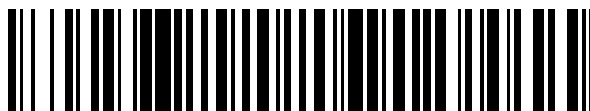


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 181**

51 Int. Cl.:

**A61P 1/12** (2006.01)  
**A61K 35/44** (2006.01)  
**A61K 35/50** (2006.01)  
**A61K 35/64** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2008 E 08725458 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2120977**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades inflamatorias usando células madre de placenta**

30 Prioridad:

**12.02.2007 US 901067 P**

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

**11.10.2013**

73 Titular/es:

**ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)  
7 POWDER HORN DRIVE  
WARREN, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**EDINGER, JAMES, W.;  
HARIRI, ROBERT, J.;  
WANG, JIA-LUN;  
YE, QIAN y  
FALECK, HERBERT**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 425 181 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades inflamatorias usando células madre de placenta

## 1. Campo

5 En la presente memoria se proporcionan métodos para usar células madre de placenta humana para tratar a individuos que tienen una enfermedad, trastorno o afección producida por, o relacionada con, una respuesta inmunitaria indeseada o perjudicial, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso, diabetes, micosis fungoide (síndrome de Alibert-Bazin) o esclerodermia.

## 2. Antecedentes

10 Las células madre humanas son células precursoras totipotentes o pluripotentes capaces de generar una diversidad de linajes de células humanas maduras. Existen pruebas que demuestran que pueden emplearse células madre para repoblar muchos, si no todos, los tejidos y restaurar funcionalidades fisiológicas y anatómicas.

15 Se han caracterizado muchos tipos diferentes de células madre de mamífero. Véase, por ejemplo, Caplan *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.486.359 (células madre mesenquimatosas humanas); Boyse *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.004.681 (células progenitoras y células madre hematopoyéticas fetales y neonatales); Boyse *et al.*, documento U.S. N° 5.192.553 (lo mismo); Beltrami *et al.*, *Cell* 114(6): 763-766 (2003) (células madre cardíacas); Forbes *et al.*, *J. Pathol.* 197(4): 510-518 (2002) (células madre hepáticas). Se han usado en trasplantes sangre de cordón umbilical y células nucleadas totales derivadas de sangre de cordón para restaurar, parcial o totalmente, la función hematopoyética en pacientes que se han sometido a una terapia de ablación.

20 La placenta es una fuente particularmente atractiva de células madre. Como las placentas de mamífero son abundantes y normalmente se desechan como un residuo médico, representan una fuente excepcional de células madre útiles para fines médicos. En la presente memoria se proporcionan dichas células madre de placenta aisladas, poblaciones de las células madre de placenta y métodos para usarlas para tratar enfermedades, trastornos o afecciones producidas por, o relacionadas con una respuesta inmunitaria indeseada o perjudicial, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso, diabetes, micosis fungoide (síndrome de Alibert-Bazin) o esclerodermia.

## 3. Sumario

30 En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar, manejar, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con o producidas por una respuesta inmunitaria, por ejemplo, asociada con, que produce o causada por inflamación. En una realización, en la presente memoria se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección asociada con o producida por una respuesta inmunitaria perjudicial, nociva, inapropiada o indeseada, por ejemplo, inflamación, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre de placenta, o de un medio acondicionado por células madre de placenta, donde la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para producir una mejoría detectable en uno o más síntomas de, o una reducción en la progresión de uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección. En la presente memoria también se proporciona el uso de células madre de placenta en la fabricación de un medicamento para tratar, manejar, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con o producidas por una respuesta inmunitaria, por ejemplo, asociada con, que produce o causada por inflamación. Dichas células madre de placenta son células madre de placenta CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>.

45 En una realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad inflamatoria intestinal. En una realización más específica, dicha enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn. En otra realización más específica, dicha enfermedad de Crohn es la enfermedad de Crohn gastroduodenal. En otra realización más específica, dicha enfermedad de Crohn es la yeyunoileítis. En otra realización más específica, dicha enfermedad de Crohn es la ileítis. En otra realización más específica, dicha enfermedad de Crohn es la ileocolitis. En otra realización más específica, dicha enfermedad de Crohn es la colitis de Crohn. En otra realización específica, dicha enfermedad inflamatoria intestinal es la colitis ulcerosa.

50 En una realización más específica, dicho síntoma de enfermedad inflamatoria intestinal es uno o más de inflamación e hinchazón de una parte del tracto GI, dolor abdominal, vaciamiento frecuente del intestino, diarrea, hemorragia rectal, anemia, pérdida de peso, artritis, problemas cutáneos, fiebre, engrosamiento de la pared intestinal, formación de tejido cicatricial en el intestino, formación de llagas o úlceras en el intestino, desarrollo de una o más fístulas en la pared intestinal, desarrollo de una o más fisuras en el ano, desarrollo de una deficiencia nutricional, desarrollo de cálculos renales, desarrollo de cálculos biliares, desarrollo de una enfermedad del hígado o sistema biliar, diarrea hemorrágica, náuseas, calambres abdominales, anemia, fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, pérdida de fluidos corporales y nutrientes, lesiones cutáneas, dolor articular, retraso del crecimiento, desarrollo de osteoporosis o inflamación ocular.

En otra realización específica, dicho síntoma de enfermedad inflamatoria intestinal es uno o más de exantema pruriginoso o doloroso, fiebre, eritrodermia generalizada, descamación, niveles elevados (por ejemplo, mayores de los normales) de bilirrubina, niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT), niveles elevados de aspartato aminotransferasa (AST), niveles elevados de fosfatasa alcalina (AP), diarrea, hemorragia interna, calambres, dolor abdominal e íleo, sensación de escozor en el ojo, irritación ocular, fotofobia, dolor ocular debido a una secreción reducida de lágrimas; sequedad de la boca, sensibilidad a alimentos picantes o ácidos, dolor abdominal, disfagia, odinofagia, pérdida de peso, enfermedad pulmonar obstructiva, debilidad muscular, dolor neuropático o calambres musculares

En otra realización específica de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende la administración de un segundo agente terapéutico al individuo que tiene la enfermedad, trastorno o afección. En una realización más específica, dicho segundo agente terapéutico es un agente antiinflamatorio, un agente inmunomodulador, y un agente inmunodepresor, una medicación para el dolor, o un antibiótico. En una realización más específica, el segundo agente terapéutico es un agente inmunomodulador. En una realización más específica, dicho agente inmunomodulador es un inmunodepresor. En una realización incluso más específica, dicho agente inmunodepresor es un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3, muromonab), un anticuerpo anti-receptor de IL-2 (por ejemplo, basiliximab (SIMULECT®) y daclizumab (ZENAPAX®)), un anticuerpo anti-receptor de linfocitos T (por ejemplo, Muromonab-CD3), azatioprina, un inhibidor de calcineurina, un corticosteroide, ciclosporina, metotrexato, mercaptopurina, micofenolato mofetilo, tacrolimus o sirolimus. En otra realización más específica, el segundo agente terapéutico comprende una célula madre de otro tipo, por ejemplo, una célula madre mesenquimatosas derivada de médula ósea, médula ósea o una célula madre hematopoyética.

### 3.1 Definiciones

Como se usa en la presente memoria, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo presente en el marcador CD105. De esta manera, las células que se denominan SH2<sup>+</sup> son CD105<sup>+</sup>.

Como se usa en la presente memoria, los términos "SH3" y SH4" se refieren a anticuerpos que se unen a epítopos presentes en el marcador CD73. De esta manera, las células que se denominan SH3<sup>+</sup> y/o SH4<sup>+</sup> son CD73<sup>+</sup>.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre aislada" significa una célula madre que está sustancialmente separada de otras células que no son células madre del tejido, por ejemplo, placenta, del que procede la célula madre. Una célula madre está "aislada" si se ha retirado de la célula madre al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos 99 % de las células que no son células madre con las cuales está asociada naturalmente la célula madre, por ejemplo, durante la recogida y/o cultivo de la célula madre.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "población aislada de células" significa una población de células que está sustancialmente separada de otras células del tejido, por ejemplo, placenta, del que procede la población de células. Una población de, por ejemplo, células madre está "aislada" si se ha retirado de la población de células madre al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos 99 % de las células con las que está asociada naturalmente la población de células madre, por ejemplo, durante la recogida y/o cultivo de la población de células madre.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre de placenta" se refiere a una célula madre o célula progenitora que procede de la placenta de un mamífero, independientemente de la morfología, de los marcadores de la superficie celular o del número de pases después de un cultivo primario, que se adhiere a un sustrato de cultivo de tejidos (por ejemplo, un plástico para el cultivo de tejidos o una placa para el cultivo de tejidos revestida de fibronectina). La expresión "célula madre de placenta", como se usa en la presente memoria, sin embargo, no se refiere a un trofoblasto, un citotrofoblasto, una célula germinal embrionaria o una célula madre embrionaria, según se conocen estas células por los expertos en la materia. Una célula se considera una "célula madre" si la célula conserva al menos un atributo de una célula madre, por ejemplo, un marcador o perfil de expresión génica asociado con uno o más tipos de células madre; la capacidad de replicarse al menos 10-40 veces en cultivo; multipotencia, por ejemplo, la capacidad de diferenciarse, *in vitro*, *in vivo* o de ambas maneras, en células de una o más de las tres capas germinales; la ausencia de características de células adultas (es decir, diferenciadas) o similares. Las expresiones "célula madre de placenta" y "célula madre derivada de placenta" pueden usarse indistintamente. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, el término "placenta" incluye el cordón umbilical. Las células madre de placenta desveladas en la presente memoria, en ciertas realizaciones, son multipotentes *in vitro* (es decir, las células se diferencian *in vitro* en condiciones de diferenciación), multipotentes *in vivo* (es decir, las células se diferencian *in vivo*) o ambas cosas.

Como se usa en la presente memoria, una célula madre es "positiva" para un marcador particular cuando el marcador es detectable. Por ejemplo, una célula madre de placenta es positiva, por ejemplo, para CD73 porque CD73 es detectable en las células madre de placenta en una cantidad detectablemente mayor que el nivel de fondo (en comparación, por ejemplo, con un control de isotipo). Una célula también es positiva para un marcador cuando ese marcador puede usarse para distinguir la célula de al menos otro tipo celular, o puede usarse para seleccionar o aislar la célula cuando está presente o se expresa por la célula.

Como se usa en la presente memoria, “inmunomodulación” e “inmunomodulador” significa que causa o que tiene la capacidad de causar un cambio detectable en una respuesta inmunitaria, y la capacidad de causar un cambio detectable en una respuesta inmunitaria.

5 Como se usa en la presente memoria, “inmunodepresión” e “inmunodepresor” significa que causa o que tiene la capacidad de causar una reducción detectable en una respuesta inmunitaria, y la capacidad de causar una represión detectable de una respuesta inmunitaria.

#### 4. Breve descripción de las figuras

10 FIG. 1: Viabilidad de células madre de placenta procedentes de perfusión (A), amnios (B), corion (C) o amnios-placa coriónica (D) o células madre de cordón umbilical (E). Los números del eje X designan la placenta a partir de la que se obtuvieron las células madre.

FIG. 2: Porcentaje de células HLA ABC<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> procedentes de perfusión (A), amnios (B), corion (C), o amnios-placa coriónica (D), o células madre de cordón umbilical (E) como se determina por FACSCalibur. Los números del eje X designan la placenta de la que se obtuvieron las células madre.

15 FIG. 3: Porcentaje de células HLA ABC<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> procedentes de perfusión (A), amnios (B), corion (C) o amnios-placa coriónica (D), o células madre de cordón umbilical (E), como se determina por FACS Aria. Los números del eje X designan la placenta de la que se obtuvieron las células madre.

FIG. 4: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de perfundido placentario.

20 FIG. 5: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de amnios.

FIG. 6: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de corion.

FIG. 7: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de amnios-placa coriónica.

25 FIG. 8: Expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de cordón umbilical.

FIG. 9: Expresión media de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en células madre derivadas de perfusión (A), amnios (B), corion (C), amnios-placa coriónica (D) o cordón umbilical (E).

30 FIGS. 10A y 10B: La reacción de linfocitos mixtos (RLM) es un modelo para la respuesta inmunitaria virgen, y se inhibe por las células madre de placenta. A partir de las subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> y “vivos” acotadas, se supervisó el porcentaje de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE)<sup>Bajo</sup> (FIGS. 10A y 10B, respectivamente). Este porcentaje aumentó después de una RLM de seis días ((FIGS. 10C y 10D, gráfico de RLM) y con la adición de células madre de placenta (FIGS. 3C y 3D, gráfico de RLMP), el efecto se revierte en los compartimentos de linfocitos T tanto CD8<sup>+</sup> como CD4<sup>+</sup>.

35 FIG. 11: Células madre derivadas de placenta procedentes de amnios-placa coriónica (AC) y estroma de cordón umbilical (CU) reprimen la alo-RLM. La RLM se realiza con linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup> o cantidades iguales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Abscisas: porcentaje de represión de la proliferación.

40 FIG. 12: Las células madre de placenta y las células madre de cordón umbilical inhiben la alo-RLM. Un ensayo de seis días en pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Células placentarias: linfocitos T: células dendríticas = aproximadamente 1:10:1. Las células madre se obtuvieron a partir de amnios-corion (AC), membrana amniótica (MA) o cordón umbilical (CU). FB = fibroblastos, MO = células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

45 FIG. 13: Las células madre de placenta de diferentes donantes deprimen la alo-RLM en diferentes grados. La figura compara la represión en una RLM por células madre de placenta procedente de dos donantes de placenta, denominados 61665 y 63450. Las células madre de placenta 63450 parecen reprimir la RLM en un mayor grado que las células madre procedentes de placenta 61665.

50 FIG. 14: Ensayo de regresión de diecisiete días y ensayo de regresión de células madre de placenta modificado. El eje x representa el número de células madre de placenta añadidas al ensayo. En el eje Y se mide el número de células LCL CD23<sup>+</sup> (línea celular linfoblastoide, una línea de células B transformada creada artificialmente) supervivientes.

FIG. 15: Supresión por células madre de placenta de la proliferación de linfocitos T en el ensayo de regresión de seis días. Se preparó un ensayo de regresión usando linfocitos T marcados con CFSE. Después de seis días, se evaluó

la proliferación de linfocitos T. Se muestra la represión relativa de la proliferación de linfocitos T por células madre de amnios-corion (AC), cordón umbilical (CU), membrana amniótica (MA) o médula ósea (MO).

5 FIG. 16: Porcentaje de cambio en la represión o introducción de un inserto Transwell en la RLM, que separa las células placentarias de los linfocitos T pero permite el intercambio del medio de cultivo. Las células madre de cordón umbilical a 25.000, 50.000, 75.000 o 100.000 por reacción muestran un grado relativamente alto de represión y un grado relativamente alto de necesidad del contacto célula a célula en los altos títulos necesarios para realizar la represión.

10 FIG. 17: Las células madre de estroma de cordón umbilical (CU) añadidas a 12.500 (CU OP/TW 12.5) a 100.000 (CU OP/TW 100) estaban separadas de la RLM por una membrana (TW) o estaban en contacto con la RLM (OP). Se usaron números iguales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y se calculó el porcentaje de represión de la RLM (% CFSE<sup>Bajo</sup> = 89 %).

FIG. 18: La relación entre la dosis de células madre de placenta y la dependencia del contacto célula a célula no es lineal. Los cambios en la represión de RLM sobre la introducción del inserto se calculan a partir de los valores proporcionados en la FIG. 17.

15 FIG. 19: Supresión diferencial de respuestas de linfocitos T por células madre de placenta y CMMO (células madre de médula ósea, siglas en inglés BMSC). El grado de represión conferida por las células madre de placenta o CMMO se calculó comparando el porcentaje de linfocitos T de RLM en la subpoblación CFSE<sup>Bajo</sup>, mayor de 70 %, con el de las RLM de las células adherentes. La RLM se separó de las células adherentes (Transwell) o se realizó en un pocillo abierto (abierto). El eje X proporciona los números de células adherentes, en miles, añadidos a 500.000 linfocitos T y 50.000 CD. La relación entre células adherentes y linfocitos T va de 1:5 a 1:40.

20 FIG. 20: Requisitos diferenciales de contacto célula a célula para células madre de placenta y inmunodepresión de células madre derivadas de médula ósea. A partir de los datos de represión proporcionados en la FIG. 15, se calculó la dependencia del contacto y se representó frente a la relación de células adherentes/linfocitos T (n=3, excepto CU: n=2).

25 FIG. 21: No se requieren linfocitos T reguladores para la represión de linfocitos T mediada por células madre de placenta. Se realizó un ensayo de regresión usando CMSP (células madre de sangre periférica, siglas en inglés PBMC) enteras o CMSP con reducción de linfocitos T reguladores, ambas teñidas con CFSE, añadiendo células madre de placenta CU en algunas condiciones. N=1.

30 FIG. 22: Las células CFSE<sup>Alto</sup> proliferan en una RLM secundaria. A partir de una RLM de células madre de placenta usando células teñidas con CFSE, los linfocitos T CFSE<sup>Alto</sup> se aislaron en un FACS Aria. Las células se usaron en una RLM. N=1.

35 FIG. 23: El sobrenadante de RLM de células madre reprimidas no reprime la RLM a un reemplazo de 75 %. Se realizaron RLM de CU (CUP), AC (ACP) y CMMO (MOP) y todas reprimieron la RLM más de 50 %. Se usó el sobrenadante de los experimentos para reemplazar de 10 a 150 µl de los 200 µl de medio usado para una nueva RLM. Como controles, también se usaron medio de linfocitos T y AC (T/AC) o cocultivos de linfocitos T y células madre derivadas de médula ósea (T/MO) de la misma manera (N=2).

40 FIGS. 24A, 24B: La preincubación de linfocitos T y células adherentes no influye sobre la represión de la RLM. Se usaron linfocitos T de dos donantes en dos experimentos independientes. Se incubaron CD maduras (A) o linfocitos T CD3<sup>+</sup> teñidos con CFSE (B) con células madre de cordón umbilical (CU) o células madre derivadas de médula ósea durante el número indicado de días antes de añadir CD (el día 0, A) o linfocitos T CD3<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> (B), empezando de esta manera la RLM. Después se realizaron las RLM de células adherentes durante seis días, de la manera normal. N=2.

45 FIGS. 25A, 25B: A. La secreción de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  en la RLM, y la RLM con células madre de placenta o células madre derivadas de médula ósea, se correlaciona inversamente con la represión de la RLM. B: datos de CFSE de linfocitos T y células NK del mismo experimento. Se recogieron los sobrenadantes de la RLM mostrada en la FIG. 14B y se analizaron con respecto a MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . B: se realizó la RLM como se ha descrito, y se observaron un promedio de 55 % (linfocitos T) o 83 % (células NK) CFSE<sup>Bajo</sup>. Se calculó el efecto represor de la adición de células madre. N=2 (parte NK: N=1).

50 FIG. 26: En los sobrenadantes de RLM y del ensayo de regresión modificado, se midió MCP-1. La represión de células madre de placenta de la RLM y el ensayo de regresión se correlaciona con la secreción del quimioatrayente MCP-1. AC: células madre de amnios-placa coriónica. CU: células madre de cordón umbilical. Barras claras: resultados del ensayo de RLM. Barras oscuras: resultados del ensayo de regresión. Eje Y: pg de MCP-1 en la solución de ensayo.

55 FIG. 27: Medición de IL-6 en el sobrenadante de la RLM modificada y ensayo de regresión. La represión de células madre de placenta de la RLM y el ensayo de regresión se correlaciona con la secreción de IL-6. AC: células madre de amnios-placa coriónica. CU: células madre de cordón umbilical. Barras claras: resultados del ensayo de RLM.

Barras oscuras: resultados del ensayo de regresión. Eje y: pg de IL-6 en solución de ensayo.

## 5. Descripción detallada

En la presente memoria se proporcionan métodos para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con, que se produce por o relacionada con una respuesta inmunitaria inapropiada, indeseada, perjudicial o nociva, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, que comprenden administrar al individuo que tiene la enfermedad, trastorno o afección una o más dosis de células madre de placenta y/o células madre de cordón umbilical. Más adelante se analizan con detalle métodos para el tratamiento de dichos individuos y para la administración de dichas células madre, solas o en combinación con otras terapias.

### 5.1 Inmunomodulación usando células madre de placenta

En la presente memoria se proporcionan métodos para la modulación, por ejemplo represión, de la actividad, por ejemplo proliferación, de una célula inmunitaria, o una pluralidad de células inmunitarias, mediante la puesta en contacto de la célula o células inmunitarias con una pluralidad de células madre de placenta. Dicha inmunomodulación es útil en el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección producida por, o relacionada con, una respuesta inmunitaria indeseada o perjudicial, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso, diabetes, micosis fungoide (síndrome de Alibert-Bazin) o esclerodermia. Dicha inmunomodulación también es útil, por ejemplo, en la reducción o eliminación de una respuesta inmunitaria del hospedador contra un tejido alogénico, por ejemplo, un órgano trasplantado, aloinjerto de tejido compuesto y similares.

En una realización, en la presente memoria se proporciona un método para reprimir una respuesta inmunitaria que comprende poner en contacto una pluralidad de células inmunitarias con una pluralidad de células madre de placenta durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células madre de placenta repriman detectablemente una respuesta inmunitaria, donde dichas células madre de placenta reprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (RLM) o un ensayo de regresión.

Las células madre de placenta son, por ejemplo, las células madre de placenta descritas en otras partes de la presente memoria (véase la Sección 5.2). Las células madre de placenta usadas para inmunodepresión pueden proceder u obtenerse a partir de una sola placenta o de múltiples placentas. Las células madre de placenta usadas para la inmunodepresión también pueden proceder de una sola especie, por ejemplo, la especie del receptor deseado o la especie de las células inmunitarias cuya función se desea reducir o reprimir, o puede proceder de múltiples especies.

Una "células inmunitaria" en el contexto de este método significa cualquier célula del sistema inmunitario, particularmente linfocitos T y células NK (natural killer, también conocidas como citotóxicas naturales). De esta manera, en diversas realizaciones del método, se ponen en contacto células madre de placenta con una pluralidad de células inmunitarias, donde la pluralidad de células inmunitarias son, o comprenden, una pluralidad de linfocitos T (por ejemplo, una pluralidad de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o linfocitos T CD8<sup>+</sup>) y/o células natural killer. Una "respuesta inmunitaria" en el contexto del método puede ser cualquier respuesta por una célula inmunitaria a un estímulo percibido normalmente por una célula inmunitaria, por ejemplo, una respuesta a la presencia de un antígeno. En diversas realizaciones, una respuesta inmunitaria puede ser la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o linfocitos T CD8<sup>+</sup>) en respuesta a un antígeno extraño, tal como un antígeno presente en una transfusión o injerto, o contra un autoantígeno, como en una enfermedad autoinmunitaria. La respuesta inmunitaria también puede ser una proliferación de linfocitos T contenidos dentro de un injerto. La respuesta inmunitaria también puede ser cualquier actividad de una célula natural killer (NK), la maduración de una célula dendrítica o similares. La respuesta inmunitaria también puede ser un efecto local, específico de tejido u órgano, o sistémico de una actividad de una o más clases de células inmunitarias, por ejemplo, la respuesta inmunitaria puede ser una enfermedad de injerto contra huésped, inflamación, formación de tejido cicatricial relacionado con inflamación, una afección autoinmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes Tipo I, lupus eritematoso, etc.), y similares.

"Contacto" en este contexto incluye la asociación de las células madre de placenta y las células inmunitarias en un único recipiente (por ejemplo, placa de cultivo, matraz, vial, etc.) o *in vivo*, por ejemplo, el mismo individuo (por ejemplo, un mamífero, por ejemplo un ser humano). En una realización preferida, el contacto es durante un tiempo suficiente y con un número suficiente de células madre de placenta y células inmunitarias como para que sea detectable un cambio en una función inmunitaria de las células inmunitarias. Más preferentemente, en diversas realizaciones, dicho contacto es suficiente para reprimir la función inmune (por ejemplo, la proliferación de linfocitos T en respuesta a un antígeno) al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %, en comparación con la función inmunitaria en ausencia de las células madre de placenta. Dicha represión en un contexto *in vivo* puede determinarse en un ensayo *in vitro* (véase más adelante); es decir, el grado de represión en el ensayo *in vitro* puede extrapolarse, para un número particular de células madre de placenta y un número de células inmunitarias en un individuo receptor, a un grado de represión en el individuo.

En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporcionan métodos para usar células madre de placenta para modular una respuesta inmunitaria, o la actividad de una pluralidad de uno o más tipos de células inmunitarias, *in vitro*. El contacto de las células madre de placenta y la pluralidad de células inmunitarias puede comprender combinar las células madre de placenta y las células inmunitarias en el mismo espacio físico de tal forma que al menos una parte de la pluralidad de células madre de placenta interaccione con al menos una parte de la pluralidad de células inmunitarias; mantener las células madre de placenta y las células inmunitarias en espacios físicos separados con un medio común; o puede comprender poner en contacto el medio de una o un cultivo de células madre de placenta o células inmunitarias con el otro tipo de célula (por ejemplo, obtener el medio de cultivo de un cultivo de células madre de placenta y resuspender las células inmunitarias aisladas en el medio). En un ejemplo específico, el contacto se realiza en una reacción de linfocitos mixtos (RLM). En otro ejemplo específico, el contacto se realiza en un ensayo de regresión.

Dicho contacto puede realizarse, por ejemplo, en una situación experimental diseñada para determinar el grado en el que una pluralidad particular de células madre de placenta es inmunomoduladora, por ejemplo, inmunodepresora. Dicha situación experimental puede ser, por ejemplo, un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (RLM) o de regresión. Los procedimientos para realizar los ensayos de RLM y de regresión son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Schwarz, "The Mixed Lymphocyte Reaction: An *In Vitro* Test for Tolerance," *J. Exp. Med.* 127(5): 879-890 (1968); Lacerda *et al.*, "Human Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Home Preferentially to and Induce Selective Regressions of Autologous EBV-Induced B Lymphoproliferations in Xenografted C.B-17 *Scid/Scid* Mice," *J. Exp. Med.* 183: 1215-1228 (1996). En una realización preferida, se realiza una RLM en la que una pluralidad de células madre de placenta contacta con una pluralidad de células inmunitarias (por ejemplo linfocitos, por ejemplo linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>).

La RLM puede usarse para determinar la capacidad inmunodepresora de una pluralidad de células madre de placenta. Por ejemplo, una pluralidad de células madre de placenta puede ensayarse en una RLM que comprende combinar linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, células dendríticas (CD) y células madre de placenta en una relación de aproximadamente 10:1:2, donde los linfocitos T están teñidos con un colorante tal como, por ejemplo, CFSE que se reparte entre las células hijas, y donde las linfocitos T se dejan proliferar durante aproximadamente 6 días. La pluralidad de células madre de placenta es inmunodepresora si la proliferación de linfocitos T en 6 días en presencia de células madre de placenta se reduce detectablemente en comparación con la proliferación de linfocitos T en presencia de CD y ausencia de células madre de placenta. En dicha RLM, las células madre de placenta se descongelan o se recogen de un cultivo. Se resuspenden aproximadamente 20.000 células madre de placenta en 100 µl de medio (RPMI1640, tampón HEPES 1 mM, antibióticos y suero humano combinado al 5 %) y se deja que se adhieran al fondo de un pocillo durante 2 horas. Se aíslan linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> a partir de perlas magnéticas Miltenyi con células mononucleares de sangre periférica enteras. Las células se tiñen con CFSE y se añade un total de 100.000 linfocitos T (linfocitos T CD4<sup>+</sup> solos, linfocitos T CD8<sup>+</sup> solos o cantidades iguales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) por pocillo. El volumen del pocillo se lleva a 200 µl y se deja que tenga lugar la RLM.

Por lo tanto, en una realización, en la presente memoria se proporciona un método para reprimir una respuesta inmunitaria que comprende poner en contacto una pluralidad de células inmunitarias con una pluralidad de células madre de placenta durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células madre de placenta repriman detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (RLM) o en un ensayo de regresión. En una realización, dichas células madre de placenta usadas en la RLM representan una muestra o alícuota de células madre de placenta de una población mayor de células madre de placenta.

Las poblaciones de células madre de placenta obtenidas a partir de diferentes placentas, o diferentes tejidos dentro de la misma placenta, pueden diferir en su capacidad de modular una actividad de una célula inmunitaria, por ejemplo, pueden diferir en su capacidad de reprimir la actividad de linfocitos T o la proliferación de la actividad de células NK. Por lo tanto, es deseable determinar, antes del uso, la capacidad de una población particular de células madre de placenta para la inmunodepresión. Dicha capacidad puede determinarse, por ejemplo, ensayando una muestra de la población de células madre de placenta en un ensayo de RLM o de regresión. En una realización, se realiza una RLM con la muestra, y se determina el grado de inmunodepresión en el ensayo atribuible a las células madre de placenta. Este grado de inmunodepresión después puede atribuirse a la población de células madre de placenta que se muestreó. De esta manera, la RLM puede usarse como método para determinar la capacidad absoluta y relativa de una población particular de células madre de placenta para reprimir la función inmunitaria. Los parámetros de la RLM pueden variarse para proporcionar más datos o para determinar la capacidad de inmunodepresión de una muestra de células madre de placenta. Por ejemplo, como la inmunodepresión por las células madre de placenta parece aumentar de forma general en proporción al el número de células madre de placenta presentes en el ensayo, la RLM puede realizarse, en una realización, con dos o más cantidades de células madre de placenta, por ejemplo, 1 x 10<sup>3</sup>, 3 x 10<sup>3</sup>, 1 x 10<sup>4</sup> y/o 3 x 10<sup>4</sup> células madre de placenta por reacción. También puede variarse el número de células madre de placenta con respecto al número de linfocitos T en el ensayo. Por ejemplo, las células madre de placenta y las linfocitos T en el ensayo pueden estar presentes en cualquier relación de, por ejemplo, aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferentemente en una relación de aproximadamente 1:5, aunque puede usarse un número relativamente mayor de células madre de placenta o linfocitos T.

El ensayo de regresión puede usarse de una forma similar.

En la presente memoria se proporcionan métodos para usar células madre de placenta para modular una respuesta inmunitaria, o la actividad de una pluralidad de uno o más tipos de células inmunitarias, *in vivo*. Las células madre de placenta y las células inmunitarias pueden ponerse en contacto, por ejemplo, en un individuo que es un receptor de una pluralidad de células madre de placenta. Cuando el contacto se realiza en un individuo, en una realización, el contacto tiene lugar entre células madre de placenta exógenas (es decir, células madre de placenta no procedentes del individuo) y una pluralidad de células inmunitarias endógenas al individuo. En realizaciones específicas, las células inmunitarias dentro del individuo son linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup> y/o células NK.

Dicha inmunodepresión usando células madre de placenta sería ventajosa para cualquier afección producida o empeorada por, o relacionada con una respuesta inmunitaria inapropiada o indeseable. La inmunomodulación mediada por células madre de placenta, por ejemplo inmunodepresión, sería útil, por ejemplo, en la represión de una respuesta inmunitaria inapropiada producida por el sistema inmunitario del individuo contra uno más de sus propios tejidos. En diversas realizaciones, por lo tanto, en la presente memoria se proporciona un método para reprimir una respuesta inmunitaria, donde la respuesta inmunitaria es una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, lupus eritematoso, diabetes, artritis reumatoide o esclerosis múltiple.

El contacto de la pluralidad de células madre de placenta con la pluralidad de uno o más tipos de células inmunitarias puede realizarse *in vivo* en el contexto de, o como una terapia auxiliar para, por ejemplo, el injerto o trasplante de uno o más tipos de tejidos a un individuo receptor. Dichos tejidos pueden ser, por ejemplo, médula ósea o sangre; un órgano; un tejido específico (por ejemplo, injerto de piel); aloinjerto de tejido compuesto (es decir, un injerto que comprende dos o más tipos diferentes de tejidos); etc. A este respecto, las células madre de placenta pueden usarse para reprimir una o más respuestas inmunitarias de una o más células inmunitarias contenidas dentro del individuo receptor, dentro del tejido o injerto trasplantado, o ambas cosas. El contacto se puede realizar antes, durante y/o después del injerto o trasplante. Por ejemplo, las células madre de placenta pueden administrarse en el momento del trasplante o injerto. Las células madre de placenta pueden también, o como alternativa, administrarse antes del trasplante o injerto, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días antes del trasplante o injerto. Las células madre de placenta pueden también, o como alternativa, administrarse a un receptor de un trasplante o injerto después del trasplante o injerto, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días después del trasplante o injerto. Preferentemente, la pluralidad de células madre de placenta se ponen en contacto con la pluralidad de células madre de placenta antes de que sea detectable cualquier signo o síntoma de una respuesta inmunitaria, por el individuo receptor o el tejido o injerto trasplantado, por ejemplo, un signo o síntoma detectable de enfermedad de injerto contra huésped o inflamación detectable.

En otra realización, el contacto dentro de un individuo se realiza principalmente entre células madre de placenta exógenas y células progenitoras o células madre exógenas, por ejemplo, células progenitoras o células madre exógenas que se diferencian en células inmunitarias. Por ejemplo, los individuos sometidos a una inmunoblación o mieloablación parcial o total como terapia auxiliar a una terapia contra el cáncer pueden recibir células madre de placenta en combinación con uno o más tipos distintos de células madre o células progenitoras. Por ejemplo, las células madre de placenta pueden combinarse con una pluralidad de células CD34<sup>+</sup>, por ejemplo, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>. Dichas células CD34<sup>+</sup> pueden ser, por ejemplo, células CD34<sup>+</sup> de una fuente de tejido tal como sangre periférica, sangre de cordón umbilical, sangre placentaria o médula ósea. Las células CD34<sup>+</sup> pueden aislarse de dichas fuentes de tejidos, o de la fuente de tejido entera (por ejemplo, unidades de sangre de cordón umbilical o médula ósea) o una preparación parcialmente purificada de la fuente de tejido (por ejemplo, glóbulos blancos de sangre de cordón) puede combinarse con las células madre de placenta. Se describen combinaciones de células madre de placenta y sangre de cordón, o células madre de sangre de cordón, en Hariri, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0180269.

