

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 148**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2007 E 07836619 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2054508**

54 Título: **Supresión tumoral usando células madre de placenta**

30 Prioridad:

04.08.2006 US 835627 P
03.08.2007 US 888926 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2013

73 Titular/es:

ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)
7 Powder Horn Drive
Warren NJ 07059, US

72 Inventor/es:

PALUDAN, CASPER;
EDINGER, JAMES;
HARBACHEUSKI, RYHOR;
MURRAY, ROSEANN y
HARIRI, ROBERT J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 148 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

Supresión tumoral usando células madre de placenta

1. Campo de la invención

La presente invención da a conocer procedimientos *in vitro* para utilizar células madre de placenta para suprimir la proliferación de células tumorales y el crecimiento tumoral. También se describen en la presente memoria células madre de placenta para el uso en la supresión de la proliferación de células tumorales y el crecimiento tumoral.

2. Antecedentes de la invención

Las células madre de humano son células precursoras totipotentes o pluripotentes capaces de generar una serie de líneas celulares maduras de humano. Existen pruebas que demuestran que las células madre se pueden emplear para repoblar muchos, cuando no todos, los tejidos y restaurar la funcionalidad fisiológica y anatómica.

Se han caracterizado muchos tipos diferentes de células madre de mamífero. Véase, p. ej., Caplan et al., patente de los EE.UU. n.º 5.486.359 (células madre mesenquimatosas de humano); Boyse et al., patente de los EE.UU. n.º 5.004.681 (células progenitoras y madre hematopoyéticas fetales y de recién nacidos); Boyse et al., patente de los EE.UU. n.º 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). En los trasplantes se han utilizado células de la sangre del cordón umbilical y células nucleadas totales procedentes de sangre del cordón umbilical para restaurar, parcial o totalmente, la función hematopoyética en los pacientes que se han sometido a una extirpación.

La placenta es una fuente particularmente atractiva de células madre. Ya que las placentas de mamíferos son abundantes y normalmente se desechan como residuo médico, representan una fuente única de células madre médicamente útiles.

Recientemente se ha demostrado que las células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea, cuando están modificadas genéticamente, tienen la capacidad de migrar e infiltrarse en determinadas células tumorales. Véase, p. ej., Hung et al., «Mesenchymal Stem Cell Targeting of Microscopic Tumors and Tumor Stroma Development Monitored by Noninvasive *In vivo* Positron Emission Tomography Imaging», *Clin. Cancer Res.* 11 (21): 7749-7756 (2005). Se ha demostrado que algunas células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea y manipuladas genéticamente suprimen el crecimiento tumoral. Véase, p. ej., Studeny et al., «Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interferon- β Delivery into Tumors», *Cancer Res.* 62: 3603-3608 (2002) (línea celular de melanoma); Nakamura et al., «Antitumor Effect of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells in a Rat Glioma Model», *Gene Therapy* 11: 1155-1164 (2004) (las células madre mesenquimatosas expresaban la IL-2 recombinante). Sin embargo, se ha demostrado que las células madre mesenquimatosas fomentan el crecimiento de al menos una clase de tumor *in vivo*. Véase Zhu et al., «Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow Favor Tumor Cell Growth *In Vivo*». *Exp. Mol. Pathol.* (publicación electrónica antes de la publicación, 2005) (células de adenocarcinoma de colon). In't Anker et al. *Stem Cells.* 22: 1338-1345 (2004) describen el aislamiento de las células madre mesenquimatosas de origen materno o fetal desde una placenta humana. Li et al., *Cell Research-Xibao Yanjiu.* 15 (7): 539-547 (2005) describen el aislamiento y el cultivo de células mononucleares de placenta de humano, su potencial de diferenciación y su efecto inmunodepresor *in vitro* contra la proliferación de linfocitos de la sangre del cordón umbilical. Zhang et al. *Experimental Hematology* 32: 657-664 (2004) describen células progenitoras mesenquimatosas procedentes de la placenta humana, su potencial de diferenciación y su capacidad para mantener la expansión del cultivo de células hematopoyéticas de la sangre de cordón umbilical en presencia de citocinas introducidas *in vitro* por vía exógena. Ohlsson et al., *Experimental and Molecular Pathology.* 75: 248-255 (2003) describen la reducción del crecimiento de las células de carcinoma de colon de rata en una matriz de gelatina cuando se cocultivan *in vitro* con una línea de células progenitoras mesenquimatosas inmortalizadas procedentes de la médula ósea de rata y, a continuación, se inyectan en las ratas. Studeny et al. *Journal of the National Cancer Institute,* 96 (21): 1593-1603 (2004) describen que las células madre mesenquimatosas de la médula ósea serían un posible vehículo para la introducción de productos transgénicos terapéuticos en los tumores xenoinjertados en ratones inmunodeficientes. Ninguno de estos documentos describe ni sugiere la invención reivindicada.

Hasta la fecha, sin embargo, nadie ha descrito que las células madres procedentes de la placenta tienen la capacidad de suprimir el crecimiento tumoral o de suprimir la proliferación de células tumorales. La presente invención da a conocer tal uso para las células madre de placenta y las poblaciones de las mismas.

3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere a células madre de placenta para el uso en un procedimiento para el tratamiento de un individuo que tiene células tumorales, en donde dichas células madre de placenta suprimen la proliferación de dichas células tumorales cuando se ponen en contacto con dichas células tumorales y en donde dichas células madre de placenta: expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para suprimir la proliferación de una gran

cantidad de células tumorales que comprenden poner en contacto dicha gran cantidad de células tumorales con las células madre de placenta durante un tiempo suficiente para que dichas células madre de placenta supriman la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con la gran cantidad de dichas células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta, y en donde dichas células madre de placenta: expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G.

La presente invención da a conocer procedimientos *in vitro* para suprimir la proliferación de células tumorales, y el crecimiento tumoral, con el uso de las células madre de placenta de la invención. También se describen en la presente memoria poblaciones de células madre de placenta y composiciones que comprenden células madre de placenta. También se describen en la presente memoria composiciones, incluidas las composiciones que comprenden células madre de placenta, que tienen propiedades supresoras de la proliferación de células tumorales. También se describen en la presente memoria poblaciones de células de placenta seleccionadas basándose en su capacidad para suprimir la proliferación de células tumorales, y composiciones que tienen tales propiedades.

En un aspecto, la invención da a conocer un procedimiento *in vitro* para suprimir la proliferación de una gran cantidad de células tumorales que comprende poner en contacto dicha gran cantidad de células tumorales con las células madre de placenta de la invención durante un tiempo suficiente para que dichas células madre de placenta supriman la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta de la invención. En una realización específica, dichas células tumorales son parte de un tumor macizo. En otra realización específica, dichas células tumorales son un tipo de células de tumores que no son macizos. En otra realización específica, dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, leucemia aguda de linfocitos T, leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón. En otra realización específica del procedimiento, dicho contacto se realiza *in vitro*. En otra realización específica, dicho contacto se realiza en un individuo *in vivo*. El individuo puede ser un mamífero, p. ej., un humano. En una realización, dichas células madre de placenta tienen un sistema histocompatible con dicho individuo. En otra realización, dichas células madre de placenta no tienen un sistema histocompatible con dicho individuo. En otra realización más específica, dicho contacto comprende administrar dichas células de placenta a dicho individuo por vía intravenosa. En otra realización más específica, dicho contacto comprende la administración de dichas células de placenta a dicho individuo en el sitio de un tumor o adyacentes a dicho sitio. En las realizaciones específicas, dichas células madre de placenta: expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G. En un aspecto descrito en la presente memoria, las células madre de placenta expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de placenta que comprende la célula madre, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; y/o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de placenta que comprende la célula madre, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

En otra realización específica, al menos una porción de dicha gran cantidad de células madre de placenta están manipuladas genéticamente para que expresen una citocina. En una realización más específica, dicha citocina es el IFN- β o la IL-2.

En otra realización específica, el procedimiento comprende adicionalmente poner en contacto dichas células tumorales con uno o varios compuestos contra el cáncer. En otra realización específica, el procedimiento comprende adicionalmente poner en contacto dichas células tumorales con una gran cantidad de células madre mesenquimatosas, p. ej., células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea. En otra realización específica, el procedimiento comprende adicionalmente poner en contacto dichas células tumorales con una gran cantidad de células de fibroblastos.

En otra realización específica, el procedimiento comprende adicionalmente poner en contacto dichas células tumorales con una o varias quimiotaxinas para células madre. En una realización más específica, dicha quimiotaxina es el factor 1 procedente del estroma (SDF-1, por su nombre en inglés).

El procedimiento puede emplear tantas células madre de placenta como sean necesarias para efectuar una supresión detectable de la proliferación de células tumorales o del crecimiento de un tumor, p. ej., en un individuo. Por ejemplo, la gran cantidad de células madre placentarias utilizadas para ponerse en contacto con la gran cantidad de células tumorales puede comprender aproximadamente 1×10^5 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^6 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^7 células madre de placenta o aproximadamente 1×10^8 células madre de placenta, o más. En otras realizaciones más específicas, el procedimiento comprende administrar al menos aproximadamente 1×10^5 , al menos aproximadamente 1×10^6 , al menos aproximadamente 1×10^7 o al menos aproximadamente 1×10^8 células madre de placenta a dicho individuo. En otras realizaciones más específicas, el procedimiento comprende administrar un número de células madre de placenta aproximadamente una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o más de cinco veces el número de células tumorales en un individuo. Cualquier procedimiento conocido en la técnica puede utilizarse para determinar el número de células tumorales en un individuo. Los procedimientos de ejemplo de cuantificación de células tumorales se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 6.365.362 y 6.645.731; en Méhes et al., *Haematologia* 31 (2): 97-109 (2001); y en

- Hardingham et al., *Cancer Research* 53: 3455-3458 (1993). En otras realizaciones más específicas, el procedimiento comprende administrar un número de células madre de placenta basándose en el peso del individuo. Por ejemplo, el procedimiento comprende administrar aproximadamente 1×10^3 células madre de placenta/kg, 5×10^3 células madre de placenta/kg, 1×10^4 células madre de placenta/kg, 5×10^4 células madre de placenta/kg, 1×10^5 células madre de placenta/kg, 5×10^5 células madre de placenta/kg, 1×10^6 células madre de placenta/kg, 5×10^6 células madre de placenta/kg, 1×10^7 células madre de placenta/kg, 5×10^7 células madre de placenta/kg o 1×10^8 células madre de placenta/kg a dicho individuo. En otras realizaciones más específicas, el procedimiento comprende administrar al menos 1×10^3 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^3 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 1×10^4 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^4 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 1×10^5 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^5 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 1×10^6 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^6 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 1×10^7 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^7 células madre de placenta/kg o al menos aproximadamente 1×10^8 células madre de placenta/kg a dicho individuo.
- En otras realizaciones más específicas diferentes, se ha hecho que dichas células madre de placenta proliferen *in vitro* durante no más de 30 duplicaciones de población, no más de 20 duplicaciones de población, no más de 10 duplicaciones de población o no más de 5 duplicaciones de población. En otra realización específica, dichas células madre de placenta estaban criopreservadas y se han descongelado antes de dicha puesta en contacto. En realizaciones más específicas del procedimiento, está confirmado que dichas células madre de placenta suprimen *in vitro* la proliferación de células tumorales, hasta, p. ej., al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% en comparación con la proliferación de un número equivalente de células tumorales en ausencia de dichas células madre de placenta.
- En otra realización específica, el procedimiento comprende adicionalmente la determinación de que dichas células madre de placenta tienen actividad supresora del crecimiento de células tumorales antes de la administración de dichas células madre de placenta a dicho individuo, p. ej., con la criba de dichas células madre de placenta por la detección de la supresión de la proliferación de células tumorales de muestras representativas. En realizaciones más específicas del procedimiento, se confirma que dichas células madre de placenta suprimen la proliferación *in vitro* de células tumorales hasta, p. ej., al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% en comparación con la proliferación de un número equivalente de células tumorales en ausencia de dichas células madre de placenta, antes de la administración a dicho individuo. En algunas realizaciones, las células madre de placenta, antes de la administración a un individuo que comprende células tumorales, se determina que suprimen la proliferación de células tumorales mediante el contacto directo, mediante el contacto indirecto (p. ej., a través de factores solubles) o ambos. Por ejemplo, en una realización del procedimiento, dichas células madre de placenta se determina que suprimen la proliferación *in vitro* de células tumorales hasta, p. ej., al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% en un ensayo de cultivo directo en, p. ej., un ensayo Transwell®, o más preferiblemente, tanto con un ensayo de cultivo directo como con un ensayo Transwell®, antes de la administración a dicho individuo. En otra realización, dichas células madre de placenta se escrutan *in vitro* por la supresión de la proliferación de células tumorales, o del crecimiento tumoral, frente a una célula tumoral que comparte el mismo tipo celular, p. ej., epitelial, escamoso, etc., el mismo origen del tejido, p. ej., mama, próstata, etc., o más preferiblemente, tanto el mismo tipo de célula como el mismo origen de tejido, que una célula tumoral que es endógena al individuo que recibirá dichas células madre de placenta de acuerdo con el procedimiento. En otra realización, dichas células madre de placenta se escrutan *in vitro* en busca de la actividad supresora del crecimiento del tumor frente a las células tumorales obtenidas de una biopsia de dicho individuo, o purificadas o aisladas de una muestra de sangre de dicho individuo. En una realización del procedimiento, dichas células madre de placenta pueden proceder de amnios, corion, placa amniocoriónica, cordón umbilical o perfundido y está confirmado que suprimen la proliferación *in vitro* de células tumorales mediante, p. ej., al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% en comparación con la proliferación de un número equivalente de células tumorales en ausencia de dichas células madre de placenta, antes de la administración a dicho individuo.
- En la presente memoria se describe un procedimiento para suprimir el crecimiento o la proliferación de una gran cantidad de células tumorales, p. ej., células de neoplasia hemática, que comprende poner en contacto dicha gran cantidad de células tumorales con una composición que comprende medio de cultivo acondicionado o un sobrenadante de un cultivo de una gran cantidad de células madre de placenta durante un tiempo suficiente para que dicho medio de cultivo acondicionado o sobrenadante suprima de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con dicho medio de cultivo acondicionado o sobrenadante. En un aspecto, dicho contacto se lleva a cabo *in vitro*. En un aspecto, dicho contacto se lleva a cabo *in vivo*. En un aspecto, dicho medio de cultivo acondicionado o sobrenadante se obtiene de una gran cantidad de células madre de placenta que se cocultivan con una gran cantidad de células tumorales.
- En algunos aspectos, dicho medio de cultivo acondicionado o sobrenadante se obtiene de una gran cantidad de células madre de placenta cocultivadas con una gran cantidad de células tumorales en una proporción de aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1 o aproximadamente 5:1 células madre de placenta por célula tumoral. El procedimiento puede emplear medio de cultivo acondicionado o sobrenadante de tantas células madre de placenta, solas o cocultivadas con una gran cantidad de células tumorales,

como sean necesarias para efectuar una supresión detectable de la proliferación de células tumorales o del crecimiento de un tumor. Por ejemplo, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante se puede obtener de un cultivo que comprende aproximadamente 1×10^5 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^6 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^7 células madre de placenta o aproximadamente 1×10^8 células madre de placenta, o más. En otra realización específica, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante se puede obtener de un cocultivo que comprende aproximadamente de 1×10^5 a aproximadamente 5×10^5 células madre de placenta y aproximadamente 1×10^5 células tumorales; aproximadamente de 1×10^6 a aproximadamente 5×10^6 células madre de placenta y aproximadamente 1×10^6 células tumorales; aproximadamente de 1×10^7 a aproximadamente 5×10^7 células madre de placenta y aproximadamente 1×10^7 células tumorales; o aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 5×10^8 células madre de placenta y aproximadamente 1×10^8 células tumorales.

En otro aspecto del procedimiento para suprimir el crecimiento o proliferación de células tumorales, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante es un medio de cultivo o sobrenadante obtenidos de un cultivo que comprende un número de células madre de placenta, solas o cocultivadas con células tumorales, en donde el número de células que produce el medio acondicionado se basa en el peso de un individuo al cual se administra el medio acondicionado. Por ejemplo, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante puede ser medio acondicionado o sobrenadante producido por un cultivo que comprende aproximadamente 1×10^3 células madre de placenta por kilogramo de masa corporal de un paciente, 5×10^3 células madre de placenta/kg, 1×10^4 células madre de placenta/kg, 5×10^4 células madre de placenta/kg, 1×10^5 células madre de placenta/kg, 5×10^5 células madre de placenta/kg, 1×10^6 células madre de placenta/kg, 5×10^6 células madre de placenta/kg, 1×10^7 células madre de placenta/kg, 5×10^7 células madre de placenta/kg o 1×10^8 células madre de placenta/kg. En otro aspecto, el medio de cultivo acondicionado o sobrenadante es medio de cultivo o sobrenadante de un cocultivo que comprende de aproximadamente de 1×10^3 a aproximadamente 5×10^3 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^3 células tumorales/kg; de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 5×10^4 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^4 células tumorales/kg; de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^5 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^5 células tumorales/kg; de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 5×10^6 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^6 células tumorales/kg; de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^7 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^7 células tumorales/kg; o de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 5×10^8 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^8 células tumorales/kg.

