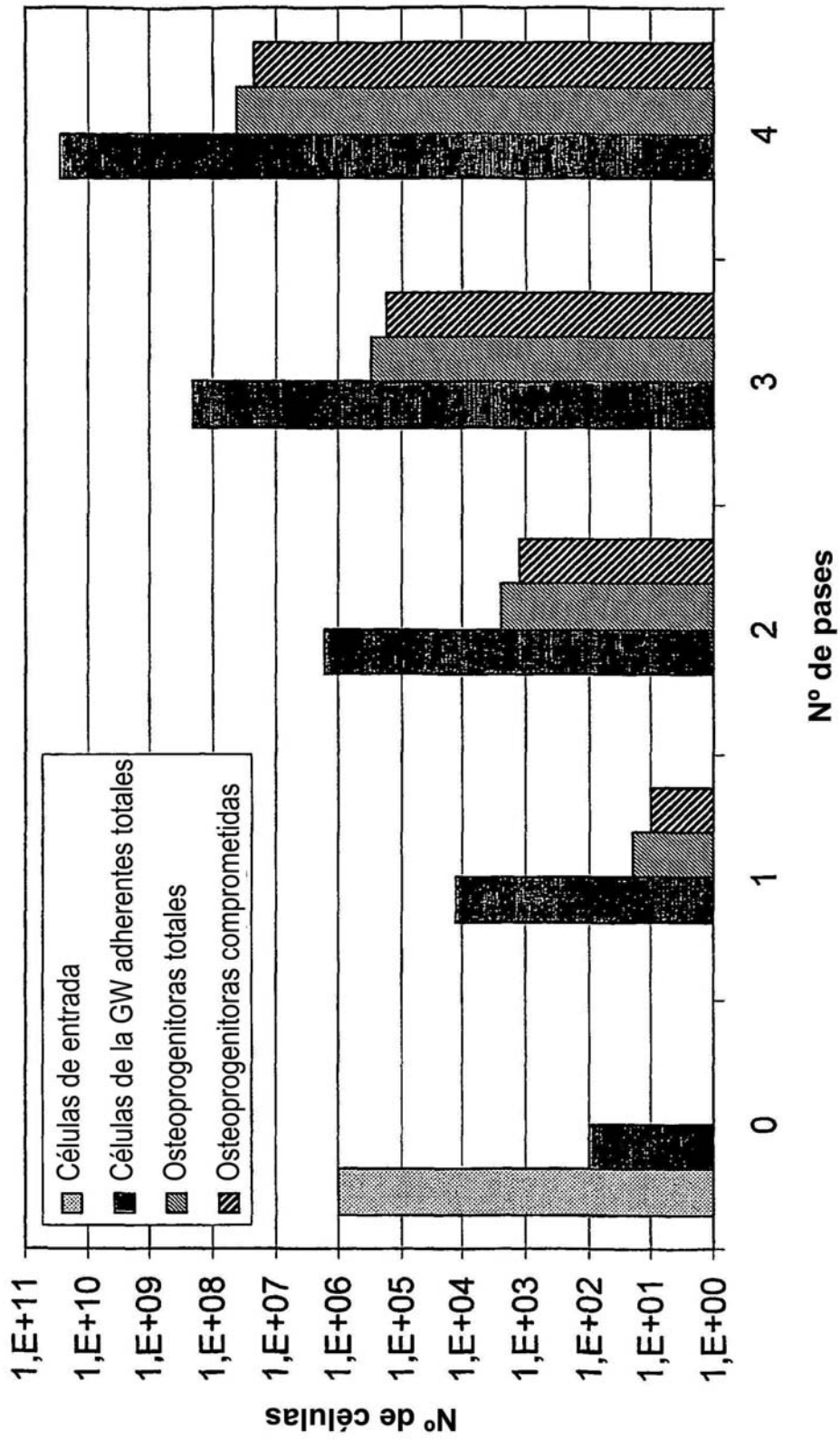


Figura 15

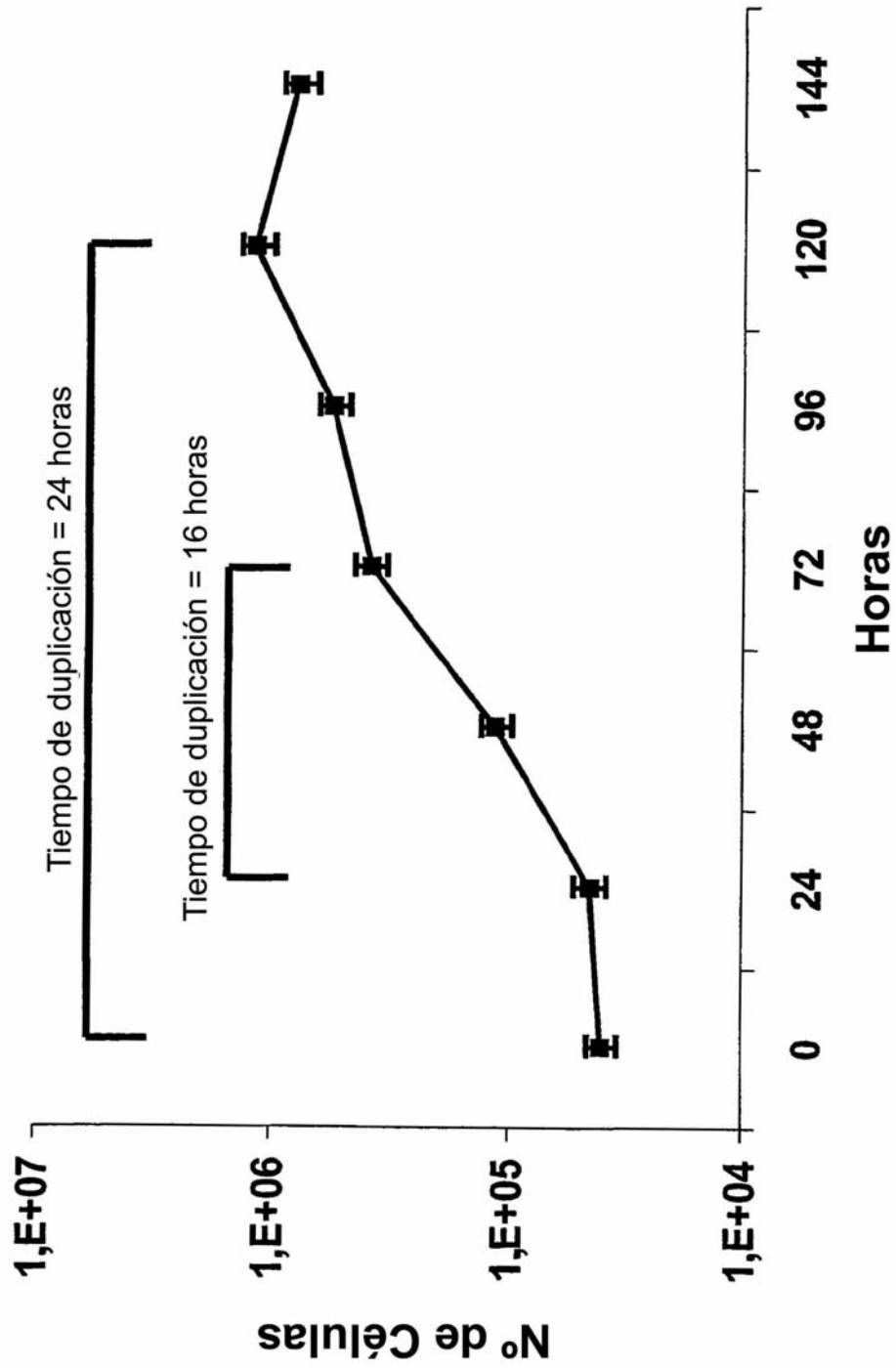


Figura 16

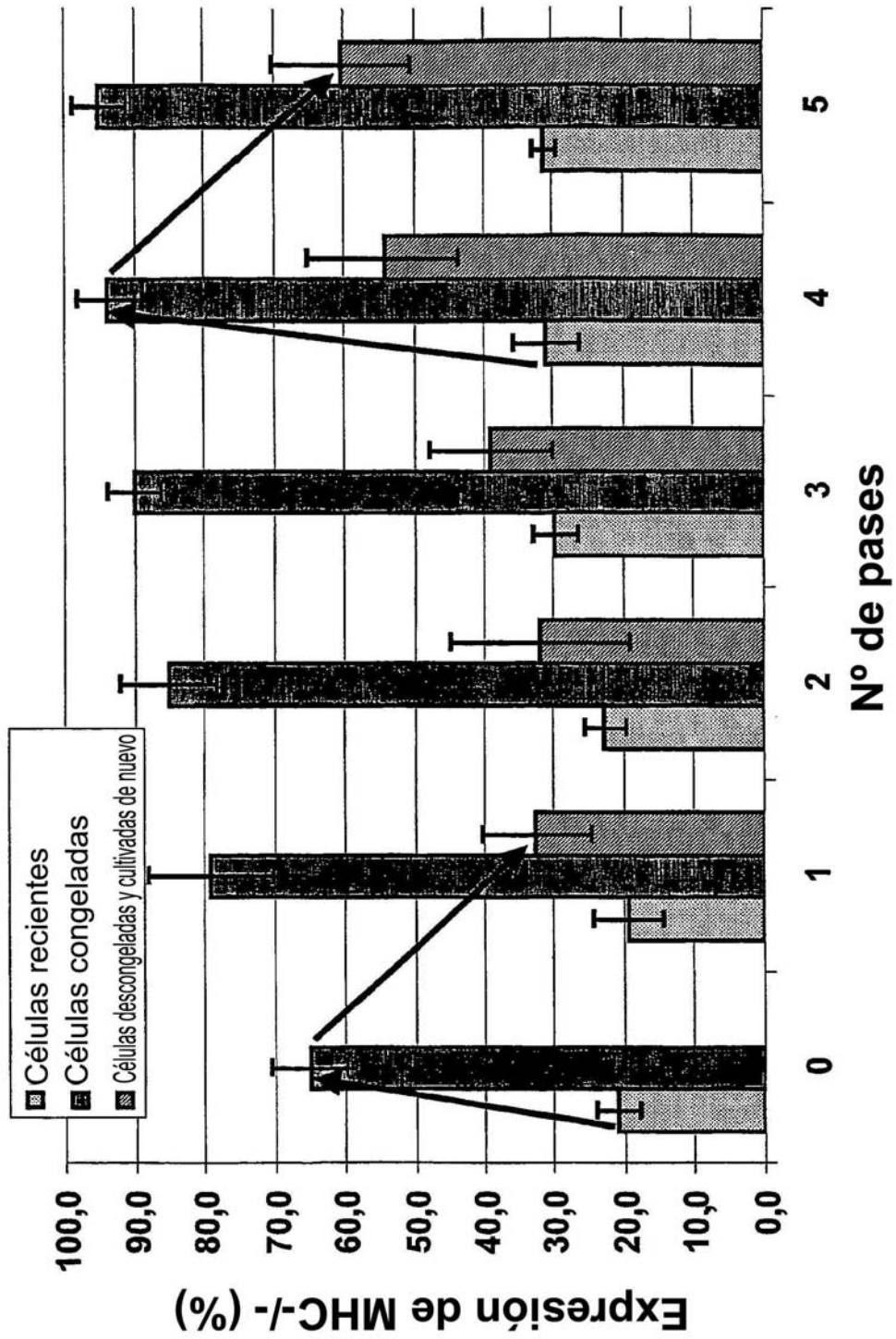


Figura 17

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el
 5 máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

10 • US 5919702 A [0006] • WO 02086104 A [0026]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- 15 • Conget,P ; J J Minguell. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cell Physiology*, 1999, vol. 181, 67-73 [0038]
- Sen,A. *J.Cell Biochem.*, vol. 81, 312-319 [0038]
- Aubin,JE. Bone stem cells: *J Cell Biochem*, 1998, vol. 30-31, 73-82 [0056]
- 20 • Beckstead,JH ; D F Bainton. Enzyme histochemistry on bone marrow biopsies: reactions useful in the differential diagnosis of leukemia and lymphoma applied to 2-micron plastic sections. *Blood*, 1980, vol. 55, 386-394 [0056]
- Beckstead, JH ; P S Halverson ; C A Ries ; D F Bainton. Enzyme histochemistry and immunohistochemistry on biopsy specimens of pathologic human bone marrow. *Blood*, 1981, vol. 57, 1088-1098 [0056]