Las células madre de placenta pueden administrarse al individuo en una relación, con respecto al número conocido o esperado de células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T, en el individuo, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferentemente de aproximadamente 1:5. Sin embargo, puede administrarse una pluralidad de células madre de placenta a un individuo en una relación de, en ejemplos no limitantes, aproximadamente 10.000:1, aproximadamente 1.000:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1.000 o aproximadamente 1:10.000. Generalmente, puede administrarse de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  células madre de placenta por kilogramo de receptor, preferentemente de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células madre de placenta por kilogramo de receptor, para efectuar una inmunodepresión. En diversas realizaciones, la pluralidad de células madre de placenta administradas a un individuo o sujeto comprenden al menos, aproximadamente, o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$  células madre de placenta o más.

Las células madre de placenta también pueden administrarse con uno o más segundos tipos de células madre, por ejemplo, células madres mesenquimatosas de médula ósea. Dichas segundas células madre pueden administrarse a un individuo con células madre de placenta en una relación de, por ejemplo, aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1.

Para facilitar el contacto de las células madre de placenta y las células inmunitarias *in vivo*, las células madre de placenta pueden administrarse al individuo por cualquier vía suficiente para poner en contacto las células madre de



placenta y las células inmunitarias entre sí. Por ejemplo, las células madre de placenta pueden administrarse al individuo, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, parenteral o directamente en un órgano, por ejemplo el páncreas. Para la administración *in vivo*, las células madre de placenta pueden formularse como una composición farmacéutica, como se describe más adelante en la Sección 5.6.1.

- 5 El método de inmunodepresión puede comprender además la adición de uno o más agentes inmunodepresores, particularmente en el contexto *in vivo*. En una realización, la pluralidad de células madre de placenta se pone en contacto con la pluralidad de células inmunitarias *in vivo* en un individuo, y se administra al individuo una composición que comprende un agente inmunodepresor. Los agentes inmunodepresores son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de linfocitos T (monoclonales o policlonales, o fragmentos de anticuerpo o derivados de los mismos), anticuerpos anti-receptor de IL-2 (por ejemplo Basiliximab (SIMULECT®) o daclizumab (ZENAPAX®), anticuerpos anti-receptor de linfocitos T (por ejemplo Muromonab-CD3), azatioprina, corticosteroides, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetilo, sirolimus, inhibidores de calcineurina y similares. En una realización específica, el agente inmunodepresor es un anticuerpo neutralizador contra la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  o MIP-1 $\beta$ . Preferentemente, el anticuerpo anti-MIP-1 $\alpha$  o MIP-1 $\beta$  se administra en una cantidad suficiente para producir una reducción detectable en la cantidad de MIP-1 $\alpha$  y/o MIP-1 $\beta$  en dicho individuo, por ejemplo, en el momento del trasplante.

## 5.2 Células madre de placenta y poblaciones de células madre de placenta

Los métodos de inmunodepresión proporcionados en la presente memoria usan células madre de placenta, es decir, células madre que pueden obtenerse a partir de una placenta o parte de la misma que (1) se adhieren a un sustrato de cultivo de tejidos; (2) tienen la capacidad de diferenciarse en tipos celulares no placentarios; y (3) tienen, en cantidades suficientes, la capacidad de reprimir de forma detectable una función inmunitaria, por ejemplo, la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos o ensayo de regresión. Las células madre de placenta no proceden de la sangre, por ejemplo, sangre placentaria o sangre de cordón umbilical. Las células madre de placenta usadas en los métodos y composiciones proporcionadas en la presente memoria tienen la capacidad, y se seleccionan por su capacidad, de reprimir el sistema inmunitario de un individuo.

Las células madre de placenta pueden ser de origen fetal o materno (es decir, pueden tener el genotipo de la madre o del feto). Las poblaciones de células madre de placenta, o poblaciones de células que comprenden células madre de placenta, pueden comprender células madre de placenta que únicamente son de origen fetal o materno, o pueden comprender una población mixta de células madre de placenta tanto de origen fetal como de origen materno. Las células madre de placenta, y las poblaciones de células que comprenden las células madre de placenta, pueden identificarse y seleccionarse por las características morfológicas, de marcador y de cultivo analizadas más adelante.

### 5.2.1 Características físicas y morfológicas

Las células madre de placenta usadas como se describe en la presente memoria, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivos celulares, se adhieren al sustrato de cultivo de tejidos, por ejemplo, a la superficie del recipiente de cultivo de tejidos (por ejemplo, plástico de cultivo de tejidos). Las células madre de placenta en cultivo asumen un aspecto estrellado, generalmente fibroblastoide, con varios procesos citoplásmicos que se extienden desde el cuerpo celular central. Sin embargo, las células madre de placenta son diferenciables morfológicamente de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células madre de placenta presentan un mayor número de estos procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, las células madre de placenta también son diferenciables de las células madre hematopoyéticas, que generalmente asumen una morfología más redondeada o de pavimento en cultivo.

### 5.2.2 Marcadores moleculares y genéticos de la superficie celular

Las células madre de placenta, y las poblaciones de células madre de placenta, útiles en los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria, expresan una pluralidad de marcadores que pueden usarse para identificar y/o aislar las células madre, o poblaciones de células que comprenden las células madre. Las células madre de placenta, y las poblaciones de células madre (es decir, dos o más células madre de placenta) incluyen células madre y poblaciones de células que contienen células madre obtenidas directamente de la placenta, o cualquier parte de la misma (por ejemplo, amnios, corion, cotiledones placentarios y similares). Las poblaciones de células madre de placenta también incluyen poblaciones de (es decir, dos o más) células madre de placenta en cultivo, y una población en un recipiente, por ejemplo, una bolsa. Las células madre de placenta, sin embargo, no son trofoblastos.

Las células madre de placenta generalmente expresan los marcadores CD73, CD105, CD200, HLA-G y/o OCT-4, y no expresan CD34, CD38 o CD45. Las células madre de placenta también pueden expresar HLA-ABC (MHC-1) y HLA-DR. Estos marcadores pueden usarse para identificar células madre de placenta, y para distinguir células madre de placenta de otros tipos de células madre. Como las células madre de placenta pueden expresar CD73 y CD105, pueden tener características parecidas a las células madre mesenquimatosas. Sin embargo, como las células madre de placenta pueden expresar CD200 y HLA-G, un marcador específico del feto, pueden distinguirse

de las células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, que no expresan ni CD200 ni HLA-G. De la misma manera, la ausencia de expresión de CD34, CD38 y/o CD45 identifica a las células madre de placenta como células madre no hematopoyéticas.

5 En la presente memoria se proporciona una población de células aisladas que comprende una pluralidad de células madre de placenta inmunodepresoras que son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>, donde dicha pluralidad reprime de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (RLM). En una realización específica de la pluralidad anterior, dichas células madre también son CD34<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células madre también son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otra realización específica, dichas células madre también son OCT-4<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células madre son también CD200<sup>+</sup>. En una realización más  
10 específica, dichas células madre son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>.

Para cualquiera de las células madre de placenta anteriores, o poblaciones de células madre de placenta, la célula madre o población de células madre de placenta son, o pueden comprender, células que se han sometido a pases al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces, o más, o expandido durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones de la población, o más.

15 En una realización específica de cualquiera de las células o poblaciones de células de placenta anteriores, el cariotipo de las células, o al menos aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % de las células de dicha población, es normal. En otra realización específica de cualquiera de las células o poblaciones de células de placenta anteriores, las células, o células de la población de células, son de origen no materno.

20 Las células madre de placenta aisladas o poblaciones de células madre de placenta aisladas, que llevan cualquiera de las combinaciones de marcadores anteriores, pueden combinarse en cualquier relación. Dos cualesquiera o más de las poblaciones de células madre de placenta anteriores pueden aislarse, o enriquecerse, para formar una población de células madre. Por ejemplo, una población aislada de células madre de placenta que comprende una primera población de células madre de placenta definida por una de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente puede combinarse con una segunda población de células madre de placenta definidas por otra de las  
25 combinaciones de marcadores descritas anteriormente, donde dicha primera y segunda poblaciones se combinan en una relación de aproximadamente 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, o aproximadamente 99:1. De una forma similar, pueden combinarse tres, cuatro o cinco cualesquiera, o más, de las células madre de placenta o poblaciones de células madre de placenta descritas anteriormente.

30 En una realización específica de las células madre de placenta mencionadas anteriormente, las células madre de placenta secretan constitutivamente IL-6, IL-8 y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1).

Las pluralidades inmunodepresoras de células madre de placenta descritas anteriormente pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células madre de placenta.

### 35 5.2.3 Selección y producción de poblaciones de células madre de placenta

En otra realización, en la presente memoria se proporciona un método para seleccionar una pluralidad de células madre de placenta inmunodepresoras a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una pluralidad de células placentarias donde al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 % al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de dichas células son  
40 células madre de placenta CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y donde dichas células madre de placenta reprimen detectablemente la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (RLM).

Las poblaciones, o pluralidades, inmunodepresoras de células madre de placenta pueden producirse de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, en la presente memoria se proporciona un método para producir una población de células, que comprende seleccionar cualquiera de las pluralidades de células madre de placenta descritas anteriormente, y aislar la pluralidad de células madre de placenta de otras células, por  
45 ejemplo, otras células placentarias.

### 5.2.4 Crecimiento en cultivo

El crecimiento de las células madre de placenta descritas en la presente memoria, como ocurre para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio particular seleccionado para el crecimiento. En condiciones óptimas, las  
50 células madre de placenta generalmente duplican su número en 3-5 días. Durante el cultivo, las células madre de placenta proporcionadas en la presente memoria se adhieren a un sustrato en cultivo, por ejemplo, la superficie de un recipiente de cultivo de tejidos (por ejemplo, plástico de una placa de cultivo de tejidos, plástico revestido con fibronectina y similares) y forman una monocapa.

Las poblaciones de células placentarias aisladas que comprenden las células madre de placenta proporcionadas en la presente memoria, cuando se cultivan en condiciones apropiadas, forman cuerpos de tipo embrioide, es decir, agrupamientos tridimensionales de células que crecen encima de la capa de células madre adherentes. Las células  
55

dentro de los cuerpos de tipo embrioide expresan marcadores asociados con células madre en una fase muy temprana, por ejemplo, OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células dentro de los cuerpos de tipo embrioide generalmente no son adherentes al sustrato de cultivo, como lo son las células madre de placenta descritas en la presente memoria, pero permanecen unidas a las células adherentes durante el cultivo. Las células de los cuerpos de tipo embrioide dependen de las células madre de placenta adherentes para la viabilidad, ya que no se forman cuerpos de tipo embrioide en ausencia de las células madre adherentes. De esta manera, las células madre de placenta adherentes facilitan el crecimiento de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende las células madre de placenta adherentes. Sin deseo de limitarse por ninguna teoría, se cree que las células de los cuerpos de tipo embrioide crecen sobre las células madre de placenta adherentes aunque las células madre embrionarias crecen sobre una capa de células de alimentación. Las células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, no desarrollan cuerpos de tipo embrioide en cultivo.

#### 5.2.5 Diferenciación

Las células madre de placenta útiles en los métodos de tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con o causadas por una respuesta inmunitaria inapropiada o perjudicial, por ejemplo, inflamación, proporcionadas en la presente memoria se pueden diferenciar en diferentes linajes celulares comprometidos. Por ejemplo, las células madre de placenta pueden diferenciarse en células de un linaje adipogénico, condrogénico, neurogénico u osteogénico. Dicha diferenciación puede realizarse, por ejemplo, por cualquier método conocido en la técnica para la diferenciación, por ejemplo, de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea en linajes celulares similares, o por métodos descritos en otras partes de la presente memoria.

Las células madre de placenta y las células madre de cordón umbilical proporcionadas en la presente memoria pueden presentar la capacidad de diferenciarse en un linaje celular particular *in vitro*, *in vivo* o *in vitro e in vivo*. En una realización específica, las células madre de placenta y las células madre de cordón umbilical proporcionadas en la presente memoria pueden diferenciarse *in vitro* cuando se ponen en condiciones que causan o promueven la diferenciación en un linaje de células particular, pero no se diferencian de forma detectable *in vivo*, por ejemplo, en un modelo de ratón NOD-SCID.

#### 5.3 Métodos para obtener células madre de placenta

##### 5.3.1 Composición de recogida de células madre

Las células madre de placenta pueden recogerse y aislarse de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria. Generalmente, las células madre se obtienen a partir de una placenta de mamífero usando una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una composición de recogida de células madre. En la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 60/754.969 relacionada, titulada "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition" presentada el 29 de diciembre de 2005, se describe con detalle una composición de recogida de células madre.

La composición de recogida de células madre puede comprender cualquier solución fisiológicamente aceptable adecuada para la recogida y/o cultivo de células madre, por ejemplo, una solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, NaCl al 0,9 %, etc.), un medio de cultivo (por ejemplo, DMEM, HDMEM, etc.) y similares.

La composición de recogida de células madre puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar las células madre de placenta, es decir, impedir que las células madre de placenta se sequen, o retrasar la muerte de las células madre de placenta, reducir el número de células madre de placenta en la población de células que mueren, o similares, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Dichos componentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis (por ejemplo, un inhibidor de caspasa o un inhibidor de JNK); un vasodilatador (por ejemplo, sulfato de magnesio, un fármaco antihipertensivo, péptido natriurético auricular (PNA), adrenocorticotropina, hormona de liberación de corticotropina, nitroprusiato sódico, hidralazina, adenosina trifosfato, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de necrosis (por ejemplo, 2-(1H-indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidona o clonazepam); un inhibidor de TNF- $\alpha$ ; y/o un perfluorocarburo que lleva oxígeno (por ejemplo, bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

La composición de recogida de células madre puede comprender una o más enzimas de degradación de tejidos, por ejemplo, una metaloproteasa, una serinproteasa, una proteasa neutra, una RNasa o una DNasa, o similares. Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, colagenasas (por ejemplo colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE, hialuronidasa y similares.

La composición de recogida de células madre puede comprender una cantidad eficaz desde el punto de vista bactericida o bacteriostático de un antibiótico. En ciertas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (por ejemplo, tobramicina), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (por ejemplo, penicilina V) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En una realización

particular, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y similares.

La composición de recogida de células madre también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones de magnesio (de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula con un peso molecular mayor de 20.000 Dalton, en una realización, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad del endotelio y la viabilidad celular (por ejemplo, un coloide natural o sintético, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente en una cantidad de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (por ejemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presentes en una cantidad de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 100 µM); un agente reductor (por ejemplo, N-acetilcisteína presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que previene la entrada de calcio en las células (por ejemplo, verapamilo presente en una concentración de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 25 µM); nitroglicerina (por ejemplo, de aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, en una realización, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de sangre residual (por ejemplo, heparina o hirudina presente en una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (por ejemplo, amilorida, etil isopropil amilorida, hexametilen amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente en una concentración de aproximadamente 1,0 µM a aproximadamente 5 µM).

### 5.3.2 Recogida y manipulación de la placenta

En general, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del parto. En una realización preferida, la placenta se recupera de una paciente después del consentimiento informado y después de haber obtenido una historia médica completa de la paciente y se asocia con la placenta. Preferentemente, la historia médica continúa después del parto. Dicha historia médica puede usarse para coordinar el uso posterior de la placenta o las células madre recogidas a partir de la misma. Por ejemplo, las células madre de placenta humanas pueden usarse, en vista de la historia médica, para medicina personalizada para el bebé asociado con la placenta, o para los padres, hermanos u otros parientes del bebé.

Antes de la recuperación de las células madre de placenta, se retira la sangre del cordón umbilical y la sangre placentaria. En ciertas realizaciones, después del parto, se recupera la sangre del cordón presente en la placenta. La placenta puede someterse a un proceso de recuperación de sangre de cordón convencional. Generalmente se usa una aguja o cánula, con ayuda de la gravedad, para extraer toda la sangre de la placenta (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.372.581; Hessel et al, Patente de Estados Unidos Nº 5.415.665). La aguja o cánula normalmente se pone en la vena umbilical y la placenta puede masajearse suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón desde la placenta. Dicha recuperación de sangre del cordón puede realizarse comercialmente, por ejemplo, LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell. Preferentemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la ruptura de tejidos durante la recuperación de la sangre del cordón.

Generalmente, la placenta se transporta desde la sala de partos o de nacimientos a otra localización, por ejemplo, un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y la recogida de las células madre, por ejemplo, por perfusión o disociación de tejidos. La placenta preferentemente se transporta en un dispositivo de transporte aislado térmicamente, estéril (que mantiene la temperatura de la placenta entre 20 y 28 °C), por ejemplo, poniendo la placenta, con el cordón umbilical pinzado en la parte proximal, en una bolsa de plástico estéril con cierre de cremallera, que después se pone en un recipiente aislado. En otra realización, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre de cordón sustancialmente como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite Nº 11/230.760, presentada el 19 de septiembre de 2005. Preferentemente, la placenta se entrega en el laboratorio de cuatro a veinticuatro horas después del parto. En ciertas realizaciones, la parte proximal del cordón umbilical se pinza, preferentemente en los 4-5 cm (centímetros) próximos a la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón. En otras realizaciones, la parte proximal del cordón umbilical se pinza después de la recuperación de la sangre del cordón pero antes del procesamiento adicional de la placenta.

La placenta, antes de la recogida de las células madre, puede almacenarse en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25 °C (grados centígrados). La placenta puede almacenarse durante un periodo no mayor de cuarenta y ocho horas, y preferentemente durante un periodo de cuatro a veinticuatro horas antes de perfundir la placenta para retirar toda la sangre de cordón residual. La placenta preferentemente se almacena en una solución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25 °C (grados centígrados). Las soluciones anticoagulantes adecuadas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse una solución de heparina o warfarina sódica. En una realización preferida, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (por ejemplo, al 1 % p/p en solución 1:1000). La placenta exanguinada preferentemente se almacena durante no más de 36 horas antes de recoger las células madre de placenta.

La placenta de mamífero o una parte de la misma, una vez recogida y preparada en general como se ha mencionado anteriormente, puede tratarse de cualquier manera conocida en la técnica, por ejemplo, puede

perfundirse o romperse, por ejemplo, digerirse con una o más enzimas de ruptura de tejidos, para obtener células madre.

### 5.3.3 Ruptura física y digestión enzimática del tejido placentario

5 En una realización, se recogen células madre de una placenta de mamífero por ruptura física, por ejemplo, digestión enzimática, del órgano, por ejemplo, usando la composición de recogida de células madre descrita en la Sección 5.3.1, anterior. Por ejemplo, la placenta, o una parte de la misma, puede, por ejemplo, pensarse, partirse, cortarse, picarse, cortarse en dados, triturarse, macerarse o similares, mientras está en contacto, por ejemplo, con un tampón, un medio o una composición de recogida de células madre, y el tejido posteriormente puede digerirse con una o más enzimas. La placenta, o una parte de la misma, también puede romperse físicamente y digerirse con una o más 10 enzimas, y el material resultante después puede sumergirse en, o mezclarse con, un tampón, un medio o una composición de recogida de células madre. Puede usarse cualquier método de ruptura física, siempre que el método de ruptura deje una pluralidad, más preferentemente la mayoría, y aún más preferentemente al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las células en dicho órgano viables, como se determina, por ejemplo, por exclusión de azul de tripano.

15 La placenta puede dividirse en componentes antes de la ruptura física y/o digestión enzimática y recuperación de las células madre. Por ejemplo, pueden obtenerse células madre de placenta a partir de la membrana amniótica, corion, cotiledones placentarios o cualquier combinación de los mismos, o cordón umbilical o cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, las células madre de placenta se obtienen a partir de tejido placentario que comprende amnios y corion, o amnios-corion y cordón umbilical. En una realización, las células madre se obtienen a partir de 20 amnios-corion y cordón umbilical en una relación de pesos de aproximadamente 1:1. Generalmente, las células madre de placenta pueden obtenerse por ruptura de un pequeño bloque de tejido placentario, por ejemplo, un bloque de tejido placentario que tiene un volumen de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o aproximadamente 1000 milímetros cúbicos.

25 Una composición de recogida de células madre preferida comprende una o más enzimas de ruptura de tejidos. La digestión enzimática preferentemente usa una combinación de enzimas, por ejemplo, una combinación de una metaloproteasa de matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. En una realización, la digestión enzimática del tejido placentario usa una combinación de una metaloproteasa de matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica para la digestión del ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa e hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) e hialuronidasa. Otras enzimas que pueden usarse para romper el tejido placentario incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serinproteasas tales como tripsina, quimotripsina o elastasa. Las serinproteasas pueden 30 inhibirse por alfa 2 microglobulina del suero y, por lo tanto, el medio usado para la digestión normalmente carece de suero. Normalmente se usan EDTA y DNasa en los procedimientos de digestión enzimática para aumentar la eficacia de la recuperación de células. El producto de digestión preferentemente se diluye para evitar que las células madre queden atrapadas dentro del producto de digestión viscoso.

35 Puede usarse cualquier combinación de enzimas de digestión de tejidos. Las concentraciones típicas para las enzimas de digestión de tejidos incluyen, por ejemplo, 50-200 U/ml para la colagenasa I y la colagenasa IV, 1-10 U/ml para la dispasa y 10-100 U/ml para la elastasa. Las proteasas pueden usarse en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o pueden usarse secuencialmente para liberar las células madre de placenta. Por ejemplo, en una realización, una placenta, o parte de la misma, se digiere primero con una cantidad apropiada de colagenasa I a 2 mg/ml durante 30 minutos, seguido de la digestión con tripsina, 0,25 %, durante 10 minutos a 37 °C. Preferentemente se usan serinproteasas consecutivamente después del uso de otras enzimas.

45 En otra realización, el tejido puede romperse adicionalmente por la adición de un quelante, por ejemplo ácido etilenglicol bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la composición de recogida de células madre que comprende las células madre, o a una solución en la que el tejido se rompe y/o digiere antes del aislamiento de las células madre con la composición de recogida de células madre.

50 Se apreciará que cuando se dispone de una placenta entera, o una parte de una placenta que comprende tanto células fetales como células maternas (por ejemplo, cuando la porción de la placenta comprende el corion o cotiledones), las células madre de placenta recogidas comprenderán una mezcla de células madre de placenta procedentes tanto de fuentes fetales como de fuentes maternas. Cuando una parte de la placenta comprende un número insignificante de células maternas o no contiene ninguna de estas células (por ejemplo, amnios), las células madre de placenta recogidas comprenderán casi exclusivamente células madre de placenta fetales.

### 5.3.4 Perfusión de la placenta

55 Las células madre de placenta también pueden obtenerse por perfusión de la placenta del mamífero. Se desvelan métodos de perfusión de placenta de mamífero para obtener células madre, por ejemplo, en Hariri, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0123141, y en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos relacionada N° 60/754.969, titulada "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition", presentada el 29 de diciembre de 2005.

- Las células madre de placenta pueden recogerse por perfusión, por ejemplo, a través del sistema vascular placentario, usando, por ejemplo, una composición de recogida de células madre como solución de perfusión. En una realización, una placenta de mamífero se perfunde mediante el paso de solución de perfusión a través de la arteria umbilical, la vena umbilical o ambas. El flujo de solución de perfusión a través de la placenta puede conseguirse usando, por ejemplo, flujo por gravedad en el interior de la placenta. Preferentemente, la solución de perfusión se hace pasar a través de la placenta usando una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica. La vena umbilical, por ejemplo, puede canularse con una cánula, por ejemplo, una cánula de TEFLON® o de plástico, que está conectada a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.
- En la preparación para la perfusión, la placenta preferentemente está orientada (por ejemplo, suspendida) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical están localizadas en el punto más alto de la placenta. La placenta puede perfundirse mediante el paso de un fluido de perfusión, por ejemplo, la composición de recogida de células madre proporcionada en la presente memoria, a través del sistema vascular de la placenta, o a través del sistema vascular de la placenta y el tejido circundante. En una realización, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa al interior de la vena y arteria umbilical. La solución de perfusión exuda desde y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos a los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un vaso abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estaba unida al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también puede introducirse a través de la abertura del cordón umbilical y dejarse fluir o percolar hacia el exterior de las aberturas en la pared de la placenta que contactaba con la pared uterina materna. En otra realización, la solución de perfusión se pasa a través de las venas umbilicales y se recoge desde la arteria umbilical, o se pasa a través de la arteria umbilical y se recoge desde las venas umbilicales.
- En una realización, la parte proximal del cordón umbilical está pinzada durante la perfusión, y más preferentemente, está pinzada en los 4-5 cm (centímetros) próximos a la inserción del cordón en el disco placentario.
- La primera recogida de fluido de perfusión procedente de una placenta de mamífero durante el proceso se exanguinación generalmente está coloreada con glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón y/o de la sangre de la placenta. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro según continúa la perfusión y los glóbulos rojos residuales del cordón se retiran de la placenta. Generalmente es adecuada una cantidad de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión para exanguinar inicialmente la placenta, pero puede usarse más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.
- El volumen de líquido de perfusión usado para recoger las células madre de placenta puede variar dependiendo del número de células madre a recoger, el tamaño de la placenta, el número de recogidas que se van a realizar a partir de una sola placenta, etc. En diversas realizaciones, el volumen del líquido de perfusión puede ser de 50 ml a 5000 ml, de 50 ml a 4000 ml, de 50 ml a 3000 ml, de 100 ml a 2000 ml, de 250 ml a 2000 ml, de 500 ml a 2000 ml o de 750 ml a 2000 ml. Generalmente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después de la exanguinación.
- La placenta puede perfundirse una pluralidad de veces durante el transcurso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se va a perfundir una pluralidad de veces, puede mantenerse o cultivarse en condiciones asépticas en un recipiente u otro contenedor adecuado, y perfundirse con una composición de recogida de células madre, o una solución de perfusión convencional (por ejemplo, una solución salina normal tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (por ejemplo, heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxycumarina) y/o con o sin un agente antimicrobiano (por ejemplo,  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomycin (por ejemplo, a 40-100  $\mu$ g/ml), penicilina (por ejemplo, a 40 U/ml), anfotericina B (por ejemplo, a 0,5  $\mu$ g/ml). En una realización, la placenta aislada se mantiene o cultiva durante un periodo de tiempo sin recoger el perfundido, de tal forma que la placenta se mantiene o cultiva durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o 2 o 3 o más días antes de la perfusión y la recogida del perfundido. La placenta perfundida puede mantenerse durante uno o más periodos de tiempo adicionales, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundirse una segunda vez con, por ejemplo, 700-800 ml de fluido de perfusión. La placenta puede perfundirse 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En una realización preferida, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, por ejemplo, la composición de recogida de células madre, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos a diferentes puntos de tiempo pueden procesarse adicionalmente de forma individual para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, por ejemplo, células madre. También pueden reunirse los perfundidos de diferentes puntos de tiempo.
- Sin deseo de limitarse por ninguna teoría, después de la exanguinación y de que haya transcurrido un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se cree que las células madre de placenta migran al interior de la microcirculación exanguinada y perfundida de la placenta donde se recogen, preferentemente por lavado en un recipiente de recogida por perfusión. La perfusión de la placenta aislada no solo sirve para retirar la sangre del cordón residual, sino que también proporciona a la placenta los nutrientes apropiados, incluyendo el oxígeno. La placenta puede cultivarse y perfundirse con una solución similar que se usó para retirar las células de sangre de cordón residuales, preferentemente, sin la adición de agentes anticoagulantes.

La perfusión como se describe en la presente memoria da como resultado la recogida de significativamente más células madre de placenta que el número que puede obtenerse a partir de una placenta de mamífero no perfundida con dicha solución, y no tratada de otra forma para obtener células madre (por ejemplo, por ruptura de tejidos, por ejemplo digestión enzimática). En este contexto, "significativamente más" significa al menos 10 % o más. La perfusión produce significativamente más células madre de placenta que, por ejemplo, el número de células madre de placenta que puede obtenerse a partir del medio de cultivo en el que se ha cultivado una placenta o una parte de la misma.

Las células madre pueden aislarse de la placenta por perfusión con una solución que comprende una o más proteasas u otras enzimas de ruptura de tejidos. En una realización específica, una placenta o parte de la misma (por ejemplo, membrana amniótica, amnios y corion, lóbulo placentario o cotiledón, o combinación de cualquiera de los anteriores) se pone a 25-37 °C y se incuba con una o más enzimas de ruptura de tejidos en 200 ml de un medio de cultivo durante 30 minutos. Las células del perfundido se recogen, se llevan a 4 °C y se lavan con una mezcla inhibidora fría que comprende EDTA 5 mM, ditioneitol 2 mM y beta-mercaptoetanol 2 mM. Las células madre se lavan después de varios minutos con una composición de recogida de células madre fría (por ejemplo a 4 °C) descrita en otras partes de la presente memoria.

Se apreciará que la perfusión usando el método de recipiente, es decir, mediante el cual el perfundido se recoge después de que ha exudado del lado materno de la placenta, da como resultado una mezcla de células fetales y maternas. Como resultado, las células recogidas por este método comprenden una población mixta de células madre de placenta tanto de origen fetal como de origen materno. Por el contrario, la perfusión únicamente mediante el sistema vascular de la placenta, con lo que el fluido de perfusión pasa a través de uno o dos vasos placentarios y se recoge únicamente a través del vaso o vasos restantes, da como resultado la recogida de una población de células madre de placenta casi exclusivamente de origen fetal.

#### 5.3.5 Aislamiento, clasificación y caracterización de células madre de placenta

Las células madre procedentes de placenta de mamífero, obtenidas por perfusión o digestión enzimática, pueden purificarse (es decir, aislarse) inicialmente de otras células por centrifugación en gradiente de Ficoll. Dicha centrifugación puede seguir cualquier protocolo convencional para velocidad de centrifugación, etc. En una realización, por ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfundido por centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, que separa las células, por ejemplo, de los restos contaminantes y las plaquetas. En otra realización, el perfundido placentario se concentra a aproximadamente 200 ml, se deposita suavemente en capas sobre Ficoll y se centrifuga a aproximadamente 1100 x g durante 20 minutos a 22 °C, y se recoge la capa de contacto de baja densidad de las células para un procesamiento adicional.

Los sedimentos celulares pueden resuspenderse en una composición de recogida de células madre nueva, o un medio adecuado para el mantenimiento de células madre, por ejemplo, medio IMDM sin suero que contiene 2U/ml de heparina y EDTA 2 mM EDTA (GibcoBRL, NY). La fracción total de células mononucleares puede aislarse, por ejemplo, usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendando por el fabricante.

Como se usa en la presente memoria, el "aislamiento" de las células madre de placenta significa la retirada de al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células con las que las células madre están asociadas normalmente en la placenta de mamífero intacta. Una célula madre de un órgano está "aislada" cuando está presente en una población de células que comprende menos de 50 % de las células con las que la célula madre está asociada normalmente en el órgano intacto.

Las células placentarias obtenidas por perfusión o digestión, por ejemplo, pueden aislarse adicionalmente, o inicialmente, por tripsinización diferencial usando, por ejemplo, una solución de tripsina al 0,05 % con EDTA al 0,2 % (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial es posible porque las células madre de placenta generalmente se separan de las superficies de plástico dentro de un periodo de aproximadamente cinco minutos mientras que otras poblaciones adherentes generalmente requieren más de 20-30 minutos de incubación. Las células madre de placenta separadas pueden recogerse después de la tripsinización y neutralización con tripsina, usando, por ejemplo, Solución de Neutralización de Tripsina (TNS, Cambrex). En una realización de aislamiento de células adherentes, se ponen alcúotas de, por ejemplo, aproximadamente  $5 \cdot 10^5$  en cada uno de varios matraces T-75, preferentemente matraces T75 revestidos con fibronectina. En dicha realización, las células pueden cultivarse con Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimatosas (MSCGM) (Cambrex) disponible en el mercado, y ponerse en un incubador de cultivo de tejidos (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces lavando con PBS. El PBS después se reemplaza por MSCGM. Los matraces preferentemente se examinan diariamente con respecto a la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y expansión de grupos de células fibroblastoides.

El número y el tipo de células recogidas a partir de una placenta de mamífero pueden supervisarse, por ejemplo, midiendo los cambios de morfología y los marcadores de la superficie celular usando técnicas de detección de células convencionales tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (por ejemplo tinción con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcador celular), clasificación de células activadas

por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas por magnetismo (MACS), por examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal, y/o midiendo cambios en la expresión génica usando técnicas bien conocidas en este campo, tales como PCR y perfil de la expresión génica. Estas técnicas pueden usarse, también, para identificar células que son positivas para uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, usando anticuerpos contra CD34, se puede determinar, usando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si es así, la célula es CD34<sup>+</sup>. De forma similar, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 para ser detectable por RT-PCR, o significativamente más ARN de OCT-4 que una célula adulta, la célula es OCT-4<sup>+</sup>. Los anticuerpos contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre, tales como OCT-4, son bien conocidos en la técnica.

Las células placentarias, particularmente las células que se han aislado por separación en Ficoll, adherencia diferencial o una combinación de ambas técnicas, pueden clasificarse usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluyendo células, basándose en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150-165). La excitación con láser de restos fluorescentes en las partículas individuales produce una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, se marcan anticuerpos específicos de marcadores de la superficie celular o ligandos con distintos marcadores fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador de células, permitiendo la separación de células basándose en su capacidad de unirse a los anticuerpos usados. Las partículas clasificadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o de 364 pocillos para facilitar la separación y clonación.

En un esquema de clasificación, se clasifican células madre de placenta basándose en la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 y/o HLA-G. Esto puede conseguirse en relación con procedimientos para seleccionar células madre basándose en sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, puede realizarse una selección de adherencia de células madre antes o después de la clasificación basándose en la expresión de marcadores. En una realización, por ejemplo, las células se clasifican primero basándose en su expresión de CD34; las células CD34<sup>-</sup> quedan retenidas y las células que son CD200<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup> se separan de todas las demás células CD34<sup>-</sup>. En otra realización, las células procedentes de la placenta se basan en su expresión de marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que presentan cualquiera de estos marcadores se aíslan para un uso adicional. Las células que expresan, por ejemplo, CD200 y/o HLA-G, en una realización específica, pueden clasificarse adicionalmente basándose en su expresión de CD73 y/o CD105, o epítomos reconocidos por anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o ausencia de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en una realización, las células placentarias se clasifican por expresión, o ausencia de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y las células placentarias que son CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup> se aíslan de otras células placentarias para un uso adicional.