Además se describen en la presente memoria procedimientos para producir poblaciones de células que comprenden células madre de placenta seleccionadas basándose en su capacidad para suprimir la proliferación de una célula tumoral o una población de células tumorales, o el crecimiento de un tumor. En un aspecto, por ejemplo, se describe en la presente memoria un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta, en donde dichas células madre de placenta (a) se adhieren a un sustrato; (b) expresan CD200 y HLA-G; o expresan CD73, CD105 y CD200; o expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G; o expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de una célula tumoral o de una gran cantidad de células tumorales, o el crecimiento de un tumor; y el aislamiento de dichas células madre de placenta de otras células para formar una población de células.

En un aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células aisladas que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de células tumorales, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de la leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón; y el aislamiento de dichas células madre de placenta de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el procedimiento comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y CD200, y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de células tumorales, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón; y el aislamiento de dichas células madre de placenta de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el procedimiento comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y OCT-4; y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de células tumorales, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón; y el aislamiento de dichas células madre de placenta de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el procedimiento comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, (c) forman cuerpos de

5 tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide; y (d) suprimen de forma detectable la proliferación de células tumorales, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón; y el aislamiento de dichas células madre de placenta de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el procedimiento comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G; y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de células tumorales, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón; y el aislamiento de dichas células madre de placenta de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el procedimiento comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4; (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y (d) suprimen de forma detectable la proliferación de células tumorales, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón; y el aislamiento de dichas células madre de placenta de otras células para formar una población de células. En un aspecto más específico de los procedimientos anteriores, dichas células madre de placenta proceden principalmente de amnios, corion, amnios y corion, o cordón umbilical. En otro aspecto más específico, las células madre utilizadas en los procedimientos son células madre de cordón umbilical.

25 En los procedimientos anteriores para la producción de poblaciones aisladas de células madre de la placenta, en un aspecto, los procedimientos pueden comprender la selección de células que muestran al menos una característica específica de una célula madre mesenquimatosa. En un aspecto, dicha característica específica de una célula madre mesenquimatosa es la expresión de CD29, la expresión de CD44, la expresión de CD90 o la expresión de una combinación de lo anterior. En otro aspecto de los procedimientos, dicha selección se lleva a cabo con un anticuerpo. En otra realización específica, dicha selección se lleva a cabo por citometría de flujo. En otro aspecto, dicha selección se lleva a cabo con perlas magnéticas. En otro aspecto, dicha selección se lleva a cabo mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia. En otro aspecto de los procedimientos anteriores, se expande dicha población de células.

30 En la presente memoria se describen poblaciones aisladas de células madre de placenta producidas o seleccionadas, p. ej., de acuerdo con cualquiera de los procedimientos anteriores. En un aspecto, por ejemplo, se describe en la presente memoria una población de células aisladas que comprende células madre de placenta, en donde dichas células madre de placenta: (a) se adhieren a un sustrato; (b) expresan CD200 y HLA-G o expresan CD73, CD105 y CD200 o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide; y (c) se ha detectado que suprimen de forma detectable la proliferación de una gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta.

45 En un aspecto, la población de células de la placenta aisladas comprende células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G y (c) se ha determinado que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón. En otro aspecto, la población de células de la placenta aisladas comprende células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y CD200, y (c) se han determinado que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón. En otro aspecto, la población de células de la placenta aisladas comprende células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y OCT-4 y (c) se ha determinado que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entra en contacto con las células madre de placenta, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón.

60 En otro aspecto, la población de células de la placenta aisladas comprende células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las

condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y (d) se ha determinado que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón. En otro aspecto, la población de células de la placenta aisladas comprende células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G y (c) se ha determinado que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con células madre de placenta, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón. Aún en otro aspecto, la población de células madre de placenta aisladas comprende células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y (d) se ha determinado que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con células madre de placenta, en donde dichas células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón.

Se describen también en la presente memoria composiciones que comprenden cualquiera de las poblaciones de células madre de placenta aisladas que se describen más arriba. En un aspecto, la composición también comprende una gran cantidad de células que no son de placenta, p. ej., células madre que no son de placenta, p. ej., células madre mesenquimatosas, p. ej., células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea. En un aspecto, la composición también comprende una gran cantidad de fibroblastos. En algunos aspectos, los fibroblastos son autólogos al sujeto al cual se le administra una composición de células madre de placenta descrita en la presente memoria.

En los procedimientos anteriores, las composiciones y poblaciones de células madre de la placenta aisladas, las células madre de placenta se pueden definir o seleccionar basándose en otros marcadores. Por ejemplo, dichas células madre de placenta que expresan CD200 y HLA-G también expresan CD73 y CD105, es decir, son CD73⁺ y C105⁺. En otro aspecto, dichas células de placenta son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dicha gran cantidad de células madre de placenta facilita el desarrollo de uno o más cuerpos de tipo embrioide de una población de células de la placenta aisladas que comprenden las células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otro aspecto, dichas células madre de placenta que expresan CD73, CD105 y CD200 son también HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto más, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ y HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células madre de placenta facilitan el desarrollo de uno o varios cuerpos de tipo embrioide a partir de una población de células de la placenta aisladas que comprenden las células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otro aspecto, dichas células madre de placenta que expresan CD200 y OCT-4 también expresan CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células madre de placenta facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide a partir de una población de células de la placenta aisladas que comprenden células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otra realización, dichas células madre de placenta que expresan CD73, CD105 y HLA-G son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En un aspecto, dichas células madre de placenta son OCT-4⁺. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD200⁺. En otra realización, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺. En algunos aspectos, dichas células madre facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide a partir de una población de células de la placenta aisladas que comprenden las células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En un aspecto, dichas células madre de placenta que expresan CD73 y CD105, y que facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son OCT-4⁺. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD200⁺. En otra realización específica, dichas células madre de placenta son OCT-4⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.

En un aspecto, dichas células madre de placenta que expresan OCT-4, y que facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, son también CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización, dichas células madre de placenta son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre de placenta son CD200⁺. En otra realización específica, dichas células madre de placenta son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.

Las células madre de placenta utilizadas en los procedimientos, poblaciones aisladas y composiciones dentro de la presente memoria pueden proceder de placenta entera o de alguna parte de la placenta. Por ejemplo, en diferentes realizaciones, dichas células madre de placenta proceden principalmente, o sólo, de amnios, o de amnios y corion. En otra realización, las células madre utilizadas en los procedimientos de la invención se obtienen del cordón umbilical.

En la presente memoria se describen poblaciones de células aisladas que comprenden células madre de placenta producidas por alguno de los procedimientos descritos en la presente memoria para seleccionar poblaciones de células de la placenta supresoras de células tumorales. Por ejemplo, en un aspecto, en la presente memoria se describe una población de células que comprende células madre de la placenta aisladas, en donde dichas células madre de placenta: (a) se adhieren a un sustrato; (b) expresan CD200 y HLA-G o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células de placenta que comprende células madre de placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células de la placenta que comprenden células madre de placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide; y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de una célula tumoral o una gran cantidad de células tumorales, o el crecimiento de un tumor.

Además se describen en la presente memoria poblaciones de células madre crioconservadas, p. ej., una población de células que comprende células madre de placenta, en donde la población de células es supresora de células tumorales, que se describen en la presente memoria. Por ejemplo, la invención da a conocer una población de células madre de placenta CD200⁺, HLA-G⁺ que suprimen la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención, en donde dichas células se han crioconservado y en donde dicha población está contenida dentro de un envase. La invención también da a conocer una población de células madre de placenta CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención, en donde dichas células madre están crioconservadas, y en donde dicha población está contenida dentro de un envase. La invención también da a conocer una población de células madre de placenta OCT-4⁺, CD200⁺ que suprime de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención, en donde dichas células madre están crioconservadas, y en donde dicha población está contenida dentro de un envase. También se describe en la presente memoria una población de células madre de placenta CD73⁺, CD105⁺ que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta, en donde dichas células están crioconservadas, y en donde dicha población está contenida dentro de un envase, y en donde dichas células madre facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan con una población de células de la placenta en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. La invención además da a conocer una población de células madre de placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención, en donde dichas células se han crioconservado, y en donde dicha población está contenida dentro de un envase. Se describe en la presente memoria una población de células madre de placenta OCT-4⁺ que suprimen de forma detectable la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no entran en contacto con las células madre de placenta, en donde dichas células están crioconservadas, en donde dicha población está contenida dentro de un envase, y en donde dichas células madre facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan con una población de células de la placenta en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En una realización de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dicho envase es una bolsa. En diferentes realizaciones, dicha población comprende aproximadamente, al menos, o como máximo 1×10^5 células madre que se acaban de mencionar, 5×10^6 células madre que se acaban de mencionar, 1×10^7 células madre que se acaban de mencionar, 5×10^7 células madre que se acaban de mencionar, 1×10^8 células madre que se acaban de mencionar, 5×10^8 células madre que se acaban de mencionar, 1×10^9 células madre que se acaban de mencionar, 5×10^9 células madre que se acaban de mencionar o 1×10^{10} células madre que se acaban de mencionar. En otras realizaciones de alguna de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células madre han recibido aproximadamente, al menos, o no más de 5 pases, no más de 10 pases, no más de 15 pases o no más de 20 pases. En otra realización de alguna de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células madre se

han expandido dentro de dicho envase.

En la presente memoria se describen además composiciones supresoras de células tumorales, es decir, composiciones que suprimen de forma detectable la proliferación de una célula tumoral o una población de células tumorales, o suprimen el crecimiento de un tumor. En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición que comprende un sobrenadante de un cultivo de alguna de las poblaciones de células de la placenta aisladas que se describen en la presente memoria. En otro aspecto, se describe en la presente memoria una composición que comprende medio de cultivo de un cultivo de células madre de la placenta aisladas, en donde dichas células de la placenta (a) se adhieren a un sustrato; (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprenden las células madre de placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende las células madre de placenta, donde dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode, y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de una célula tumoral o población de células tumorales, o el crecimiento de un tumor, en donde dicho cultivo de células madre de placenta se ha cultivado en dicho medio durante 24 horas o más.

En otro aspecto, cualquiera de las composiciones anteriores comprende una matriz. En un determinado aspecto, dicha matriz es un armazón tridimensional. En otro aspecto, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina o vitronectina. En otro aspecto, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial procedente de la membrana amniótica. En otro aspecto, dicha matriz comprende una proteína membranaria extracelular. En otro aspecto, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otro aspecto, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otro aspecto, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, citocina, anticuerpo o molécula orgánica de menos de 5000 Da.

También se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden células madre de placenta que se han manipulado genéticamente para que produzcan citocinas exógenas o recombinantes asociadas a la supresión tumoral. Por ejemplo, en una realización, un compuesto farmacéutico comprende una gran cantidad de células madre de placenta, en donde dichas células madre de placenta se han manipulado genéticamente para que expresen el IFN- β o la IL-2 exógenos. En una realización, dichas células madre de placenta expresan el IFN- β o la IL-2 exógenos en una cantidad que da lugar a una mayor supresión, de forma detectable, de la proliferación de las células tumorales, cuando dichas células tumorales se ponen en contacto con dichas células madre de placenta, en comparación con las células madre de placenta que no expresan el IFN- β ni la IL-2 exógenos. En las realizaciones más específicas, dichas células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G; y (c) suprimen la proliferación de una célula tumoral o de una gran cantidad de células tumorales, o el crecimiento de un tumor. En un aspecto, las células madre de placenta expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende la célula madre, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode, o expresan OCT-4, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende la célula madre, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de una célula tumoral o una gran cantidad de células tumorales, o el crecimiento de un tumor.

3.1 Definiciones

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «aproximadamente» denota, p. ej., una desviación de \pm 10% de un valor indicado.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «SH2» se refiere a un anticuerpo que se fija a un epítipo sobre el marcador CD105. Así pues, las células que se denominan SH2⁺ son CD105⁺. Véase, p. ej., la patente de los EE.UU. n.º 5.486.359.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «SH3» y «SH4» se refiere a anticuerpos que se fijan a epítipos presentes en el marcador CD73. Así pues, las células que se denominan SH3⁺ y/o SH4⁺ son CD73⁺. Véase, p. ej., la patente de los EE.UU. n.º 5.486.359.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «célula madre aislada» significa una célula madre que está sustancialmente separada de otra célula del tejido que no es célula madre, p. ej., placenta, a partir del cual se obtiene la célula madre. Una célula madre está «aislada» si se retiran de la célula madre al menos el 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o al menos el 99% de las células que no son madre con las cuales está la célula asociada de forma natural, p. ej., durante la recogida y/o cultivo de la célula madre.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «población aislada de células» significa una población de células que está sustancialmente separada de otras células del tejido, p. ej., placenta, del cual procede la población de células. Una célula madre está «aislada» si se retira de la célula madre al menos el 50%, 60%, 70%,

75%, 80%, 90%, 95% o al menos el 99% de las células con la cual la población de células, o las células de las que la población de células procede, está asociada de forma natural, p. ej., durante la recogida y/o cultivo de la célula madre.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «célula madre de placenta» se refiere a una célula madre, o célula progenitora, que procede de una placenta de mamífero, independientemente de su forma, de los marcadores de la superficie celular o del número de pases tras un cultivo primario, que se adhiere a un sustrato de cultivo de tejidos (p. ej., plástico para cultivo de tejidos o una placa de cultivo de tejidos revestida con fibronectina). La terminología «célula madre de placenta» abarca las células madre o las células progenitoras procedentes de cualquier porción de una placenta de mamífero, que incluye amnios, corion, placa amniocoriónica, y/o el cordón umbilical, así como las células procedentes de la perfusión de la placenta. La terminología «célula madre de placenta» tal y como se utiliza en la presente memoria, sin embargo, no se refiere a un trofoblasto ni a una célula obtenida de la sangre del cordón umbilical. Se considera que una célula es una «célula madre» si la célula conserva al menos un atributo de una célula madre, p. ej., la capacidad para diferenciarse en al menos otro tipo de célula.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, una célula madre es «positiva» para un marcador particular cuando ese marcador es detectable. Por ejemplo, una célula madre de placenta es positiva para, p. ej., CD73 (es decir, es CD73⁺) porque CD73 es detectable en las células madre de placenta en una cantidad que es detectablemente mayor que el ruido de fondo (en comparación con, p. ej., un control de isotipo). Una célula es también positiva para un marcador cuando dicho marcador se puede utilizar para diferenciar la célula de al menos otro tipo de célula, o se puede utilizar para seleccionar o aislar la célula cuando está presente en la célula o ésta la expresa.

20 Una «célula tumoral» en el contexto de este procedimiento significa cualquier célula que muestra un perfil de crecimiento anormal, e incluye células benignas, pero hiperplásicas, células cancerosas, células metastásicas y similares. Una «célula tumoral» puede ser, p. ej., una célula de un tumor macizo, o una célula que tiene el potencial o la capacidad de formar un tumor macizo, o una célula de un tumor que no es macizo, p. ej., la célula de una neoplasia hemática. En algunas realizaciones, la célula tumoral procede de una célula con un origen epitelial, glandular o hematopoyético. En algunas realizaciones, las células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón.

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «suprime la proliferación de una célula tumoral o de una gran cantidad de células tumorales» significa que reduce la cantidad de proliferación de una célula tumoral o de una gran cantidad de células tumorales en comparación con un control o estándar. Por ejemplo, la proliferación de una célula tumoral o de una gran cantidad de células tumorales en presencia de, p. ej., una gran cantidad de células madre de placenta, se compara con la proliferación del mismo tipo de células tumorales o de gran cantidad de células tumorales en ausencia de las células madre de placenta. La terminología abarca una reducción detectable de la proliferación de las células tumorales o de una gran cantidad de células tumorales, un cese de la proliferación o una reducción del número de células tumorales.

4. Breve descripción de las figuras

Figura 1: viabilidad de las células madre de placenta obtenidas de perfusión (A), amnios (B), corion (C) o placa amniocoriónica (D); o células madre de cordón umbilical (E). Los números en el eje X se refieren a la placenta de la cual se obtienen las células madre.

40 Figura 2: porcentaje de células HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ obtenidas de perfusión (A), amnios (B), corion (C), placa amniocoriónica (D) o cordón umbilical (E) que se determinó mediante FACS Calibur. Los números en el eje X se refieren a la placenta de la cual se obtienen las células madre.

45 Figura 3: porcentaje de células HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ obtenidas de perfusión (A), amnios (B), corion (C), placa amniocoriónica (D) o cordón umbilical (E), según se determinó mediante FACS Aria. Los números en el eje X se refieren a la placenta de la cual se obtienen las células madre.