- 25 • Osteogenic potential of vascular pericytes. Canfield, AE ; M J Doherty ; B A Ashton. Osteogenic potential of vascular pericytes. *EM Squared, Inc*, 2000, 143-151 [0056]
- Caplan,AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop.Res*, 1991, vol. 9, 641-650 [0056]
- Chacko, AW ; S R M Reynolds. Architecture of distended and nondistended human umbilical cord tissues, with special reference to the arteries and veins. Carnegie
 30 Institution of Washington, *Contributions to Embryology*, 1954, vol. 35, 135-150 [0056]
- Friedenstein,AJ ; J F Gorskaja ; N N Kulagina. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976, vol. 4, 267-274 [0056]
- Mitchell,KE ; M L Weiss ; B M Mitchell ; P Martin ; D Davis ; L Morales ; B Helwig
 35 ; M Beerenstrauch ; K Abou-Easa ; T Hildreth. Matriz Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia. *Stem Cells*, 2003, vol. 21, 50-60 [0056]
- Nanaev,AK ; G Kohnen ; A P Milovanov ; S P Domogatsky ; P Kaufmann. Stromal Differentiation and Architecture of the Human Umbilical Cord. *Placenta*, 1997, vol. 18, 53-64 [0056]
- 40 • Parry, EW. Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord. *Journal of Anatomy*, 1970, vol. 107, 505-518 [0056]
- Pereda,J ; P M Motta. New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. *Medical Electron Microscopy*, 2002, vol. 32, 67-78 [0056]

- Romanov, YA ; V A Svintsitskaya ; V N Smirnov. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells*, 2003, vol. 21, 105-110 [0056]
- Schoenberg, MD ; A Hinman ; R D Moore. Studies on connective tissue V, Feber
5 formation in Wharton's Jelly. *Laboratory Investigation*, 1960, vol. 9, 350-355 [0056]
- Takechi, K ; Y Kuwabara ; M Mizuno. Ultrastructural and Immunohistochemical Studies of Wharton's Jelly Umbilical Cord Cells. *Placenta*, 1993, vol. 14, 235-245 [0056]
- Tuchmann-Duplessis, H ; G David ; P Haegel. *Illustrated Human Embryology*.
10 Springer-Verlag, 1972, 54-61 [0056]
- Weiss, L. *Histology: cell and tissue biology*. Elsevier Biomedical, 1983, 997-998 [0056]