En otra realización, pueden usarse perlas magnéticas para separar las células. Las células pueden clasificarse usando una técnica de clasificación de células activadas por magnetismo (MACS), un método para separar partículas basándose en su capacidad de unirse a perlas magnéticas (de 0,5-100 μm de diámetro). Puede realizarse una diversidad de modificaciones útiles sobre las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpos que reconocen específicamente una molécula o hapteno particular de la superficie celular. Las perlas después se mezclan con las células para permitir la unión. Las células después se pasan a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de la superficie celular específico. En una realización, estas células después pueden aislarse y volverse a mezclar con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores adicionales de la superficie celular. Las células se pasan de nuevo a través de un campo magnético, aislando células que se unen a los dos anticuerpos. Dichas células después pueden diluirse en placas separadas, tales como placas de microtitulación para el aislamiento clonal.

Las células madre de placenta también pueden caracterizarse y/o clasificarse basándose en la morfología celular y las características de crecimiento. Por ejemplo, las células madre de placenta pueden caracterizarse como células que tienen y/o seleccionadas basándose, por ejemplo, en un aspecto de fibroblastoide en cultivo. Las células madre de placenta también pueden caracterizarse como células que tienen y/o se seleccionan basándose en su capacidad de formar cuerpos de tipo embrioide. En una realización, por ejemplo, se aíslan de otras células placentarias células placentarias que tienen forma de fibroblastoide expresan CD73 y CD105 y producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo. En otra realización, se aíslan de otras células placentarias células placentarias OCT-4<sup>+</sup> que producen uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo.

En otra realización, las células madre de placenta pueden identificarse y caracterizarse por un ensayo de unidades de formación de colonias. Los ensayos de unidades de formación de colonias son conocidos generalmente en la técnica, tales como el medio Mesen Cult™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)

Las células madre de placenta pueden evaluarse con respecto a la viabilidad, potencial de proliferación y longevidad usando técnicas convencionales conocidas en este campo, tales como un ensayo de exclusión con azul de tripano, ensayo de captación de diacetato de fluoresceína, ensayo de captación de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y ensayo de captación de timidina, ensayo de proliferación de células por MTT (para evaluar la proliferación). La longevidad puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica, tales como por



determinación del número máximo de duplicaciones de la población en un cultivo extendido.

Las células madre de placenta también pueden separarse de otras células placentarias usando otras técnicas conocidas en este campo, por ejemplo, crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células indeseadas (selección negativa); separación basada en las diferencias en la capacidad de aglutinación de las células en la población mixta, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; filtración; centrifugación convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugación contracorriente); separación a gravedad unidad; distribución contracorriente; electroforesis; y similares.

#### 5.4 Cultivo de células madre de placenta

##### 5.4.1 Medios de cultivo

Pueden usarse células madre de placenta aisladas, poblaciones de células madre de placenta, o células o tejido placentario a partir del cual se desarrollan las células madre de placenta, para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células generalmente se transfieren a recipientes estériles de cultivo de tejidos sin revestir o revestidos con una matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína de membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

Las células madre de placenta pueden cultivarse en cualquier medio y en cualquier condición, considerada en la técnica aceptable para el cultivo de células madre. Preferentemente, el medio de cultivo comprende suero. Las células madre de placenta pueden cultivarse, por ejemplo, en DMEM-LG (Medio Esencial Modificado de Dulbecco, baja concentración de glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA+BSA (ácido linoleico-albúmina de suero bovino), dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1 y penicilina/estreptomina; DMEM-HG (alta concentración de glucosa) que comprende suero bovino fetal (FBS) al 10 %; DMEM-HG que comprende FBS al 15 %; IMDM (Medio de Dulbecco modificado por Iscove) que comprende FBS al 10 %, suero de caballo al 10 % e hidrocortisona; M199 que comprende FBS al 10 %, EGF y heparina;  $\alpha$ -MEM (medio esencial mínimo) que comprende FBS al 10 %, GlutaMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende FBS al 10 %, GlutaMAX™ y gentamicina, etc. Un medio preferido es DMEM-LG/MCDB-201 que comprende FBS al 2 %, ITS, LA+BSA, dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF y penicilina/estreptomina.

Otros medios que pueden usarse para cultivar células madre de placenta incluyen DMEM (de alta o baja concentración de glucosa), medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimatosas (MSCGM), Medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMIEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE.

El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferentemente aproximadamente 2-15 % (v/v); suero equino (de caballo) (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferentemente aproximadamente 0,001 % (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento semejante a insulina-1 (IGF-1), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, solos o en combinación.

##### 5.4.2 Expansión y proliferación de células madre de placenta

Una vez que se dispone de una célula madre de placenta aislada o una población aislada de células madre (por ejemplo, una célula madre o población de células madre separadas de al menos 50 % de las células placentarias con las que la célula madre o la población de células madre está asociada normalmente *in vivo*), la célula madre o población de células madre puede proliferarse y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, una población de células madre de placenta puede cultivarse en recipientes de cultivo de tejidos, por ejemplo, placas, matraces, placas multipocillo o similares, durante un periodo de tiempo suficiente para que las células madre proliferen hasta una confluencia de 70-90 %, es decir, hasta que las células madre y su descendencia ocupen 70-90 % del área de la superficie de cultivo del recipiente de cultivo de tejidos.

Las células madre de placenta pueden sembrarse en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células pueden sembrarse a baja densidad (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup>) o a alta densidad (por ejemplo, aproximadamente 50.000 o más células/cm<sup>2</sup>). En una realización preferida, las células se cultivan a aproximadamente 0-aproximadamente 5 por ciento por volumen de CO<sub>2</sub> en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan a aproximadamente 2-aproximadamente 25 por ciento de O<sub>2</sub> en aire, preferentemente a aproximadamente 5-aproximadamente 20 % de O<sub>2</sub> en aire. Las células preferentemente se cultivan a aproximadamente 25 °C-aproximadamente 40 °C, preferentemente a 37 °C. Las células preferentemente se cultivan en un incubador. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo usando un biorreactor. Las células madre de placenta preferentemente se desarrollan

en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína o similares).

Una vez que se ha obtenido una confluencia de 70-90 %, las células pueden someterse a pases. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, por ejemplo, tripsinizarse usando técnicas bien conocidas en este campo, para separarlas de la superficie de cultivo de tejidos. Después de retirar las células por pipeteo y recuento de las células, aproximadamente 20.000-100.000 células madre, preferentemente aproximadamente 50.000 células madre, se pasan a un nuevo recipiente de cultivo que contiene medio de cultivo limpio. Generalmente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del que se retiraron las células madre. En la presente memoria se proporcionan poblaciones de células madre de placenta que se han sometido a pases al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces, o más, y combinaciones de las mismas.

#### 5.4.3 Poblaciones de células madre de placenta

Los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria, en ciertas realizaciones, usan poblaciones de células madre de placenta. Las poblaciones de células madre de placenta pueden aislarse directamente de una o más placentas; es decir, la población de células madre de placenta puede ser una población de células placentarias que comprende células madre de placenta obtenidas a partir de, o contenidas dentro de, un perfundido u obtenidas a partir de, o contenidas dentro de, un producto de digestión (es decir, el conjunto de células obtenidas por digestión enzimática de una placenta o una parte de la misma). Las células madre de placenta aisladas descritas en la presente memoria también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células madre de placenta. Las poblaciones de células placentarias que comprenden células madre de placenta también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células madre de placenta.

Las poblaciones de células madre de placenta descritas en la presente memoria comprenden células madre de placenta, por ejemplo, células madre de placenta como se describen en la presente memoria. En diversas realizaciones, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células en una población de células madre de placenta aisladas son células madre de placenta. Es decir, una población de células madre de placenta puede comprender, por ejemplo, hasta 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de células que no son células madre.

En la presente memoria se proporcionan métodos para producir una población de células madre de placenta aisladas, por ejemplo, mediante la selección de células madre de placenta, obtenidas por digestión enzimática o perfusión, que expresan marcadores particulares y/o características de cultivo o morfológicas particulares. En una realización, por ejemplo, una población celular puede producirse por un método que comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD73, CD105 y CD200; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y OCT-4; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105 y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra realización, el método para producir una población celular comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4 y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo de tipo embriode; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el método puede comprender además seleccionar células placentarias que expresan ABC-p (una proteína transportadora ABC específica de placenta; véase, por ejemplo, Allikmets *et al.*, *Cancer Res.* 58(23): 5337-9 (1998)). El método también puede comprender seleccionar células que presentan al menos una característica específica para, por ejemplo, una célula madre mesenquimatosas, por ejemplo, expresión de CD29, expresión de CD44, expresión de CD90 o expresión de una combinación de los anteriores.

En las realizaciones anteriores, el sustrato puede ser cualquier superficie sobre la que pueda realizarse el cultivo y/o selección de células, por ejemplo, células madre de placenta. Generalmente, el sustrato es un plástico, por ejemplo, un plástico de una placa multipocillo o una placa de cultivo de tejidos. El plástico de cultivo de tejidos puede estar revestido con una micromolécula, por ejemplo laminina o fibronectina.

Las células, por ejemplo, las células madre de placenta pueden seleccionarse de una población de células madre de placenta por cualquier medio conocido en la técnica de selección de células. Por ejemplo, las células pueden seleccionarse usando un anticuerpo o anticuerpos contra uno o más marcadores de la superficie celular, por ejemplo, en citometría de flujo o FACS. La selección puede realizarse usando anticuerpos junto con perlas

magnéticas. En la técnica se conocen anticuerpos que son específicos para ciertos marcadores relacionados con las células madre. Por ejemplo, anticuerpos contra OCT-4 (Abcam, Cambridge, MA), CD200 (Abcam), HLA-G (Abcam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), CD105 (Abcam; BioDesign International, Saco, ME), etc. También están disponibles en el mercado anticuerpos contra otros marcadores, por ejemplo, CD34, CD38 y CD45 están disponibles, por ejemplo, en StemCell Technologies o BioDesign International.

La población de células madre de placenta aislada puede comprender células placentarias que no son células madre o células que no son células placentarias.

Las poblaciones de células madre de placenta aisladas pueden combinarse con una o más poblaciones de células que no son células madre o células que no son placentarias. Por ejemplo, una población aislada de células madre de placenta puede combinarse con sangre (por ejemplo, sangre placentaria o sangre de cordón umbilical), células madre derivadas de sangre (por ejemplo, células madre derivadas de sangre placentaria o sangre de cordón umbilical), poblaciones de células nucleadas derivadas de sangre, células mesenquimatosas derivadas de médula ósea, poblaciones de células madre derivadas de hueso, médula ósea en bruto, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas dentro de tejidos, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.) y similares. Las células en una población de células madre de placenta aislada pueden combinarse con una pluralidad de células de otro tipo en relaciones de aproximadamente 100.000.000:1, 50.000.000:1, 20.000.000:1, 10.000.000:1, 5.000.000:1, 2.000.000:1, 1.000.000:1, 500.000:1, 200.000:1, 100.000:1, 50.000:1, 20.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 2.000:1, 1.000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000; 1:2.000.000; 1:5.000.000; 1:10.000.000; 1:20.000.000; 1:50.000.000; o aproximadamente 1:100.000.000, comparando las cantidades de células nucleadas totales en cada población. Las células en una población de células madre de placenta aislada también pueden combinarse con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos celulares.

En una realización, una población aislada de células madre de placenta se combina con una pluralidad de células madre hematopoyéticas. Dichas células madre hematopoyéticas pueden estar, por ejemplo, contenidas dentro de sangre placentaria sin procesar, sangre de cordón umbilical o sangre periférica; en las células nucleadas totales procedentes de sangre placentaria, sangre de cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células CD34<sup>+</sup> procedentes de sangre placentaria, sangre de cordón umbilical o sangre periférica; en médula ósea no procesada; en células nucleadas totales procedentes de médula ósea; en una población aislada de células CD34<sup>+</sup> procedentes de médula ósea o similares.

#### 5.5 Conservación de células madre de placenta

Las células madre de placenta pueden conservarse, es decir, ponerse en condiciones que permitan el almacenamiento a largo plazo, o en condiciones que inhiban la muerte celular, por ejemplo, por apoptosis o necrosis.

Las células madre de placenta pueden conservarse usando, por ejemplo, una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de necrosis y/o un perfluorocarburo que lleva oxígeno, como se describe en la Solicitud Provisional de Estados Unidos relacionada N° 60/754.969, titulada "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition" presentada el 25 de diciembre de 2005. En una realización, en la presente memoria se proporciona un método para conservar una población de células madre que comprende poner en contacto dicha población de células madre con una composición de recogida de células madre que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarburo que lleva oxígeno, donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células madre, en comparación con una población de células madre que no está en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de caspasa. En otra realización específica, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de JNK. En una realización más específica, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o proliferación de dichas células madre. En otra realización, dicha composición de recogida de células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo que lleva oxígeno en fases separadas. En otra realización, dicha composición de recogida de células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo que lleva oxígeno en una emulsión. En otra realización, la composición de recogida de células madre comprende además un emulsionante, por ejemplo lecitina. En otra realización, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo están entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C en el momento del contacto de las células madre. En otra realización más específica, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo están entre aproximadamente 2 °C y 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 5 °C, en el momento del contacto de las células madre. En otra realización más específica, dicho contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células madre. En otra realización más específica, dicho contacto se realiza durante la congelación y descongelación de dicha población de células madre.

En otra realización, pueden conservarse poblaciones de células madre de placenta por un método que comprende poner en contacto dicha población de células madre con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto para conservar

órganos, donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células madre, en comparación con una población de células madre con la que no ha contactado el inhibidor de la apoptosis. En una realización específica, el compuesto conservante de órganos es una solución UW (descrita en la Patente de Estados Unidos N° 4.798.824; también conocida como ViaSpan; véase también Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2): 251-257 (1990)) o una solución descrita en Stem *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.552.267. En otra realización, dicho compuesto conservante de órganos es hidroxietilalmidón, ácido lactobiónico, rafinosa o una combinación de los mismos. En otra realización, la composición de recogida de células madre comprende además un perfluorocarburo que lleva oxígeno, en dos fases o como una emulsión.

En otra realización del método, las células madre de placenta entran en contacto con una composición de recogida de células madre que comprende un inhibidor de la apoptosis y perfluorocarburo que lleva oxígeno, compuesto conservante de órganos o una combinación de los mismos, durante la perfusión. En otra realización, dichas células madre se ponen en contacto durante un proceso de ruptura de tejidos, por ejemplo, digestión enzimática. En otra realización, las células madre de placenta se ponen en contacto con dicho compuesto de recogida de células madre después de la recogida por perfusión, o después de la recogida por ruptura de tejidos, por ejemplo, digestión enzimática.

Generalmente, durante la recogida, enriquecimiento y aislamiento de células placentarias, es preferible minimizar o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y al estrés mecánico. En otra realización del método, por lo tanto, una célula madre o población de células madre se expone a una condición hipóxica durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, donde una concentración hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en sangre. En una realización más específica, dicha población de células madre se expone a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otra realización más específica, dicha población de células madre se expone a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no se expone a una condición hipóxica, durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento. En otra realización específica, dicha población de células madre no se expone a estrés de cizalla durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento.

Las células madre de placenta descritas en la presente memoria pueden crioconservarse, por ejemplo, en un medio de crioconservación en recipientes pequeños, por ejemplo, ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero sin limitación, medio de cultivo que incluye, por ejemplo, medio de crecimiento o medio de congelación de células, por ejemplo, medio de congelación de células disponible en el mercado, por ejemplo, C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación preferentemente comprende DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 10 % (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, Plasmalyte, metilcelulosa y/o glicerol. Las células madre de placenta preferentemente se enfrían a aproximadamente 1 °C/min durante la crioconservación. Una temperatura de crioconservación preferida es de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -180 °C, preferentemente de aproximadamente -125 °C a aproximadamente 140 °C. Las células crioconservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido antes de descongelarse para el uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente 90 °C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células crioconservadas preferentemente se descongelan a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

## 5.6 Usos de células madre de placenta

### 5.6.1 Composiciones que comprenden células madre de placenta

Los métodos de inmunodepresión proporcionados en la presente memoria pueden usar composiciones que comprenden células madre de placenta o biomoléculas de las mismas. De la misma manera, las pluralidades y poblaciones de células madre de placenta proporcionadas en la presente memoria pueden combinarse con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable para su uso, por ejemplo, en investigación o terapia.

#### 5.6.1.1 Células madre de placenta crioconservadas

Las células madre de placenta inmunodepresoras, y las poblaciones de las células, descritas en la presente memoria pueden conservarse, por ejemplo, crioconservarse para un uso posterior. Los métodos para la crioconservación de células, tales como las células madre, sin bien conocidos en la técnica. Pueden prepararse poblaciones de células madre de placenta en una forma que se pueda administrar fácilmente a un individuo. Por ejemplo, las células madre de placenta o poblaciones de las células madre de placenta descritas en la presente memoria pueden contenerse dentro de un recipiente que sea adecuado para el uso médico. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, una bolsa de plástico estéril, matraz, frasco u otro recipiente a partir del cual pueda dispensarse fácilmente la población de células madre de placenta. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico aceptable desde el punto de vista médico adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente preferentemente es uno que permite la crioconservación de la población de células madre combinada.

Las poblaciones de células madre de placenta inmunodepresoras crioconservadas pueden comprender células madre de placenta derivadas de un solo donante o de múltiples donantes. La población de células madre de placenta puede tener compatibilidad HLA total con un receptor deseado, o incompatibilidad HLA parcial o total.

De esta manera, en una realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende una población de células madre de placenta inmunodepresoras en un recipiente. En una realización específica, la población de células madre está crioconservada. En otra realización específica, el recipiente es una bolsa, matraz o frasco. En una realización más específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En una realización más específica, dicha bolsa es adecuada, permite o facilita la administración intravenosa de dicha población de células madre de placenta. La bolsa puede comprender múltiples lúmenes o compartimentos que están interconectados para permitir la mezcla de las células madre de placenta y una o más soluciones distintas, por ejemplo, un fármaco, antes o durante la administración. En otra realización específica, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la crioconservación de la población de células madre combinadas. En otra realización específica, dicha población de células madre de placenta está contenida dentro de una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En una realización más específica, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl al 0,9 %. En otra realización específica, dicha población de células madre de placenta comprende células placentarias que tienen una compatibilidad HLA con un receptor de dicha población de células madre. En otra realización específica, dicha población de células madre combinadas comprende células placentarias que tienen al menos una incompatibilidad HLA parcial con un receptor de dicha población de células madre. En otra realización específica, dichas células madre de placenta proceden de una pluralidad de donantes.

#### 5.6.1.2 Composiciones farmacéuticas

Las poblaciones inmunodepresoras de células madre de placenta, o poblaciones de células que comprenden células madre de placenta, pueden formularse en composiciones farmacéuticas para su uso *in vivo*. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden una población de células madre de placenta, o una población de células que comprenden células madre de placenta, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable aceptada para la administración *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender cualquiera de las poblaciones de células madre de placenta, o tipos de células madre de placenta, descritas en otras partes de este documento. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células madre de placenta fetales, maternas o tanto fetales como maternas. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender además células madre de placenta obtenidas a partir de un solo individuo o placenta, o de una pluralidad de individuos o placentas.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender cualquier número inmunodepresor de células madre de placenta. Por ejemplo, una sola dosis unitaria de células madre de placenta puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células madre de placenta.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender poblaciones de células que comprenden 50 % o más de células viables (es decir, al menos 50 % de las células en la población son funcionales o están vivas). Preferentemente, al menos 60 % de las células en la población son viables. Más preferentemente, al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de las células en la población de la composición farmacéutica son viables.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender uno o más compuestos que, por ejemplo, faciliten el injerto (por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de linfocitos T, un inmunodepresor o similares); estabilizadores tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, hidroxietil almidón y similares.

#### 5.6.1.3 Medio acondicionado de células madre de placenta

Las células madre de placenta proporcionadas en la presente memoria pueden usarse para producir medio acondicionado que es inmunodepresor, es decir, medio que comprende una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células madre que tienen un efecto inmunodepresor detectable sobre una pluralidad de uno o más tipos de células inmunitarias. En diversas realizaciones, el medio acondicionado comprende medio en el que las células madre de placenta se han desarrollado durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días. En otras realizaciones, el medio acondicionado comprende medio en el que las células madre de placenta se han desarrollado hasta al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de confluencia o hasta 100 % de confluencia. Dicho medio acondicionado puede usarse para soportar el cultivo de una población separada de células madre de placenta, o células madre de otro tipo. En otra realización, el medio acondicionado comprende medio en el que se han diferenciado células madre de placenta en un tipo celular adulto. En otra realización, el medio acondicionado comprende medio en el que se han cultivado células madre de placenta y células madre no placentarias.

De esta manera, en una realización, en la presente memoria se proporciona una composición que comprende medio de cultivo procedente de un cultivo de células madre de placenta, donde dichas células madre de placenta (a) se adhieren a un sustrato; (b) expresan CD73, CD105 y CD200 y (c) reprimen de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en una RLM (reacción de linfocitos mixtos), donde dicho cultivo de células madre de placenta se ha cultivado en dicho medio durante 24 horas o más. En una realización específica, la composición comprende además una pluralidad de dichas células madre de placenta.

#### 5.6.1.4 Matrices que comprenden células madre de placenta

En la presente memoria además se proporcionan matrices, hidrogeles, soportes y similares que comprenden células madre de placenta inmunodepresoras, por ejemplo, una población inmunodepresora de células madre de placenta.

Las células madre de placenta proporcionadas en la presente memoria pueden sembrarse en una matriz natural, por ejemplo, un biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Dicho material de membrana amniótica puede ser, por ejemplo, membrana amniótica diseccionada directamente de una placenta de mamífero; membrana amniótica fijada o tratada térmicamente, membrana amniótica sustancialmente seca (es decir, <20 % de H<sub>2</sub>O), membrana coriónica, membrana coriónica sustancialmente seca, membrana amniótica y coriónica sustancialmente seca y similares. Se describen biomateriales placentarios preferidos sobre los que pueden sembrarse las células madre de placenta en Hariri, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0048796.

Las células madre de placenta proporcionadas en la presente memoria pueden suspenderse en una solución de hidrogel adecuada, por ejemplo, para inyección. Los hidrogeles adecuados para dichas composiciones incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. En una realización, una solución de hidrogel que comprende las células puede dejarse endurecer, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tenga células dispersas en su interior para la implantación. Las células madre de placenta en dicha matriz también pueden cultivarse de forma que las células se expandan por mitosis antes de la implantación. El hidrogel es, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura reticulada tridimensional de celdas abiertas que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los materiales formadores de hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliacrilatos, que están reticulados iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o matriz es biodegradable.

En algunas realizaciones, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ* (véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2002/0022676; Anseth *et al.*, *J. Control Release*, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang *et al.*, *Biomaterials*, 24(22): 3969-80 (2003).

En algunas realizaciones, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas tales como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones acuosas de alcohol, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Son ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que pueden reaccionar con cationes poli(fosfacenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados tales como poliestireno sulfonado. También pueden usarse copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de éter vinílico. Son ejemplos de grupos ácidos grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de alcohol halogenado (preferentemente fluorado), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.

Las células madre de placenta o cocultivos de las mismas pueden sembrarse en una estructura o soporte tridimensional e implantarse *in vivo*. Dicha estructura puede implantarse en combinación con uno cualquiera o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación de tejidos o aumentan de otra manera o mejoran la práctica de los métodos de tratamiento descritos en otras partes de la presente memoria.

Los ejemplos de soportes que pueden usarse en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria incluyen mallas no tejidas, espumas porosas o péptidos de autoensamblaje. Las mallas no tejidas pueden formarse usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo PGA-PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). También pueden usarse como soportes espumas compuestas de, por ejemplo, copolímero de poli(ε-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procesos tales como liofilización o secado por congelación (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.355.699).

En otra realización, el soporte es, o comprende, un soporte nanofibroso, por ejemplo, un soporte nanofibroso de electrohilado. En una realización más específica, dicho soporte nanofibroso comprende poli(ácido L-láctico) (PLLA), colágeno de tipo I, un copolímero de fluoruro de vinilideno y trifluoroetileno (PVDF-TrFE), poli(ε-caprolactona), poli(L-lactida-co-ε-caprolactona) [P(LLA-CL)] (por ejemplo, 75:25), y/o un copolímero de poli(3-hidroxitbutirato-co-3-hidroxitvalerato) (PHBV) y colágeno de tipo I. En otra realización más específica, dicho soporte promueve la diferenciación de células madre de placenta en condrocitos. En la técnica se conocen métodos para producir soportes nanofibroso, por ejemplo, soportes nanofibrosos electrohilados. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, *Tissue*

*Engineering* 10(7): 1160-1168 (2004); Xu *et al.*, *Biomaterials* 25: 877-886 (2004); Meng *et al.*, *J Biomaterials Sci., Polymer Edition* 18(1): 81-94 (2007).

Las células madre de placenta descritas en la presente memoria, por ejemplo, células madre de placenta inmunodepresoras, también pueden sembrarse sobre, o ponerse en contacto con, un material cerámico fisiológicamente aceptable que incluye, pero sin limitación, fosfato mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- y tetra-cálcico, hidroxiapatita, fluoroapatitas, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de calcio y magnesio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS®, y mezclas de los mismos. Los materiales cerámicos biocompatibles porosos actualmente disponibles en el mercado incluyen SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza) y productos de injerto óseo de colágeno mineralizados tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS®, RHAKOSS™ y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). La estructura puede ser una mezcla, combinación o compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.

En otra realización, las células madre de placenta pueden sembrarse o ponerse en contacto con un fieltro, que puede estar compuesto, por ejemplo, de un hilo de múltiples filamentos fabricado a partir de un material bioabsorbible tal como copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL o ácido hialurónico.

Las células madre de placenta descritas en la presente memoria, en otra realización, pueden sembrarse en soportes de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Dichos soportes de espuma pueden moldearse en una forma útil, tal como la de una parte de una estructura específica en el cuerpo a reparar, a reemplazar o a aumentar. En algunas realizaciones, la estructura se trata, por ejemplo, con ácido acético 0,1 M seguido de incubación en polilisina, PBS y/o colágeno, antes de la inoculación de las células madre de placenta inmunodepresoras para aumentar la unión celular. Pueden modificarse las superficies externas de una matriz para mejorar la unión o crecimiento de células y la diferenciación del tejido, tal como por revestimiento con plasma de la matriz, o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, dermatán sulfato, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular y/u otros materiales tales como, pero sin limitación, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales, y similares.

En algunas realizaciones, el soporte comprende, o se trata con materiales que lo hacen no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y mantener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de la matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero sin limitación, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE y siliconas de polietanourea segmentadas, tales como PURSPAN™ (The PolymerTechnology Group, Inc., Berkeley, Calif.). El soporte también puede comprender agentes antitrombóticos tales como heparina; los soportes también pueden tratarse para alterar la carga de la superficie (por ejemplo, revistiéndolos con plasma) antes de la siembra con células madre de placenta.

### 5.6.2 Tratamiento de enfermedades

En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar a un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección, donde la enfermedad, trastorno o afección se produce por o está asociada con una respuesta inmunitaria inapropiada o indeseable, por ejemplo, una enfermedad, trastorno o afección que puede tratarse beneficiosamente por inmunodepresión, que comprende administrar al individuo células madre de placenta. En una realización específica, la cantidad es una cantidad suficiente para reprimir de forma detectable una respuesta inmunitaria en el individuo. Dicha respuesta inmunitaria puede ser, por ejemplo, la proliferación de linfocitos T en una RLM o un ensayo de regresión realizado usando linfocitos T del individuo.

Un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con o causada por una respuesta inmunitaria inapropiada o indeseable, por ejemplo, un individuo que tiene o con riesgo de desarrollar esclerosis múltiple; una persona que tiene o con riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, puede tratarse con una pluralidad de células madre de placenta y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos, en cualquier momento durante la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, el individuo puede tratarse inmediatamente después del diagnóstico o antes de que hayan transcurrido 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días desde el diagnóstico, o antes de que hayan transcurrido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años después del diagnóstico. El individuo puede tratarse una vez o múltiples veces durante el curso clínico de la enfermedad. Cuando sea apropiado, el individuo puede tratarse durante un ataque agudo, durante la remisión o durante una fase degenerativa crónica.

Las células madre de placenta útiles en el tratamiento de dicha enfermedad, trastorno o afección pueden ser cualquiera de las células madre de placenta indicadas en las reivindicaciones. En una realización específica, las células madre de placenta expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200.

En una realización, al individuo se le administra una dosis de aproximadamente 300 millones de células madre de placenta. Sin embargo, la dosificación puede variar de acuerdo con las características físicas del individuo, por ejemplo, el peso, y puede variar de 1 millón a 10 billones de células madre de placenta por dosis, preferentemente

entre 10 millones y 1 billón por dosis, o entre 100 millones y 50 millones de células madre de placenta por dosis. La administración preferentemente es intravenosa, pero puede ser por cualquier vía aceptable desde el punto de vista médico para la administración de células vivas, por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraocular y similares. En una realización, una dosis de células madre de placenta, por ejemplo, procedente del amnios, amnios/corion, corion o cordón umbilical está contenida dentro de una bolsa de sangre o bolsa similar, adecuada para la inyección en embolada o administración por medio de un catéter.

Las células madre de placenta o células madre de cordón umbilical, o el medio acondicionado por células madre de placenta o células madre de cordón umbilical, pueden administrarse en una sola dosis o en múltiples dosis. Cuando las células madre de placenta se administran en múltiples dosis, las dosis pueden ser parte de un régimen terapéutico diseñado para aliviar uno o más síntomas agudos de una enfermedad, trastorno o afección, donde la enfermedad, trastorno o afección se produce por, o está asociada con una respuesta inmunitaria inapropiada o indeseable, o puede ser parte de un régimen terapéutico a largo plazo diseñado para prevenir o reducir la gravedad de un curso crónico de dicha enfermedad, trastorno o afección.

### 5.6.3 Tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal

En una realización, las células madre de placenta, poblaciones de células madre de placenta y/o composiciones que comprenden células madre de placenta o poblaciones de células madre de placenta se usan para tratar a un individuo que tiene o con riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa. De esta forma, en otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad inflamatoria intestinal, o un síntoma asociado con una enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende administrar al individuo una pluralidad de células madre de placenta, o medio acondicionado por células madre de placenta, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para modular de forma detectable, por ejemplo, reprimir una respuesta inmunitaria en el individuo.

*Enfermedad de Crohn.* En una realización, la EII es la enfermedad de Crohn, algunas veces denominada ileítis o enteritis. La enfermedad de Crohn es un trastorno crónico que produce inflamación del tracto digestivo (también denominado tracto gastrointestinal o GI). La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto GI, desde la boca hasta el ano, pero la mayoría de las veces afecta a la parte inferior del intestino delgado, denominada íleon. Se conocen cinco tipos de enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn gastroduodenal afecta al estómago y al duodeno (la porción superior del intestino delgado). La yeyunoileítis es la enfermedad de Crohn del yeyuno, la parte más larga del intestino delgado. La ileítis es la enfermedad de Crohn del íleon, la parte inferior del intestino delgado. La ileocolitis es la forma más común de enfermedad de Crohn, y afecta al íleon y al colon. Finalmente, la colitis de Crohn (colitis granulomatosa) afecta al colon y se distingue de la colitis ulcerosa en que en la colitis de Crohn con frecuencia hay áreas de tejido sano entre áreas de tejido enfermo, y en la colitis de Crohn puede estar implicado solo el colon, sin estar implicado el recto. Se cree que la enfermedad de Crohn se produce por una reacción inapropiada del sistema inmunitario del cuerpo frente a antígenos presentes en el tracto GI, incluyendo, por ejemplo, alimentos, bacterias beneficiosas, etc., dando como resultado una acumulación de glóbulos blancos en el revestimiento del intestino. La inflamación asociada con la enfermedad de Crohn también se ha atribuido a la acción de la citosina conocida como factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).

*Colitis ulcerosa.* En otra realización, la EII es la colitis ulcerosa. La colitis ulcerosa es una enfermedad que produce inflamación y llagas (úlceras) en el revestimiento del recto y/o colon. Las úlceras se forman en los lugares en los que la inflamación ha destruido las células que normalmente revisten el colon; las úlceras generalmente sangran y producen pus posteriormente. Cuando se produce inflamación en el recto y en la parte inferior del colon, la enfermedad se denomina proctitis ulcerosa. Si se ve afectado todo el colon, la enfermedad se llama pancolitis. Si solo está afectado el lado izquierdo del colon, la enfermedad se denomina colitis limitada o distal. Los síntomas de la colitis ulcerosa incluyen, pero sin limitación, dolor abdominal, diarrea hemorrágica, fiebre, náuseas, calambres abdominales, anemia, fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, hemorragia rectal, pérdida de fluidos corporales y nutrientes, lesiones cutáneas, dolor articular y retraso del crecimiento (en niños). La colitis ulcerosa también puede producir complicaciones tales como inflamación del ojo, enfermedad hepática y osteoporosis.

De esta manera, en una realización, en la presente memoria se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre de placenta a dicho individuo, donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado una mejoría detectable en al menos un síntoma de dicha enfermedad inflamatoria intestinal (EII). En una realización específica, la EII es la enfermedad de Crohn. En una realización más específica, dicha enfermedad de Crohn es la enfermedad de Crohn gastroduodenal, yeyunoileítis, ileítis, ileocolitis o colitis de Crohn. En otra realización más específica, dicho síntoma es un síntoma de la enfermedad de Crohn. En una realización más específica, dicho síntoma de la enfermedad de Crohn es inflamación e hinchazón de una parte del tracto GI, dolor abdominal, vaciamiento frecuente del intestino y/o diarrea. En otra realización más específica, dicho síntoma de la enfermedad de Crohn es hemorragia rectal, anemia, pérdida de peso, artritis, problemas cutáneos, fiebre, engrosamiento de la pared intestinal, formación de tejido cicatricial en el intestino, formación de llagas o úlceras en el intestino, desarrollo de una o más fistulas en la pared intestinal, desarrollo de una o más fisuras en el ano, desarrollo de deficiencias nutricionales (por ejemplo, deficiencias en una o más de proteínas, calorías, vitaminas), desarrollo de cálculos renales, desarrollo de cálculos biliares o enfermedades del hígado o sistema biliar.