Figura 4: expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en las células madre procedentes de perfundido de la placenta.

Figura 5: expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en las células madre procedentes del amnios.

50 Figura 6: expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en las células madre procedentes del corion.

Figura 7: expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en las células madre procedentes de la placa amniocoriónica.

55 Figura 8: expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en las células madre procedentes del cordón umbilical.

Figura 9: promedio de la expresión de HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 en las células madre procedentes de perfusión (A), amnios (B), corion (C), placa amniocoriónica (D) o cordón umbilical (E).

5 Figura 10: las células madre de placenta y las células madre de cordón umbilical inhiben el crecimiento de las células tumorales de la línea de células linfoblastoides (LCL). Las LCL se cultivaron solas, o con células madre de placenta de la placa amniocoriónica (AC) o de membrana amniótica (MA), o con células madre de cordón umbilical (CU), durante 17 días. La proporción de las células madre de placenta por LCL fue de 2:1. Se contaron las células grandes AAD⁻ (n = 3 para CU).

10 Figura 11: las células madre de placenta acaban con las células tumorales de forma tan eficaz como lo hacen las células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea (CMM-MO). Se muestra un cocultivo de 6 días de LCL con CMM-MO o bien con células madre de cordón umbilical (CU) (n = 1).

15 Figura 12: dependencia de la dosis para la supresión del tumor que presentan las células madre de placenta. Las células de carcinoma histiocítico, de leucemia mielógena crónica (LMC), de carcinoma de mama, de leucemia linfocítica aguda (LLA) y de carcinoma de colon se incubaron solas o con células madre de placenta en proporciones de 1:2, 1:1, 1,5:1 y 2:1. Tras el cocultivo se determinó el número de células vivas 7-AAD⁻. A continuación, se calculó la supresión de las células madre de placenta sobre los cultivos que crecen con libertad. Los números absolutos de células tumorales que crecen en libertad se dan entre paréntesis después de la descripción de cada línea celular en la leyenda (los números indican 10⁵ células). N = 2, excepto para LCL, donde n = 4.

20 Las figuras 13A y 13B: supresión y dependencia del contacto para la supresión tumoral producida por las células madre de placenta. A: En Transwell[®] (barras negras) o en pocillos abiertos (A, barras huecas), las células de carcinoma histiocítico, de leucemia mielógena crónica, de carcinoma canalicular de la mama, de LCL, de retinoblastoma, de carcinoma de pulmón, de carcinoma de mama y de LLA se incubaron solas o con células madre de placenta a una proporción de 1:1. Después de seis días se contaron las células vivas 7-AAD⁻ y se calculó la supresión basándose en el número de células en el cultivo en crecimiento libre (B, inserciones numeradas). B: la dependencia del contacto se calculó a partir de los datos de la supresión. Transwell[®]: n = 1, excepto LCL n = 2.

25 Figura 14: citocinas muy expresadas en los sobrenadantes de los experimentos cuyos resultados se muestran en las figuras 13A y 13B. Entre las 25 citocinas analizadas, IL-6, IL-8 y MCP-1 se muestran para el LCL y el linfoma histiocítico. Compárense las figuras 15A y 15B.

30 Figuras 15A y 15B: perfil de la secreción de citocinas de un cocultivo de células madre de placenta y LCL. A: se cultivaron las LCL solas o con células madre de placenta en pocillos abiertos (LCL PDAC) o en Transwell[®] (LCL PDAC TW). Se contaron las células CD23⁺ vivas en un citómetro de flujo. B: los sobrenadantes del experimento en A se analizaron en el Luminex. N = 2.

35 Figuras 16A y 16B: A: supresión de las líneas de células tumorales debida a las células madre de placenta y a las células madre mesenquimatosas de la médula ósea (CMM-MO). Las células de la línea celular de la leucemia megacariocítica MEG-01, de linfoma histiocítico, de retinoblastoma y de leucemia mielógena crónica se incubaron solas o con células madre de cordón umbilical (CU), células madre amniocoriónicas de placenta (AC) o CMM-MO. Después de un cocultivo de seis días, se determinó el número de células vivas AAD⁻ para cada cocultivo. B: Cinética temporal de la supresión de células tumorales debida a las células madre de placenta. Las células MEG-01 se incubaron solas, o se cocultivaron con células endoteliales de la vena umbilical humana (CEVUH), CMM-MO o células madre de placenta (PDAC). El número de células vivas (anexina V⁻, 7-AAD⁻) se determinó para cada cultivo a los 1, 2, 3, 4, y 6 días del inicio del cocultivo.

40 Figura 17: dependencia del contacto para la supresión tumoral de las células MEG-01 debida a las células madre de placenta. Los medios acondicionados para cocultivo de células madre del cordón umbilical y MEG-01 inhiben el crecimiento de las células tumorales de la línea celular de leucemia megacariocítica (MEG-01). Las células MEG-01 se cultivaron bien solas, o bien directamente se cocultivaron con células madre de cordón umbilical (MEG/CU) o bien se cultivaron en medios acondicionados (división 1:2 o 1:10) recogidos de cocultivos de células madre de cordón umbilical (CU)/MEG-01 suprimidas, cocultivos de células madre mesenquimatosas de la médula ósea (MO)/MEG-01 o cocultivos de MEG-01/CEVUH (H). Tras seis días de cocultivo, se determinó el número de células vivas (anexina V⁻, 7-AAD⁻).

45 Figura 18: perfil de secreción de citocinas en el cocultivo de células madre de placenta y MEG-01. Las MEG-01, las células madre de placenta (PDAC), las CMM-MO y las CEVUH se cultivaron solas, o se cocultivaron en las combinaciones siguientes: MEG-01/CEVUH; MEG-01/CMM-MO o MEG-01/PDAC. Los sobrenadantes de cultivos de 7 días se recogieron y analizaron en el Luminex para detectar la secreción del factor de crecimiento AA derivado de las plaquetas (PDGF-AA, por su nombre en inglés), factor estimulador de las colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, por su nombre en inglés), el oncogén α relacionado con el crecimiento (GRO α , por su nombre en inglés) y del factor inhibidor de la leucemia (LIF, por su nombre en inglés). Las cantidades se muestran en pg/ml.

55 Figura 19: migración de las células madre de cordón umbilical (CU1) en respuesta al factor 1 derivado de las células del estroma (SDF-1, por su nombre en inglés). Las células madre de placenta de CU1 se incubaron durante 24

horas sólo en medio libre de suero (basal), o en medio con STF al 10%, SDF-1, o SDF-1 más AMD3100, el inhibidor de CXCR4. Tras añadir el colorante CYQUANT® GR a las células, se midió la fluorescencia con un lector de placas de fluorescencia a 480 nm/520 nm.

5. Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a células madre de placenta para el uso en un procedimiento para el tratamiento de un individuo que tiene células tumorales, en donde dichas células madre de placenta suprimen la proliferación de dichas células tumorales cuando se ponen en contacto con dichas células tumorales, y en donde dichas células madre de placenta: expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G.

10 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para suprimir la proliferación de una gran cantidad de células tumorales que comprende poner en contacto dicha gran cantidad de células tumorales con las células madre de placenta durante un tiempo suficiente para que dichas células madre de placenta supriman la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de dichas células tumorales que no se han puesto en contacto con las células madre de placenta, y en donde dichas células madre de placenta: expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105, y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G.

5.1. Supresión de células tumorales mediante las células madre de placenta

La presente invención da a conocer la supresión de la proliferación de células tumorales, y la supresión del crecimiento tumoral, mediante el uso de células madre de placenta. En una realización, la invención da a conocer un procedimiento *in vitro* para suprimir la proliferación de una célula tumoral o de una gran cantidad de células tumorales, o el crecimiento de un tumor, o la proliferación de una célula de tumor que no es macizo o una gran cantidad de células de tumor que no es macizo, que comprende poner en contacto la célula o células tumorales, o el tumor, con las células madre de placenta de acuerdo con la presente invención durante un tiempo suficiente para que dichas células madre de placenta supriman de forma detectable la proliferación de la célula o células tumorales, o el crecimiento del tumor.

Las células madre de placenta son, p. ej., las células madre de placenta descritas en otra parte de la presente memoria (véase el apartado 5.2). Las células madre de placenta utilizadas para la supresión de células tumorales pueden proceder u obtenerse de una única placenta o de varias placentas. Las células madre de placenta utilizadas para la supresión de células tumorales pueden proceder también de una única especie, p. ej., la especie del organismo que va a recibirlas o la especie de células tumorales cuya función se ha de reducir o suprimir, o puede proceder de varias especies. Las células madre de placenta pueden proceder de la placenta completa, o de cualquier porción de la misma, por ejemplo, el amnios, el corion, la placa amniocoriónica o el cordón umbilical. Las células madre de placenta procedentes de cualquier porción de la placenta pueden utilizarse en los procedimientos de la invención. Las células madre de placenta pueden recogerse de la placenta, o de una porción de la misma, mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, p. ej., perfusión o digestión enzimática.

Una célula tumoral puede ser cualquier célula que presente un crecimiento o proliferación celular neoplásico, bien sea maligno o benigno, e incluye células precancerosas así como células cancerosas. Ejemplos de células tumorales incluyen, pero sin limitarse a ellas, células de carcinoma, células de linfoma, células de blastoma, células de sarcoma y células de leucemia. Ejemplos más particulares de células tumorales incluyen células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer de colon, células de cáncer de células escamosas, células de cáncer microcítico de pulmón, células de cáncer no microcítico de pulmón, células de cáncer digestivo, células de cáncer de páncreas, glioblastoma, células de cáncer cervical, células de cáncer de ovario, células de cáncer de hígado, células de cáncer de vejiga, células de hepatoma, células de cáncer colorrectal, células de carcinoma de endometrio, células de carcinoma de glándula salival, células de cáncer de riñón, células de cáncer de hígado, células de cáncer de vulva, células de cáncer de tiroides, células de carcinoma hepático y diferentes tipos de células de cáncer de cabeza y cuello. En realizaciones específicas, las células tumorales son células de linfoma megacarioblástico, células de leucemia aguda linfoblástica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena aguda de la médula ósea, células de leucemia mielógena crónica, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón.

La presencia de células tumorales en un individuo puede determinarse al realizar una biopsia en un tejido que se sospecha que es canceroso, o puede determinarse de muestras de líquidos corporales, p. ej., de las células purificadas o aisladas de una muestra de sangre. A continuación, las células o tejidos cancerosos se pueden caracterizar mediante una amplia gama de medios biológicos, moleculares, morfológicos y citológicos. Específicamente, los marcadores biológicos y moleculares se pueden utilizar para valorar características tales como el origen del tipo de célula (tal como una célula epitelial), tipo específico de célula (tal como el tipo de órgano, como mama o próstata), crecimiento celular o potencial de crecimiento celular, parada del crecimiento celular y estado de la hiperploidía. Estos marcadores celulares se seleccionan a partir de, pero sin limitarse a ellos, marcadores moleculares, bioquímicos y biológicos y sondas que se utilizan solos o en combinación.

«Poner en contacto» en el contexto de la presente invención abarca el poner juntas las células madre de placenta y las células tumorales *in vitro*, p. ej., en un solo recipiente (p. ej., placa de cultivo, matraz, vial, etc.). «Poner en contacto» también abarca el poner juntas las células madre de placenta y las células tumorales *in vivo*, por ejemplo, el mismo individuo (p. ej., mamífero, por ejemplo, ratón, rata, perro, gato, oveja, cabra, caballo, humano, etc.), por ejemplo, al proporcionar las células madre de placenta al individuo por vía intravenosa, mediante inyección directa en el sitio de un tumor o similares. En algunas realizaciones de la puesta en contacto *in vivo*, dichas células madre de placenta y dichas células tumorales son células en un cultivo celular. En algunas otras realizaciones, dichas células se cocultivan en el mismo espacio físico, p. ej., en la misma placa de cultivo o pocillo de una placa de cultivo. En otra realización, dicha puesta en contacto no requiere el contacto físico directo entre dichas células madre de placenta y dichas células tumorales. Por ejemplo, dicha puesta en contacto puede comprender el cultivo de dichas células madre de placenta y dichas células tumorales en espacios físicos independientes, p. ej., distintos pocillos en una placa de cultivo de células, en donde el medio en el cual dichas células madre de placenta y dichas células tumorales está compartido entre las células madre de placenta y las células tumorales. En algunas realizaciones de puesta en contacto *in vivo*, tanto las células madre de placenta como las células tumorales son exógenas al individuo, es decir, ningún tipo de célula tiene su origen dentro del individuo. En otra realización, las células tumorales son células tumorales que surgen dentro del individuo mediante oncogenia, a saber, las células tumorales son endógenas al individuo. En una realización preferida, la puesta en contacto (*in vitro*) es durante un tiempo suficiente, y con un número de células madre de placenta de acuerdo con la invención suficiente para ocasionar la supresión de la proliferación de la célula tumoral o de células tumorales, durante un periodo de tiempo tras dicha puesta en contacto. En un aspecto, la puesta en contacto (tanto *in vitro* como *in vivo*) es durante un tiempo suficiente, y con un número de células madre de placenta suficiente para ocasionar una supresión detectable de la proliferación de la célula tumoral o de células tumorales, durante un periodo de tiempo tras dicha puesta en contacto. Más preferiblemente, en distintas realizaciones, dicha puesta en contacto es suficiente para suprimir la proliferación de una célula tumoral o de células tumorales hasta al menos el 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% en comparación con la función inmunitaria en ausencia de las células madre de placenta, durante un periodo de tiempo tras dicha puesta en contacto. Incluso más preferiblemente, la proliferación de una célula tumoral o una gran cantidad de células tumorales está completamente suprimida, de tal forma que las células tumorales no proliferan, o no proliferan lo suficiente para incrementar el número total de células tumorales, durante un periodo de tiempo después de dicha puesta en contacto. En distintas realizaciones, el periodo de tiempo es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas o más.

En la supresión de las células tumorales, p. ej., células tumorales en un individuo, se pueden emplear tantas células madre de placenta como sea necesario para efectuar una supresión detectable de la proliferación de células tumorales o del crecimiento de un tumor. Por ejemplo, en distintas realizaciones del procedimiento, las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se ponen en contacto con una gran cantidad de células tumorales, p. ej., células tumorales en un individuo, en donde una gran cantidad de células madre de placenta comprende aproximadamente 1×10^5 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^6 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^7 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^8 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^9 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^{10} células madre de placenta, aproximadamente 1×10^{11} células madre de placenta, aproximadamente 1×10^{12} células madre de placenta, o más.

En otras realizaciones, el procedimiento comprende la administración de al menos aproximadamente 1×10^5 , al menos aproximadamente 1×10^6 , al menos aproximadamente 1×10^7 , o al menos aproximadamente 1×10^8 células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención a dicho individuo por kilogramo de la masa corporal del individuo. En una realización específica, aproximadamente 1 millón de células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se administran a un individuo que comprende una gran cantidad de células tumorales, por kilogramo de la masa corporal del individuo.

En diferentes realizaciones más específicas, el procedimiento comprende la administración de un número de células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención aproximadamente una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, o más de cinco veces el número de células tumorales en un individuo. Se puede utilizar cualquier procedimiento conocido para determinar el número de células tumorales en un individuo. Procedimientos de ejemplo de cuantificación de células tumorales se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 6.365.362 y 6.645.731; de Méhes et al., *Haematologia* 31 (2): 97-109 (2001); y Hardingham et al., *Cancer Research* 53: 3455-3458 (1993). En otras realizaciones más específicas, el procedimiento comprende la administración de un número de células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención basándose en el peso del individuo. Por ejemplo, el procedimiento comprende la administración de aproximadamente 1×10^3 células madre de placenta/kg, 5×10^3 células madre de placenta/kg, 1×10^4 células madre de placenta/kg, 5×10^4 células madre de placenta/kg, 1×10^5 células madre de placenta/kg, 5×10^5 células madre de placenta/kg, 1×10^6 células madre de placenta/kg, 5×10^6 células madre de placenta/kg, 1×10^7 células madre de placenta/kg, 5×10^7 células madre de placenta/kg o 1×10^8 células madre de placenta/kg a dicho individuo. En otras realizaciones más específicas, el procedimiento comprende la administración de al menos aproximadamente 1×10^3 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^3 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 1×10^4 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^4 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 1×10^5 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^5 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 1×10^6 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^6 células madre de

placenta/kg, al menos aproximadamente 1×10^7 células madre de placenta/kg, al menos aproximadamente 5×10^7 células madre de placenta/kg o al menos aproximadamente 1×10^8 células madre de placenta/kg a dicho individuo.