En otra realización más específica, la EII es la colitis ulcerosa. En una realización más específica, dicha colitis ulcerosa es proctitis ulcerosa, pancolitis, colitis limitada o colitis distal. En otra realización más específica, dicho síntoma es un síntoma de colitis ulcerosa. En una realización más específica, dicho síntoma es dolor abdominal, diarrea hemorrágica, fiebre, náuseas, calambres abdominales, anemia, fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, hemorragia rectal, pérdida de fluidos corporales y nutrientes, lesiones cutáneas, dolor articular y retraso del crecimiento. En otra realización más específica, el síntoma es osteoporosis, inflamación ocular o enfermedad hepática.

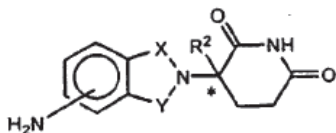
En otra realización específica, dicho individuo al que se le administran células madre de placenta recibe adicionalmente una o más de una segunda terapia, donde dicha segunda terapia comprende un agente antiinflamatorio, esteroide, inmunodepresor y/o un antibiótico. Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios útiles en el tratamiento de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa incluyen, pero sin limitación, mesalamina, 5-ASA (ácido 5-aminosalicílico) (por ejemplo, ASACOL® (mesalamina, liberación retardada), DIPENTUM (Osalazina), PENTASA® (mesalamina, liberación controlada)), sulfasalazina (una combinación de 5-ASA y sulfapiridina), anticuerpos antiinflamatorios (por ejemplo, Infliximab (REMICADE®)) y similares. Los ejemplos de esteroides útiles en el tratamiento de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa incluyen, pero sin limitación, cortisona, hidrocortisona, prednisona, metilprednisona y similares. Generalmente, como se pone en práctica en la técnica, la dosificación del esteroide primero se suministra en una dosis relativamente grande, seguida de dosis más pequeñas según va disminuyendo la inflamación. Los ejemplos de inmunodepresores útiles en el tratamiento de la enfermedad de Crohn incluyen, pero sin limitación, ciclosporina A, 6-mercaptopurina o azatioprina. En el tratamiento de la enfermedad de Crohn puede usarse cualquier antibiótico incluyendo, por ejemplo, ampicilina, sulfonamida, cefalosporina, tetraciclina y/o metronidazol. En otra realización específica, la segunda terapia es la administración de tricocéfalos porcinos, por ejemplo, huevos de *Trichuris suis*.

#### 5.6.4 Segundas composiciones terapéuticas y segundas terapias

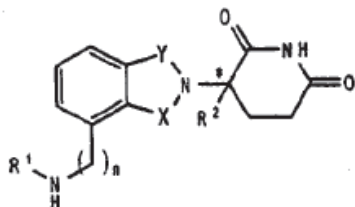
En cualquiera de los métodos de tratamiento anteriores, el método puede comprender la administración de una segunda composición terapéutica o segunda terapia. La mención anterior de segundos compuestos terapéuticos o segundas terapias específicas en los métodos de tratamiento de enfermedades específicas, no pretende ser exclusiva. Por ejemplo, cualquiera de las enfermedades, trastornos o afecciones analizadas en la presente memoria puede tratarse con cualquiera de los compuestos antiinflamatorios o compuestos inmunodepresores descritos en la presente memoria. En realizaciones en las que se administran células madre de placenta con un segundo agente terapéutico, o con un segundo tipo de célula madre, las células madre de placenta y el segundo agente terapéutico y/o segundo tipo de célula madre pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes, por ejemplo, la administración puede realizarse con una diferencia de tiempo menor o igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 minutos entre las dos terapias o con una diferencia de tiempo menor o igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22 horas entre las dos terapias o con una diferencia de tiempo menor o igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días entre las dos terapias.

En una realización específica, el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección relacionada o producida por una respuesta inmunitaria inapropiada, perjudicial o nociva comprende la administración de un segundo tipo de célula madre, o población de un segundo tipo de célula madre. En una realización específica, dicho segundo tipo de célula madre es una célula madre mesenquimatosas, por ejemplo, una célula madre mesenquimatosas derivada de médula ósea. En otras realizaciones, el segundo tipo de célula madre es una célula madre multipotente, una célula madre pluripotente, una célula progenitora, una célula madre hematopoyética, por ejemplo, una célula madre hematopoyética CD34<sup>+</sup>, una célula madre adulta, una célula madre embrionaria o una célula germinal embrionaria. El segundo tipo de célula madre, por ejemplo, célula madre mesenquimatosas, puede administrarse con las células madre de placenta o células madre de cordón umbilical en cualquier relación, por ejemplo, una relación de aproximadamente 100:1, 75:1, 50:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:75 o 1:100. Las células madre mesenquimatosas pueden obtenerse en el mercado o a partir de una fuente original, por ejemplo, médula ósea, aspirado de médula ósea, tejido adiposo y similares.

En otra realización específica, dicha segunda terapia comprende un compuesto inmunomodulador, donde el compuesto inmunomodulador es 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona; 3-(4'-aminoisolinolina-1-ona)-1-piperidina-2,6-diona; 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona; o  $\alpha$ -(3-aminofalimid)glutarimida. En una realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



en la que uno de X e Y es C=O, y el otro de X e Y es C=O o CH<sub>2</sub>, y R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo inferior, o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero, diastereómero, racemato o mezcla de estereoisómeros de los mismos. En otra realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



5

en la que uno de X e Y es C=O y el otro es CH<sub>2</sub> o C=O;

R<sup>1</sup> es H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquino(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo, alquil(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquil(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), C(O)R<sup>3</sup>, C(S)R<sup>3</sup>, C(O)OR<sup>4</sup>, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-OR<sup>5</sup>, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)OR<sup>5</sup>, C(O)NHR<sup>3</sup>, C(S)NHR<sup>3</sup>, C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>3</sup>, C(S)NR<sup>3</sup>R<sup>3</sup> o alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-O(CO)R<sup>5</sup>;

10 R<sup>2</sup> es H, F, bencilo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) o alquino(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>3</sup> y R<sup>3</sup> son independientemente alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquino(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo, alquil(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquil(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), alquil(C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-OR<sup>5</sup>, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)OR<sup>5</sup>, alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-O(CO)R<sup>5</sup> o C(O)OR<sup>5</sup>;

15 R<sup>4</sup> es alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquino(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-OR<sup>5</sup>, bencilo, arilo, alquil(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heterocicloalquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o alquil(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)-heteroarilo(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>);

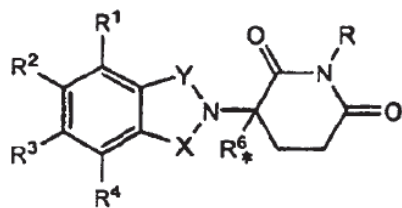
R<sup>5</sup> es alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquino(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), bencilo, arilo o heteroarilo(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>);

cada vez que aparece, R<sup>6</sup> es independientemente H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), alquino(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), bencilo, arilo, heteroarilo(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) o alquil(C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)-C(O)O-R<sup>5</sup> o los grupos R<sup>6</sup> pueden estar unidos para formar un grupo heterocicloalquilo;

20 n es 0 o 1; y

\* representa un centro de carbono quiral;

o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero, diastereómero, racemato o mezcla de estereoisómeros de los mismos. En otra realización más específica, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto que tiene la estructura



25

en la que:

uno de X e Y es C=O y el otro es CH<sub>2</sub> o C=O;

R es H o CH<sub>2</sub>OCOR';

30 (i) cada uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup>, independientemente de los otros, es halo, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> es nitro o -NHR<sup>5</sup> y el resto de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> son hidrógenos;

R<sup>5</sup> es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 carbonos

R<sup>6</sup> es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro o flúor;

R' es R<sup>7</sup>-CHR<sup>10</sup>-N(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>);

R<sup>7</sup> es m-fenileno o p-fenileno o -(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)- donde n tiene un valor de 0 a 4;

cada uno de R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup>, considerados independientemente entre sí, es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> considerados conjuntamente son tetrametileno, pentametileno, hexametileno o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- en el que X<sub>1</sub> es -O-, -S- o -NH-;

5 R<sup>10</sup> es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono o fenilo; y

\* representa un centro de carbono quiral;

o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, clatrato, enantiómero, diastereómero, racemato o mezcla de estereoisómeros de los mismos.

10 Puede administrarse cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores, adecuada para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal o de un síntoma de enfermedad inflamatoria intestinal. Dichos agentes terapéuticos pueden administrarse en cualquier combinación con las células madre de placenta o células madre de cordón umbilical, al mismo tiempo o como un curso de tratamiento separado.

15 Las células madre de placenta o células madre de cordón umbilical pueden administrarse al individuo que padece EII, por ejemplo, enfermedad de Crohn, en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica adecuada para la inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Las células madre de placenta pueden administrarse en una sola dosis o en múltiples dosis. Cuando las células madre de placenta se administran en múltiples dosis, las dosis pueden ser parte de un régimen terapéutico diseñado para aliviar uno o más síntomas agudos de EII, por ejemplo, enfermedad de Crohn, o pueden ser parte de un régimen terapéutico a largo plazo diseñado para prevenir o reducir la gravedad de un curso crónico de la enfermedad. En realizaciones en las que las  
20 células madre de placenta se administran con un segundo agente terapéutico, o con un segundo tipo de célula madre, las células madre de placenta y el segundo agente terapéutico y/o segundo tipo de célula madre pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes, por ejemplo, las administraciones pueden tener lugar dentro de un periodo menor o igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 minutos entre sí o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22 horas entre sí o dentro de un periodo menor o igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días entre sí.  
25

Algunos de los ejemplos se han incluido solo con fines de referencia y no limitan indebidamente el alcance de las reivindicaciones.

## 6. Ejemplos

6.1 Ejemplo 1: Aislamiento de células madre de placenta adherentes

30 Este ejemplo demuestra la recogida y aislamiento de células madre de placenta adherentes.

*Materiales y métodos.* Se reclutaron donantes de placenta a partir de madres gestantes que se incluyeron en programas privados de bancos de sangre de cordón umbilical y proporcionaron un consentimiento informado que permitía el uso de la placenta exanguinada después de la recuperación de la sangre del cordón con fines de investigación. Estas donantes permitieron el uso de datos enmascarados generados a partir del procesamiento  
35 normal de muestras de su sangre de cordón umbilical para criopreservación. Esto permitió la comparación entre la composición de la sangre de cordón recogida y el perfundido efluente recuperado usando este método experimental descrito a continuación.

Después de la exanguinación del cordón umbilical y la placenta, la placenta se puso en un recipiente aislado estéril a temperatura ambiente y se suministró al laboratorio en las cuatro horas siguientes al nacimiento. Se desecharon las  
40 placentas si, tras la inspección, tenían pruebas de daños físicos tales como fragmentación del órgano o avulsión de vasos umbilicales. Las placentas se mantuvieron a temperatura ambiente (23±2 °C) o refrigeradas (4 °C) en recipientes estériles durante 2 a 20 horas. Periódicamente, las placentas se sumergieron y lavaron en solución salina estéril a 25±3 °C para retirar cualquier sangre o resto visible en la superficie. El cordón umbilical se transeccionó aproximadamente a 5 cm de su inserción en la placenta y los vasos umbilicales se canularon con  
45 catéteres de Teflon o de polipropileno conectados a una trayectoria de fluido estéril que permitía la perfusión bidireccional de la placenta y la recuperación del fluido efluente. El sistema empleado en el presente experimento permitió conseguir todos los aspectos de acondicionamiento, perfusión y recogida del efluente en condiciones atmosféricas ambientales controladas así como la supervisión a tiempo real de la presión intravascular y los caudales, las temperaturas central y del perfundido y los volúmenes de efluente recuperados. Se evaluó un intervalo  
50 de protocolos de acondicionamiento durante un periodo postparto de 24 horas y la composición celular del fluido efluente se analizó por citometría de flujo, microscopía óptica y ensayos de unidades formadoras de colonias.

*Acondicionamiento de la placenta.* La placenta se mantuvo en condiciones variables con la intención de estimular y mantener un entorno fisiológicamente compatible para la proliferación y reclutamiento de células madre de placenta. En una cánula se introdujo un flujo de medio IMDM sin suero (GibcoBRL, NY) que contenía 2 U/ml de heparina  
55 (EJkins-Sinn, N. J.). La perfusión de la placenta se realizó a una velocidad de 50 ml por minuto hasta que se

recogieron aproximadamente 150 ml de perfundido. Este volumen de perfundido se etiquetó como la “fracción temprana”. La placenta se perfundió a la misma velocidad para recoger una segunda fracción de aproximadamente 150 ml, que se etiquetó como la “fracción tardía”. Durante el transcurso del procedimiento, la placenta se masajeó suavemente para ayudar al proceso de perfusión y ayudar a la recuperación del material celular. El fluido efluente se recogió del circuito de perfusión por drenaje por gravedad y aspiración a través de la cánula arterial.

Las placentas se obtuvieron de las salas de parto junto con sangre de cordón después de obtener el consentimiento parental por escrito, y se procesaron a temperatura ambiente de 12 a 24 horas después del parto. Antes del procesamiento, las membranas se retiraron y el sitio materno se limpió de sangre residual. Los vasos umbilicales se canularon con catéteres hechos de agujas Butterfly de calibre 20 de uso para la recogida de muestras de sangre. Las placentas después se perfundieron con Medio de Eagle modificado por Dulbecco (HDMEM) heparinizado (2 U/ml) a una velocidad de 15 ml/minuto durante 10 minutos y los perfundidos se recogieron de los sitios maternos en una hora y se contaron las células nucleadas. Los procedimientos de perfusión y recogida se repitieron una o dos veces hasta que el número de células nucleadas recuperadas se redujo por debajo de 100/μl. Los perfundidos se reunieron y se sometieron a una ligera centrifugación para retirar las plaquetas, los restos y las membranas celulares desnucleadas. Las células nucleadas después se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y, después del lavado, se resuspendieron en HDMEM. Para el aislamiento de las células adherentes, se pusieron alícuotas de 5-10 x 10<sup>6</sup> células en cada uno de varios matraces T-75 y se cultivaron con Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimatosas (MSCGM) disponible en el mercado obtenido de BioWhittaker, y se pusieron en un incubador de cultivo de tejidos a 37 °C, con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiraron lavando con PBS, que después se reemplazó por MSCGM. Los matraces se examinaron diariamente con respecto a la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y expansión de grupos de células fibroblastoides.

*Recuperación y Aislamiento de Células.* Las células se recuperaron de los perfundidos por centrifugación a aproximadamente 200 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este procedimiento sirvió para separar las células de los restos contaminantes y las plaquetas. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio IMDM sin suero que contenía 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares totales se aisló usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante y se resuspendió la fracción de células mononucleares. Las células se contaron usando un hemocitómetro. La viabilidad se evaluó por exclusión con azul de tripano. El aislamiento de células mesenquimatosas se consiguió por tripsinización diferencial usando una solución de tripsina al 0,05 % con EDTA al 0,2 % (Sigma). La tripsinización diferencial fue posible porque las células fibroblastoides se separaron de las superficies de plástico dentro de un periodo de aproximadamente 5 minutos mientras que las otras poblaciones adherentes necesitaron más de 20-30 minutos de incubación. Las células fibroblastoides separadas se recogieron después de la tripsinización y neutralización con tripsina usando Solución de Neutralización de Tripsina (TNS, BioWhittaker). Las células se lavaron en HDMEM y se resuspendieron en MSCGM. La citometría de flujo de las células se realizó usando un instrumento FACSCalibur de Becton-Dickinson usando anticuerpos monoclonales marcados con PE y FITC seleccionados basándose en marcadores conocidos para CMM (células madre mesenquimatosas) derivadas de médula ósea. Los anticuerpos se adquirieron en B.D. y Caltag Laboratories (South San Francisco, Calif.) y se obtuvieron hibridomas productores de anticuerpos SH2, SH3 y SH4 de AM. Cul. y las reactividades de los anticuerpos en sus sobrenadantes de cultivo se detectaron por anticuerpos de cabra anti-ratón F(ab)<sub>2</sub> marcados con PE o FITC. La diferenciación de linaje se realizó usando el medio de cultivo de inducción y mantenimiento disponible en el mercado (BioWhittaker), usado según las instrucciones del fabricante.

*Aislamiento de Células madre de placenta.* El examen microscópico de las células adherentes en los matraces de cultivo reveló tipos celulares morfológicamente diferentes, incluyendo células con forma de huso, células redondas con núcleos grandes y numerosas vacuolas pequeñas perinucleares, y células con forma de estrella con varias proyecciones, a través de una de las cuales las células se unían al matraz. No se intentó caracterizar adicionalmente estos tipos de células adherentes, porque se observaron células similares que no eran células madre en el cultivo de médula ósea, sangre de cordón y sangre periférica. Sin embargo, las células fibroblastoides, que aparecían en último lugar como grupos y por inspección visual parecían ser similares a las células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, se aislaron por tripsinización diferencial y se subcultivaron en matraces secundarios. La microscopía de fase de las células, que tenían un aspecto redondeado después de la tripsinización, mostró que estaban altamente granuladas y eran similares a las CMM derivadas de médula ósea producidas en el laboratorio o adquiridas en Bio Whittaker.

Cuando se subcultivaron, estas células placentarias adherentes, a diferencia de su fase anterior, se adherían en un periodo de horas, asumían la forma fibroblastoide características y formaban un patrón de crecimiento similar a las CMM derivadas de médula ósea de referencia. Además, durante el subcultivo y la realimentación, las células mononucleares unidas débilmente se retiraron por lavado y los cultivos permanecieron homogéneos y carentes de cualquier contaminante celular visible no fibroblastoide.

En experimentos posteriores, se caracterizó el fenotipo de marcadores de la superficie celular o, en el caso de OCT-4, el fenotipo de expresión génica, de estas células adherentes, obtenidas de diferentes experimentos de perfusión. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 3 que se proporciona a continuación:

TABLA 3: Caracterización de células madre de placenta (CMPL) recogidas de experimentos de perfusión distintos

ID Nº	Medio	(Viales) Congelados	CD34	CD45	CD10	CD29	CD54	SH2	SH3	SH4	SSEA4	CD44	HLA1	CD90	Oct4
CMPL-1	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					
CMPL-2	BW	Y (6)	-	-	+	+	+	+	+	+					
CMPL-3	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
CMPL-4	BW	Ninguno													
CMPL-5	BW	Y (9)	-	-	+	+	+	+	+	+					
CMPL-6	BW	Y (26)	-	-	+/ bajo	+	+	+	+	+					+
CMPL-7	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
CMPL-8	BW	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
CMPL-9	BW	Y (11)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
CMPL-10	BW	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
CMPL-11	D-5 %FCS	Y (9)													
CMPL-12	D-5 %FCS	Y (7)													
CMPL-13	D-5 %FCS	Y (5)													
CMPL-14	D-5 %FCS	Y (9)													
CMPL-15	Anthro-1	Y (7)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
CMPL-16	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
CMPL-17	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
CMPL-18	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
CMPL-19	BWtoA	Y (17)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
CMPL-20	BWtoA	Y (40)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
CMPL-21	BWtoA	Y (9)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
CMPL-22	BWtoA	FTE													
CMPL-23	Anthro-1	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	

ID Nº	Medio	(Viales) Congelados	CD34	CD45	CD10	CD29	CD54	SH2	SH3	SH4	SSEA4	CD44	HLA1	CD90	Oct4
CMPL-24	Anthro-1	FTE													
CMPL-25	Anthro-1	FTE													
CMPL-26	Anthro-1	Y (15)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	
CMPL-27	Anthro-1	Y (25)	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	

+: Detectado por citometría de flujo o, para OCT-4, expresión génica detectada por RT-PCR

-: No detectado

Blanco: no se ensayó la presencia de marcador

FTE: no pudo expandirse

D-5 %FCS: DMEM-FCS al 5 %

BWtoA: medio BW a Anthro-1

## 6.2 Ejemplo 2: Cultivo de células madre de placenta

Se obtienen células madre de placenta a partir de una placenta de mamífero después del parto por perfusión o por ruptura física, por ejemplo digestión enzimática. Las células se cultivan en un medio de cultivo que comprende DMEM-LG al 60 % (Gibco), MCDB-201 al 40 % (Sigma), suero bovino fetal (FCS) al 2 % (Hyclone Laboratories), insulina-transferrina-selenio (ITS) 1x, ácido linolénico-albúmina de suero bovino (LA-BSA) 1x, dexametasona  $10^{-9}$  M (Sigma), 2-fosfato de ácido ascórbico  $10^{-4}$  M (Sigma), factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (R&D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems) y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomina.

El matraz de cultivo en el que las células se cultivan se prepara como se indica a continuación: se revisten matraces T75 con fibronectina (FN), añadiendo 5 ml de PBS que contienen 5 ng/ml de FN humano (Sigma F0895) al matraz. Los matraces con la solución de FN se dejan a 37 °C durante 30 minutos. Después se retira la solución de FN antes del cultivo celular. No se necesita secar los matraces después del tratamiento. Como alternativa, los matraces se dejan en contacto con la solución de FN a 4 °C durante una noche o más, antes del cultivo, los matraces se calientan y se retira la solución de FN.

### 15 *Células madre de placenta aisladas por perfusión*

Se establecen cultivos de células madre de placenta procedentes de perfundido placentario como se indica a continuación. Se siembran células de un gradiente de Ficoll en matraces T75 revestidos con FN, preparados como se ha indicado anteriormente, a  $50\text{-}100 \times 10^6$  células/matraz en 15 ml de medio de cultivo. Generalmente, se siembran de 5 a 10 matraces. Los matraces se incuban a 37 °C durante 12-18 horas para permitir la unión de células adherentes. Se añaden 10 ml de PBS caliente a cada matraz para retirar las células en suspensión, y se mezclan suavemente. Después se retiran 15 ml del medio y se reemplazan con 15 ml de medio de cultivo limpio. Todo el medio se cambia 3-4 días después de iniciar el cultivo. Se realizan cambios posteriores del medio de cultivo, durante los cuales se retira 50 % o 7,5 ml del medio.

Empezando aproximadamente el día 12, el cultivo se observa con un microscopio para examinar el crecimiento de las colonias de células adherentes. Cuando los cultivos celulares alcanzan una confluencia de aproximadamente 80 %, generalmente entre el día 13 y el día 18 después de iniciarse el cultivo, las células adherentes se recogen por digestión con tripsina. Las células recogidas de estos cultivos primarios se denominan pase 0 (cero).

### *Células madre de placenta aisladas por ruptura física y digestión enzimática*

Se establecen cultivos de células madre de placenta a partir de tejido placentario digerido como se indica a continuación. La placenta perfundida se pone en una hoja de papel estéril con el lado materno hacia arriba. Se retiran por raspado aproximadamente 0,5 cm de la capa superficial en el lado materno de la placenta con una cuchilla, y la cuchilla se usa para retirar un bloque de tejido placentario que mide aproximadamente 1 x 2 x 1 cm. Este tejido placentario después se corta en piezas de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Estas piezas se recogen en un tubo Falcon de 50 ml y se digieren con colagenasa IA (2 mg/ml, Sigma) durante 30 minutos, seguido de tripsina-EDTA (0,25 %, GIBCO BRL) durante 10 minutos, a 37 °C en un baño de agua. La solución resultante se centrifuga a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se retira la solución de digestión. El sedimento se resuspende hasta aproximadamente 10 volúmenes con PBS (por ejemplo, un sedimento de 5 ml se resuspende con 45 ml de PBS) y los tubos se centrifugan a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de tejido/células se resuspende en 130 ml de medio de cultivo y las células se siembran a 13 ml por matraz T75 recubierto con fibronectina. Las células se incuban a 37 °C con una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células madre de placenta opcionalmente se crioconservan en esta etapa.

### *Subcultivo y expansión de células madre de placenta*

Las células crioconservadas pueden descongelarse rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Las células madre de placenta se retiran inmediatamente del criovial con 10 ml de medio caliente y se transfieren a un tubo estéril de 15 ml. Las células se centrifugan a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspenden suavemente en 10 ml de medio de cultivo caliente por pipeteo y se determinan los recuentos de células viables por exclusión con azul de tripano. Las células después se siembran a aproximadamente 6000-7000 células por cm<sup>2</sup> en matraces revestidos con FN, preparados como se ha indicado anteriormente (aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por matraz T-75). Las células se incuban a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad. Cuando las células alcanzan una confluencia de 75-85 %, todo el medio gastado se retira asépticamente de los matraces y se desecha. Se añaden 3 ml de solución de tripsina/EDTA al 0,25 % (p/v) para cubrir la capa celular, y las células se incuban a 37 °C, con 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad durante 5 minutos. El matraz se golpea suavemente una o dos veces para inducir la separación de células. Una vez que >95 % de las células tienen un aspecto redondeado y se han separado, se añaden 7 ml de medio de cultivo caliente a cada matraz T75 y la solución se dispersa por pipeteo sobre la superficie de la capa de células varias veces.

Después de contar las células y determinar la viabilidad como se ha indicado anteriormente, las células se centrifugan a 1000 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se someten a pases resuspendiendo suavemente el sedimento celular desde un matraz T-75 con medio de cultivo, y las células se

cultivan uniformemente en dos matraces T-75 revestidos con FN.

Usando los métodos anteriores, se identificaron poblaciones de células madre de placenta adherentes que expresaban marcadores CD105, CD117, CD33, CD73, CD29, CD44, CD10, CD90 y CD133. Esta población de células no expresaba CD34 o CD45. Algunos, pero no todos los cultivos de estas células madre de placenta expresan HLA-ABC y/o HLA-DR.

### 6.3 Ejemplo 3: Aislamiento de células madre de placenta a partir de estructuras placentarias

#### 6.3.1 Materiales y métodos

##### 6.3.1.1 Aislamiento del fenotipo de interés

Se obtuvieron cinco poblaciones distintas de células placentarias a partir de las placentas de embarazos normales a término. Todas las donantes proporcionaron un consentimiento por escrito completo para el uso de sus placentas con fines de investigación. Se examinaron cinco poblaciones de células: células placentarias procedentes de (1) perfundido placentario (procedente de la perfusión del sistema vascular placentario); y digestiones enzimáticas de (2) amnios, (3) corion, (4) amnios-placa coriónica y (5) células de cordón umbilical obtenidas por digestión enzimática. Los diversos tejidos se limpiaron en PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y se pusieron en placas Petri estériles distintas. Los diversos tejidos se cortaron usando un bisturí quirúrgico estéril y se pusieron en tubos cónicos Falcon de 50 ml. Los tejidos cortados se digirieron con Colagenasa 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 20 minutos en un baño de agua a 37 °C, se centrifugaron y después se digirieron con Tripsina-EDTA al 0,25 % (Gibco-Invitrogen Corp) durante 10 minutos en un baño de agua a 37 °C. Los diversos tejidos se centrifugaron después de la digestión y se aclararon una vez con PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corp). Las células reconstituidas después se filtraron dos veces, una vez con filtros celulares de 100 µm y otra vez con filtros de separación de 30 µm, para retirar cualquier matriz extracelular residual o resto celular.

##### 6.3.1.2 Evaluación de la viabilidad celular y recuentos de células

Se empleó el método manual de exclusión de azul de tripano después de la digestión para calcular los recuentos celulares y evaluar la viabilidad celular. Las células se mezclaron con Colorante Azul de Tripano (Sigma-Aldrich) en una relación de 1:1 y las células se leyeron en un hemacitómetro.

##### 6.3.1.3 Caracterización de marcadores de la superficie celular

Para la caracterización se seleccionaron células que eran HLA ABC<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>. Se identificaron células que tenían este fenotipo, se cuantificaron y se caracterizaron por dos de las siguientes técnicas: citómetros de flujo Becton-Dickinson, el FACSCalibur y el FACS Aria (Becton-Dickinson, San José, CA, Estados Unidos). Las diversas células placentarias se tiñeron, a una relación de aproximadamente 10 µl de anticuerpo por 1 millón de células, durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Se usaron los siguientes anticuerpos anti-humano: anticuerpos monoclonales conjugados con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) contra HLA-G (Serotec, Raleigh, NC), CD10 (BD Immunocytometry Systems, San José, CA), CD44 (BD Biosciences Pharmingen, San José, CA) y CD105 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN); anticuerpos monoclonales conjugados con Ficoeritrina (PE) contra CD44, CD200, CD117 y CD13 (BD Biosciences Pharmingen); Estreptavidina conjugada con Ficoeritrina-Cy5 (PE Cy5) y anticuerpos monoclonales contra CD117 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados con Ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) contra CD33 y CD10 (BD Biosciences); estreptavidina conjugada con Alofocianina (APC) y anticuerpos monoclonales contra CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 Biotinilado (BD Biosciences Pharmingen). Después de la incubación, las células se aclararon una vez para retirar los anticuerpos no unidos y se fijaron durante una noche con paraformaldehído al 4 % (USB, Cleveland, OH) a 4 °C. Al día siguiente, las células se aclararon dos veces, se filtraron a través de un filtro de separación de 30 µm y se procesaron en el o los citómetros de flujo.

Las muestras que se tiñeron con anticuerpos anti-IgG de ratón (BD Biosciences Pharmingen) se usaron como controles negativos y se usaron para ajustar los Tubos Fotomultiplicadores (TFM). Como controles positivos se usaron muestras que se tiñeron una sola vez con anticuerpos anti-humanos y se usaron para ajustar los solapamientos/compensaciones espectrales.

##### 6.3.1.4 Clasificación y cultivo de células

Un conjunto de células placentarias (procedentes de perfundido, amnios o corion) se tiñó con 7-amino-actinomicina D (7AAD; BD Biosciences Pharmingen) y anticuerpos monoclonales específicos para el fenotipo de interés. Las células se tiñeron a una relación de 10 µl de anticuerpo por 1 millón de células, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Estas células después se clasificaron positivamente con respecto a las células vivas que expresaban el fenotipo de interés en el BD FACS Aria y se cultivaron. Para realizar una comparación se cultivaron poblaciones de células placentarias clasificadas (población de interés) y "Todas" (no clasificadas). Las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos revestida con fibronectina (Sigma-Aldrich) a las densidades celulares indicadas en la Tabla 4 (células/cm<sup>2</sup>). Se determinaron la densidad celular y si el tipo celular se cultivaba por duplicado o por triplicado y estaba dirigido por el número de células que expresaban el fenotipo de interés.



TABLA 4: Densidades de cultivo de células

<b>Cultivo en placa de 96 pocillos</b>			
<b>Densidad de células cultivadas</b>			
Condiciones	Clasificadas	Todas	Todas con Densidad Max
Fuente de células	A		
Conjunto N° 1:	40,6 K/cm <sup>2</sup>	40,6 K/cm <sup>2</sup>	93,8 K/cm <sup>2</sup>
Conjunto N° 2:	40,6 K/cm <sup>2</sup>	40,6 K/cm <sup>2</sup>	93,8 K/cm <sup>2</sup>
Conjunto N° 3:	40,6 K/cm <sup>2</sup>	40,6 K/cm <sup>2</sup>	93,8 K/cm <sup>2</sup>
Fuente de células	B		
Conjunto N° 1:	6,3 K/cm <sup>2</sup>	6,3 K/cm <sup>2</sup>	62,5 K/cm <sup>2</sup>
Conjunto N° 2:	6,3 K/cm <sup>2</sup>	6,3 K/cm <sup>2</sup>	62,5 K/cm <sup>2</sup>
Fuente de células	C		
Conjunto N° 1:	6,3 K/cm <sup>2</sup>	6,3 K/cm <sup>2</sup>	62,5 K/cm <sup>2</sup>
Conjunto N° 2:	6,3 K/cm <sup>2</sup>	6,3 K/cm <sup>2</sup>	62,5 K/cm <sup>2</sup>

En cada pocillo de la placa de 96 pocillos se añadieron medio completo (DMEM-LG al 60% (Gibco) y MCDB-201 al 40% (Sigma); suero bovino fetal al 2% (Hyclone Laboratories); insulina-transferrina-selenio (ITS) 1x; ácido linolénico-albúmina de suero bovino (LA-BSA) 1x, dexametasona 10<sup>-9</sup> M (Sigma), 2-fosfato de ácido ascórbico 10<sup>-4</sup> M (Sigma), factor de crecimiento epidérmico a 10 ng/ml (R&D Systems) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) a 10 ng/ml (R&D Systems) y la placa se puso en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub>/37 °C. El día 7 se añadieron 100 µl de medio completo a cada uno de los pocillos. La placa de 96 pocillos se supervisó durante aproximadamente dos semanas y se completó una evaluación final del cultivo el día 12.

6.3.1.5 Análisis de los datos

Los datos de FACSCalibur se analizaron en FlowJo (Tree star, Inc) usando técnicas de acotamiento de subpoblaciones de interés convencionales. Los datos de BD FACS Aria se analizaron usando el software FACSDiva (Becton-Dickinson). Los datos del FACS Aria se analizaron usando acotamiento de subpoblaciones con discriminación de dobletes para minimizar los dobletes, así como técnicas de acotamiento convencionales. Todos los resultados se recopilaron en Microsoft Excel y todos los valores, en la presente memoria, se representan como media ± desviación típica (número, error típico de la media).

6.3.2 Resultados

6.3.2.1 Viabilidad celular

La viabilidad después de la digestión se evaluó usando el método manual de exclusión con azul de tripano (FIG. 1). La viabilidad media de las células obtenidas a partir de la mayor parte del tejido digerido (procedente de amnios, corion o amnios-placa coriónica) fue aproximadamente 70%. Las células del amnios tenían una viabilidad media de 74,35% ± 10,31% (n=6, ETM=4,21), las del corion tenían una viabilidad media de 78,18% ± 12,65% (n=4, ETM=6,32), las del amnios-placa coriónica tenían una viabilidad media de 69,05% ± 10,80% (n=4, ETM=5,40) y el las de cordón umbilical tenían una viabilidad media de 63,30% ± 20,13% (n=4, ETM=10,06). Las células procedentes de perfusión, que no se sometieron a digestión, conservaron la mayor viabilidad media, 89,98 ± 6,39% (n=5, ETM=2,86).

6.3.2.2 Cuantificación de células

Se analizaron las cinco poblaciones distintas de células derivadas de placenta para determinar los números de células HLA ABC/CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>. A partir del análisis de los datos de BD FACSCalibur, se observó que el amnios, el perfundido y el corion contenían el mayor número total de estas células, 30,72 ± 21,80 (n=4, ETM=10,90), 26,92 ± 22,56 (n=3, ETM=13,02) y 18,39 ± 6,44 (n=2, ETM=4,55) respectivamente (datos no mostrados). La amnios-placa coriónica y el cordón umbilical contenían el menor número total de células que expresaban el fenotipo de

interés,  $4,72 \pm 4,16$  (n=3, ETM=2,40) y  $3,94 \pm 2,58$  (n=3, ETM=1,49) respectivamente (datos no mostrados).

De forma similar, cuando se analizó el porcentaje de células totales que expresaban el fenotipo de interés, se observó que el amnios y el perfundido placentario contenían los mayores porcentajes de células que expresaban este fenotipo  $0,0319\% \pm 0,0202\%$  (n=4, ETM=0,0101) y  $0,0269\% \pm 0,0226\%$  (n=3, ETM=0,0130) respectivamente (FIG. 2). Aunque el cordón umbilical contenía un número pequeño de células que expresaban el fenotipo de interés (FIG. 2), contenía el tercer mayor porcentaje de células que expresaban el fenotipo de interés,  $0,020 \pm 0,0226\%$  (n=3, ETM=0,0131) (FIG. 2). El corion y el amnios-placa coriónica contenían los menores porcentajes de células que expresaban el fenotipo de interés,  $0,0184 \pm 0,0064\%$  células (n=2, ETM=0,0046) y  $0,0177 \pm 0,0173\%$  (n=3, ETM=0,010) respectivamente (FIG. 2).

De forma coherente con los resultados del análisis BD FACSCalibur, los datos de BD FACS Aria también identificaron al amnios, al perfundido y al corion como fuentes de mayores números de células HLA ABC<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> que las fuentes restantes. El número total medio de células que expresaban el fenotipo de interés entre amnios, perfundido y corion fue  $126,47 \pm 55,61$  células (n=15, ETM=14,36),  $81,65 \pm 34,64$  células (n=20, ETM=7,75) y  $51,47 \pm 32,41$  (n=15, ETM= 8,37), respectivamente (datos no mostrados). El amnios-placa coriónica y el cordón umbilical contenían el mínimo número total de células que expresaban el fenotipo de interés,  $44,89 \pm 37,43$  células (n=9, ETM=12,48) y  $11,00 \pm 4,03$  células (n=9, ETM= 1,34) respectivamente (datos no mostrados).

Los datos de BD FACS Aria revelaron que las fuentes de células B y A contenían los mayores porcentajes de células HLA ABC<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>,  $0,1523 \pm 0,0227\%$  (n=15, ETM=0,0059) y  $0,0929 \pm 0,0419\%$  (n=20, ETM=0,0094) respectivamente (FIG. 3). La fuente de células D contenía el tercer mayor porcentaje de células que expresaban el fenotipo de interés,  $0,0632 \pm 0,0333\%$  (n=9, ETM=0,0111) (FIG. 3). Las fuentes de células C y E contenían los menores porcentajes de células que expresaban el fenotipo de interés,  $0,0623 \pm 0,0249\%$  (n=15, ETM=0,0064) y  $0,0457 \pm 0,0055\%$  (n=9, ETM=0,0018) respectivamente (FIG. 3).

Después se identificaron y cuantificaron las células HLA ABC<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> a partir de cada fuente celular, sus células se analizaron adicionalmente y se caracterizaron con respecto a su expresión de marcadores de la superficie celular HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 y CD105.

#### 6.3.2.3 Células derivadas de perfundido placentario

Las células derivadas de perfundido fueron sistemáticamente positivas para HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105 y CD13 (FIG. 4). La expresión media de cada marcador para las células derivadas de perfundido fue el siguiente:  $37,15\% \pm 38,55\%$  (n=4, ETM=19,28) de las células expresaban HLA-G;  $36,37\% \pm 21,98\%$  (n=7, ETM=8,31) de las células expresaban CD33;  $39,39\% \pm 39,91\%$  (n=4, ETM=19,96) de las células expresaban CD117;  $54,97\% \pm 33,08\%$  (n=4, ETM=16,54) de las células expresaban CD10;  $36,79\% \pm 11,42\%$  (n=4, ETM=5,71) de las células expresaban CD44;  $41,83\% \pm 19,42\%$  (n=3, ETM=11,21) de las células expresaban CD200;  $74,25\% \pm 26,74\%$  (n=3, ETM=15,44) de las células expresaban CD90;  $35,10\% \pm 23,10\%$  (n=3, ETM=13,34) de las células expresaban CD38;  $22,87\% \pm 6,87\%$  (n=3, ETM=3,97) de las células expresaban CD105; y  $25,49\% \pm 9,84\%$  (n=3, ETM=5,68) de las células expresaban CD13.

#### 6.3.2.4 Células derivadas de amnios

Las células derivadas de amnios fueron sistemáticamente positivas para HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105 y CD13 (FIG 5). La expresión media de cada marcador para las células derivadas de amnios fue la siguiente:  $57,27\% \pm 41,11\%$  (n=3, ETM=23,73) de las células expresaban HLA-G;  $16,23\% \pm 15,81\%$  (n=6, ETM=6,46) de las células expresaban CD33;  $62,32\% \pm 37,89\%$  (n=3, ETM=21,87) de las células expresaban CD117;  $9,71\% \pm 13,73\%$  (n=3, ETM=7,92) de las células expresaban CD10;  $27,03\% \pm 22,65\%$  (n=3, ETM=13,08) de las células expresaban CD44;  $6,42\% \pm 0,88\%$  (n=2, ETM=0,62) de las células expresaban CD200;  $57,61\% \pm 22,10\%$  (n=2, ETM=15,63) de las células expresaban CD90;  $63,76\% \pm 4,40\%$  (n=2, ETM=3,11) de las células expresaban CD38;  $20,27\% \pm 5,88\%$  (n=2, ETM=4,16) de las células expresaban CD105; y  $54,37\% \pm 13,29\%$  (n=2, ETM=9,40) de las células expresaban CD13.

#### 6.3.2.5 Células derivadas de corion

Las células derivadas de corion fueron sistemáticamente positivas para HLA-G, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38 y CD13, mientras que la expresión de CD33 y CD105 variaba (FIG. 6). La expresión media de cada marcador para las células de corion fue la siguiente:  $53,25\% \pm 32,87\%$  (n=3, ETM=18,98) de las células expresaban HLA-G;  $15,44\% \pm 11,17\%$  (n=6, ETM=4,56) de las células expresaban CD33;  $70,76\% \pm 11,87\%$  (n=3, ETM=6,86) de las células expresaban CD117;  $35,84\% \pm 25,96\%$  (n=3, ETM=14,99) de las células expresaban CD10;  $28,76\% \pm 6,09\%$  (n=3, ETM=3,52) de las células expresaban CD44;  $29,20\% \pm 9,47\%$  (n=2, ETM=6,70) de las células expresaban CD200;  $54,88\% \pm 0,17\%$  (n=2, ETM=0,12) de las células expresaban CD90;  $68,63\% \pm 44,37\%$  (n=2, ETM=31,37) de las células expresaban CD38;  $23,81\% \pm 33,67\%$  (n=2, ETM=23,81) de las células expresaban CD105; y  $53,16\% \pm 62,70\%$  (n=2, ETM=44,34) de las células expresaban CD13.

6.3.2.6 Células placentarias de amnios-placa coriónica

Las células de amnios-placa coriónica fueron sistemáticamente positivas para HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105 y CD13 (FIG. 7). La expresión media de cada marcador para las células derivadas de amnios-placa coriónica fue la siguiente: 78,52% ± 13,13% (n=2, ETM=9,29) de las células expresaban HLA-G; 38,33% ± 15,74% (n=5, ETM=7,04) de las células expresaban CD33; 69,56% ± 26,41% (n=2, ETM=18,67) de las células expresaban CD117; 42,44% ± 53,12% (n=2, ETM=37,56) de las células expresaban CD10; 32,47% ± 31,78% (n=2, ETM=22,47) de las células expresaban CD44; 5,56% (n=1) de las células expresaban CD200; 83,33% (n=1) de las células expresaban CD90; 83,52% (n=1) de las células expresaban CD38; 7,25% (n=1) de las células expresaban CD105; y 81,16% (n=1) de las células expresaban CD13.

5

10 6.3.2.7 Células derivadas de cordón umbilical

Las células derivadas de cordón umbilical fueron sistemáticamente positivas para HLA-G, CD33, CD90, CD38, CD105, y CD13, mientras que la expresión de CD117, CD10, CD44 y CD200 variaba (FIG. 8). La expresión media de cada marcador para las células derivadas de cordón umbilical fue la siguiente: 62,50% ± 53,03% (n=2, ETM=37,50) de las células expresaban HLA-G; 25,67% ± 11,28% (n=5, ETM=5,04) de las células expresaban CD33; 44,45% ± 62,85% (n=2, ETM=44,45) de las células expresaban CD117; 8,33% ± 1,79% (n=2, ETM=8,33) de las células expresaban CD10; 21,43% ± 30,30% (n=2, ETM=21,43) de las células expresaban CD44; 0,0% (n=1) de las células expresaban CD200; 81,25% (n=1) de las células expresaban CD90; 64,29% (n=1) de las células expresaban CD38; 6,25% (n=1) de las células expresaban CD105; y 50,0% (n=1) de las células expresaban CD13.

15

En la FIG.9 se muestra un resumen de todas las medias de expresión de marcadores.

20 6.3.2.8 Informe de clasificación por BD FACS Aria

Las tres poblaciones distintas de células placentarias que expresaban los mayores porcentajes de HLA ABC, CD45, CD34 y CD133 (células derivadas de perfundido, amnios y corion) se tiñeron con 7AAD y los anticuerpos para estos marcadores. Las tres poblaciones se clasificaron positivamente para las células vivas que expresaban el fenotipo de interés. Los resultados de la clasificación BD de FACS Aria se presentan en la Tabla 5.

25 Tabla 5:

Informe de clasificación por BD FACS Aria			
Fuente de células	Acontecimientos procesados	Acontecimientos clasificados (Fenotipo de Interés)	% Del Total
Perfundido	135540110	51215	0,037786
Amnios	7385933	4019	0,054414
Corion	108498122	4016	0,003701

Se cultivaron las tres poblaciones distintas de células clasificadas positivamente ("clasificadas") y sus células no clasificadas correspondientes y los resultados del cultivo se evaluaron el día 12. Las células derivadas de perfundido clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 40.600/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes. Dos de las tres series de células derivadas de perfundido no clasificadas, cada una cultivada a una densidad celular de 40.600/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado principalmente células pequeñas, redondas no adherentes con varias células adherentes localizadas alrededor de la periferia del pocillo. Las células derivadas del perfundido no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 93.800/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado principalmente células pequeñas, redondas no adherentes con varias células adherentes localizadas alrededor de la periferia de los pocillos.

30

35

Las células derivadas de amnios clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes. Las células derivadas de amnios no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes. Las células derivadas de amnios no clasificadas cultivadas a una densidad celular de 62.500/cm<sup>2</sup> dieron como resultado células pequeñas redondas no adherentes.

40

Las células derivadas de corion clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes. Las células derivadas de corion no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes. Las células derivadas de corion no clasificadas cultivadas a una densidad celular de 62.500/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado células

pequeñas, redondas no adherentes. Estas células se volvieron adherentes tras un cultivo posterior.

Después de la realización de los experimentos indicados anteriormente, y el cultivo adicional de las células madre de placenta, se determinó que el marcaje de los anticuerpos para CD117 y CD133, en el que un anticuerpo conjugado con estreptavidina se marcaba con ficoeritrina (PE) conjugada con biotina, produjo un nivel de fondo significativo suficiente para asemejarse a una lectura positiva. Este nivel de fondo inicialmente había hecho que las células madre de placenta se consideraran positivas para los dos marcadores. Cuando se usó un marcador diferente, APC o PerCP, el nivel de fondo se redujo, y se determinó correctamente que las células madre de placenta eran negativas tanto para CD117 como para CD133.

#### 6.4 Ejemplo 4: Diferenciación de células madre de placenta

Se diferenciaron células madre de placenta adherentes en varios linajes celulares diferentes. Las células madre de placenta adherentes se aislaron de la placenta por ruptura física del tejido en sitios anatómicos dentro de la placenta, incluyendo la membrana amniótica, corion, cotiledones placentarios o cualquier combinación de los mismos, y se obtuvieron células madre de cordón umbilical por ruptura física del tejido del cordón umbilical.

Las células madre de placenta y las células madre de cordón umbilical se establecieron en un medio que contenía bajas concentraciones de suero bovino fetal y factores de crecimiento limitados. El análisis de citometría de flujo mostró que las células madre de placenta generalmente presentaban un fenotipo CD200<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> a porcentajes  $\geq 70\%$ . Se observó que las células madre de placenta diferenciaban los linajes de adipocitos, condrocitos y osteocitos.

En un medio de inducción que contenía IBMX, insulina, dexametasona e indometacina, las células madre de placenta se transformaron en adipocitos cargados de grasa en 3 a 5 semanas. En condiciones de cultivo de inducción osteogénico, se observó que las células madre de placenta formaban nódulos óseos y tenían deposiciones de calcio en su matriz extracelular. Se realizó una diferenciación condrogénica de células madre de placenta en microgránulos y se confirmó por la formación de glicosaminoglicano en los agregados de tejido.

#### 6.5 Ejemplo 5: Inmunomodulación usando células madre de placenta

Las células madre de placenta poseen un efecto inmunomodulador, incluyendo la represión de la proliferación de linfocitos T y células natural killer (citotóxicas naturales). Los siguientes experimentos demuestran que las células madre de placenta tienen la capacidad de modular la respuesta de linfocitos T a la estimulación en dos ensayos, el ensayo de reacción de linfocitos mixtos y el ensayo de regresión.

##### 6.5.1 Ensayos de reacción de linfocitos mixtos

La RLM mide la reacción de una población efectora contra una población diana. Los efectores pueden ser linfocitos o poblaciones purificadas, tales como linfocitos T CD8<sup>+</sup> o células NK. La población diana es CMSP irradiadas alogénicas, o, como en los presentes estudios, CD maduras. La población respondedora consiste en células aloespecíficas, estimadas en 20% de linfocitos T totales. La RLM de células madre de placenta modificada usa células madre de placenta en la reacción.

Se cultivaron células madre de placenta en pocillos de placas de 96 pocillos, y se añadió la población efectora. Las células madre de placenta y los efectores marcados con *N*-succinimidil éster de diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (CFSE) se preincubaron durante 24 horas antes de añadir las dianas, CD maduras. Después de seis días, se recogieron los sobrenadantes y las células no adherentes. Los sobrenadantes se analizaron por análisis de perlas Luminex y las células se analizaron por citometría de flujo.

Clásicamente, la RLM produce una respuesta proliferativa tanto en el compartimento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> como en el compartimento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Esta respuesta es una respuesta de linfocitos T vírgenes, ya que dos donantes alogénicos nunca se han encontrado antes. Tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como los linfocitos T CD8<sup>+</sup> proliferaban vigorosamente en la RLM convencional. Cuando se añadieron células madre de placenta a la RLM, se inhibió la proliferación de linfocitos T CD4 y CD8, medida por el porcentaje de células respondedoras CFSE<sup>Bajo</sup>.

El efecto de la adición de las células madre de placenta a una RLM (RLMP) puede verse en las FIGS. 10A y 10B (gráfico de RLMP) y en la FIG. 11. Los resultados fueron similares tanto si se usaban individualmente solo linfocitos T CD4<sup>+</sup> o linfocitos T CD8<sup>+</sup>, o si se usaban cantidades iguales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup> conjuntamente. Las células madre de placenta obtenidas del amnios-corion o estroma del cordón umbilical reprimieron la RLM en medidas similares, y no se observó ninguna diferencia en represión entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Esto también ocurrió para las reacciones de masas de linfocitos T.

Se realizó una RLM por separado usando linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup> o tanto linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, y células dendríticas (CD) alogénicas. Se añadieron células madre de placenta a la RLM y se evaluó el grado de proliferación de los linfocitos T, usando una RLM sin células madre de placenta como control.

Se aislaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y monocitos CD14<sup>+</sup>, a partir de capas leucocitarias usando perlas y columnas Miltenyi MACS, usadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron células dendríticas por un cultivo de seis días de monocitos en RPMI1640 suplementado con plasma de donante al 1%, IL-4 y GM-CSF, y un cultivo de dos días en RPMI1640 suplementado con IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Se incubaron linfocitos T alogénicos y CD

5 en la relación T:CD de 10:1 para producir una RLM clásica de 6 días. La proliferación celular se evaluó tiñendo los linfocitos T con CFSE (succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína) antes de añadirse al ensayo. El CFSE se usa para evaluar el grado de proliferación midiendo la dilución de la tinción entre las poblaciones de células hijas.

Para este ensayo, se añadieron células madre de placenta (CMP) en la relación T:CD:CMMP de 10:1:2. La reacción se preparó en una placa de 96 pocillos en un volumen final de 200  $\mu$ l de RPMI 1640 suplementado con suero humano combinado al 5% (R5). Después de seis días, las células no adherentes se resuspendieron brevemente y se transfirieron a un tubo de 5 ml lavado con RPMI, y teñido con anticuerpos contra CD4 y CD8. La proliferación del compartimento CD4 y CD8 se evaluó en un BD FACS Calibur.

*Células madre de placenta.* Las células madre de placenta se obtuvieron como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. Las células madre de placenta se obtuvieron a partir de los siguientes tejidos placentarios: amnios (MA), o amnios/corion (AC). Las células de cordón umbilical se obtuvieron por digestión del cordón umbilical (CU). Como controles se añadieron fibroblastos (FB) y células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (CMM).

*Resultados.* Cuando se añaden células madre de placenta a la RLM, se inhibe la proliferación de linfocitos T (FIG. 12). Las células madre de placenta usadas en los experimentos reflejados en la FIG. 10 procedían de una placenta, denominada 61665. Para todas las células madre de placenta ensayadas, cuando se usaban linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, pero de forma individual, el compartimento de CD4<sup>+</sup> se reprimía en un mayor grado que el compartimento de CD8<sup>+</sup> (FIG. 12A). La represión por células madre de placenta MA y CU de la activación de CD4<sup>+</sup> era aproximadamente equivalente a la represión mediada por CMM, con una represión de aproximadamente un 60%-75%. Cuando la RLM se realizó usando linfocitos T tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, las células madre de placenta reprimían la proliferación en el compartimento de CD4<sup>+</sup> en un grado mucho mayor que en el compartimento CD8<sup>+</sup> (FIG. 12B). En particular, la represión de la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> por células madre de placenta MA se aproximaba a 90%, superando la represión mostrada por CMM. La diferencia en represión entre estos dos compartimentos fue muy sorprendente para las células madre de placenta MA y AC.

Las células madre de placenta de diferentes donantes reprimen la proliferación de linfocitos T en la RLM en un grado diferente (FIG. 13). Células madre de placenta procedentes de una placenta diferente, denominada 65450, reprimían la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en la RLM de forma diferente que las células madre de placenta procedentes de la placenta 61665. Sorprendentemente, las CMP AC y CU de la placenta 65450 reprimían la proliferación de linfocitos T de 80% a 95%, superando la represión en este ensayo por las CMM. Sin embargo, las células madre de placenta AC procedentes de la placenta 65450 no reprimían la proliferación de linfocitos T en un grado apreciable (compárese la represión de células madre de placenta MA en la FIG. 10A).

Las células madre de placenta también reprimían la actividad de las células Natural Killer (NK) en la RLM.

### 6.5.2 Ensayo de regresión

En un ensayo de regresión se mostró que las células madre de placenta reprimían una respuesta de linfocitos T a una línea de linfocitos B que expresaban antígenos del virus de Epstein-Barr (EBV). El ensayo de regresión es un ensayo de recuerdo que mide los mecanismos de linfocitos T efectoros producidos por la presentación de péptidos antigénicos de EBV al MHC de Clase I y II de linfocitos B transformados por EBV. El ensayo se realiza mezclando linfocitos T con una línea de linfocitos B transformada creada artificialmente, la línea de células linfoblastoides (LCL) del mismo donante. La LCL expresa nueve antígenos del virus de Epstein-Barr que inducen entre ellos una serie de respuestas de linfocitos T y B adaptativas, aunque en el ensayo de regresión clásico, solo se miden los mecanismos efectoros de linfocitos T. El ensayo de regresión ofrece una forma conveniente para medir la citotoxicidad contra dianas infectadas con un patógeno natural, ya que la LCL expresa el marcador de linfocitos B activado CD23. Por lo tanto, el número de células que expresan CD23 es una medida del número de LCL que sobreviven en el ensayo.

El ensayo de regresión clásico de 17 días dio resultados similares a los observados en el primer grupo de barras de la Figura 14. No se detectaron células CD23<sup>+</sup>, ya que se habían destruido por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Con la adición de células madre de placenta, como se ve en los dos siguientes grupos de barras, aumentó la supervivencia de linfocitos CD23<sup>+</sup>. Sin deseo de limitarse por ninguna teoría, pueden darse dos explicaciones para el efecto observado. O los linfocitos T habían muerto y dejado atrás la LCL para que se expandiera libremente, o las células madre de placenta principalmente aumentaban la longevidad de la LCL, habiendo tenido menos efecto sobre los linfocitos T.

En un ensayo de regresión separado, se obtuvieron linfocitos T y células dendríticas de donantes de laboratorio. Se obtuvieron líneas de linfocitos B transformadas con virus de Epstein-Barr, LCL incubando células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con sobrenadante de una línea de EBV lítica, B95.8, y ciclosporina A durante dos semanas. La LCL expresaba 9 antígenos de EBV. El crecimiento de la línea LCL se mantiene en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%. El ensayo de regresión se realizó mezclando linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>

con LCL autóloga en una relación T:LCL de 10:1. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en 200 µl de RPMI 1640 suplementado con suero humano combinado al 5% (R5). Para este ensayo, se añadieron células madre de placenta en una relación T:TCL:CMF de 10:1:2. El ensayo se realizó durante 6, 10 o 17 días.

5 Se realizó un ensayo de regresión de seis días usando linfocitos T marcados con CFSE. Las células madre de placenta de la placenta 65450 reprimieron la proliferación de linfocitos T en el ensayo de regresión aproximadamente en 65%-aproximadamente 97%, un resultado que corresponde con los resultados de esas CMF en la RLM (Figura 15). De nuevo, las líneas CU y AC de la placenta 65450 reprimían significativamente la proliferación de linfocitos T, mientras que las CMF MA de 65450 no reprimían la proliferación.

10 En un experimento separado, se determinó que también se reprimían las células natural killer en la RLM y en los ensayos de regresión. En las células NK, cuando la RLM o el ensayo de regresión se realizaba incluyendo 50 U/ml de IL-2, el efecto represor era de aproximadamente 45% (intervalo de aproximadamente 40% a aproximadamente 65%, ETM 5%).

15 *Las células madre de placenta no son inmunogénicas.* En ningún caso se observó más de 5% de proliferación de linfocitos B de fondo contra las células madre de placenta de cualquier donante o cualquier sitio anatómico de la placenta.

20 *Requisitos de contacto célula-célula.* El efecto citotóxico en el ensayo de regresión y en el alo-reconocimiento en la RLM, dependen de las interacciones RT (receptor de linfocitos T):MHC entre la diana y las células efectoras. Los requisitos de contacto célula-célula en la represión mediada por células madre de placenta se evaluó usando un ensayo Transwell. En el ensayo, se realizó una RLM en la que los linfocitos T y las células madre de placenta estaban separados por una membrana. Como se ve en la Figura 16, cuanto mayor era el número de células madre de placenta usadas en la RLM, mayor era la reducción de la represión, indicando que, particularmente a mayores densidades, las células madre de placenta (CU) requieren un contacto significativo con los linfocitos T para reprimir la proliferación de linfocitos T.

25 Un ensayo distinto confirmó que la inmunodepresión de linfocitos T por células madre de placenta parece implicar al menos parcialmente un factor soluble. Para determinar si la inmunodepresión mediada por células madre de placenta depende del contacto célula-célula, se realizaron ensayos Transwell en los que se pusieron células madre de placenta en un inserto en el fondo del cual una membrana permitía el paso únicamente de factores solubles. En el suelo del pocillo, separados de las células madre de placenta, estaban la RLM o los linfocitos T solos. Para determinar si un efecto observado dependía de la dosis relativa de células madre de placenta, las células madre se añadieron a diferentes densidades relativas a linfocitos T y CD. Cuando se separaron células madre de placenta de cordón umbilical de la RLM, se anuló parcialmente el efecto represor. Cuando se usaron células madre de placenta a densidades similares a las usadas en la Figura 11, la represión de la RLM se anuló 75% para linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y 85% para linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 17, Figura 18). El efecto represor estaba aún a 66% cuando se usó solo un cuarto de la dosis de células madre de placenta (CU OP 25) y se redujo a los niveles de fondo cuando se añadieron 35 12.500 células madre de placenta CU. No se observó ningún cambio en la represión con la separación usando un inserto (Figura 17). A 25.000 células madre de placenta, a pesar del efecto represor aún vigoroso, se observó la menor reducción relativa en la represión sobre la introducción del inserto (Figura 18).

6.6 Ejemplo 6: la dependencia del contacto de la inmunodepresión de células madre de placenta difiere de la de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea

40 En un experimento para determinar el grado de dependencia del contacto en la inmunomodulación, las células madre de cordón umbilical mostraron un requisito notablemente diferente para el contacto célula-célula para la inmunomodulación que el de las células madre derivadas de médula ósea. En particular, las células madre de placenta dependían más del contacto célula-célula para efectuar la inmunomodulación, particularmente a mayores números de células madre de placenta o mesenquimatosas.

45 Las células madre derivadas de médula ósea (CMMO) y las células madre de cordón umbilical (CU) tienen diferentes requisitos para el contacto célula-célula, dependiendo de la relación entre células adherentes y linfocitos T en un ensayo de reacción de leucocitos mixtos (RLM). En un experimento Transwell, en el que se separaron células madre de placenta de linfocitos T y células dendríticas (CD) en la RLM, la represión variaba entre los dos tipos de células adherentes. La Figura 19 presenta resultados del pocillo abierto y Transwell unos al lado de los otros. 50 Cuando se usaron aproximadamente 100.000 o 75.000 CU o CMMO en el formato de pocillo abierto, se observó una represión similar. Sin embargo, en el formato Transwell, las CU reprimen la RLM en un menor grado que las CMMO, indicando una mayor dependencia del contacto a esas relaciones elevadas entre células madre de placenta y linfocitos T. cuando se usaron menores relaciones entre células placentarias y linfocitos T, las células madre de placenta eran más represoras célula por célula.

55 A partir de los datos de represión, se calculó el grado de dependencia de contacto. La Figura 20 muestra la dependencia del contacto de las RLM CMMO y CU. Las células derivadas de médula ósea son menos dependientes del contacto a mayores relaciones MO/linfocitos T que las CU. En otras palabras, las células madre de placenta CU y las CMMO se comportan de forma diferente con respecto a un parámetro importante para el mecanismo, la

necesidad de contacto célula-célula.

Se necesitan linfocitos T reguladores (Treg) para la represión de linfocitos T mediada por CMMO. Véase Aggarwal & Pittenger, "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses," *Blood* 105(4): 1815-1822 (2004). Se retiraron Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donantes sanos, y se realizó un ensayo de regresión usando células transformadas con EBV (virus de Epstein-Barr) autólogas. Se añadieron CU en algunas condiciones. Como puede verse en la Figura 21, no hay diferencia en la represión mediada por células madre de placenta de la respuesta de linfocitos T en el ensayo de regresión estén presentes o no Tregs. De esta manera, aunque se ha notificado que los linfocitos T reguladores son necesarios para la represión de linfocitos T mediada por CMMO, los linfocitos T reguladores no parecen intervenir en la inmunodepresión mediada por células madre de placenta.

Se realizó una RLM en la que los linfocitos T se tomaban de una RLM reprimida por células madre de placenta, y se añadieron células dendríticas frescas. Los linfocitos T se tiñeron con CFSE, que se distribuye igualmente en las células hijas durante la proliferación. Las células CFSE<sup>Alto</sup> son linfocitos T que no han proliferado (por ejemplo, los picos más a la izquierda en los paneles de la Figura 21). Esta población se obtuvo por clasificación de linfocitos T teñidos en un FACS Aria. Estas células se usaron en una segunda RLM con células dendríticas frescas. Como puede verse en la Figura 22, no se observó una represión duradera, ya que las células reprimidas inicialmente proliferaban bien frente a las CD. Es poco probable que las células CFSE<sup>Bajo</sup> (es decir, las células hijas) fueran responsables de la represión, ya que estas células proliferaron por sí mismas posteriormente. La población de CFSE<sup>Alto</sup> está constituida por células no alo-específicas que no habrían proliferado contra este donante de CD, así como los linfocitos T reprimidos por las células madre de placenta. Una vez retiradas las células madre de placenta, las células reprimidas proliferaban.

Una RLM se reprime por CMMO cuando aproximadamente 10% del sobrenadante se reemplaza por el sobrenadante de una RLM CMMO. En un marcado contraste, no se observó ningún cambio en la proliferación de linfocitos T cuando el sobrenadante se reemplazó por sobrenadante de una RLM que comprendía células madre de placenta, aunque se reemplazara 75% del medio (Figura 23).

Es posible que las CD o los linfocitos T en reposo se vean afectados por la incubación con células madre de placenta durante diferentes periodos de tiempo antes de iniciarse la RLM. Esto se ensayó incubando células madre de placenta o CMMO con linfocitos T (Figura 24A) o CD (Figura 24B) durante periodos de tiempo variables antes de empezar el ensayo. La preincubación de los linfocitos T y las células madre de placenta no altera el fenotipo depresor de forma apreciable (Figura 20A). Sin embargo, la represión de linfocitos T CMMO cambia dependiendo de la duración de la preincubación de CD/células madre de placenta. Como se muestra en la Figura 20B, la represión por CMMO es más fuerte cuando las CD se añaden un día después que los linfocitos T. Sin embargo, aparece una represión mucho menor cuando las CD se añaden al mismo tiempo que los linfocitos T. La incubación de CD durante un periodo mayor con CMMO puede invertir esta pérdida de represión. A los dos días de preincubación, la represión alcanza el escenario en el que las CD se añaden un día después que los linfocitos T (+1 día). No se observa una tendencia similar con la represión mediada por células madre de placenta.

6.7 Ejemplo 7: perfil de citocinas de células madre de placenta y células madre de cordón umbilical en la RLM y el ensayo de regresión

Se determinó que las células madre de cordón umbilical (CU) y las células madre de placenta de amnios-placa coriónica (AC) secretaban ciertas citocinas en el medio de RLM.

En algunos ensayos, se usó una serie de citocinas para medir los niveles de citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes. Se descubrió que en los sobrenadantes se secretaban varios factores, siendo el más relevante para la RLM y los ensayos de regresión la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . Estos dos quimioatrayentes atraen a los linfocitos T y se secretan por linfocitos T CD8<sup>+</sup> en respuesta a una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Cuando se ensayó en la RLM, esta secreción de quimioatrayentes se correlacionaba inversamente con la represión de células madre de placenta y CMM de la RLM (Figura 25). Ni las células madre de placenta ni las CMM secretaban MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ .

En otro estudio se encontró una correlación en la secreción de MCP-1 e IL-6, siendo ambos importantes inmunorreguladores (Figura 26 y Figura 27; compárese con la Figura 11). Aunque las células madre de placenta solas no secretaban IL-6 o MCP-1, las líneas CU y AC, ambas de las cuales reprimen la RLM y la proliferación de linfocitos T en el ensayo de regresión (Figura 11), secretan MCP-1 e IL-6 (Figura 26 y Figura 27). Aunque la IL-6 está asociada principalmente con acciones proinflamatorias (véase, por ejemplo, Kishimoto *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 23: 1-21 (2005)), también tiene otras funciones, tales como un papel protector durante la lesión hepática en ratones (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, *J. Clin. Invest* 115: 860-869 (2005)).

En un estudio separado, las AC usadas en una RLM o ensayo de regresión se analizaron con respecto a la secreción de citocinas. Las citocinas se midieron en un sistema Luminex en sobrenadantes de cultivos de células madre de 6 días, RLM de células madre o ensayos de regresión de células madre. Las RLM incluían las células madre, células dendríticas (CD) y linfocitos T en una relación de 2/1/10. Los ensayos de regresión del virus de

Epstein-Barr (EBV) incluían células madre, células tumorales EBV (TS) y linfocitos T en una relación TS:células madre:linfocitos T de 2:1:10.

5 Se observó que los niveles de IL-6 (11 ng/ml) e IL-8 (16 ng/ml) permanecen constantes en cultivos que tienen solo células madre, RLM y ensayos de regresión. Se determinó que la concentración de MCP-1 era de aproximadamente 2 ng/ml en cultivos que contenían solo células madre y RLM de células adherentes de control no represoras y ensayos de regresión, pero aumentaban a aproximadamente 10 ng/ml en RLM de células madre reprimidas y ensayos de regresión de células madre. Estos valores caen dentro de los niveles en suero registrados para MCP-1.

10 La interleucina-2 (IL-2) es tanto un factor de supervivencia de linfocitos T como un factor obligado para los linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Esta subserie de linfocitos T no es necesaria para la represión de linfocitos T por las células madre AC, pero los niveles de IL-2 se reducen uniformemente durante la represión de la RLM por las células madre AC. Los sobrenadantes de RLM en ausencia de células madre AC contenían aproximadamente 35 pg/ml de IL-2, mientras que las RLM que incluían células madre AC contenían hasta 440 pg/ml de IL-2.