En otras realizaciones más específicas, dichas células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención han proliferado *in vitro* durante no más de 30 duplicaciones de población, no más de 20 duplicaciones de población, no más de 10 duplicaciones de población o no más de 5 duplicaciones de población. En otra realización específica, dichas células madre de placenta se han crioconservado y descongelado antes de dicha puesta en contacto. En otras realizaciones específicas del procedimiento, dichas células madre de placenta suprimen dicha proliferación de células tumorales en aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95%, en comparación con la proliferación de un número equivalente de células tumorales en ausencia de dichas células madre de placenta.

Ventajosamente, las células madre de placenta, p. ej., células madre de placenta de un individuo particular o de un conjunto de individuos, de tejidos concretos, o similares, se escrutan por la actividad supresora del tumor antes de su uso, p. ej., para suprimir el crecimiento o la proliferación de las células tumorales en un individuo. En un aspecto específico, por lo tanto, el procedimiento para suprimir la proliferación o el crecimiento de las células tumorales mediante el uso de células madre de placenta comprende escrutar dichas células madre de placenta *in vitro* en función de la actividad supresora del crecimiento celular antes de la administración de dichas células madre de placenta a dicho individuo. En determinadas realizaciones del procedimiento, está confirmado que dichas células madre de placenta suprimen *in vitro* la proliferación de células tumorales mediante, p. ej., al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o el 95% en comparación con la proliferación de un número equivalente de células tumorales en ausencia de dichas células madre de placenta, antes de la administración a dicho individuo, en donde la proliferación se mide mediante el número de células producido en las condiciones equivalentes durante un periodo de tiempo. Las células madre de placenta pueden suprimir las células tumorales por contacto directo, a través de factores solubles, o de ambas formas. Así pues, en otros aspectos más específicos del procedimiento, está confirmado que dichas células madre de placenta suprimen *in vitro* la proliferación de células tumorales en un ensayo de cultivo directo, en un ensayo Transwell[®] o, más preferiblemente, tanto en un ensayo de cultivo directo como en un ensayo Transwell[®], antes de la administración a dicho individuo.

Las células madre de placenta se pueden escrutar por la supresión de la proliferación o del crecimiento de células tumorales mediante el uso de cualquier célula tumoral, pero los escrutinios más útiles son los que replican, o intentan replicar, la supresión tumoral dentro de un individuo afectado. Por ejemplo, en otro aspecto, dichas células madre de placenta se escrutan *in vitro* por la actividad supresora del crecimiento tumoral frente a una célula tumoral del mismo tipo celular, p. ej., epitelial, escamoso, etc., el mismo origen de tejido, p. ej., mama, próstata, etc., o más preferiblemente, el mismo tipo celular y el mismo origen de tejido que una célula tumoral del individuo al que se administrarán dichas células madre de placenta. En otro aspecto, dichas células madre de placenta se escrutan *in vitro* por la actividad supresora del crecimiento tumoral frente a las células tumorales obtenidas a partir de una biopsia de células tumorales de dicho individuo, o las células tumorales purificadas o aisladas de una muestra de sangre de dicho individuo.

En diferentes realizaciones más específicas del procedimiento, dichas células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención son de amnios, corion, placa amniocoriónica o cordón umbilical, o de un perfundido de la placenta, y está confirmado que suprimen *in vitro* la proliferación de células tumorales mediante, p. ej., al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95%, en comparación con la proliferación de un número equivalente de células tumorales en ausencia de dichas células madre, antes de la administración a dicho individuo.

Para la puesta en contacto *in vivo* de las células madre de placenta con un tumor endógeno, p. ej., tumor macizo o neoplasia hemática, las células madre de placenta se pueden introducir en el individuo de cualquier manera conocida por los expertos en la técnica que sea eficaz a la hora de introducir células vivas en un individuo. Por ejemplo, las células madre de placenta se pueden introducir en el individuo mediante transfusión intravenosa, o se pueden introducir por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica y similares. En una realización preferida, las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se inyectan en el individuo en, en el sitio de, o en la periferia, del tumor o de las células tumorales. Las células también pueden introducirse mediante el trasplante de, p. ej., una matriz natural o artificial, p. ej., gelatina, en la cual quedan capturadas las células madre de placenta y fuera de la cual las células pueden crecer una vez transplantadas. Ejemplos no limitantes de tales matrices se dan a conocer en el apartado 5.6.1.4 que viene a continuación.

La introducción de las células madre de placenta en el individuo mediante cualquiera de estos procedimientos, u otros conocidos por los expertos en la técnica, es suficiente para facilitar el contacto entre dichas células madre de placenta y las células tumorales. La introducción de las células madre de placenta en un individuo, en particular en un individuo que tiene células tumorales endógenas, puede comprender una única introducción, o varias introducciones durante el transcurso de varias horas, varios días, varias semanas, varios meses o varios años. Cada introducción de células madre de placenta puede comprender un número de células madre suficiente de por sí para suprimir de forma detectable la proliferación de una gran cantidad de células tumorales, o puede ser suficiente en el agregado. Para la administración *in vivo*, las células madre de placenta se pueden formular como una composición

farmacéutica, tal y como se describe en el apartado 5.6.1, que viene a continuación.

El grado de supresión en un contexto *in vivo* se puede determinar en un ensayo *in vitro*, por ejemplo, comparando el número de células tumorales producidas por una célula tumoral o por una gran cantidad de células tumorales en las condiciones de crecimiento óptimas durante un periodo de tiempo en comparación con un número de células tumorales producidas por un número equivalente de células tumorales en contacto con las células madre de placenta durante la misma cantidad de tiempo. La proliferación de las células, entre ellas las células tumorales, se puede evaluar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, las células en cultivo o en un individuo se pueden muestrear en diferentes puntos del tiempo y se pueden contar con un hemocitómetro o un dispositivo similar. Las células tumorales se pueden tefir con un colorante que no se degrada diseñado para que se segregue a las células hijas, p. ej., tinción con bromodesoxiuridina (BrDU), diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) o diacetato de ácido carboxílico Oregon Green 488 (Invitrogen) y el grado de tinción determinado con un citómetro. Las células madre de placenta suprimen el crecimiento de las células tumorales en donde las células tumorales, en contacto con las células madre de placenta, muestran una tinción por célula detectable y más baja (p. ej., una cantidad media detectable más baja de tinción por célula) que las células tumorales que no estuvieron en contacto con las células madre de placenta. El grado de supresión en un ensayo *in vitro* se puede extrapolar, para un número de células madre de placenta y un número de células tumorales determinados, hasta un grado de supresión del tumor o de células tumorales en un individuo.

La supresión del crecimiento de un tumor se puede evaluar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica de diagnóstico por imagen o de detección de tumores *in vivo*. Por ejemplo, las células del tumor se pueden marcar con un anticuerpo específico del tumor y diagnosticarlo por imagen utilizando, p. ej., TEP o TAC, o se puede diagnosticar por imagen con rayos X. La determinación de la supresión del crecimiento tumoral se puede verificar, p. ej., mediante inspección visual de una imagen del tumor, mediante la determinación de la intensidad de la marcación del tumor, mediante la determinación del área del tumor en una imagen del tumor, etc. También puede realizarse una determinación de la supresión del crecimiento de un tumor *in vivo* mediante la detección u observación de cualquier eliminación, mejora, o enlentecimiento, del empeoramiento de un síntoma relacionado con el tumor.

El individuo puede ser un mamífero, p. ej., un humano. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto comprende administrar dichas células de placenta para el uso de acuerdo con la invención a dicho individuo por vía intravenosa. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto comprende la administración de dichas células de la placenta para el uso de acuerdo con la invención a dicho individuo en el sitio de un tumor, o adyacente a él.

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención también pueden administrarse con uno o más segundos tipos de células madre, p. ej., células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Tales segundas células madre se pueden administrar a un individuo con células madre de placenta en una proporción de, p. ej., aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1.

Las células madre de placenta también pueden administrarse con uno o más tipos de células que no son células madre. En una realización, las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se administran a un individuo junto con una segunda gran cantidad de células del individuo que son autólogas. En otra realización, las células madre de placenta se coadministran con fibroblastos. En algunos aspectos, los fibroblastos son fibroblastos autólogos. Los fibroblastos se pueden administrar a un individuo con células madre de placenta en una proporción de, p. ej., aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1.

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención pueden también administrarse con una o más quimiotaxinas de células madre. En un aspecto, la quimiotaxina de la célula madre es SDF-1.

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

Los procedimientos de supresión de la proliferación de células tumorales utilizan células madre de placenta, es decir, células madre que se pueden obtener de una placenta o de parte de la misma, que (1) se adhieren a un sustrato de cultivo de tejidos; (2) tienen la capacidad de diferenciarse en tipos celulares que no son de la placenta; y (3) tienen, en cantidad suficiente, la capacidad de suprimir de forma detectable la proliferación de una célula tumoral o gran cantidad de células tumorales, o de suprimir de forma detectable el crecimiento de un tumor. Las células madre de placenta no proceden de la sangre, p. ej., sangre de la placenta o sangre del cordón umbilical. Las células madre de placenta utilizadas en los procedimientos y las composiciones tienen la capacidad, y se seleccionan por su capacidad, de suprimir *in vitro* o *in vivo* la proliferación de una célula cancerosa o de una gran cantidad de células cancerosas, o para suprimir *in vivo* el crecimiento de un tumor.

Las células madre de placenta pueden tener un origen fetal o materno (es decir, pueden tener el genotipo de la madre o bien del feto). Las poblaciones de células madre de placenta, o las poblaciones de células que comprenden las células madre de placenta, pueden comprender células madre de placenta que son únicamente fetales o de origen materno, o pueden comprender una población mixta de células madre de placenta de origen fetal y materno. Las células madre de placenta, y las poblaciones de células que comprenden las células madre de placenta, se pueden identificar y seleccionar mediante las características morfológicas, marcadoras y del cultivo que se explican

a continuación.

5.2.1 Características físicas y morfológicas

Las células madre de placenta utilizadas en la presente invención, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivos celulares, se adhieren al sustrato del cultivo de tejidos, p. ej., a la superficie del recipiente del cultivo de tejidos (p. ej., plástico para cultivo de tejidos). Las células madre de placenta en el cultivo adquieren un aspecto generalmente fibroblastoide, estrellado, con una serie de proyecciones citoplasmáticas que se extienden desde el cuerpo central de la célula. Sin embargo, las células madre de placenta se pueden diferenciar morfológicamente de los fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, ya que las células madre de placenta exhiben un mayor número de tales proyecciones que los fibroblastos. Desde el punto de vista morfológico, las células madre de placenta también se pueden diferenciar de las células madre hematopoyéticas, que generalmente adquieren en el cultivo una forma más redondeada o de guijarro.

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 procedimientos y las composiciones de la presente invención, expresan una gran cantidad de marcadores que se pueden utilizar 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 para el uso de acuerdo con la invención (es decir, dos o más células madre de placenta) incluyen las células madre y las poblaciones de células que contienen células madre obtenidas directamente de la placenta, o de cualquier parte de la misma (p. ej., amnios, corion, placa amniocoriónica, cotiledones de la placenta, cordón umbilical 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 envase, p. ej., una bolsa. Sin embargo, las células madre de placenta no son trofoblastos.

Las células madre de placenta expresan generalmente los marcadores CD73, CD105, CD200, HLA-G, y/o OCT-4, y no expresan CD34, CD38 ni CD45. Las células madre de placenta también pueden expresar HLA-ABC (MHC-1) y HLA-DR. Estos marcadores pueden utilizarse para identificar las células madre de placenta y para distinguir entre las células madre de placenta y otros tipos de células madre. Ya que las células madre de placenta puede expresar CD73 y CD105, pueden tener características similares a las de una célula madre mesenquimatosas. No obstante, ya que las células madre de placenta pueden expresar CD200 y HLA-G, un marcador fetal específico, se pueden diferenciar de las células madre mesenquimatosas, p. ej., células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea, que no expresan ni CD200 ni HLA-G. Del mismo modo, la ausencia de expresión de CD34, CD38 y/o CD45 identifica la células madre de placenta como células madre no hematopoyéticas.

En un aspecto, en la presente memoria se describe una población de células aisladas que comprende una gran cantidad de células madre de placenta que son CD200⁺, HLA-G⁺, en donde dichas células madre suprimen de forma detectable la proliferación de las células cancerosas o el crecimiento del tumor. En otro aspecto de las poblaciones aisladas, dichas células madre son también CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dicha población aislada produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe una población de células aisladas que comprende una gran cantidad de células madre de placenta que son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, en donde dichas células madre suprimen de forma detectable la proliferación de las células cancerosas o el crecimiento del tumor. En un aspecto de dichas poblaciones, dichas células madre son HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ y HLA-G⁺. En otro aspecto, dicha población de células produce uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En la presente memoria también se describe una población de células aisladas que comprende una gran cantidad de células madre de placenta que son CD200⁺, OCT-4⁺, en donde dichas células madre suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento del tumor. En un aspecto, dichas células madre son CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dichas células madre son HLA-G⁺. En otro aspecto, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otro aspecto, la población produce uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En la presente memoria también se describe una población de células aisladas que comprende una gran cantidad de células madre de placenta que son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺, en donde dichas células madre suprimen de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocítica mixta (RLM). En un aspecto de la gran cantidad anterior, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre son también OCT-4⁺. En otro aspecto, dichas células madre son también CD200⁺. En otro aspecto, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺.

Se describe en la presente memoria una población de células aisladas que comprende una gran cantidad de células madre de placenta supresoras de células tumorales que son células madre CD73⁺, CD105⁺, en donde dicha gran cantidad forma uno o varios cuerpos de tipo embrioide en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y en donde dichas células madre suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento del tumor. En un aspecto, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre son también OCT-4⁺. En otro aspecto, dichas células madre son también OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.

En la presente memoria también se describe una población de células aisladas que comprende una gran cantidad de células madre de placenta que son células madre OCT-4⁺, en donde dicha población forma uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide y en donde se ha identificado que dichas células madre suprimen de forma detectable la proliferación de las células cancerosas o el crecimiento del tumor.

En algunos aspectos, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de dichas células aisladas de la placenta son células madre OCT-4⁺. En un aspecto de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dichas células madre son CD200⁺. En un aspecto, dichas células madre son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dicha población se ha expandido, por ejemplo, por haber recibido al menos un pase, al menos tres pases, al menos cinco pases, al menos 10 pases, al menos 15 pases o al menos 20 pases.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el procedimiento puede comprender adicionalmente la selección de células de la placenta que expresan ABC-p (una proteína ABC de transporte específica de la placenta; véase, p. ej., Allikmets et al., *Cancer Res.* 58 (23): 5337-9 (1998)). El procedimiento puede comprender también la selección de células que presentan al menos una característica específica de, p. ej., una célula madre mesenquimatosa, por ejemplo, expresión de CD29, expresión de CD44, expresión de CD90 o expresión de una combinación de lo anterior.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria una población de células aisladas que comprende una gran cantidad de células madre de placenta supresoras de células tumorales que son CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ y CD133⁻.

En un aspecto de las células madre de placenta mencionadas más arriba, las células madre de placenta secretan constitutivamente IL-6, IL-8 y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1).

Cada una de las grandes cantidades de células madre de placenta a que se hace referencia más arriba pueden comprender células madre de placenta obtenidas y aisladas directamente de una placenta de mamífero, o células madre de placenta que se han cultivado y han recibido pases al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 o más veces, o una combinación de las mismas.

Las grandes cantidades de las células madre de placenta supresoras de células tumorales que se describen más arriba puede comprender, aproximadamente, al menos, o no más de, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células madre de placenta.

5.2.3 Selección y producción de poblaciones de células madre de placenta

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un procedimiento para seleccionar una gran cantidad de células madre de placenta desde una gran cantidad de células de la placenta, que comprende la selección de una población de células de la placenta en donde al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de dichas células son células madre de placenta CD200⁺, HLA-G⁺, y en donde dichas células madre de placenta suprimen de forma detectable la proliferación de las células cancerosas o el crecimiento del tumor. En un aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre que son también CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre que son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dicha selección también comprende la selección de una gran cantidad de células madre de placenta que forman uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otro aspecto, la invención también da a conocer un procedimiento para seleccionar una gran cantidad de células madre de placenta a partir de una gran cantidad de células de la placenta, que comprende la selección de una gran cantidad de células de la placenta, en donde al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de dichas células son células madre de placenta CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, y en donde dichas células madre de placenta suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento del tumor. En un aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre que son también HLA-G⁺. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que también son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻,

CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ y HLA-G⁺. En otro aspecto, dicha selección comprende adicionalmente seleccionar una población de células de la placenta que produce uno o varios cuerpos de tipo embriode cuando la población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

5 En otro aspecto, se describe en la presente memoria un procedimiento para seleccionar una gran cantidad de células madre de placenta desde una gran cantidad de células de la placenta, que comprende la selección de una gran cantidad de células de la placenta, en donde al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos el 95% de dichas células son células madre de placenta CD200⁺, OCT-4⁺, y en donde dichas células madre de placenta
10 suprimen de forma detectable la proliferación de las células cancerosas o el crecimiento del tumor. En un aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también HLA-G⁺. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también
15 CD34⁻, CD38⁻ CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺.

En otro aspecto, la invención también da a conocer un procedimiento para seleccionar una gran cantidad de células madre de placenta desde una gran cantidad de células de la placenta, que comprende la selección de una gran cantidad de células de la placenta, en donde al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%,
20 al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de dichas células son células madre de placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺, y en donde dichas células madre de placenta suprimen de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocítica mixta (RLM). En un aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD200⁺. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que también son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺.
25

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para seleccionar una gran cantidad de células madre de placenta desde una gran cantidad de células de la placenta, que comprende la selección de una gran cantidad de células de la placenta, en donde al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos el 95% de dichas células son células madre de placenta CD73⁺, CD105⁺, y en donde dicha gran cantidad forma uno o varios cuerpos de tipo embriode en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode, y en donde dichas células madre suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento tumoral.
30 En un aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también OCT-4⁺. En un determinado aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.
35

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para seleccionar una gran cantidad de células madre de placenta desde una gran cantidad de células de la placenta, que comprende la selección de una gran cantidad de células de la placenta, en donde al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de dichas células aisladas de la placenta son células madre OCT-4⁺, y en donde dicha gran cantidad forma uno o varios cuerpos de tipo embriode en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipos embriode, y en donde dichas células madre suprimen de forma detectable la proliferación de las células cancerosas o el crecimiento del tumor. En un aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD73⁺ y CD105⁺. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otro aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD200⁺. En determinado aspecto, dicha selección comprende la selección de las células madre de placenta que son también CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.
40
45
50

En la presente memoria se describen los procedimientos para producir poblaciones de células madre de placenta que pueden suprimir la proliferación de células tumorales. Por ejemplo, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células, que comprende la selección de alguna de las grandes cantidades de células madre de placenta descritas más arriba, y aislar la gran cantidad de células madre de placenta a partir de otras células, p. ej., otras células de la placenta. En un aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células de la placenta, en donde dichas células de la placenta (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprenden la célula de la placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode, o expresan OCT-4, y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende la célula madre, cuando dicha población se cultiva en las
55
60

condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide; y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento tumoral; y aislar dichas células de la placenta de otras células para formar una población de células.

- 5 En un aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de las células cancerosas o el crecimiento tumoral; y el aislamiento de dichas células madre de placenta a partir de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y CD200, y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento tumoral; y el aislamiento de dichas células madre de placenta a partir de otras células para formar una población de células.
- 10 En otro aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y OCT-4, y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento tumoral; y el aislamiento de dichas células madre de placenta a partir de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y (d) suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento tumoral; y el aislamiento de dichas células madre de placenta de otras células para formar una población de células.
- 15 En otro aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G; y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4+ o CD8+ en una RLM; y el aislamiento de dichas células madre de placenta desde otras células para formar una población de células. En la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y (d) suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento tumoral; y el aislamiento de dichas células madre de placenta a partir de otras células para formar una población de células.
- 20 En otro aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G; y (c) suprimen de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4+ o CD8+ en una RLM; y el aislamiento de dichas células madre de placenta desde otras células para formar una población de células. En la presente memoria se describe un procedimiento para producir una población de células que comprende la selección de las células madre de placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y (d) suprimen de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento tumoral; y el aislamiento de dichas células madre de placenta a partir de otras células para formar una población de células.
- 25 Para los procedimientos anteriores que seleccionan poblaciones de células madre de placenta, la selección puede comprender la determinación de si una muestra de dichas células madre de placenta suprime la proliferación de células cancerosas, o si suprime el crecimiento de un tumor, y al seleccionar la población de células madre de placenta, si la muestra de las células madre de placenta suprime de forma detectable la proliferación de células cancerosas o el crecimiento del tumor.
- 30

35 5.2.4 Crecimiento en cultivo

El crecimiento de las células madre de placenta descritas en la presente memoria, al igual que para cualquier célula de mamífero, depende en parte del medio concreto seleccionado para el crecimiento. En las condiciones óptimas, las células madre de placenta típicamente duplican su número en 3 a 5 días. Durante el cultivo, las células madre de placenta para el uso en la invención se adhieren a un sustrato en el cultivo, p. ej., la superficie de un frasco para cultivo de tejidos (p. ej., al plástico de la placa de cultivo de tejidos, al plástico revestido de fibronectina y similares), y forman una monocapa.

40

Las poblaciones de células de placenta aisladas que comprenden las células madre de placenta descritas en la presente memoria, cuando se cultivan en las condiciones apropiadas, forman cuerpos de tipo embrioide, es decir, agrupaciones tridimensionales de células que crecen por encima de la capa de células madre adheridas. Las células dentro de los cuerpos de tipo embrioide expresan marcadores asociados a las células madre muy incipientes, p. ej., OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células que están dentro de los cuerpos de tipo embrioide no están típicamente adheridas al sustrato del cultivo, a diferencia de las células madre de placenta descritas en la presente memoria, pero permanecen pegadas a las células adheridas durante el cultivo. La viabilidad de las células de los cuerpos de tipo embrioide depende de las células madre de placenta adheridas, ya que los cuerpos de tipo embrioide no se forman en ausencia de las células madre adheridas. Así pues, las células madre de placenta adheridas facilitan el crecimiento de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células de la placenta que comprenden las células madre de placenta adheridas. Sin desear comprometerse con la teoría, las células de los cuerpos de tipo embrioide se cree que crecen sobre las células madre de placenta adheridas al igual que las células madre embrionarias crecen sobre una capa alimenticia de células. Las células madre mesenquimatosas, p. ej., las células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea, no desarrollan cuerpos de tipo embrioide en el cultivo.

45

50

55

5.3 Procedimientos para obtener células madre de placenta

5.3.1 Composición para la recogida de células madre

Además, en la presente memoria se describen los procedimientos para recoger y aislar células madre de placenta.

Generalmente, las células madre se obtienen de una placenta de mamífero con el uso de una solución fisiológicamente aceptable, p. ej., una composición para la recogida de células madre. Una composición para la recogida de células madre se describe detalladamente en la solicitud provisional relacionada de los EE.UU. n.º 60/754.969, titulada «Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition» registrada el 29 de diciembre de 2005.

5

La composición para la 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 (p. ej., solución salina tamponada con fosfato, solución de Krebs, solución de Krebs modificada, solución de Eagle, NaCl al 0,9%, etc.), un medio de cultivo (p. ej., DMEM, HDMEM, etc.) y similares.

10

La composición para la recogida de células madre puede comprender uno o varios componentes que tienden a conservar las células madre de placenta, es decir, impedir que se mueran las células madre de placenta, o retrasar la muerte de las células madre de placenta, reducir el número de células madre de placenta que se mueren en una población de células, o similar, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Tales componentes pueden ser, p. ej., un inhibidor de la apoptosis (p. ej., un inhibidor de caspasa o inhibidor de JNK); un vasodilatador (p. ej., sulfato de magnesio, un hipotensor, péptido natriurético auricular [ANP, por su nombre en inglés], corticotropina, corticoliberina, nitroprusiato de sodio, hidralazina, trifosfato de adenosina, adenosina, sulfato de indometacina o magnesio, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de la necrosis (p. ej., 2-(1H-indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina, o clonazepam); un inhibidor del TNF- α ; y/o un perfluorocarburo que lleva oxígeno (p. ej., bromuro de perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

15

20

La composición para la recogida de células madre puede comprender uno o varias enzimas de degradación de tejidos, p. ej., una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una ARNasa o una ADNasa o similares. Tales enzimas incluyen, pero sin limitarse a ellas, colagenasas (p. ej., colagenasas I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASA, hialuronidasa y similares.

25

La composición para la recogida de células madre puede comprender una cantidad bactericida o bacteriostática y eficaz de un antibiótico. En algunos aspectos no limitantes, el antibiótico es un macrólido (p. ej., tobramicina), una cefalosporina (p. ej., cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozilo, cefaclor, cefixima o cefadroxilo), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (p. ej., penicilina V) o una quinolona (p. ej., ofloxacino, ciprofloxacino o norfloxacino), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En un aspecto particular, el antibiótico es activo contra las bacterias grampositivas y/o gramnegativas, p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y similares.

30

La composición para la recogida de células madre puede también comprender uno o más de los compuestos siguientes: 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 de masa molecular mayor de 20.000 Da, en un aspecto, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y la viabilidad celular (p. ej., un coloide sintético o que se produce de forma natural, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o de aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (p. ej., hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presentes de aproximadamente 25 μ M a aproximadamente 100 μ M); un reductor (p. ej., N-acetilcisteína presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que impide la entrada de calcio en las células (p. ej., verapamilo presente de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 25 μ M); nitroglicerina (p. ej., de aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, en un aspecto, presente en una cantidad suficiente para ayudar a impedir la coagulación de la sangre residual (p. ej., heparina o hirudina presente a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida (p. ej., amilorida, etilisopropilamilorida, hexametilamilorida, dimetilamilorida o isobutilamilorida presente de aproximadamente 1,0 μ M a aproximadamente 5 μ M).

35

40

45

5.3.2 Recogida y manipulación de la placenta

Generalmente, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión tras el parto. En un aspecto, la placenta se recupera de una paciente después de conseguir un consentimiento informado y una anamnesis completa de la paciente, y queda asociada a la placenta. Preferiblemente, la anamnesis continúa tras el parto. Tal anamnesis se puede utilizar para coordinar el uso posterior de la placenta o de las células madre recogidas de ésta. Por ejemplo, las células madre de placenta humana se pueden utilizar, a la luz de la anamnesis, para la medicina personalizada para el lactante asociado a la placenta, o para los padres, gemelos u otros parientes del lactante.

50

Antes de la recuperación de las células madre de placenta, se retiran la sangre del cordón umbilical y la sangre de la placenta. En algunos aspectos, tras el parto se recupera la sangre del cordón de la placenta. La placenta se puede someter a un procedimiento convencional de recuperación de la sangre del cordón umbilical. Típicamente se utiliza una aguja o cánula, con ayuda de la gravedad, para desangrar la placenta (véase, p. ej., Anderson, patente de los EE.UU. n.º 5.372.581; Hessel et al., patente de los EE.UU. n.º 5.415.665). La aguja o la cánula se coloca normalmente en la vena umbilical y se puede dar un masaje suave a la placenta para ayudar a drenar la sangre del

55

cordón umbilical desde la placenta. Tal recuperación de la sangre del cordón umbilical se puede realizar comercialmente, p. ej., LifeBank Inc., Cedar Knolla, N. J., ViaCord, *Cord Blood Registry and Cryocell*. Preferiblemente, la placenta se drena por acción de la gravedad sin más manipulación para alterar el tejido lo menos posible durante la recuperación de la sangre del cordón.

- 5 Típicamente, una placenta se transporta desde la habitación del parto o del nacimiento a otra ubicación, p. ej., un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón umbilical y la recogida de las células madre mediante, p. ej., perfusión o disociación del tejido. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte con aislamiento térmico y estéril (que mantiene la temperatura de la placenta entre 20 y 28 °C), por ejemplo, colocando la placenta, con el cordón umbilical pinzado en el lado proximal, en una bolsa de plástico estéril con cierre de cremallera, que luego se coloca en un recipiente aislado. En otro aspecto, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre del cordón umbilical como se describe sustancialmente en la solicitud pendiente de patente de los EE.UU. n.º 11/230.760, registrada el 19 de septiembre de 2005. Preferiblemente, la placenta se entrega al laboratorio de 4 a 24 horas después del parto. En algunos aspectos, el cordón umbilical está pinzado proximalmente, preferiblemente a menos de 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de recuperar la sangre del cordón. En otras realizaciones, el lado proximal del cordón umbilical se pinza tras la recuperación de la sangre del cordón, pero antes de otros procesamientos de la placenta.

- La placenta, antes de la recogida de las células madre, se puede conservar en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25 °C (Celsius). La placenta se puede conservar durante un tiempo que no supere las 48 horas y preferiblemente durante un tiempo de 4 a 24 horas antes de la perfusión de la placenta para retirar cualquier sangre residual del cordón umbilical. La placenta se conserva preferiblemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25 °C (Celsius). Las soluciones anticoagulantes adecuadas se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una solución de heparina o warfarina sódica. En un aspecto, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (p. ej., 1% p/p en solución de 1:1000). La placenta desangrada se conserva preferiblemente 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 por lo general como se describe más arriba, se puede tratar de cualquier manera conocida en la técnica, p. ej., se puede perfundir o romper, p. ej., digerir con una o más enzimas que rompen el tejido, para obtener las células madre.

5.3.3. Rotura física y digestión enzimática de tejido placentario

- 30 En un aspecto, las células madre se recogen de una placenta de mamífero mediante la rotura física, p. ej., digestión enzimática, del órgano. Por ejemplo, la placenta, o una porción de la misma, se puede, p. ej., aplastar, cizallar, desmenuzar, cortar en trocitos, picar, macerar, o similar, mientras se pone en contacto con la composición para la recogida de células madre descrita en la presente memoria, y el tejido posteriormente se digiere con una o varias enzimas. La placenta, o una porción de la misma, también se puede romper físicamente y digerir con una o varias enzimas, y el material resultante introducirlo, o mezclarlo, a continuación en la composición para la recogida de células madre descrita en la presente memoria. Se puede utilizar cualquier procedimiento de rotura física, siempre y cuando el procedimiento de rotura mantenga viables una gran cantidad, más preferiblemente una mayoría, y más preferiblemente al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99%, de las células en dicho órgano, como se determinó mediante, p. ej., exclusión con azul de tripano.

- 40 La placenta se puede diseccionar en sus componentes antes de la alteración física y/o la digestión enzimática y la recuperación de las células madre. Por ejemplo, las células madre de placenta se pueden obtener de la membrana amniótica, corion, cotiledones de la placenta o cualquier combinación de los mismos. Las células madre del cordón umbilical también pueden utilizarse en los procedimientos de la invención. En un aspecto, las células madre de placenta se obtienen del tejido de la placenta que comprende amnios y corion. En otro aspecto, las células madre de placenta se obtienen del cordón umbilical. Típicamente, las células madre de placenta se pueden obtener mediante la rotura de un pequeño bloque de tejido de la placenta, p. ej., un bloque de tejido de la placenta 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 mm³.

- 50 Una composición para la recogida de recogida de células madre preferida comprende una o varias enzimas que rompen el tejido. La digestión enzimática utiliza preferiblemente una combinación de enzimas, p. ej., una combinación de una metaloproteasa de la matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. En un aspecto, la digestión enzimática del tejido de la placenta utiliza una combinación de una metaloproteasa de la matriz, una proteasa neutra y una enzima mucolítica para la digestión del ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa y hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp, Indianápolis, Ind.) e hialuronidasa. Otras enzimas que se pueden utilizar para romper el tejido de la placenta incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina o elastasa. Las serina proteasas pueden ser inhibidas por la microglobulina $\alpha 2$ en el suero, y por lo tanto, el medio utilizado para la digestión está normalmente libre de suero. El EDTA y la ADNasa se utilizan habitualmente en los procedimientos de digestión enzimática para incrementar la eficacia de la recuperación de las células. El producto de la digestión se diluye preferiblemente para evitar que las células madre queden atrapadas dentro de la digestión viscosa.

Puede utilizarse cualquier combinación de enzimas de digestión de tejidos. Las concentraciones típicas para las enzimas de digestión de tejidos incluyen, p. ej., 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 se pueden utilizar en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o se puede utilizar posteriormente para liberar las células madre de placenta. Por ejemplo, en un aspecto, una placenta, o parte de la misma, se digiere primero con una cantidad adecuada de colagenasa I a 2 mg/ml durante 30 min, seguido de la digestión con tripsina, 0,25%, durante 10 minutos, a 37 °C. Es preferible utilizar las serina proteasas de forma consecutiva después de utilizar otras enzimas.

En otro aspecto, el tejido puede además romperse mediante la adición de un quelante, p. ej., ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) a la composición para la recogida de células madre que comprende las células madre, o a una solución en la que el tejido se rompe y/o digiere antes de aislar las células madre con la composición para la recogida de células madre.

Se apreciará que cuando una placenta entera, o una porción de una placenta que comprende tanto células fetales como maternas (por ejemplo, cuando la porción de la placenta comprende el corion o los cotiledones), las células madre de placenta recogidas comprenderán una mezcla de células madre de placenta que tendrán un origen tanto fetal como materno. Cuando una porción de la placenta que no comprende células maternas (por ejemplo, amnios), o que comprende un número insignificante de ellas, las células madre de placenta recogidas comprenderán casi exclusivamente células madre de placenta fetales.

5.3.4 Perfusión de la placenta

Las células madre de placenta también se pueden obtener mediante la perfusión de la placenta de mamífero. Los procedimientos para perfundir la placenta de mamífero para la obtención de células madre se describen, p. ej., en Hariri, patente de los EE.UU. n.º 7.045.148 y en la solicitud provisional relacionada de los EE.UU. n.º 60/754.969, titulada «Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition» registrada el 29 de diciembre de 2005.