15 Las concentraciones de IL-2 se correlacionaban con la represión. Por ejemplo, una RLM de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que mostraba una represión de 85% contenía 330 pg/ml de IL-2 y una RLM de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que mostraba represión de 85%, usando células madre AC contenía 66 pg/ml de IL-2. Estos resultados indican que la IL-2 y MCP-1, tradicionalmente conocidas como estimuladores de la respuesta inmunitaria, pueden intervenir en la represión inmunitaria.

#### 6.8 Ejemplo 8: producción de un producto de células madre crioconservadas y banco de células madre

20 Este ejemplo demuestra el aislamiento de células madre de placenta y la producción de un producto basado en células madre congeladas.

25 *Resumen:* se disecciona y digiere tejido placentario, seguido de cultivos primarios y de expansión para conseguir un producto celular expandido que produce muchas dosis de células. Las células se almacenan en un banco celular de dos niveles y se distribuyen como un producto de células congeladas. Todas las dosis de células derivadas de la placenta de un solo donante se definen como un lote, y un lote de placenta se procesa en un momento usando una técnica estéril en una sala especializada y una campana de flujo laminar de Clase 100. El producto celular se define como CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup> que tiene un cariotipo normal y sin o sustancialmente sin contenido de células maternas.

##### 6.8.1 Obtención de células madre

30 *Disección y digestión del tejido:* se obtiene una placenta antes de que hayan transcurrido 24 horas desde la expulsión. El tejido placentario se obtiene del amnios, una combinación de amnios y corion o corion. El tejido se corta en pequeñas piezas, de aproximadamente 1 mm de tamaño. El tejido cortado se digiere en 1 mg/ml de Colagenasa 1A durante 1 hora a 37 °C seguido de Tripsina-EDTA durante 30 minutos a 37 °C. Después de tres lavados en FBS al 5% en PBS, el tejido se resuspende en medio de cultivo.

35 En otra realización, se obtiene una placenta antes de que hayan transcurrido 24 horas desde la expulsión. Después de limpiar la placenta, se fija con una pinza un hemostato en el extremo distal del cordón umbilical. El cordón umbilical se corta en la unión con la placenta y se transfiere a una placa estéril. Después de cortar el cordón por debajo del hemostato, el cordón se masajea para retirar los coágulos sanguíneos y se transfiere a 500 ml de PBS que contiene gentamicina y anfotericina B. Se usan 5 g de este cordón. Se usa un bisturí para recortar el material placentario restante cortando en un radio de aproximadamente 7,62 cm desde el punto de unión del cordón umbilical. Se fuerza a los coágulos de sangre a salir del material restante y se transfieren 5 g del amnios-corion, centrado en la raíz del cordón umbilical, al mismo recipiente que el cordón umbilical. El cordón umbilical y el tejido de amnios-corion se cortan en secciones transversales, y después se cortan en piezas de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> de tamaño. El tejido después se digiere con 1 mg/ml de Colagenasa 1A (20 ml/gramo de tejido) durante 1 hora a 37 °C seguido de Tripsina-EDTA (10 ml/g de tejido) durante 30 minutos a 37 °C. Después de tres lavados en FBS al 5% en PBS, el tejido se resuspende en medio de cultivo (20 ml/g de tejido) y se transfiere a matraces T a aproximadamente 0,22 ml/cm<sup>2</sup>.

45 *Cultivo primario:* el objetivo del cultivo primario es establecer células a partir de tejido placentario digerido. El tejido digerido se suspende en medio de cultivo y se pone en matraces T Corning, que se incuban en una cámara humidificada mantenida a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 5 días de cultivo, se repone la mitad del medio. Se forman colonias de alta densidad de células a las dos semanas de cultivo. Las colonias se recogen con Tripsina-EDTA, que después se inactiva con FBS al 2% en PBS. Las células se centrifugan y resuspenden en medio de cultivo para la siembra de los cultivos de expansión. Estas células se definen como células de Pase 0 que tienen 0 tiempos de duplicado.

55 *Cultivo de expansión:* las células recogidas del cultivo primario, recogidas del cultivo de expansión o descongeladas del banco de células se usan para sembrar cultivos de expansión. Se tratan fábricas de células (NUNC™) con 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 50 ml/min/bandeja durante 10 minutos a través de un filtro estéril y se calientan en un incubador humidificado mantenido a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células de siembra se cuentan en un hemacitómetro con azul



de tripano y se registra el número de células, la viabilidad, el número de pases y el número acumulativo de duplicaciones. Las células se suspenden en medio de cultivo a aproximadamente  $2,3 \times 10^4$  células/ml y se siembran a 110 ml/bandeja en las fábricas de células. Después de 3-4 días y de nuevo a 5-6 días de cultivo, se retira el medio de cultivo y se reemplaza con medio nuevo, seguido de otro tratamiento con 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Cuando las células alcanzan aproximadamente  $10^5$  células/cm<sup>2</sup>, las células se recogen con Tripsina-EDTA, seguido de inactivación con FBS al 2% en PBS. Después, las células se centrifugan y resuspenden en medio de cultivo.

*Crioconservación:* las células a congelar se recogen del cultivo con Tripsina-EDTA (por ejemplo, 0,044 ml/cm<sup>2</sup> durante 5 minutos), se inactivan con FBS al 2% en PBS y se cuentan en un hemacitómetro. Después de la centrifugación (por ejemplo, a 300 x g), las células se resuspenden con DMSO al 10% en FBS a una concentración de aproximadamente 1 millón de células/ml para las células a usar para el ensamblaje de un banco celular, y 10 millones de células/ml para dosis de células congeladas individuales. En otra realización, las células se diluyen a aproximadamente 2 millones de células/ml en HAS al 10%, DMSO al 10% en Plasmalyte. La solución de células se transfiere a un recipiente de congelación, que se pone en un baño de alcohol isopropílico en un congelador a -80 °C. Al día siguiente, las células se transfieren a nitrógeno líquido.

#### 6.8.2 Diseño de un banco de células madre

Un "lote" se define como todas las dosis de células derivadas de la placenta de un solo donante. Las células mantuvieron un crecimiento, cariotipo y fenotipo normal de marcadores en la superficie celular durante más de 8 pases y 30 duplicaciones durante el cultivo de expansión. Dada esta limitación, las dosis comprenden células de 5 pases y aproximadamente 20 duplicaciones. Para generar un suministro de células equivalentes, un solo lote se expande en cultivo y se almacena en un banco celular de dos niveles y se congelan dosis. En particular, las células recogidas del cultivo primario, que se definen como células de Pase 0 que se han sometido a 0 duplicaciones, se usan para iniciar un cultivo de expansión. Después del primer pase, se producen aproximadamente 4 duplicaciones, y las células se congelan en un Banco Celular Maestro (BCM). Los viales del BCM se usan para sembrar cultivos de expansión adicionales. Después de dos pases adicionales de células descongeladas a partir del BCM, las células se congelan en un Banco de Células de Trabajo (BCT), aproximadamente 12 duplicaciones acumulativas. Los viales del BCT se usan para sembrar un cultivo de expansión para otros dos pases, dando como resultado células de Pase 5 a aproximadamente 20 duplicaciones que se congelan en dosis individuales.

#### 6.8.3 Congelación de células para cultivo

Los recipientes congelados de células se ponen en una bolsa de plástico cerrada herméticamente y se sumergen en un baño de agua a 37 °C. Los recipientes se agitan suavemente hasta que todo el contenido se ha fundido excepto un pequeño trozo de hielo. Los recipientes se retiran de la bolsa de plástico cerrada herméticamente y se añade lentamente un volumen 10X de medio de cultivo a las células con mezcla suave. Se cuenta una muestra en el hemacitómetro y se siembra en cultivos de expansión.

#### 6.8.4 Descongelación de células para inyección

Se transfieren recipientes congelados de células al sitio de administración en un transportador de nitrógeno seco. Antes de la administración, los recipientes se ponen en una bolsa de plástico cerrada herméticamente y se sumergen en un baño de agua a 37 °C. Los recipientes se agitan suavemente hasta que todo el contenido se ha fundido excepto un pequeño trozo de hielo. Los recipientes se retiran de la bolsa de plástico cerrada herméticamente y se añade un volumen igual de HSA al 2,5%/Dextrano al 5%. Las células se inyectan sin lavado adicional.

#### 6.8.5 Ensayo y especificaciones

Una muestra de sangre materna acompaña a todas las placentas de donantes. La muestra se analiza con respecto al antígeno de superficie de anticuerpo nuclear de Hepatitis B, ácido nucleico y anticuerpo del virus de la Hepatitis C, y ácido nucleico y anticuerpo de VIH I y II. El procesamiento placentario y el cultivo primario empiezan antes de la recepción de los resultados del ensayo, pero solo continúa para placentas asociadas con muestras de sangre materna que dan un resultado negativo para todos los virus. Un lote se rechaza si los ensayos del donante son positivos para cualquier patógeno. Además, se realizan los ensayos descritos en la Tabla 6 en el BCM, el BCT y una muestra del material de dosis de células obtenido a partir de un vial del BCT. Un lote solo se libera cuando se cumplen todas las especificaciones.

Tabla 6: ensayo de células especificaciones

Ensayo	Métodos	Resultado requerido
Esterilidad	BD BACTEC PEDS PLUS/F y BACTEC Myco/F Lytic	Negativo
Endotoxina	Coágulos en gel de LAL	≤ 5 UE/ml*

Ensayo	Métodos	Resultado requerido
Viabilidad	Azul de tripano	>70% viables
Micoplasma	Cultivo directo, ADN fluorocromo (FDA PTC 1993)	Negativo
Identidad	Citometría de flujo (véase más adelante)	CD105 <sup>+</sup> , CD200 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+</sup> , CD34 <sup>-</sup>
Pureza de células	Microsatélite	Sin detectar células contaminantes
Cariotipo	Bandas G y recuento de cromosomas en células en metafase	Normal

\*Para el producto designado para constituir 40 ml de células congeladas/dosis y un máximo de 5 UE/ml, el producto celular está por debajo del límite superior de 5 UE/kg/dosis para receptores de más de 40 kg de peso corporal.

#### 6.8.6 Análisis del fenotipo de marcadores de superficie

5 Las células se ponen en paraformaldehído (PFA) al 1% en PBS durante 20 minutos y se almacenan en un refrigerador hasta que se tiñen (hasta una semana). Las células se lavan con FBS al 2% y azida sódica al 0,05% en PBS (tampón de tinción) y después se resuspenden en tampón de tinción. Las células se tiñen con los siguientes conjugados de anticuerpo: CD105-FITC, CD200-PE, CD34-PECy7, CD10-APC. Las células también se tiñen con controles de isotipo. Después de 30 minutos de incubación, las células se lavan y resuspenden con tampón de tinción, seguido de análisis en un citómetro de flujo. Las células que tienen una mayor fluorescencia en comparación con los controles de isotipo se cuentan como positivas para un marcador.

6.9 Tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico usando células madre de placenta o células madre de cordón umbilical

Este ejemplo proporciona regímenes de tratamiento ejemplares para enfermedades o afecciones relacionadas con el sistema inmunitario.

#### 15 6.9.1 Tratamiento de la enfermedad de Crohn

Un individuo presenta ileocolitis, una forma de enfermedad de Crohn y experimenta dolor abdominal, diarrea hemorrágica y fiebre. Al individuo se le administran  $1-5 \times 10^8$  células madre de placenta y/o células madre de cordón umbilical CD10<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup> en una solución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa. Se supervisa al individuo durante las dos semanas posteriores para evaluar la reducción de uno o más de los síntomas. Se supervisa al individuo durante el transcurso del año siguiente, y se administran células madre de placenta en la misma dosis cuando sea necesario.

#### 6.9.2 Tratamiento de enfermedad de injerto contra hospedador

25 A un individuo que espera un trasplante alogénico de médula ósea se le administran  $5-10 \times 10^8$  células madre de placenta y/o células madre de cordón umbilical CD10<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup> en una solución de NaCl al 0,9% por vía intravenosa en las 24 horas previas al trasplante de médula ósea. La administración de las células madre se repite en las 24 horas posteriores al trasplante de médula ósea. Se supervisa al individuo durante los 100 días siguientes y recibe una dosis de seguimiento de  $5-10 \times 10^8$  células madre de placenta y/o células madre de cordón umbilical CD10<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup> si se desarrolla EICH (enfermedad de injerto contra huésped) y progresa más allá del Grado I.

#### 30 6.9.3 Tratamiento de artritis reumatoide

35 Un individuo presenta artritis reumatoide en tres o más articulaciones. Al individuo se le administra una combinación de células madre de placenta o de cordón umbilical y células madre de placenta que se han modificado para producir un polipéptido de fusión que comprende IL-1Ra y DHFR, administrándose los dos tipos de células madre en una relación 1:1. Las células modificadas y no modificadas por ingeniería genética son  $1-5 \times 10^8$  células madre de placenta y/o células madre de cordón umbilical CD10<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup> en una solución de NaCl al 0,9%. Al individuo se le administra metotrexato como una dosificación convencional y se supervisa con respecto a la reducción de la inflamación articular.

#### Equivalentes:

40 Las composiciones y métodos desvelados en la presente memoria no tienen limitado su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Células madre de placenta para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal, donde el método comprende administrar dichas células madre de placenta en una cantidad terapéuticamente eficaz que es suficiente para producir una mejoría detectable en uno o más síntomas de dicha enfermedad inflamatoria intestinal; y donde dichas células madre de placenta son CD10+, CD34-, CD105+ y CD200+.
2. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
- 10 3. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa.
4. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn.
5. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha enfermedad de Crohn es la enfermedad de Crohn gastroduodenal, yeyunoileítis, ileítis, ileocolitis o colitis de Crohn.
- 15 6. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, donde dicho síntoma es uno o más de inflamación e hinchazón de una parte del tracto GI, dolor abdominal, vaciamiento frecuente del intestino, diarrea, hemorragia rectal, anemia, pérdida de peso, engrosamiento de la pared intestinal, formación de tejido cicatricial en el intestino, formación de llagas o úlceras en el intestino, desarrollo de una o más fístulas en la pared intestinal, desarrollo de una o más fisuras en el ano, desarrollo de una deficiencia nutricional, diarrea hemorrágica, náuseas, calambres abdominales, fatiga, pérdida de apetito, pérdida de fluidos corporales y nutrientes, niveles de bilirrubina mayores de lo normal, niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT), niveles elevados de aspartato aminotransferasa (AST), niveles elevados de fosfatasa alcalina (AP), hemorragia interna, calambres o íleo.
- 20 7. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho método comprende además administrar un segundo agente terapéutico.
- 25 8. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho segundo agente terapéutico comprenden de mesalamina, un agente 5-ASA (ácido 5-aminosalicílico), osalazina, sulfasalazina (una combinación de 5-ASA y sulfapiridina), un anticuerpo antiinflamatorio, un esteroide o un inmunodepresor.
- 30 9. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho anticuerpo antiinflamatorio es Infliximab.
10. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho esteroide es cortisona, hidrocortisona, prednisona o metilprednisona.
11. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho método comprende además administrar un segundo agente terapéutico.
- 35 12. Las células madre de placenta para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho inmunodepresor es ciclosporina A, 6-mercaptopurina o azatioprina.

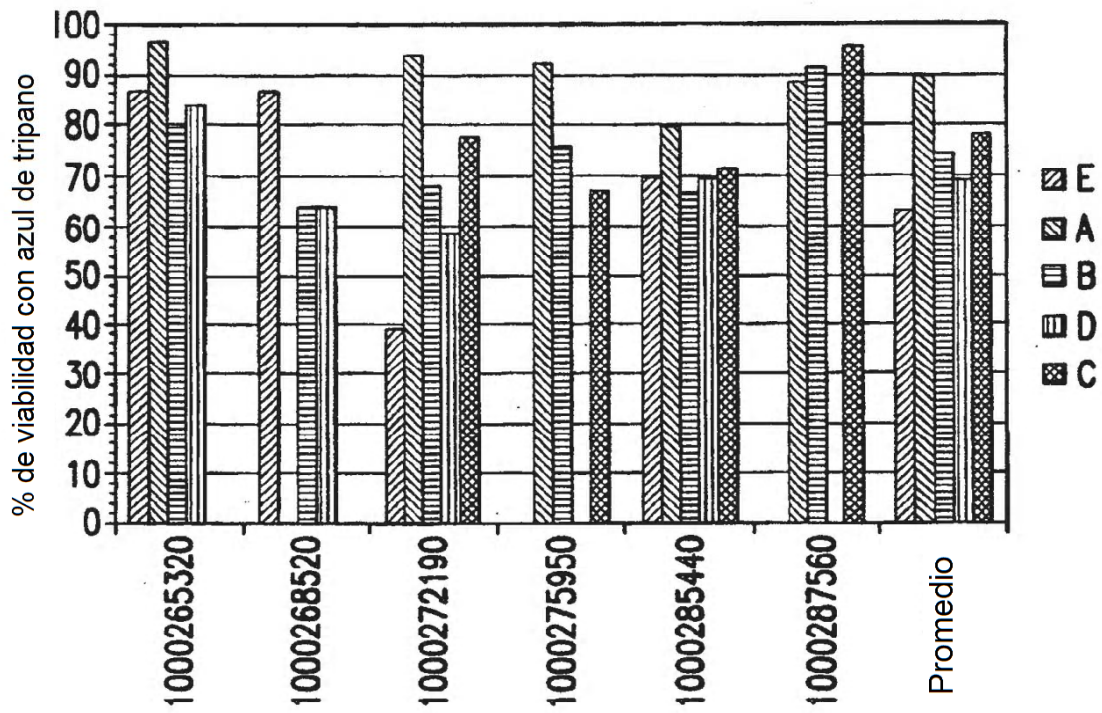


FIG. 1

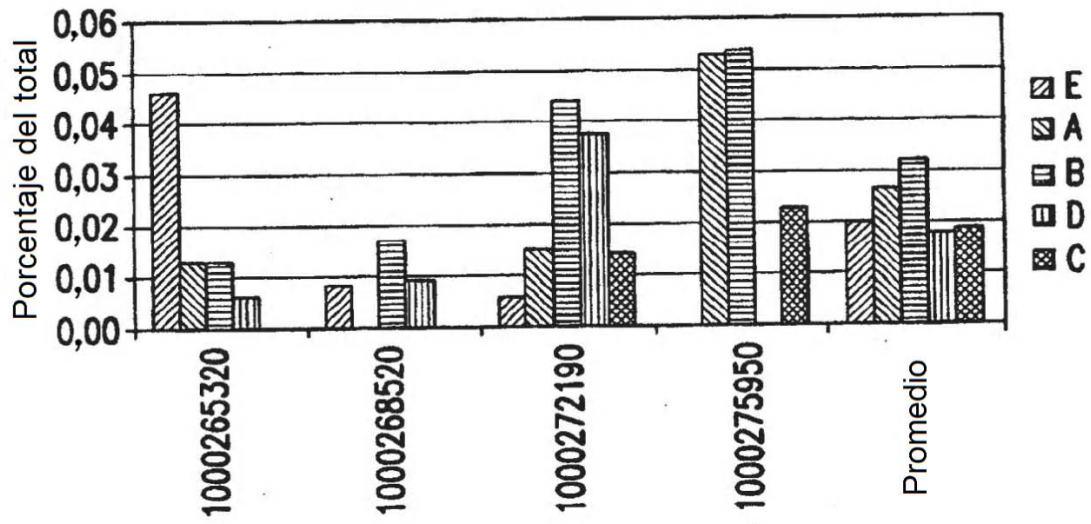
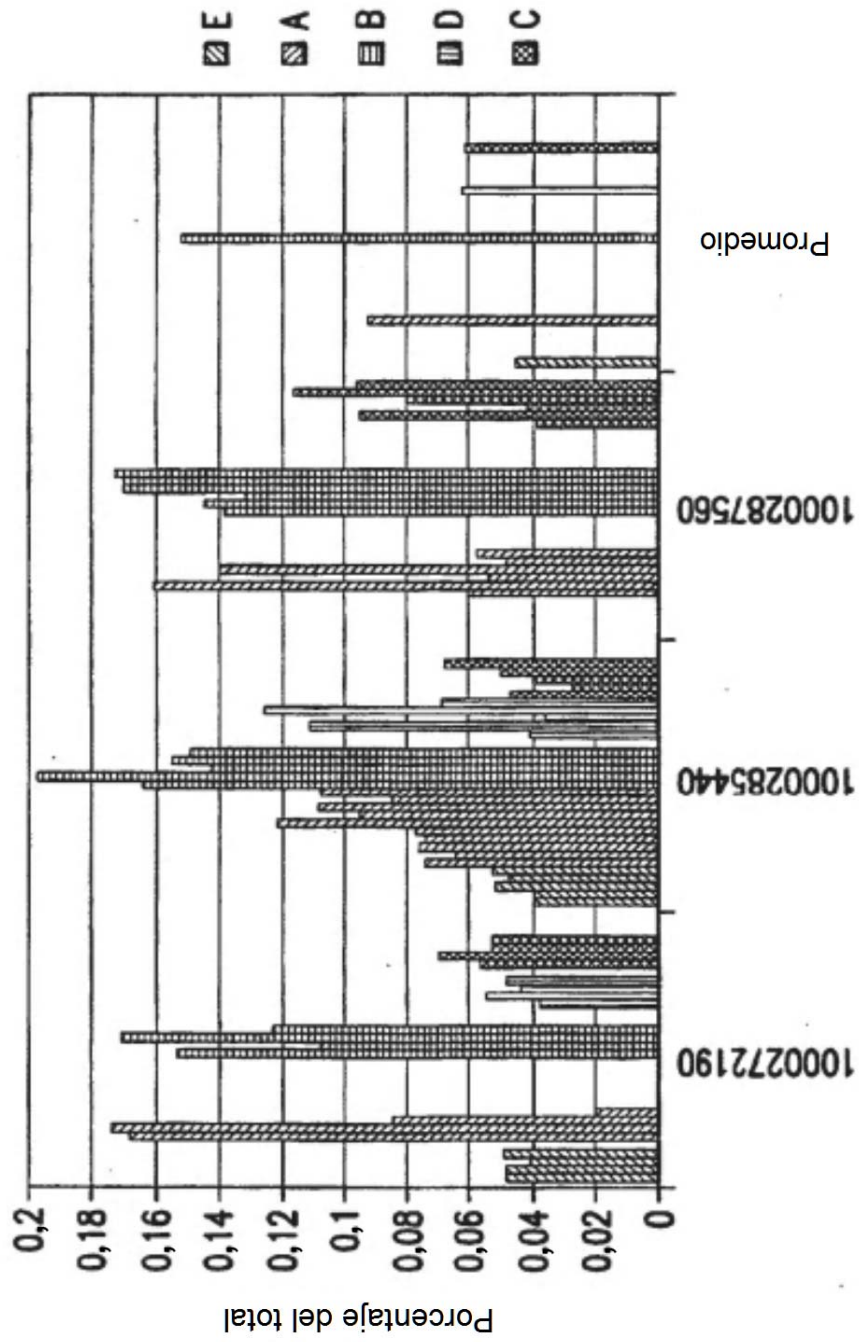