Las células madre de placenta se pueden recoger mediante perfusión, p. ej., a través de la vasculatura de la placenta mediante el uso de, p. ej., una composición para la recogida de células madre en forma de solución de perfusión. En un aspecto, se realiza la perfusión de una placenta de mamífero al hacer pasar la solución de perfusión a través de la arteria umbilical o bien la vena umbilical, o bien ambas. Se puede conseguir que fluya la solución de perfusión a través de la placenta mediante el uso de, p. ej., flujo por gravedad para que entre en la placenta. Preferiblemente, la solución de perfusión se fuerza a que entre en la placenta mediante una bomba, p. ej., una bomba peristáltica. En la vena umbilical se puede, p. ej., obtener una vía con una cánula, p. ej., una cánula de plástico o TEFLON[®], que está conectada a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril se conecta a un distribuidor de perfusión.

En la preparación para la perfusión, la placenta está orientada preferiblemente (p. ej., suspendida) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical estén localizadas en el punto más alto de la placenta. La placenta se puede perfundir mediante el paso de un líquido de perfusión, p. ej., la composición para la recogida de células madre descrita en la presente memoria, a través de la vasculatura de la placenta, o a través de la vasculatura de la placenta y el tejido circundante. En un aspecto, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un recipiente con la solución de perfusión. La solución de perfusión se hace pasar por la vena y la arteria umbilicales. La solución de perfusión exuda desde, y/o pasa a través de, las paredes de los vasos sanguíneos hacia los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un vaso abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estaba pegada al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y se deja que fluya o que salga por filtración desde las aperturas en la pared de la placenta que interactúan con la pared uterina materna. En otro aspecto, la solución de perfusión se hace pasar a través de las venas umbilicales y se recoge desde la arteria umbilical, o se hace pasar a través de la arteria umbilical y se recoge desde las venas umbilicales.

En un aspecto, el cordón umbilical proximal está pinzado durante la perfusión y, más preferiblemente, está pinzado a menos de 4-5 cm (centímetros) de la inserción del cordón umbilical en el disco de la placenta.

La primera recogida de líquido de perfusión desde una placenta de mamífero durante el proceso de desangrado está generalmente coloreada con glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón umbilical y/o de la sangre de la placenta. El líquido de la perfusión se vuelve más incoloro a medida que continúa la perfusión y las células sanguíneas residuales del cordón umbilical se van lavando de la placenta. Por lo general, de 30 a 100 ml (mililitros) de líquido de perfusión es lo adecuado para desangrar inicialmente la placenta, pero se puede utilizar más o menos líquido de perfusión según los resultados observados.

El volumen de líquido de la perfusión utilizado para recoger las células madre de placenta puede variar según el número de células madre a recoger, el tamaño de la placenta, el número de recogidas a realizar de una única placenta, etc. En distintos aspectos, 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 2000 ml o de 750 ml a 2000 ml.

Típicamente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después del desangrado.

La placenta se puede perfundir una gran cantidad de veces a lo largo de varias horas o varios días. Cuando hay que perfundir la placenta una gran cantidad de veces, se puede mantener o cultivar en condiciones asépticas en un envase u otro recipiente adecuado, y perfundir con la composición para la recogida de células madre, o una solución de perfusión estándar (p. ej., una solución salina normal tal como una solución salina tamponada con fosfato [PBS]) con o sin un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina sódica, coumarina, bishidroxicoumarina) y/o con o sin un antimicrobiano (p. ej., β -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tal como estreptomina (p. ej., a 40-100 μ g/ml), penicilina (p. ej., a 40 U/ml), amfotericina B (p. ej., a 0,5 μ g/ml). En un aspecto, una placenta aislada se mantiene o cultiva durante un periodo de tiempo sin recoger el perfundido, de tal manera 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 de la recogida del perfundido. La placenta perfundida se puede mantener durante una o más veces adicionales, p. ej., 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 perfundir una segunda vez con, p. ej., 700-800 ml de líquido de perfusión. La placenta se puede perfundir 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5, o 6 horas. En un aspecto, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, p. ej., composición para la recogida de células madre, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes momentos del tiempo se pueden procesar adicionalmente de forma individual para recuperar las poblaciones de células en función del tiempo, p. ej., las células madre. Los perfundidos de diferentes momentos del tiempo también se pueden agrupar.

Sin desear comprometerse con ninguna teoría, tras el desangrado y un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se cree que las células madre de placenta migran a la microcirculación de desangrado y de perfusión de la placenta cuando, de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria, se recogen, preferiblemente lavando en un vaso de recogida por perfusión. La perfusión de la placenta aislada no sólo sirve para retirar la sangre residual del cordón, sino que también proporciona a la placenta los nutrientes adecuados, entre ellos el oxígeno. La placenta puede cultivarse y perfundirse con una solución similar a la utilizada para retirar las células residuales de la sangre del cordón, preferiblemente, sin añadir anticoagulantes.

La perfusión de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria da lugar a una recogida de células madre de placenta significativamente mayor que el número que se obtiene de una placenta de mamífero no perfundida con dicha solución y si tratar de otro modo para obtener células madre (p. ej., mediante rotura del tejido, p. ej., digestión enzimática). En este contexto, «significativamente mayor» significa al menos más del 10%. La perfusión de acuerdo con los procedimientos de la invención produce un número de células madre de placenta significativamente mayor que, p. ej., el número de células madre de placenta que se obtienen del medio de cultivo en el cual se ha cultivado una placenta, o una porción de la misma.

Las células madre se pueden aislar de la placenta mediante perfusión con una solución que comprende una o más proteasas u otras enzimas que rompen el tejido. En un aspecto, una placenta o porción de la misma (p. ej., membrana amniótica, amnios y corion, lóbulo de la placenta o cotiledón, cordón umbilical o una combinación de cualquiera de los anteriores) se lleva a 25-37 °C, y se incuba con una o más enzimas que rompen el tejido 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 fría de inhibidores que comprende EDTA a 5 mM, ditiotreitól a 2 mM y β -mercaptoetanol a 2 mM. Transcurridos unos minutos, las células madre se lavan con una composición fría (p. ej., 4 °C) para la recogida de células madre de la invención.

Se apreciará que la perfusión con uso del procedimiento de selección guiada, es decir, en donde el perfundido se recoge después de que se haya exudado desde el lado materno de la placenta, dará lugar a una mezcla de células maternas y fetales. Como resultado, las células recogidas por este procedimiento comprenden una población mixta de células madre de placenta de origen fetal y de origen materno. En cambio, la perfusión únicamente a través de la vasculatura de la placenta, en la cual el líquido de perfusión se hace pasar a través de uno o más vasos de la placenta y se recoge únicamente a través de los vasos restantes, da lugar a 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 de placenta de mamífero, tanto si se obtienen por perfusión o por digestión enzimática, pueden inicialmente purificarse de (a saber, aislarse de) otras células mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Tal centrifugación puede seguir cualquier protocolo estándar para la velocidad de centrifugación, etc. En un aspecto, por ejemplo, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfundido mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo cual separa las células de, p. ej., el desecho contaminante y las plaquetas. En otro aspecto, el perfundido de la placenta se concentra a aproximadamente 200 ml, se deposita suavemente sobre Ficoll y se centrifuga a aproximadamente 1100 x g durante 20 minutos a 22 °C y la capa de las células de la interfase de baja densidad se recoge para un procesamiento posterior.

Los sedimentos celulares se pueden resuspender en una composición para la recogida de células madre recién preparada, o en un medio adecuado para el mantenimiento de las células madre, p. ej., medio IMDM libre de suero

que contiene heparina a 2 U/ml y EDTA a 2 mM (Gibco BRL, NY). La fracción de células mononucleares totales se puede aislar, p. ej., con LYMPHOPREP® (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «aislar» células madre de placenta significa retirar al menos el 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 intacta de mamífero. Una célula madre de un órgano está «aislada» cuando está presente en una población de células que comprende menos del 50% de las células con las que la célula madre está asociada normalmente en el órgano intacto.

10 Las células de la placenta obtenidas por perfusión o digestión pueden, por ejemplo, más adelante o inicialmente, aislarse mediante tripsinización diferencial con, p. ej., una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, Saint Louis MO). Se puede realizar la tripsinización diferencial porque las células madre de placenta típicamente se despegan de la superficie de plástico en menos de aproximadamente 5 minutos mientras que otras poblaciones adheridas típicamente requieren más de 20-30 minutos de incubación. Las células madre de placenta despegadas se pueden recoger después de la tripsinización y la neutralización de la tripsina, mediante, p. ej., una solución neutralizante de tripsina (TNS, Cambrex). En un aspecto de aislamiento de células adheridas, en cada uno de los
15 distintos frascos T75, preferiblemente frascos T75 revestidos con fibronectina, se colocan alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente $5-10 \times 10^6$ células. En tal aspecto, las células se pueden cultivar con medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas disponible comercialmente (MSCGM, por su nombre en inglés) (Cambrex) y colocarse en un incubador de cultivo de tejidos (37 °C, CO₂ al 5%). Después de 10 a 15 días, las células que no
20 están adheridas se retiran de los frascos mediante lavados con PBS. A continuación, la PBS se reemplaza por MSCGM. Los frascos se examinan preferiblemente cada día en busca de la presencia de distintos tipos de células adheridas y, en particular, para la identificación y expansión de agrupaciones de células fibroblastoides.

25 El número y tipo de células recogido de una placenta de mamífero se puede supervisar, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y de los marcadores de la superficie celular mediante las técnicas estándares de detección de células tales como la citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (p. ej., tinción con anticuerpos específicos de un marcador celular o específicos de tejido), clasificación de células activadas con fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas con magnetismo (MACS), mediante evaluación de la morfología de las células al microscopio confocal u óptico, y/o midiendo los cambios de la expresión génica mediante las técnicas bien conocidas en la técnica, tales como PCR y perfiles de expresión génica. Estas técnicas
30 pueden utilizarse también para identificar las células que dan positivo para uno o más marcadores concretos. Por ejemplo, con anticuerpos contra CD34, se puede determinar, con las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si es así, la célula es CD34⁺. Asimismo, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 para poderlo detectar mediante RT-PCR, o ARN de OCT-4 significativamente en mayor cantidad que una célula adulta, la célula es OCT-4⁺. Se conocen bien en la técnica los anticuerpos contra los marcadores de la
35 superficie celular (p. ej., marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de los genes específicos de las células madre, tales como OCT-4.

Las células de la placenta, en particular las células que se han aislado mediante separación en Ficoll, adherencia diferencial o una combinación de ambas, se puede clasificar con un clasificador de células activadas con fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas con fluorescencia (FACS) es un procedimiento bien
40 conocido para separar partículas, entre ellas las células, basándose en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151: 150-165). La excitación con láser de los restos fluorescentes en las partículas individuales da lugar a una carga eléctrica pequeña que permite la separación electromagnética de las partículas positivas y negativas desde una mezcla. En un aspecto, los anticuerpos o ligandos específicos de la superficie celular se marcan con marcadores fluorescentes diferentes. Las células se procesan a través del
45 clasificador de células, lo que permite separar las células basándose en su capacidad para fijarse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas por FACS se pueden depositar directamente en pocillos distintos de placas de 96 pocillos o de 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En un esquema de clasificación, las células madre de placenta se clasifican basándose en la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 y/o HLA-G. Esto puede llevarse a cabo junto con
50 procedimientos para seleccionar las células madre basándose en sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, puede llevarse a cabo una etapa de selección por adherencia antes o después de la clasificación basándose en la expresión de los marcadores. En un aspecto, por ejemplo, las células se clasifican primero basándose en la expresión de CD34; las células CD34⁻ se conservan y las células que son CD200⁺ HLA-G⁺ se separan de otras células CD34⁻. En otro aspecto, las células de la placenta se basan en la expresión de los
55 marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, las células que exhiben cualquiera de estos marcadores se aíslan para el uso posterior. Las células que expresan, p. ej., CD200 y/o HLA-G pueden, en un aspecto, clasificarse adicionalmente basándose en la expresión de CD73 y/o CD105, o de los epítomos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o que carecen de la expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en un aspecto, las células de la placenta se clasifican mediante la expresión, o la falta de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34,
60 CD38 y CD45, y las células de la placenta que son CD200⁺, HLA-G⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻ se aíslan de otras células de la placenta para el uso posterior.

En otro aspecto, se pueden utilizar perlas magnéticas para separar las células. Se pueden clasificar las células mediante una técnica de clasificación de células activadas con magnetismo (MACS), un procedimiento para separar partículas basándose en su capacidad para fijarse a las perlas magnéticas (diámetro de 0,5-100 µm). Se pueden realizar una serie de modificaciones útiles sobre las microesferas magnéticas, entre ellas, la adición covalente del anticuerpo que reconoce específicamente una molécula de la superficie celular particular o hapteno. A continuación, las perlas se mezclan con las células para permitir la fijación. A continuación, las células se hacen pasar a través de un campo magnético para separar las células que tienen el marcador de la superficie celular específico. En un aspecto, estas células pueden aislarse y volverse a mezclar con las perlas magnéticas conjugadas a un anticuerpo contra otros marcadores de la superficie celular. Las células se vuelven a hacer pasar a través de un campo magnético, y se aíslan las células que se fijan a ambos anticuerpos. Después, tales células se pueden diluir en placas distintas, tal como placas de microtitulación, para el aislamiento clonal.

Las células madre de placenta también se pueden caracterizar y/o clasificar basándose en las características de crecimiento y la morfología de las células. Por ejemplo, las células madre de placenta se pueden caracterizar por tener y/o seleccionarse basándose en, p. ej., una apariencia fibroblastoide en el cultivo. Las células madre de placenta también pueden caracterizarse por tener, y/o ser seleccionadas, basándose en su capacidad para formar cuerpos de tipo embriode. En un aspecto, por ejemplo, las células de la placenta que tienen forma fibroblastoide, que expresan CD73 y CD105, y que producen uno o más cuerpos de tipo embriode en el cultivo se aíslan de otras células de la placenta. En otro aspecto, las células de la placenta OCT-4⁺ que producen uno o más cuerpos de tipo embriode en el cultivo se aíslan de otras células de la placenta.

En otro aspecto, las células madre de placenta se pueden identificar y caracterizar mediante un ensayo de unidades formadoras de colonias. Los ensayos de unidades formadoras de colonias se conocen comúnmente en la técnica, tal como el medio MESEN CULTTM (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia).

Las células madre de placenta se pueden valorar por la viabilidad, el potencial de proliferación y la longevidad mediante las técnicas estándares conocidas en la técnica, tal como el ensayo de exclusión con azul de tripano, ensayo de captación de diacetato de fluoresceína, ensayo de captación de yoduro de propidio (para valorar la viabilidad); y ensayo de captación de timidina, ensayo de proliferación de células MTT (para valorar la proliferación). La longevidad se puede determinar mediante los procedimientos bien conocidos en la técnica, tal como por determinación del número máximo de duplicaciones de la población en un cultivo prolongado.

Las células madre de placenta también pueden separarse de otras células de la placenta con otras técnicas conocidas en la técnica, p. ej., crecimiento selectivo de las células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células indeseadas (selección negativa); separación basándose en la capacidad de aglutinación diferencial de las células en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; filtración; centrifugación zonal y convencional; elutriación por centrifugación (centrifugación con retroceso del flujo), separación por gravedad de las unidades; distribución contracorriente; electroforesis; y similares.

5.4 Cultivo de las células madre de placenta

5.4.1 Medios de cultivo

Las células madre de placenta aisladas, o la población de células madre de placenta, o las células o tejido de la placenta de las cuales se hacen crecer las células madre de placenta, se pueden utilizar para iniciar, o para inocular, cultivos de células. Las células se transfieren generalmente a recipientes para cultivo de tejidos estériles revestidos o sin revestir con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (p. ej., nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina y proteína membranaria extracelular (p. ej., MATRIGEL (BD Discovery Labware, Bedford, Mass)).

Las células madre de placenta se pueden cultivar en cualquier medio y, en cualquier condición, que se reconoce en la técnica como aceptable para el cultivo de las células madre. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende suero. Las células madre de placenta se pueden cultivar en, por ejemplo, DMEM-LG (medio esencial modificado de Dulbecco, bajo en glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblastos de pollo) que contiene ITS (insulina-transferina-selenio), AL+SAB (ácido linoleico-seroalbúmina bovina), dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1, y penicilina/estreptomina; DMEM-HG (rico en glucosa) que comprende suero de ternera fetal al 10% (STF); DMEM-HG que comprende STF al 15%; IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove) que comprende STF al 10%, suero de caballo al 10% e hidrocortisona; M199 que comprende STF al 10%, EGF y heparina; α-MEM (medio esencial mínimo) que comprende STF al 10%, GLUTAMAXTM y gentamicina; DMEM que comprende STF al 10%, GLUTAMAXTM y gentamicina, etc. Un medio preferido es DMEM-LG/MCDB-201 que comprende STF al 2%, ITS, AL+SAB, dextrosa, ácido L-ascórbico, PDGF, EGF y penicilina/estreptomina.

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

El medio de cultivo se puede complementar con uno o más componentes, entre ellos, por ejemplo, suero (p. ej., suero de ternera fetal (STF), preferiblemente aproximadamente al 2-15% (v/v); suero equino (de caballo) (SE), suero humano (SH)); β -mercaptoetanol (BME), preferiblemente aproximadamente al 0,001% (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF), factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO), aminoácidos, entre ellos la L-valina; y uno o más antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, solos o en combinación.

5.4.2 Expansión y proliferación de las células madre de placenta

Una vez que una célula madre de placenta aislada, o población aislada de células madre (p. ej., una célula madre o población de células madre separada de al menos el 50% de las células de la placenta con las cuales la célula madre o la población de células madre está asociada normalmente *in vivo*), la célula madre o la población de células madre puede proliferar y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, una población de células madre de placenta puede cultivarse en envases para cultivo de tejidos, p. ej., placas, frascos, placas multipocillo o similares, durante un tiempo suficiente para que las células madre proliferen hasta que la confluencia sea del 70-90%, es decir, hasta que las células madre y su progenie ocupan el 70-90% de la superficie del recipiente para cultivo de tejidos.

Las células madre de placenta se pueden inocular en recipientes de cultivo a una densidad que permite el crecimiento celular. Por ejemplo, las células se pueden inocular de una densidad baja (p. ej., de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 células/cm²) a una densidad alta (p. ej., 50.000 o más células/cm²). En un aspecto, las células se cultivan en aproximadamente del 0% a aproximadamente el 5% en volumen de CO₂ en el aire. En algunos aspectos, las células se cultivan en aproximadamente del 2 a aproximadamente el 25% de O₂ en el aire, preferiblemente de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 20% de O₂ en el aire. Las células se cultivan preferiblemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a 37 °C. Las células se cultivan preferiblemente en un incubador. El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, con un biorreactor. Las células madre de placenta se hacen crecer preferiblemente con poco estrés oxidativo (p. ej., con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, *N*-acetilcisteína o similares).

Una vez que se obtiene una confluencia del 70%-90%, se puede dar un pase a las células. Por ejemplo, las células se pueden tratar enzimáticamente, p. ej., con tripsina, mediante las técnicas bien conocidas en la técnica, para despegarlas de la superficie para cultivo de tejidos. Tras retirar las células con pipeta y contar las células, aproximadamente 20.000-100.000 células madre, preferiblemente aproximadamente 50.000 células madre, se pasan a un nuevo recipiente de cultivo que contiene un medio de cultivo nuevo. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del cual se retiran las células madre. La invención abarca las poblaciones de células madre de placenta que han recibido al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 pases o más.

5.4.3. Poblaciones de células madre de placenta

En la presente memoria se describen poblaciones de células madre de placenta. La población de células madre de placenta se puede aislar directamente de una o varias placentas; es decir, la población de células madre de placenta puede ser una población de células de la placenta, que comprende células madre de placenta, obtenidas de, o contenidas en, el perfundido, u obtenerse de, o contenerse en, el producto de la digestión (es decir, la recogida de células obtenidas por digestión enzimática de una placenta o de una parte de la misma). Las células madre de placenta aisladas para el uso de acuerdo con la invención también se pueden cultivar o expandir para producir poblaciones de células madre de placenta. Las poblaciones de células de la placenta que comprenden las células madre de placenta también se pueden cultivar y expandir 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 las descritas en la presente memoria. En distintos aspectos, al menos el 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, p. ej., hasta el 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de células que no son células madre.

En las realizaciones de la presente memoria, el sustrato puede ser cualquier superficie en la cual se puede llevar a cabo el cultivo y/o la selección de células, p. ej., células madre de placenta. Típicamente, el sustrato es plástico, p. ej., plástico de placa para cultivo de tejidos o de placa multipocillo. El plástico para cultivo de tejidos se puede revestir con una biomolécula, p. ej., laminina o fibronectina.

Las células, p. ej., las células madre de placenta, pueden seleccionarse para una población de células madre de placenta mediante cualquier medio conocido en la técnica de selección de células. Por ejemplo, las células se pueden seleccionar utilizando un anticuerpo o anticuerpos contra uno o más marcadores de la superficie celular, por ejemplo, en citometría de flujo o FACS. La selección se puede llevar a cabo con anticuerpos junto con perlas magnéticas. En la técnica se conocen los anticuerpos que son específicos contra determinados 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. Los anticuerpos contra otros marcadores también están disponibles en el mercado, p. ej., CD34, CD38 y CD45 se pueden adquirir a, p. ej., StemCell Technologies o BioDesign International.

- 5 La población aislada de células madre de placenta puede comprender células de la placenta que no son células madre, o células que no son células de la placenta.

Las poblaciones de células madre de placenta aisladas pueden estar combinadas con una o más poblaciones de células que no son células madre o de células que no son de la placenta. Por ejemplo, una población aislada de células madre de placenta puede estar combinada con sangre (p. ej., sangre de la placenta o sangre del cordón umbilical), células madre procedentes de la sangre (p. ej., células madre procedentes de la placenta o de la sangre del cordón umbilical), poblaciones de células nucleadas procedentes de la sangre, células mesenquimatosas procedentes de la médula ósea, poblaciones de células madre procedentes de hueso, médula ósea bruta, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas en un tejido, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (p. ej., condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.) y similares. Las células de una población de células madre de placenta aisladas se pueden combinar con una gran cantidad de células de otro tipo en proporciones 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, que comparan el número de células nucleadas totales en cada población. De igual forma, las células en una población aislada de células madre de placenta se puede combinar con una gran cantidad de células de una gran cantidad de tipos de células.

En un aspecto, una población aislada de células madre de placenta se combina con una gran cantidad de células madre hematopoyéticas. Tales células madre hematopoyéticas pueden, por ejemplo, estar contenidas dentro de la sangre del cordón umbilical de la placenta sin procesar o de la sangre periférica; en las células nucleadas totales de sangre de placenta, de sangre del cordón umbilical o de sangre periférica; en una población aislada de células CD34⁺ de sangre de la placenta, de sangre del cordón umbilical o de sangre periférica; en médula ósea sin procesar; en las células nucleadas totales de la médula ósea; en una población aislada de células CD34⁺ de la médula ósea, o similares.

5.5 Conservación de las células madre de placenta

Las células madre de placenta se pueden conservar, es decir, colocarse en las condiciones que permiten el almacenamiento a largo plazo, o en las condiciones que inhiben la muerte celular mediante, p. ej., apoptosis o necrosis.

Las células madre de placenta se pueden conservar mediante, p. ej., una composición que comprende un inhibidor de la apoptosis, inhibidor de la necrosis y/o un perfluorocarburo que lleva oxígeno, como se describe en la solicitud provisional relacionada de los EE.UU. n.º 60/754.969 titulada «Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition» registrada el 25 de diciembre de 2005. En un aspecto, la invención da a conocer un procedimiento para conservar una población de células madre que comprende poner en contacto dicha población de células madre con una composición para la recogida de células madre que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarburo que lleva oxígeno, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células madre, en comparación con una población de células madre que no se han puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En un aspecto, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de caspasa. En otro aspecto, dicho inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de JNK. En otro aspecto, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación ni la proliferación de dichas células madre. En otro aspecto, dicha composición para la recogida de células madre comprende dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo que lleva oxígeno en fases distintas. En otro aspecto, dicha composición para la recogida de células madre comprende, en una emulsión, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo que lleva oxígeno. En otro aspecto, la composición para la recogida de células madre comprende adicionalmente un emulsionante, p. ej., lecitina. En otro aspecto, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo se encuentran entre 0 °C y aproximadamente 25 °C en el momento de entrar en contacto con las células madre. En otro aspecto, dicho inhibidor de la apoptosis y dicho perfluorocarburo se encuentran entre aproximadamente 2 °C y 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 5 °C, en el momento de entrar en contacto con las células madre. En otro aspecto, dicha puesta en contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células madre. En otro aspecto, dicha puesta en contacto se realiza durante la congelación y descongelación de dicha población de células madre.

En otro aspecto, se describe un procedimiento de conservación de una población de células madre de placenta que comprende poner en contacto dicha población de células madre con un inhibidor de la apoptosis y un compuesto que conserva el órgano, en donde dicho inhibidor de la apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o impedir la apoptosis en la población de células madre, en comparación con una población

de células madre que no se han puesto en contacto con el inhibidor de la apoptosis. En un aspecto, el compuesto que conserva el órgano es una solución UW (descrita en la patente de los EE.UU. n.º 4.798.824; también conocida como ViaSpan; véase también Southard et al., *Transplantation* 49 (2): 251-257 (1990)) o una solución descrita en Stern et al., patente de los EE.UU. n.º 5.552.267. En otro aspecto, dicho compuesto que conserva el órgano es almidón hidroxietilado, ácido lactobiónico, rafinosa o una combinación de los mismos. En otro aspecto, la composición para la recogida de células madre comprende adicionalmente un perfluorocarburo que lleva oxígeno, bien en dos fases o bien como una emulsión.

En otro aspecto del procedimiento, las células madre de placenta se ponen en contacto durante la perfusión con una composición para la recogida de células madre que comprende un inhibidor de la apoptosis y un perfluorocarburo que lleva oxígeno, compuesto para la conservación del órgano, o combinación de los mismos. En otro aspecto, dichas células madre se ponen en contacto durante un proceso de rotura del tejido, p. ej., digestión enzimática. En otro aspecto, las células madre de placenta se ponen en contacto con dicho compuesto para la recogida de las células madre tras la recogida mediante perfusión, o tras la recogida mediante rotura del tejido, p. ej., por digestión enzimática.

Típicamente, durante la recogida, enriquecimiento y aislamiento de las células de la placenta, es preferible disminuir al mínimo o eliminar el estrés celular debido a la hipoxia y al estrés mecánico. En otro aspecto del procedimiento, por consiguiente, una célula madre, o una población de células madre, se expone a una condición hipóxica a lo largo de la recogida, enriquecimiento o aislamiento durante menos de seis horas en el transcurso de dicha conservación, en donde una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración de oxígeno en la sangre normal. En un aspecto, dicha población de células madre se expone a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas en el transcurso de dicha conservación. En otro aspecto, 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 y aislamiento. En otro aspecto, dicha población de células madre no se expone al estrés por cizalla durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento.

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se pueden crioconservar, p. ej., en un medio de crioconservación en envases pequeños, p. ej., ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero sin limitación, un medio de cultivo que incluye, p. ej., medio de crecimiento, o un medio de congelación celular, por ejemplo el medio de congelación de células disponible comercialmente, p. ej., C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación comprende preferiblemente DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración de, p. ej., aproximadamente el 10% (v/v). El medio de crioconservación puede comprender otros agentes, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células madre de placenta se enfrían preferiblemente en aproximadamente 1 °C/min durante la crioconservación. Una temperatura de crioconservación preferida es de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -180 °C, preferiblemente de aproximadamente -125 °C a aproximadamente -140 °C. Las células crioconservadas se pueden transferir a nitrógeno líquido antes de la descongelación para el uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90 °C, se transfieren a una zona de almacenamiento en nitrógeno líquido. Las células crioconservadas se descongelan preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

5.6 Usos de las células madre de placenta

5.6.1 Composiciones que comprenden las células madre de placenta

Los procedimientos de supresión de células tumorales de la presente invención pueden utilizar composiciones que comprenden células madre de placenta o biomoléculas de las mismas. De la misma manera, las grandes cantidades y las poblaciones de células madre de placenta para el uso de acuerdo con la presente invención se pueden combinar con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable para el uso en, p. ej., investigación o terapéutica.

5.6.1.1 Células madre de placenta crioconservadas

Las poblaciones de células madre de placenta supresoras de células tumorales para el uso de acuerdo con la invención se pueden conservar, por ejemplo, crioconservar, para el uso posterior. Los procedimientos para la crioconservación de las células, tales como las células madre, se conocen bien en la técnica. Las poblaciones de células madre de placenta se pueden preparar de una forma que es fácilmente administrable a un individuo. Por ejemplo, en la presente memoria se describe una población de células madre de placenta que está contenida dentro de un envase que es adecuado para el uso médico. Tal envase puede ser, por ejemplo, una bolsa de plástico, frasco, tarro, u otro envase estéril, desde el cual la población de células madre de placenta se puede dispensar con facilidad. Por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa médicamente aceptable de plástico adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un paciente. El envase es preferiblemente uno que permite la crioconservación de la población combinada de células madre.

Las poblaciones de células madre de placenta supresoras de células tumorales y crioconservadas pueden comprender células madre de placenta de un único donante, o de varios donantes. La población de células madre

de placenta puede ser completamente histocompatible con un paciente determinado, o parcial o completamente histoincompatible.

Así pues, en un aspecto, en la presente memoria se describe una composición que comprende una población de células madre de placenta supresoras de células tumorales en un envase. En un aspecto, la población de células madre está crioconservada. En otro aspecto, el envase es una bolsa, frasco o tarro. En un aspecto, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En un aspecto, dicha bolsa es adecuada, permite, o facilita, la administración intravenosa de dicha población de células madre de placenta. La bolsa puede comprender varias cavidades o compartimentos que están interconectados para permitir la mezcla de las células madre de placenta y una o varias soluciones diferentes, p. ej., un fármaco, antes de, o durante, la administración. En otro aspecto, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la crioconservación de la población combinada de células madre. En un aspecto, dicha población de células madre de placenta está contenida dentro de una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En un aspecto, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl al 0,9%. En otro aspecto, dicha población de células madre de placenta comprende células de la placenta que son histocompatibles con un paciente receptor de dicha población de células madre. En otro aspecto, dicha población combinada de células madre comprende células de la placenta que son al menos parcialmente histoincompatibles con un destinatario de dicha población de células madre. En otro aspecto, dichas células madre de placenta proceden de una gran cantidad de donantes.

5.6.1.2 Composiciones farmacéuticas

Las poblaciones de células madre de placenta supresoras de células tumorales, o las poblaciones de células que comprenden células madre de placenta, se pueden formular en composiciones farmacéuticas para el uso *in vivo*. Tales 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, p. ej., una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable aceptada para la administración *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender alguna de las poblaciones de células madre de placenta, o tipos de células madre de placenta, descritas en otro lugar en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células madre de placenta fetales, maternas, o tanto fetales como maternas. Las composiciones farmacéuticas pueden además comprender células madre de placenta obtenidas de un solo individuo o placenta, o de una gran cantidad de individuos o placentas.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender cualquier cantidad de células madre de placenta supresora de células tumorales. Por ejemplo, una única dosis unitaria de células madre de placenta puede comprender, en distintas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células madre de placenta.

Las composiciones farmacéuticas comprenden poblaciones de células que comprenden un 50% o más de células viables (es decir, al menos el 50% de las células de la población son funcionales o están vivas). Preferiblemente, son viables al menos el 60% de las células de la población. Más preferiblemente, son viables al menos el 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células de la población en la composición farmacéutica.

5.6.1.3 Medios acondicionados para células madre de placenta

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se pueden utilizar para producir un medio acondicionado que es supresor de células tumorales, es decir, que el medio comprende una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células madre que tienen un efecto supresor detectable sobre las células tumorales de una gran cantidad de uno o más tipos de células tumorales. En distintas realizaciones, el medio acondicionado comprende un medio en el cual las células madre de placenta han crecido 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 un medio en el cual las células madre de placenta han crecido hasta una confluencia de al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o hasta una confluencia del 100%. Tal medio acondicionado puede utilizarse para mantener el cultivo de una población independiente de células madre de placenta, o de células madre de otra clase. En otra realización, el medio acondicionado comprende un medio en el cual las células madre de placenta se han diferenciado en un tipo de células adultas. En otra realización, el medio acondicionado comprende un medio en el cual se han cultivado las células madre de placenta y las células madre que no son de la placenta.

Así pues, en un aspecto, en la presente memoria se describe una composición que comprende medio de cultivo de un cultivo de células madre de placenta, en donde dichas células madre de placenta (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de placenta que comprende las células madre de placenta, cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células de placenta que comprenden las células madre de placenta cuando dicha población se cultiva en las condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; y (c) suprimen de forma detectable el crecimiento o proliferación de una célula tumoral o de una población de células tumorales. En un aspecto, la composición comprende además una gran cantidad de

dichas células madre de placenta. En otro aspecto, la composición comprende una gran cantidad de células que no son de la placenta. En un aspecto, dichas células que no son de la placenta comprenden células CD34⁺, p. ej., células progenitoras hematopoyéticas, tales como células progenitoras hematopoyéticas de la sangre periférica, células progenitoras hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical, o células progenitoras hematopoyéticas de la sangre de la placenta. Las células que no son de la placenta pueden comprender también otras células madre, tales como células madre mesenquimatosas, p. ej., células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea. Las células que no son de la placenta pueden también ser uno o varios tipos de células adultas o de líneas celulares. En otro aspecto, la composición comprende un agente antiproliferativo, p. ej., un anticuerpo anti-MIP-1 α o anti-MIP-1 β .