FIG.2



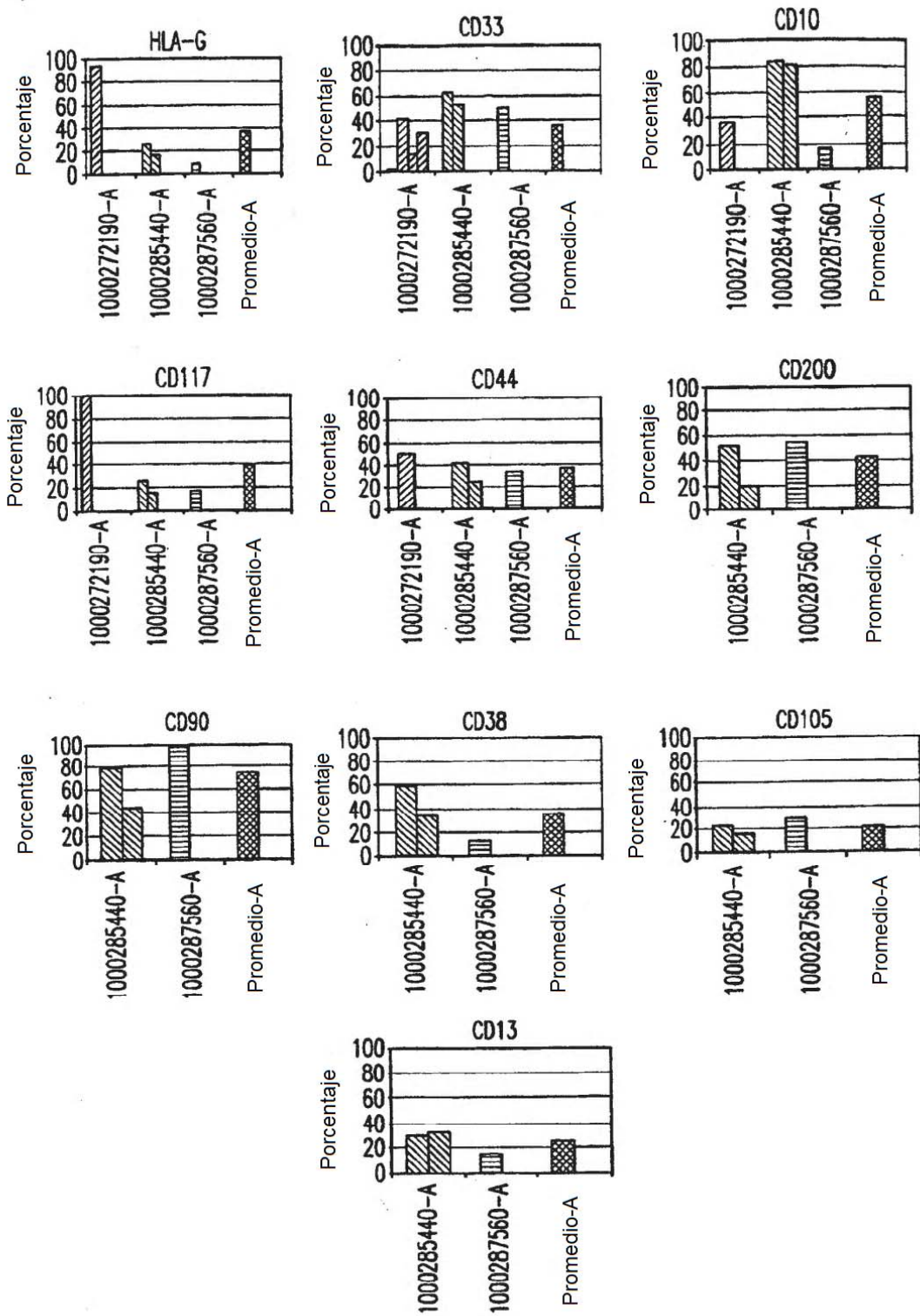


FIG.4

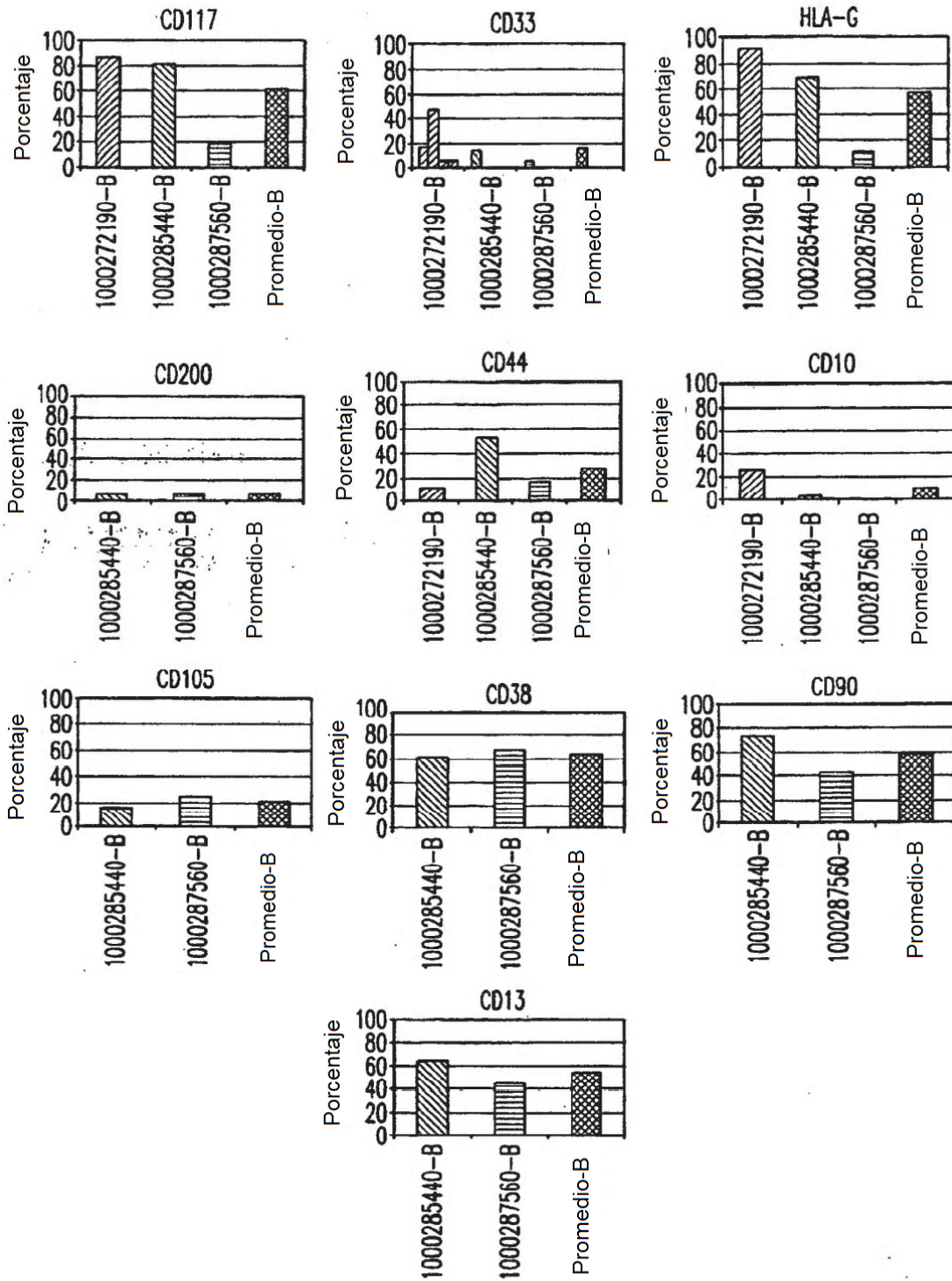


FIG. 5



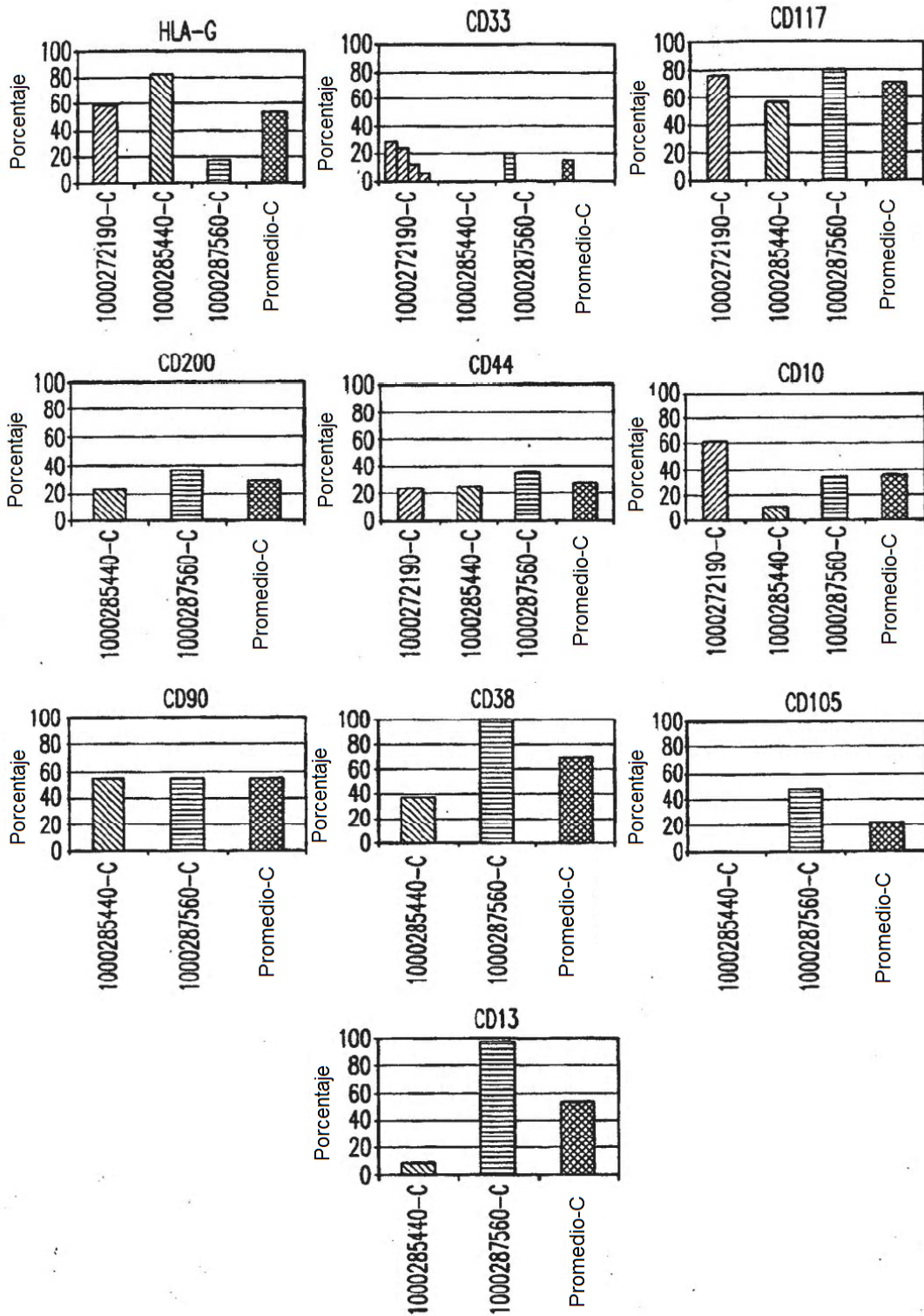


FIG. 6

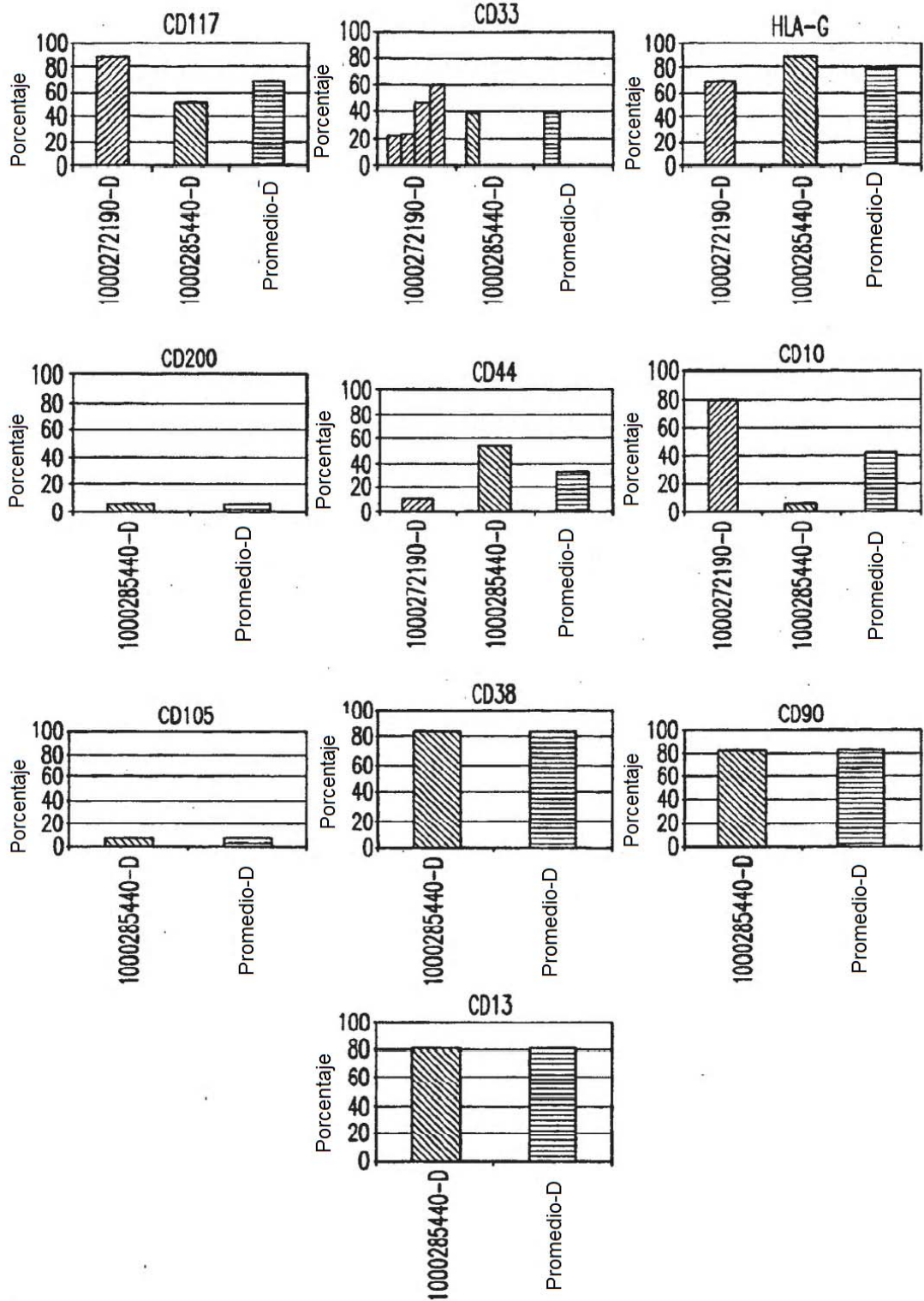


FIG. 7

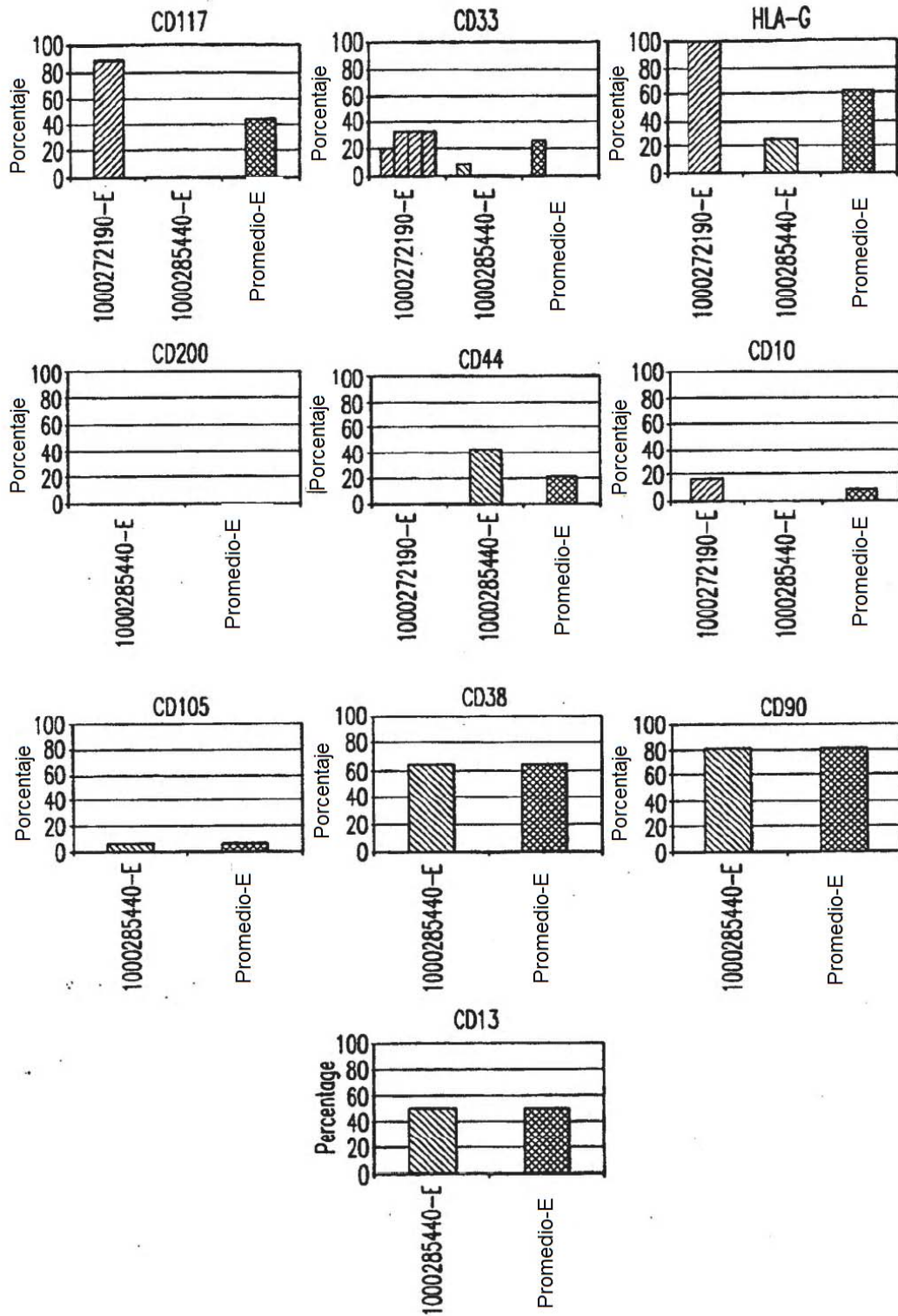


FIG.8

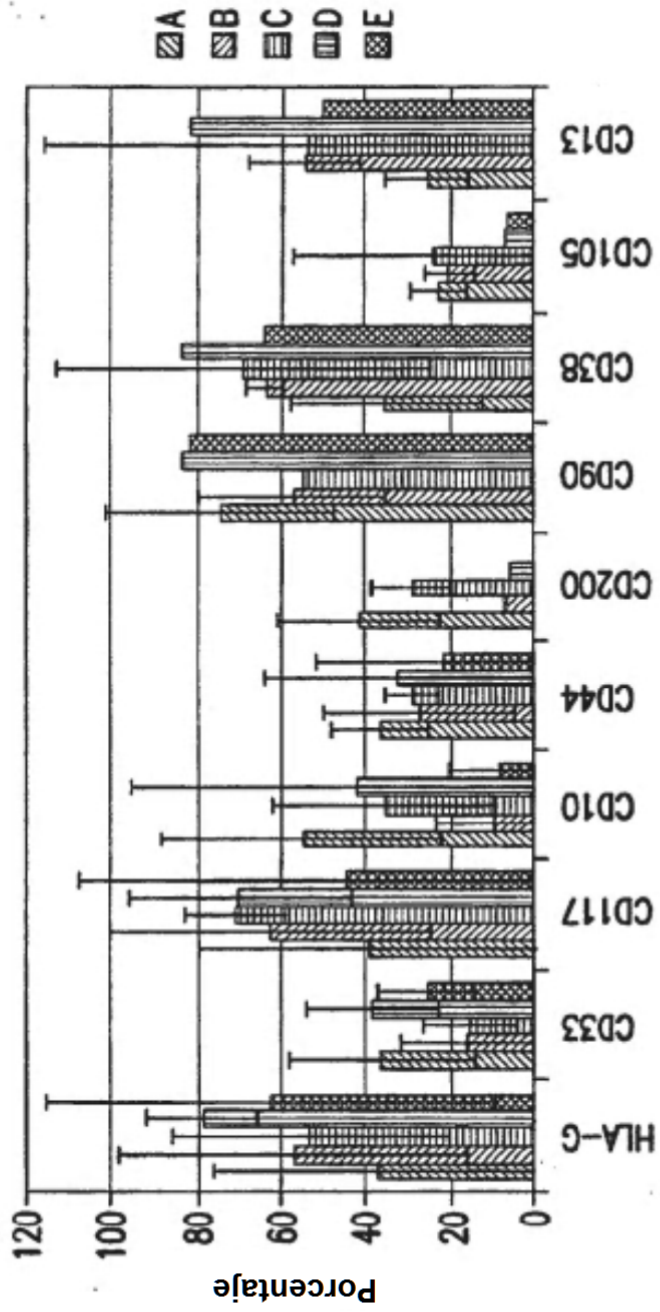
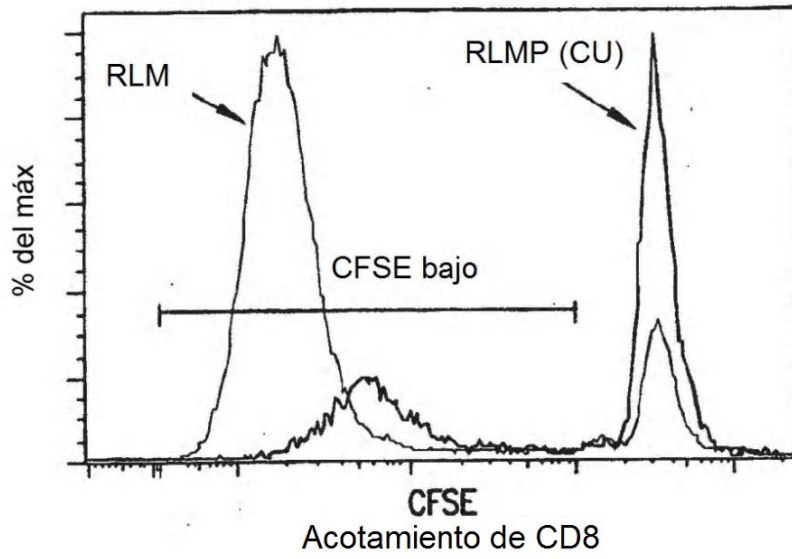
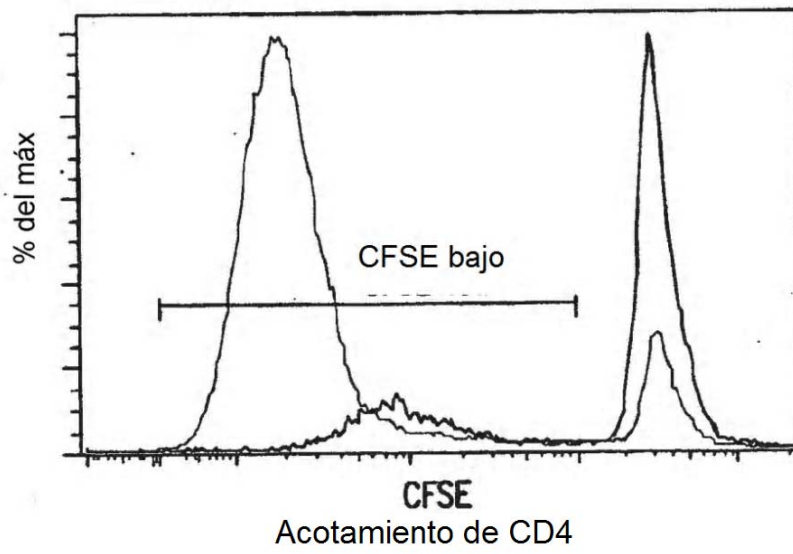


FIG. 9



**FIG.10A**



**FIG.10B**

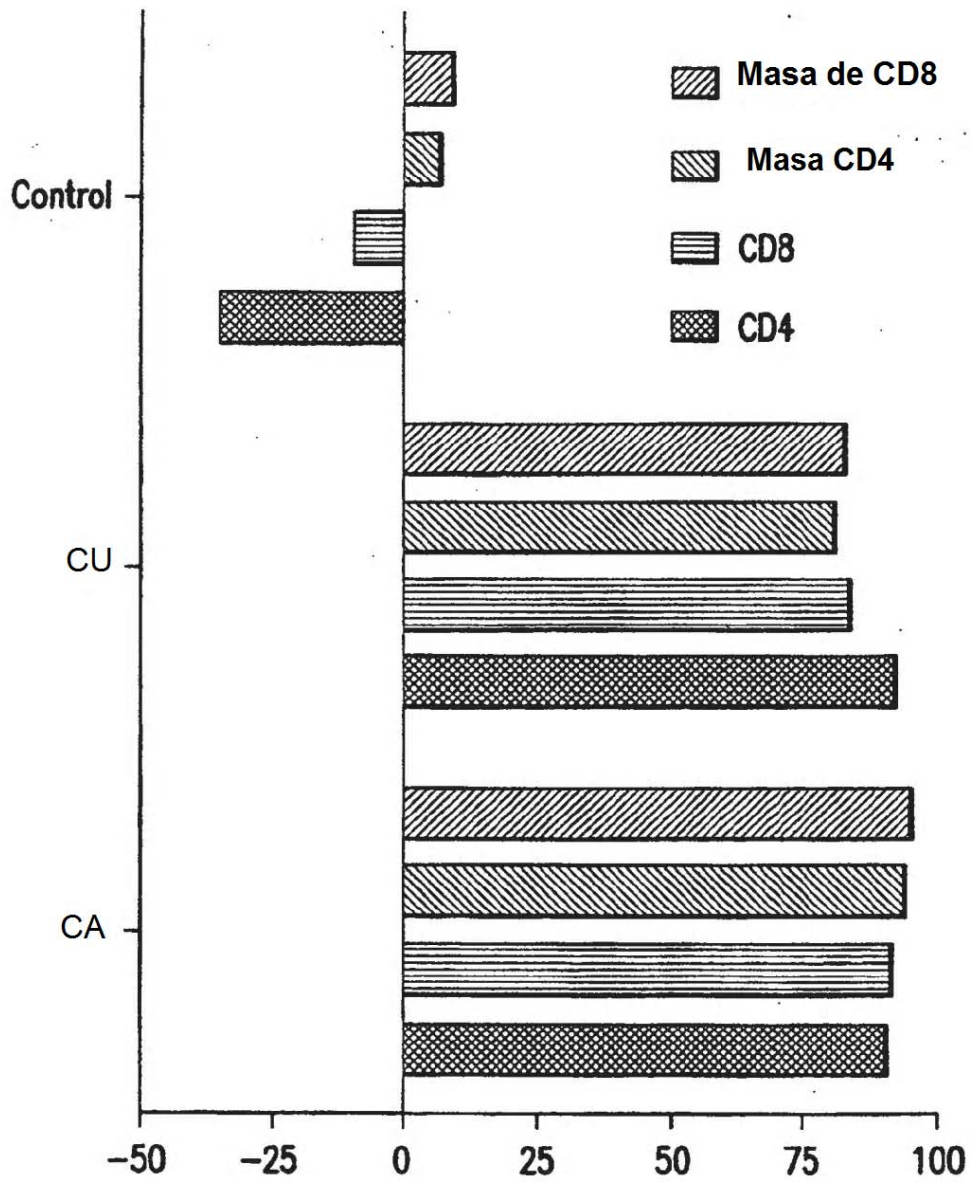
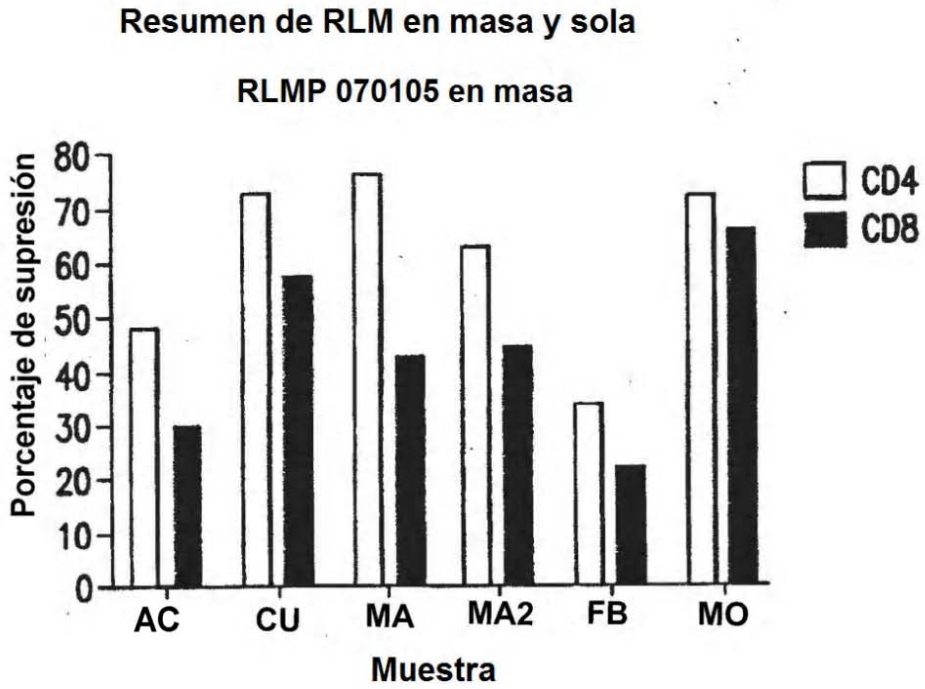
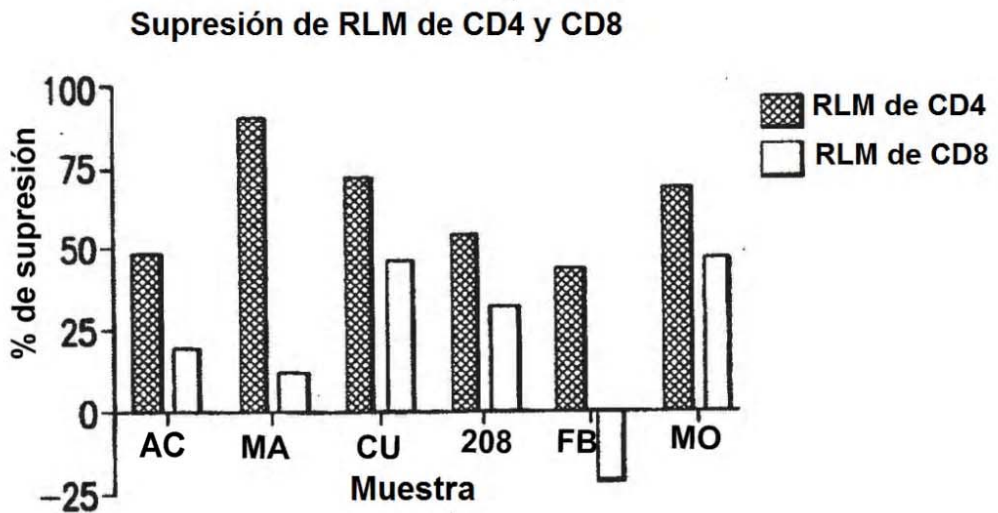


FIG. 11



**FIG.12A**



**FIG.12B**

Porcentaje de supresión de RLM, líneas 63450 y MO

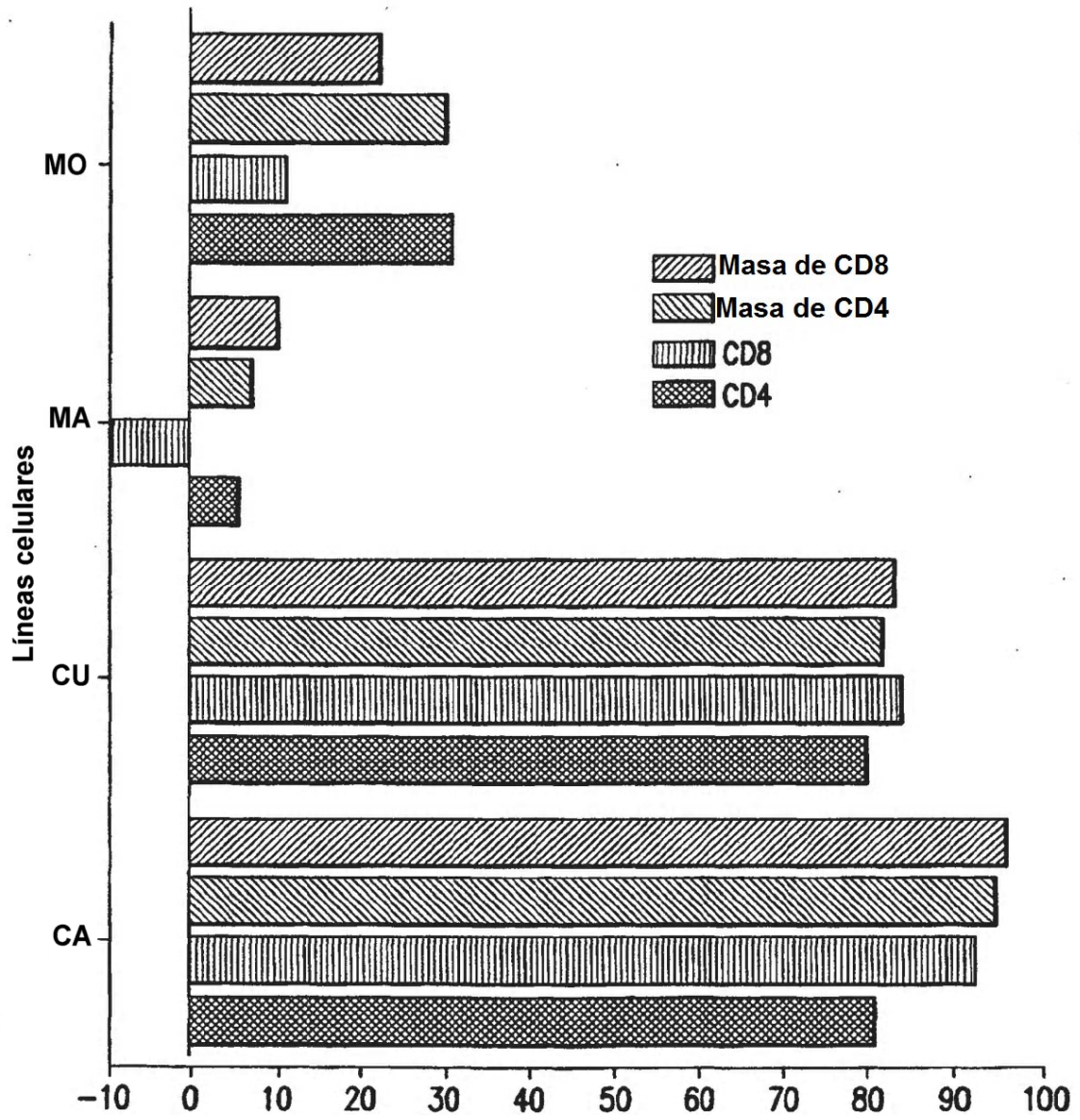


FIG.13



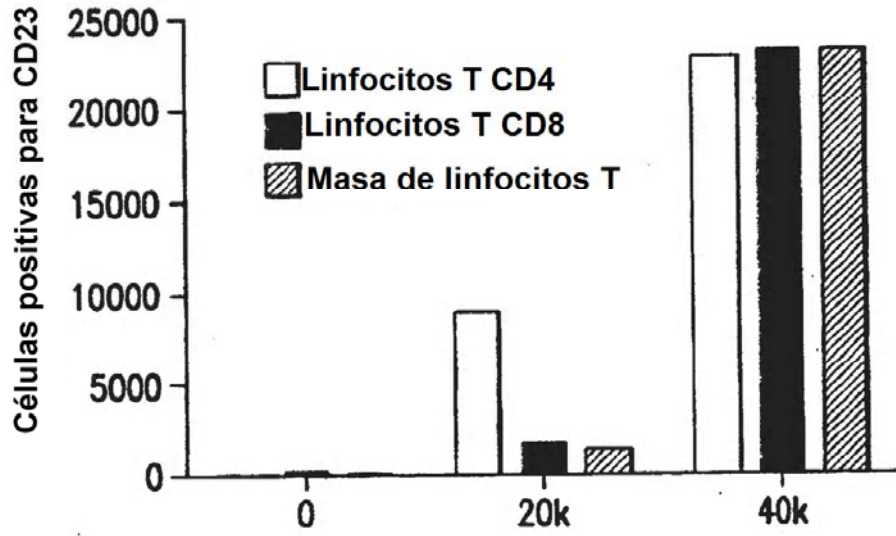


FIG.14

Ensayo de regresión: Supresión por líneas 63450 y MO

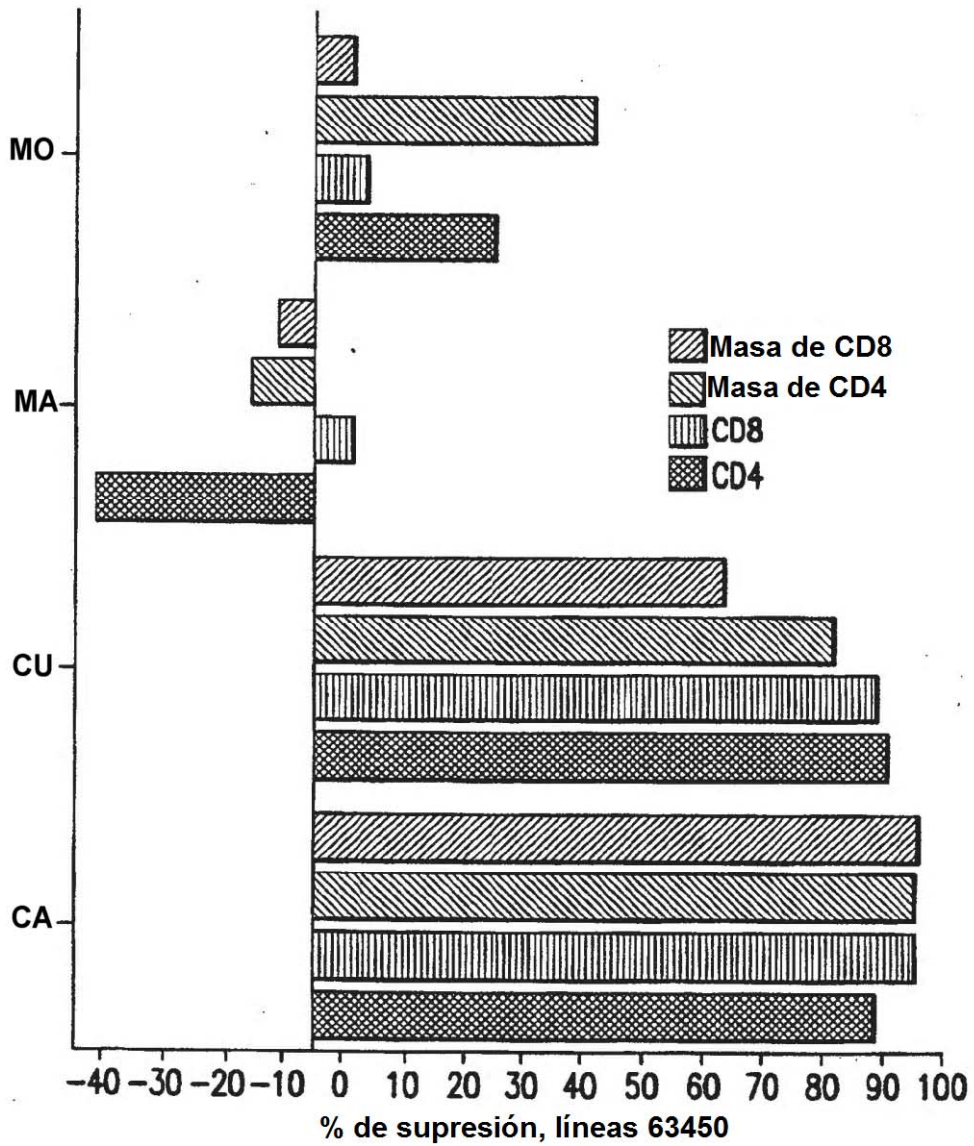


FIG.15

Cambio de la supresión de CADP con la introducción de inserto

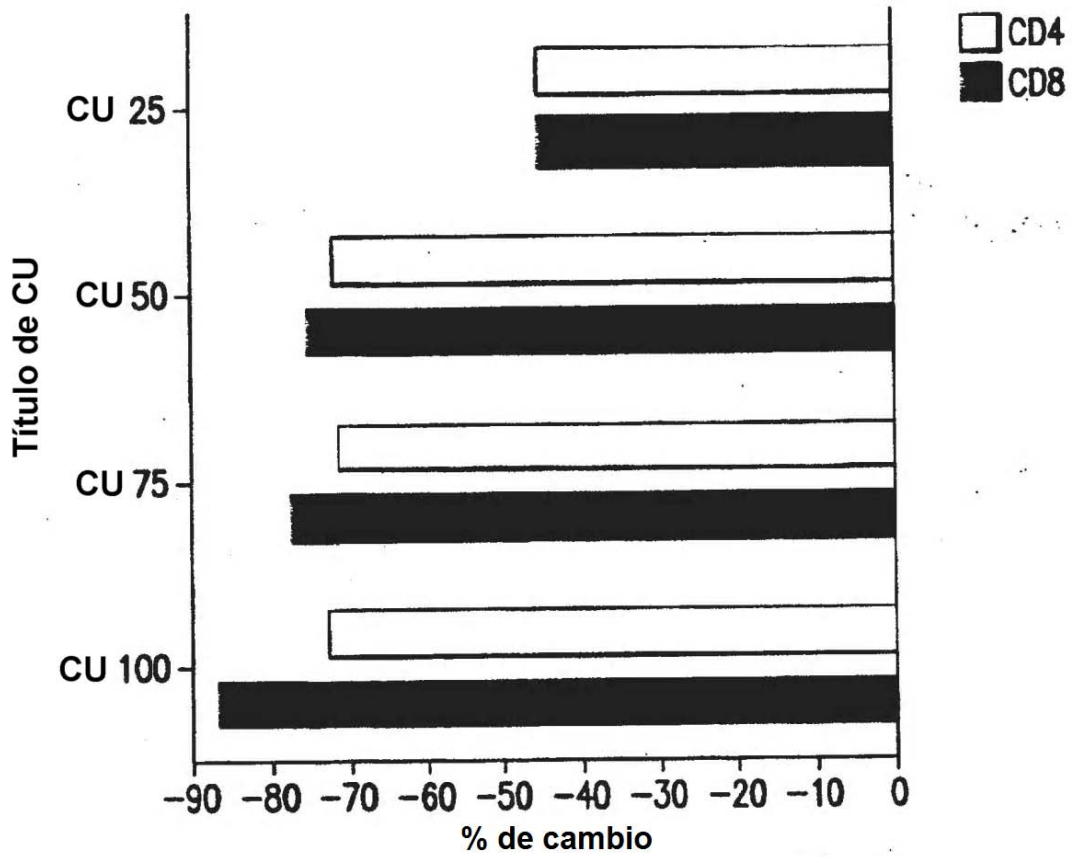


FIG.16

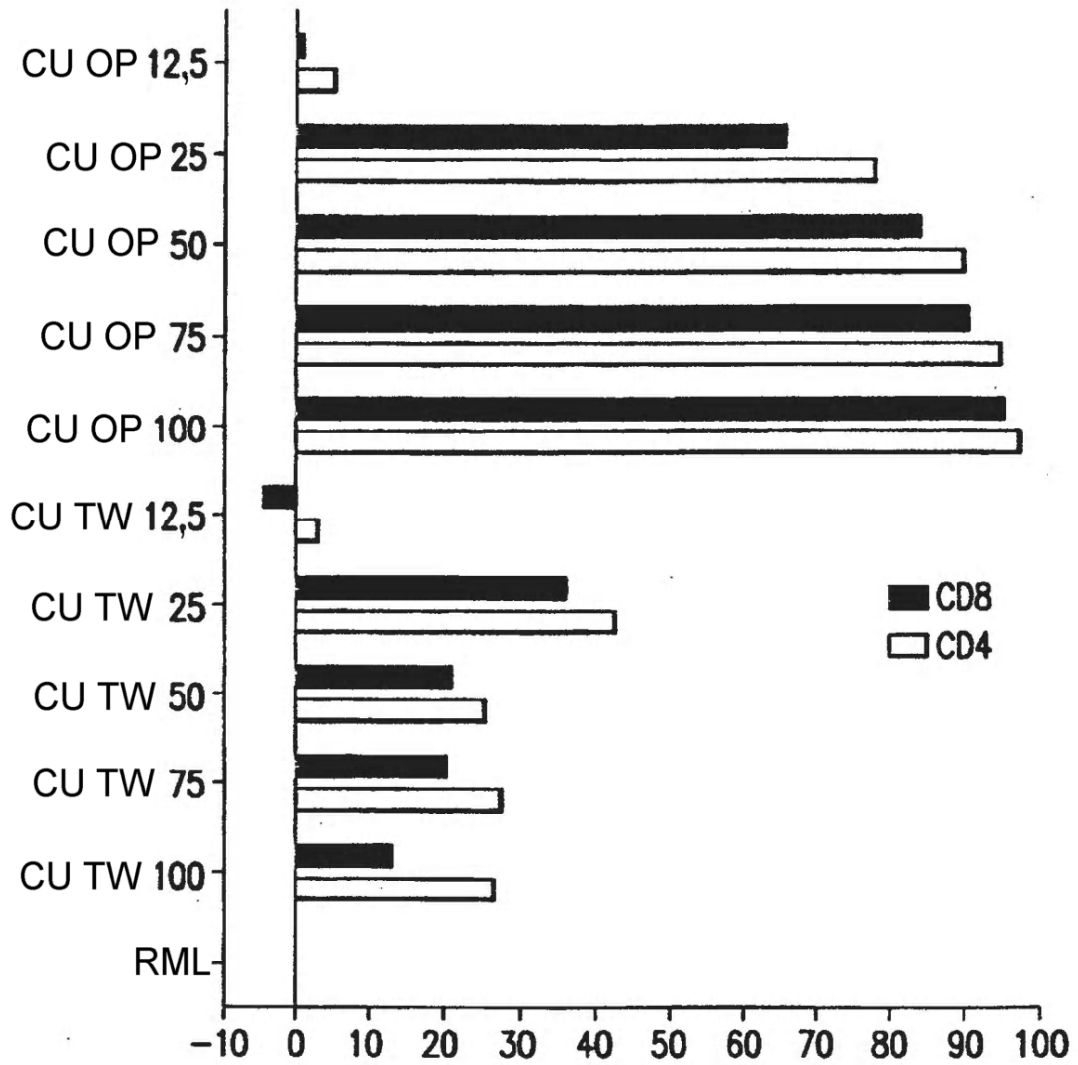


FIG.17

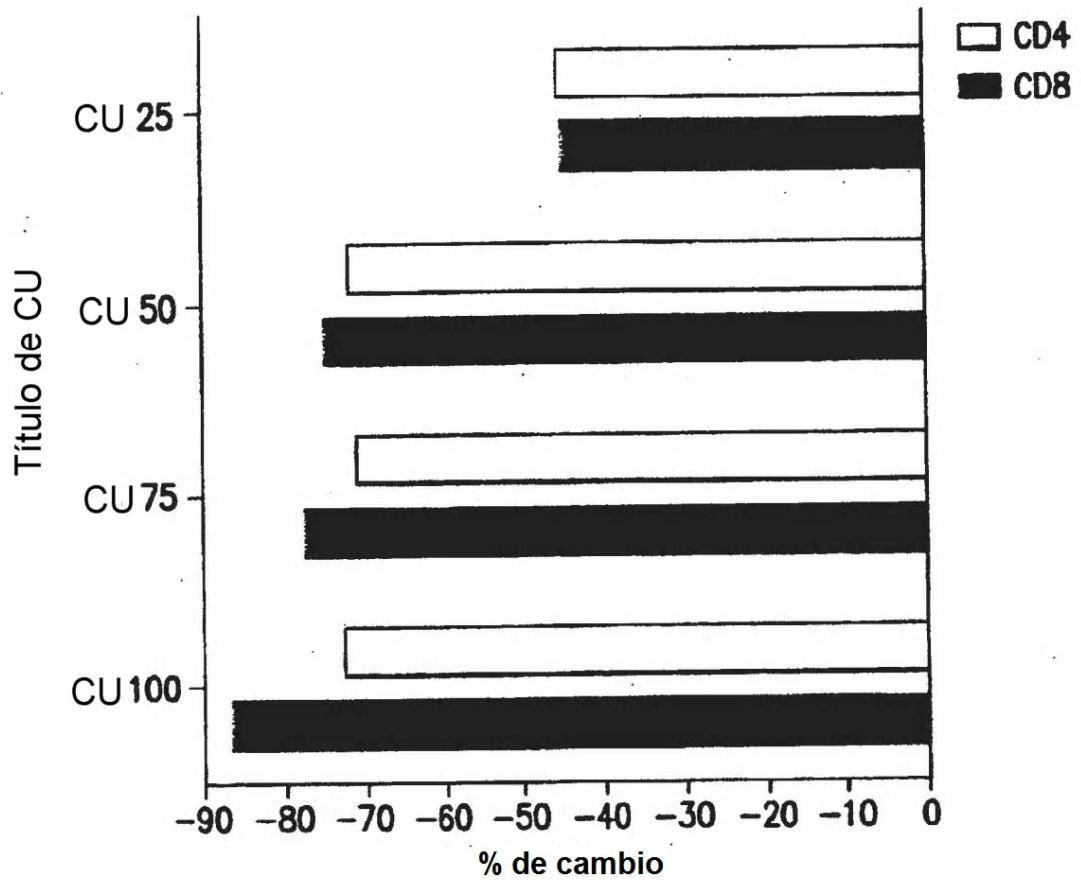


FIG.18

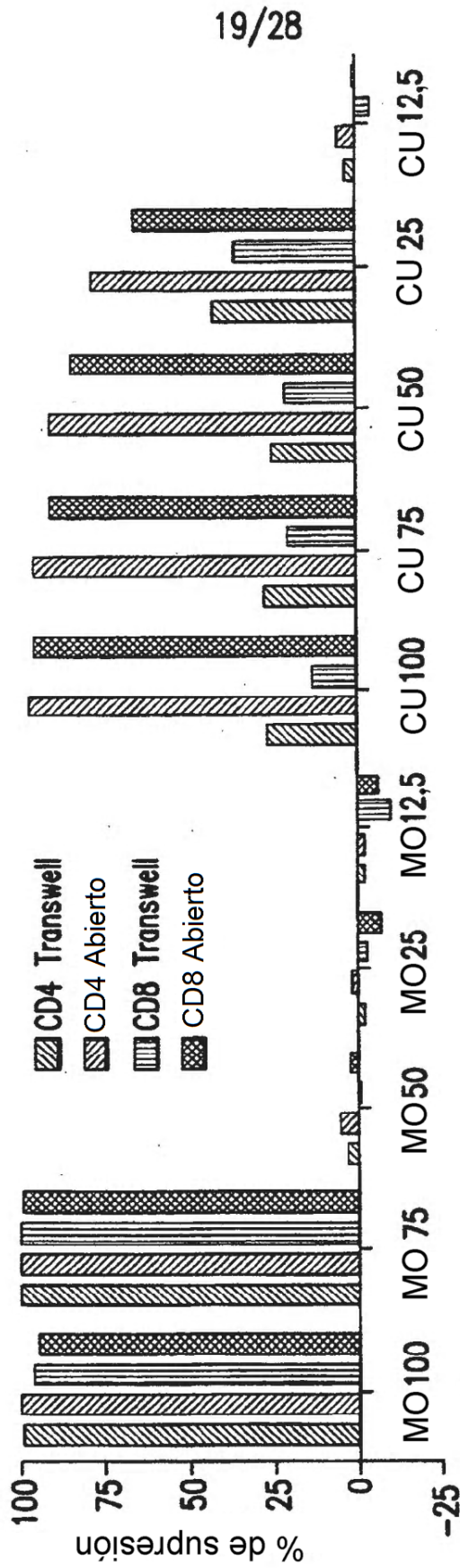


FIG.19

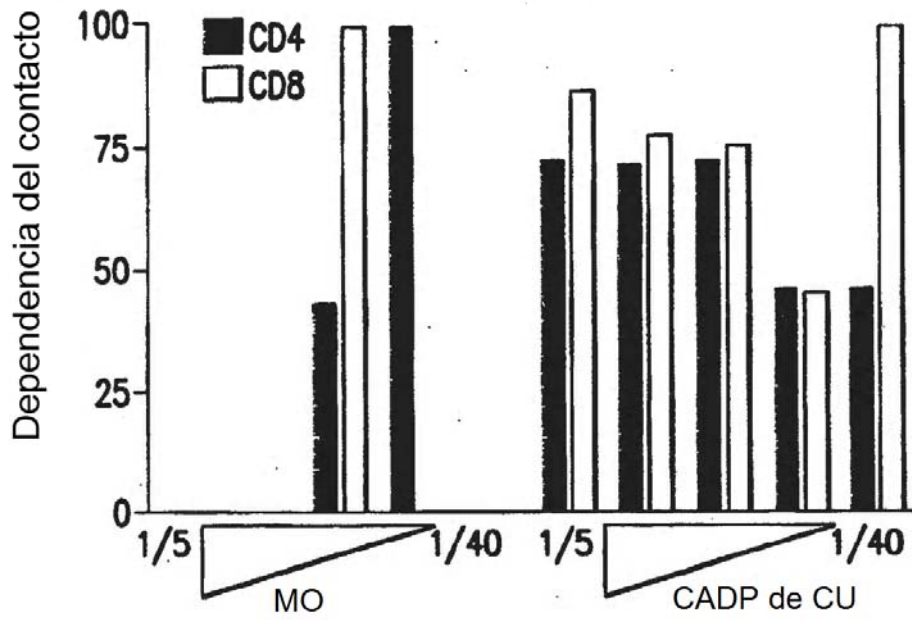


FIG.20

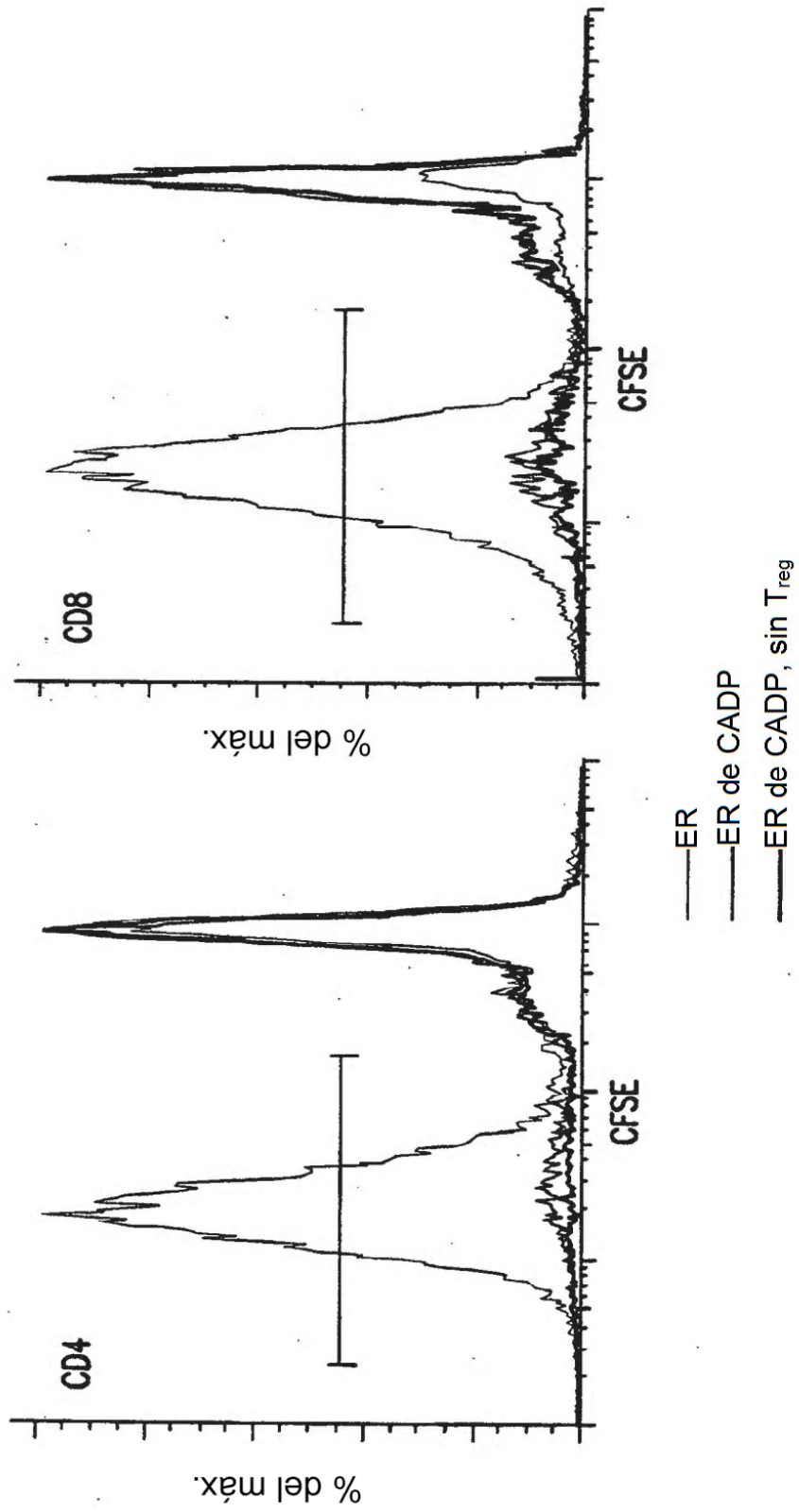


FIG.21



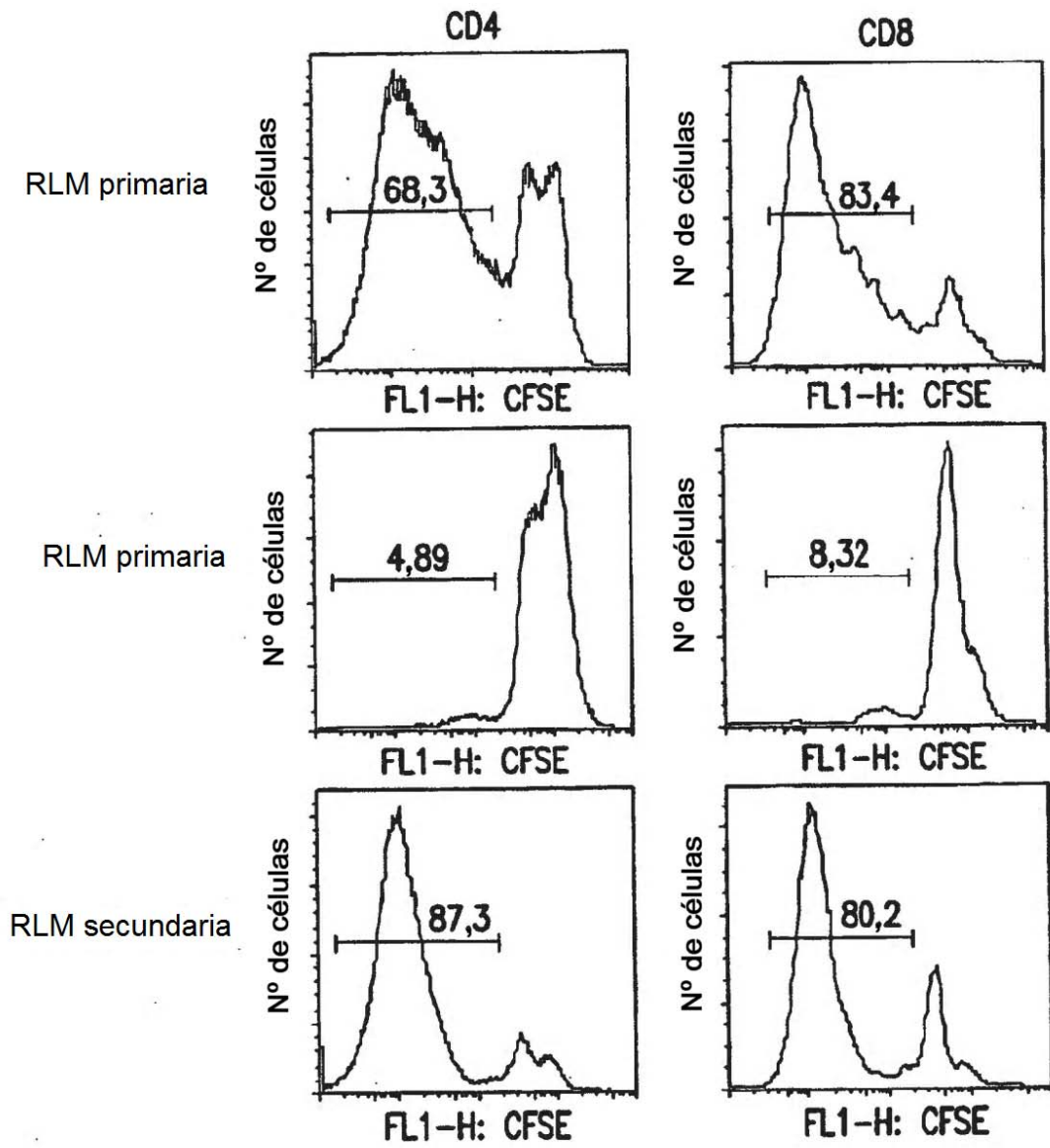


FIG.22

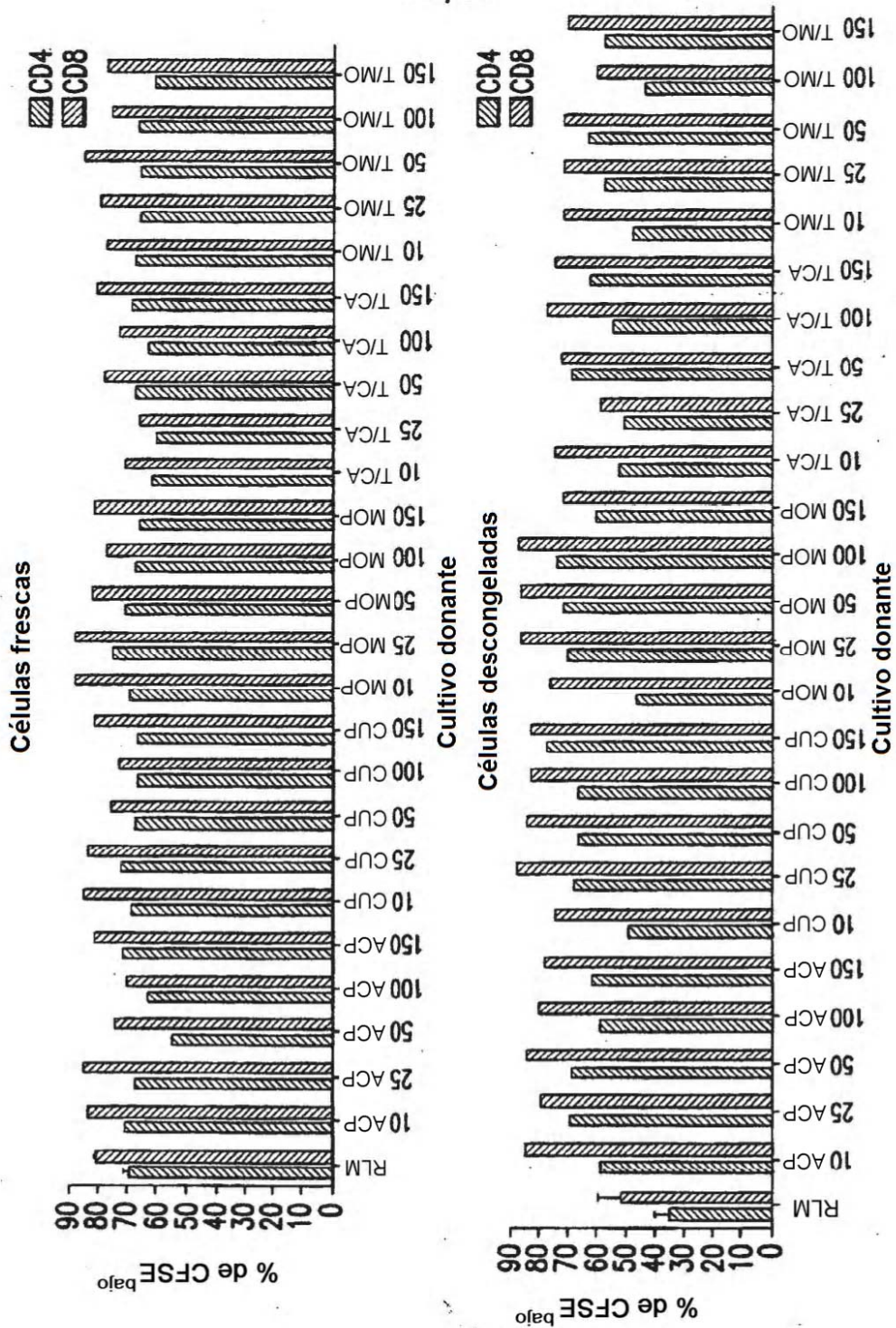


FIG. 23

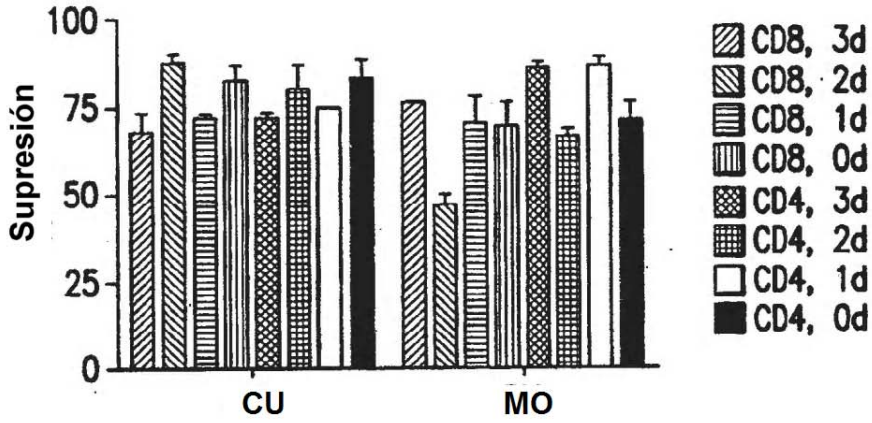


FIG.24A

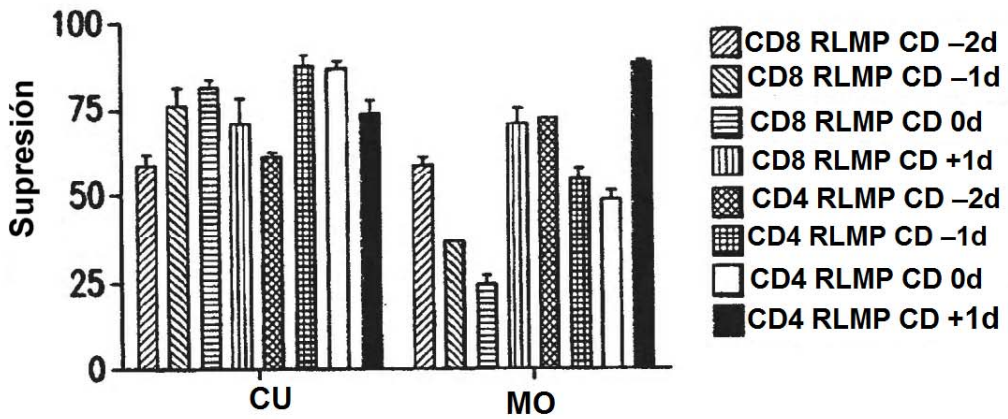


FIG.24B

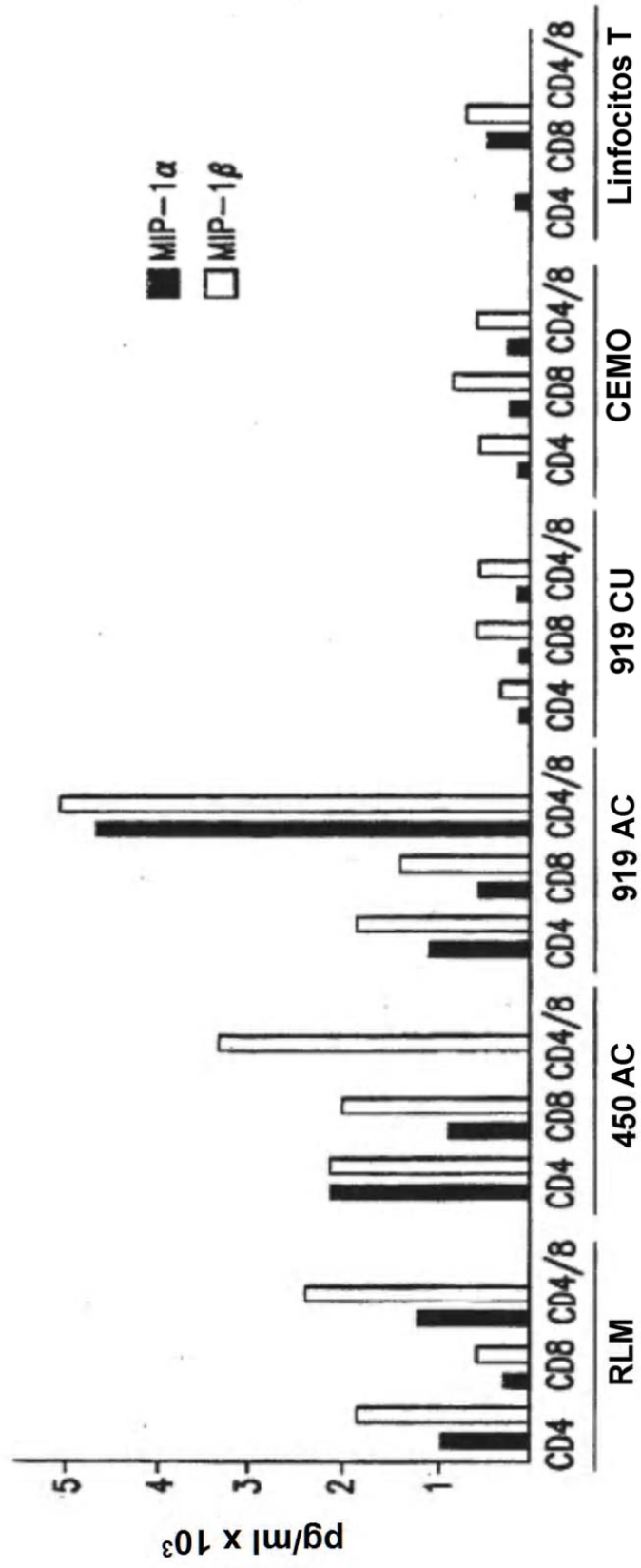


FIG.25A

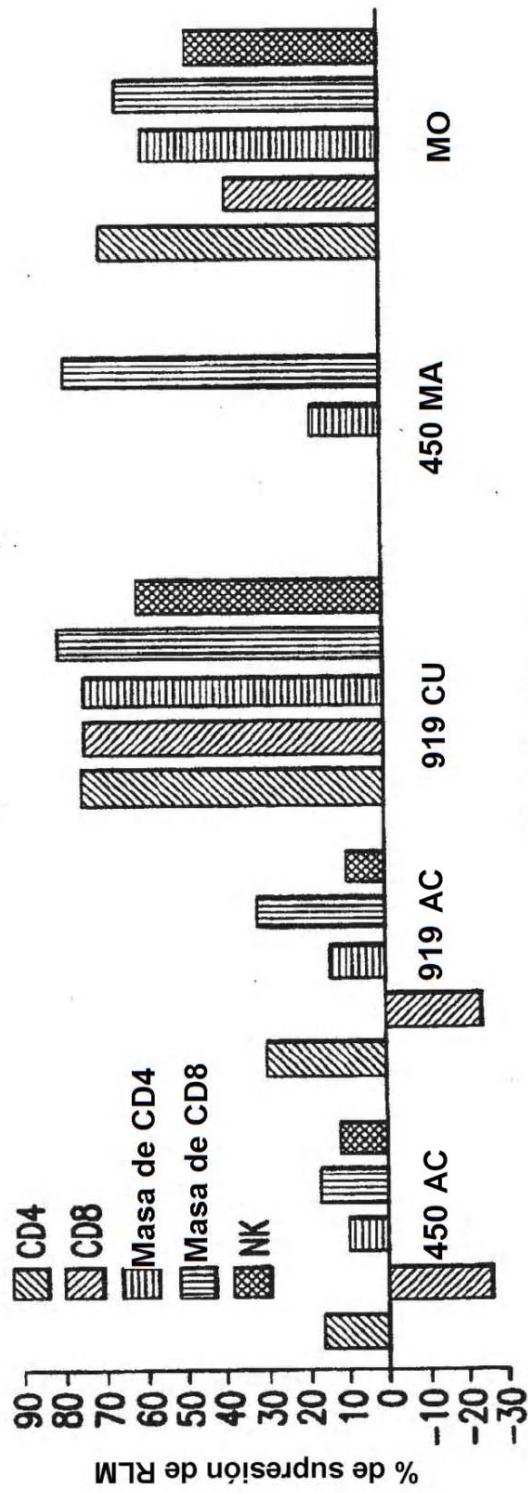


FIG.25B

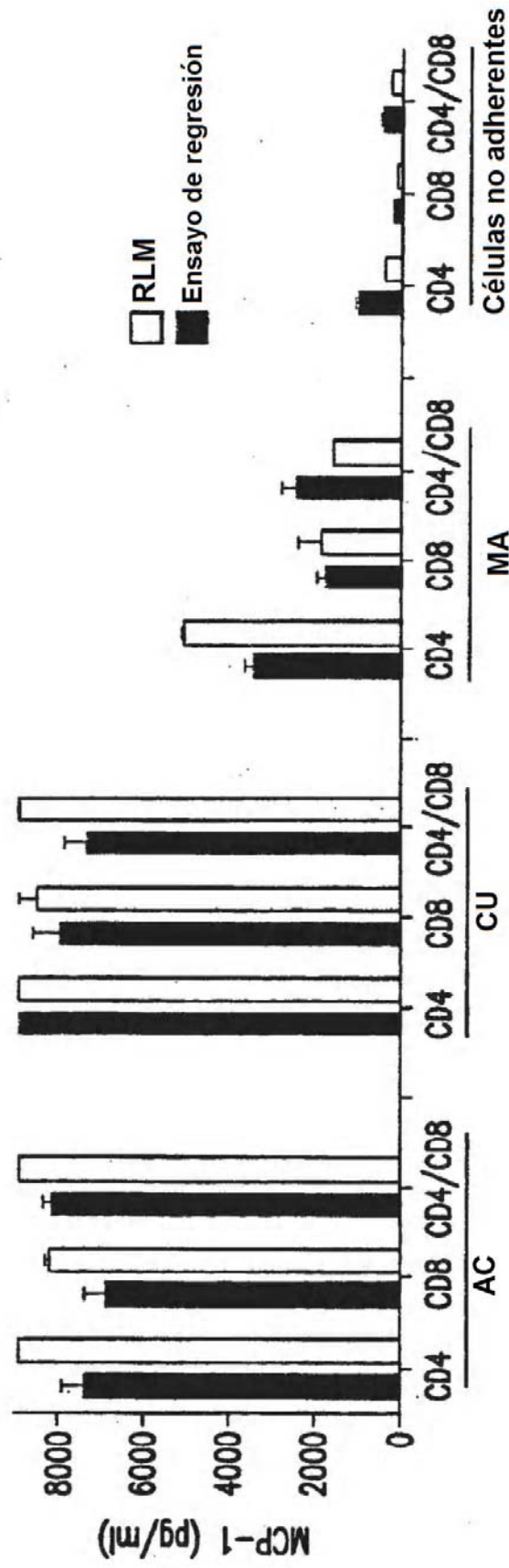


FIG.26

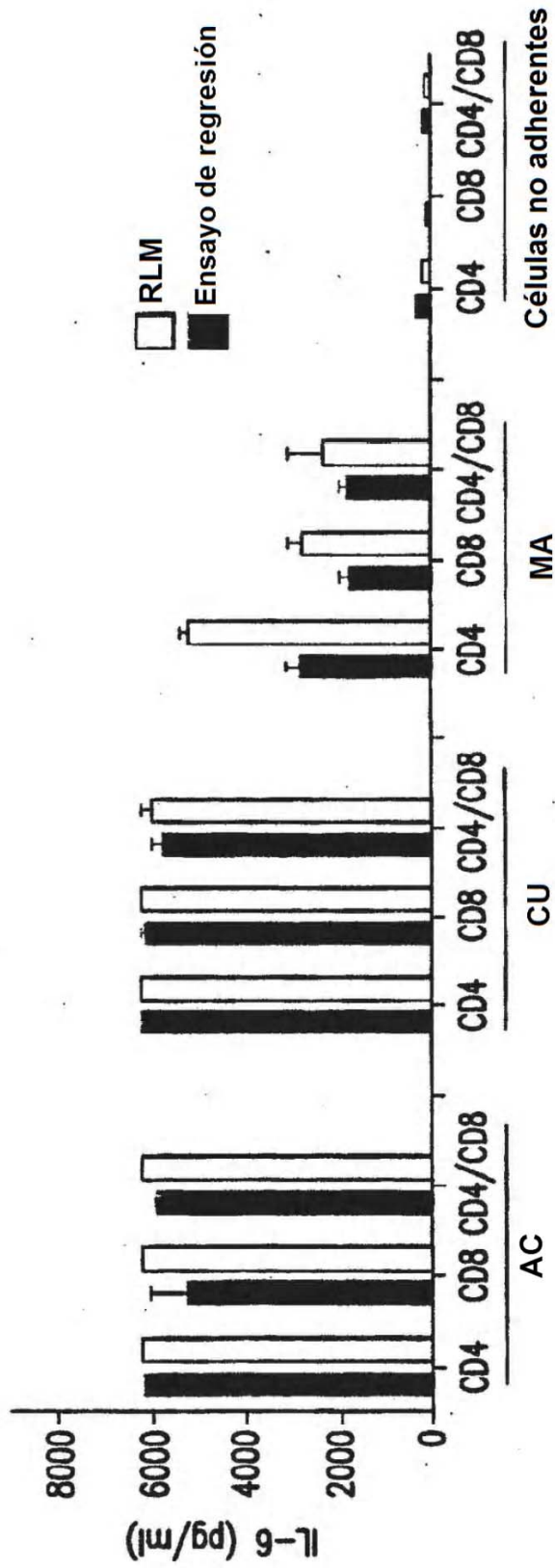


FIG.27