En un aspecto, el medio o sobrenadante de cultivo acondicionado de células madre de placenta se obtiene de una gran cantidad de células madre de placenta cocultivadas con una gran cantidad de células tumorales a una proporción de células madre de placenta por células tumorales de aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, o aproximadamente 5:1. Por ejemplo, el medio o sobrenadante de cultivo acondicionado se puede obtener de un cultivo que comprende aproximadamente 1×10^5 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^6 células madre de placenta, aproximadamente 1×10^7 células madre de placenta o aproximadamente 1×10^8 células madre de placenta o más. En otro aspecto, el medio o sobrenadante de cultivo acondicionado se obtiene de un cocultivo que comprende de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^5 células madre de placenta y aproximadamente 1×10^5 células tumorales; de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 5×10^6 células madre de placenta y aproximadamente 1×10^6 células tumorales; de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^7 células madre de placenta y aproximadamente 1×10^7 células tumorales; o de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 5×10^8 células madre de placenta y aproximadamente 1×10^8 células tumorales.

En otra realización específica del procedimiento para suprimir el crecimiento o la proliferación de células tumorales, el medio o sobrenadante de cultivo acondicionado es un medio o sobrenadante de cultivo obtenido a partir de un cultivo que comprende un número de células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención solas o cocultivadas con células tumorales, en donde el número de células de placenta que produce el medio acondicionado se basa en el peso de un individuo al cual se ha de administrar el medio acondicionado. Por ejemplo, el medio o el sobrenadante del cultivo acondicionado puede ser medio o sobrenadante acondicionado producido mediante un cultivo que comprende aproximadamente 1×10^3 células madre de placenta por kg de la masa corporal de un paciente, 5×10^3 células madre de placenta/kg, 1×10^4 células madre de placenta/kg, 5×10^4 células madre de placenta/kg, 1×10^5 células madre de placenta/kg, 5×10^5 células madre de placenta/kg, 1×10^6 células madre de placenta/kg, 5×10^6 células madre de placenta/kg, 1×10^7 células madre de placenta/kg, 5×10^7 células madre de placenta/kg o 1×10^8 células madre de placenta/kg. En otra realización específica, el medio o sobrenadante de cultivo acondicionado se puede obtener de un cocultivo que comprende de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 5×10^3 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^3 células tumorales/kg, de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 5×10^4 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^4 células tumorales/kg; de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^5 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^5 células tumorales/kg; de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 5×10^6 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^6 células tumorales/kg; de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^7 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^7 células tumorales/kg, o de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 5×10^8 células madre de placenta/kg y aproximadamente 1×10^8 células tumorales/kg.

En una realización específica, el medio acondicionado adecuado para la administración a un individuo de 70 kg comprende sobrenadante acondicionado por aproximadamente 70 millones de células madre de placenta en un medio de cultivo de aproximadamente 200 ml.

Un medio acondicionado se puede concentrar para preparar un producto administrable con calidad farmacéutica. Por ejemplo, el medio acondicionado se puede concentrar a aproximadamente el 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o más mediante la retirada de agua, p. ej., por evaporación, liofilización o similares. En una realización específica, por ejemplo, un medio acondicionado de 200 ml de aproximadamente 70 millones de células madre de placenta se puede concentrar a un volumen de aproximadamente 180 ml, 160 ml, 140 ml, 120 ml, 100 ml, 80 ml, 60 ml, 40 ml, 20 ml o menos. El medio acondicionado puede estar sustancialmente seco, p. ej. en un polvo.

5.6.1.4 Matrices que comprenden células madre de placenta

En la presente memoria se describen adicionalmente matrices, p. ej., hidrogeles, armazones y similares que comprenden una población de células madre de placenta supresora de células tumorales, o una cantidad supresora tumoral de un medio acondicionado de células madre de placenta.

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se pueden inocular en una matriz natural, p. ej., un biomaterial de placenta tal como un material de la membrana amniótica. Tal material de membrana amniótica puede ser, p. ej., membrana amniótica diseccionada directamente de una placenta de mamífero; membrana amniótica tratada con calor o fijada, membrana amniótica sustancialmente seca (a saber, H₂O a < 20%), membrana coriónica, membrana coriónica sustancialmente seca, membrana corioamniótica sustancialmente seca y similares.

Los biomateriales de placenta preferidos en los cuales se pueden inocular las células madre de placenta se describen en Hariri, solicitud de publicación de los EE.UU. n.º 2004/0048796. La matriz, p. ej., hidrogel, se puede empapar con medio acondicionado para células madre, o preparar con dicho medio.

5 Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se pueden suspender en una solución de hidrogel adecuada para, p. ej., inyección. Los hidrogeles adecuados para tales composiciones incluyen péptidos de autoensamblaje, tal como RAD16. En una realización, una solución de hidrogel que comprende las células se puede dejar endurecer, por ejemplo, en un molde, para formar una matriz para la implantación que tiene células dispersas por ella. Las células madre de placenta en tal matriz también se pueden cultivar de tal modo que las células se expanden mitóticamente antes de la implantación. El hidrogel es, p. ej., un polímero orgánico (natural o sintético)
10 que está entreconectado mediante enlaces covalentes, enlaces iónicos o puentes de hidrógeno para crear una estructura de celosía abierta tridimensional que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. Los materiales que forman el hidrogel incluyen polisacáridos, tal como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliacrílatos, que se entrecruzan iónicamente, o polímeros en bloque, tal como copolímeros en bloque de óxido de polietileno-propilenglicol que se entrecruzan por temperatura o por pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o la matriz es biodegradable.
15

En algunos aspectos descritos en la presente memoria, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ* (véase, p. ej., la solicitud de publicación de la patente de EE.UU. 2002/0022676; Anseth et al., *J. Control Release*, 78 (1-3): 199-209 (2002); Wang et al., *Biomaterials*, 24(22): 3969-80 (2003).

20 En algunos aspectos, los polímeros son al menos parcialmente solubles en soluciones acuosas, tal como agua, soluciones salinas tamponadas o soluciones alcohólicas acuosas, que tienen grupos laterales cargados o una sal iónica monovalente del mismo. Ejemplos de polímeros que tienen grupos laterales ácidos que se pueden hacer reaccionar con cationes son poli(fosfacenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tal como poliestireno sulfonado. También pueden utilizarse los copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados por la reacción del ácido acrílico o metacrílico con monómeros o polímeros de éter de vinilo. Los ejemplos de grupos ácidos son grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos alcohólicos halogenados (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.
25

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención o cultivos de las mismas se pueden inocular en una estructura o armazón tridimensional e implantarse *in vivo*. Tal estructura se puede implantar en combinación con uno o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación del tejido o si no, facilitan o mejoran la puesta en práctica de la invención.
30

Ejemplos de armazones que se pueden utilizar en la presente invención incluyen esteras no tejidas, espumas porosas o péptidos autoensamblantes. Las esteras no tejidas se pueden formar con fibras de un copolímero absorbible sintético de ácido glucónico y láctico (p. ej., PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N. J.). Se pueden utilizar también como armazones las espumas compuestas de, p. ej., copolímero de poli(ϵ -caprolactona)/poli(ácido glucónico) (PCL/PGA), formado por procesos tal como la sublimación, o liofilización (véase, p. ej., patente de los EE.UU. n.º 6.355.699).
35

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención también pueden sedimentarse en, o ponerse en contacto con, un material cerámico fisiológicamente aceptable, que incluye, pero sin limitarse a ellos, fosfato de mono-, di-, tri-, α -tri-, β -tri-, y tetra-calcio, hidroxapatita, fluoroapatitas, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de magnesio y calcio, cristales biológicamente activos tal como BIOGLASS[®] y mezclas de los mismos. Los materiales cerámicos biocompatibles y porosos actualmente disponibles en el mercado incluyen SURGIBONE[®] (CanMedica Corp, Canadá), ENDOBON[®] (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS[®] (Mathys, AG, Betlach, Suiza) y productos para injerto de hueso de colágeno mineralizado tal como HEALOS[™] (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS[®], RHAKOSS[®] y CORTOSS[®] (Orthovita, Malvern, Pa.). La estructura puede ser una mezcla, combinación o composición de materiales naturales y/o sintéticos.
40
45

En otra realización, las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención se pueden inocular en, o poner en contacto con, un fieltro, que puede estar, p. ej., compuesto por un hilo de multifilamentos hecho de un material bioabsorbible tal como ácido hialurónico, o copolímeros o mezclas de PGA, PLA, PCL.

50 Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención pueden, en otra realización, inocularse en armazones de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Tales armazones de espuma pueden moldearse de una forma útil, de tal forma que una porción de una estructura específica del cuerpo que hay que reparar, reemplazar o aumentar. En algunas realizaciones, la estructura se trata, p. ej., con ácido acético a 0,1 M seguido de la incubación en polilisina, PBS y/colágeno, antes de la inoculación de las células de la invención para mejorar la adhesión celular. Las superficies externas de una matriz se pueden modificar para mejorar la adhesión o crecimiento de las células y la diferenciación del tejido, tal como revistiendo la matriz con plasma, o añadiendo una o más proteínas (p. ej., colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glucoproteínas, glucosaminoglucanos (p. ej., sulfato de heparina, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular y/o otros materiales tales como, pero sin limitarse a ellos, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas
55

vegetales, y similares.

En algunas realizaciones, el armazón comprende, o se trata con, materiales que lo convierten en no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden favorecer y mantener el crecimiento endotelial, la migración y el depósito de la matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero sin limitarse a ellos, materiales naturales tal como proteínas de la membrana basal tal como la laminina y el colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tal como ePTFE (politetrafluoroetileno expandido), y siliconas de poliuretano segmentadas, tal como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.). El armazón también puede comprender agentes antitrombóticos tal como heparina; los armazones también se pueden tratar para alterar la carga de la superficie (p. ej., revestimiento con plasma) antes de la sedimentación con células madre de placenta.

5.6.2 Politerapias

Las células madre de placenta, y las composiciones de células madre de placenta descritas en la presente memoria, pueden ser parte de una pauta terapéutica contra el cáncer que incluye uno o varios fármacos contra el cáncer. Tales fármacos contra el cáncer se conocen bien en la técnica. Los fármacos contra el cáncer específicos que se pueden administrar a un individuo que tiene cáncer incluyen, pero sin limitarse a ellos: acivicina; aclarubicina; hidrociluro de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleukina; altretamina; ambomicina; ametantrona; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparraginasas; asperlina; azacitidina; azatepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; bisantreno; bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero; carboplatino; carmustina; carubicina; carzelesina; cedefingol; celecoxib (inhibidor de COX-2); clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; hidrociluro de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; hidrociluro de eflomitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; hidrociluro de epirubicina; erbulozol; esorubicina; estramustina; fosfato sodio de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; hidrociluro de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fludarabina; fluorouracilo; fluorocitabina; fosquidona; fostriecina; gemcitabina; hidrociluro de gemcitabina; hidroxiurea; idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; iroplatino; irinotecán; hidrociluro de irinotecán; lanreotida; letrozol; leuprorelina; liarozol; lometrexol; lomustina; losoxantrona; masoprocol; maitansina; hidrociluro de metcloreptamina; megestrol; melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogillina; mitomalcina; mitomicina; mitospero; mitotano; mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamincina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfano; piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; perdnimustina; procarbazona; puromicina; hidrociluro de puromicina; pirazofurina; riboprina; safingol; hidrociluro de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreoptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; taxotere; tegafur; teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazoferina; tirapazamina; toremifeno; tretolona; triciribina; tirtretaxato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; tubulozol; uramustina; uredepa; vapreotida; verteporfina; vinblastina; vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; vinepidina; vinglicinato; vinleurosina; vinorelbina; vinrosidina; vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; y zorubicina.

Otros fármacos contra el cáncer incluyen, pero sin limitarse a ellos: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleukina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubincina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelis; proteína 1 morfogenética anti-dorsalizadora; antiandrógeno; carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glucinato de afidicolina; moduladores génicos de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1, axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de la bacatina III; balanol; batimastat, antagonistas de BCR/ABL; benzocloruros; benzoilestaurosoprina; derivados β -lactámicos; β -aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinileespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfofina C; derivados de la camptotecina; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de la caseína cinasa (ICOS); castañosespermina; cecropina B; cetorelix; cloros; sulfonamida de cloroquinolaxina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos del clomifeno; clotrimazol; collismicina A; collismicina B; combrestatina A4; análogo de la combrestatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de la criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidenmina B; desloreline; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diazicuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; 9-dihidrotaxol; dioxamicina; difenil-espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; doxorubicina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA, ebselén; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; episterida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; hidrociluro de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores del glutatión; hepsulfam; heregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido

ibandronico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imatinib (p. ej., GLEEVEC®), imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor 1 de crecimiento de tipo insulinoide; agonistas del interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; 4-ipomeanol; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinólido; kahalaluro F; triacetato de lamelarina-N, lanreotida; leinamicina; 5 lenograstim; sulfato de lentinan; leptolestatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón α de los leucocitos; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo lineal de poliaminas; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipófilos de platino; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; loxantrona; loxoribina, lurtotecán; texafirina + lutecio; lisofilina; péptidos lífticos; maitansina; manostatina A; 10 marimastat; masoprocol; maspina, inhibidores de matrilisina; inhibidores de la melatoproteinasa de la matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; mitoguzona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento del fibroblasto de mitoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; Erbitux; gonadotropina coriónica humana; lípido A monofosforilado + sk de la pared celular de miobacterias; mopidamol; fármaco contra el cáncer de la mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared celular de micobacterias; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituídas; naferelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; navapina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; 15 nemorubicina; ácido neridróico; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; oblimersen (GENASENSE®); O⁶-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor oral de citocinas; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos del paclitaxel; derivados del paclitaxel; palauamina; palmitoilirizoxina; ácido pamidróico; 20 panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosano polisulfato de sodio; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perillíco; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasas; picibanilo; hidrocloreuro de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario 25 basado en la proteína A; inhibidor de la proteína cinasa C; inhibidores de la proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la fosforilasa de nucleósidos de purina; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado del polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la farnesilo proteína transferasa ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; roitukina; romurtida; roquimex; 30 rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; imitadores de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de fijación a la somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiestatina 1; escualamina; estípiamida; inhibidores de la estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; 35 suradista; suramina; swainsonina; talimustina; tamoxifeno; taumustina; tazaroteno; tecogalan sódico; tegafur; telurapirilo; inhibidores de la telomerasa; temporfina; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrázomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; imitador de la trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de la timopoyetina; timotrinán; tiroestimulina; etiletiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrón; turosterida; 40 inhibidores de la tirosina cinasa; trifostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de la urocina; vapreotida; variolina B; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina, vorozol, zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalámero de zinostatina.

5.6.3 Ensayos

45 Las células madre de placenta se pueden utilizar en ensayos para identificar los compuestos o composiciones que realzan la capacidad de las células madre de placenta para suprimir la proliferación de células tumorales. Preferiblemente, el ensayo se utiliza para un tipo de cáncer cuya proliferación puede ser suprimida por las células tumorales en ausencia de tales compuestos o composiciones.

50 En un aspecto, las células madre de placenta se combinan con un compuesto problema y células tumorales, p. ej., una línea de células tumorales, y se determina el efecto de las células madre de placenta sobre las células tumorales, p. ej., en presencia y en ausencia del compuesto problema. Un compuesto problema mejora la capacidad que las células madre de placenta tiene para suprimir la proliferación de células tumorales si la proliferación de células tumorales se reduce de forma detectable cuando el compuesto problema está presente en comparación con cuando está ausente. En un aspecto, por ejemplo, en la presente memoria se describe un procedimiento para 55 identificar un compuesto que potencia la supresión tumoral de las células madre de placenta, que comprende poner en contacto una primera gran cantidad de células madre con una segunda gran cantidad de células tumorales en presencia de dicho compuesto en las condiciones que permiten la proliferación de células tumorales, en donde si dicho compuesto ocasiona un cambio detectable en la proliferación de células tumorales en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no se han puesto en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se 60 identifica como un compuesto que potencia la supresión tumoral de las células madre de placenta. La primera gran cantidad y la segunda gran cantidad pueden tener el mismo número, o diferente número, de células. En un aspecto, dichas células tumorales son células tumorales de una biopsia. En otro aspecto, dichas células tumorales son células de una línea de células tumorales.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para identificar, en un panel o conjunto de compuestos, un compuesto o una gran cantidad de compuestos que son los que potencian mejor la supresión de la proliferación de células tumorales ocasionada por las células madre de placenta. Ya que distintos cánceres tienen diferentes orígenes y características genéticas y bioquímicas, y diferentes etiologías, los diferentes compuestos pueden ser más o menos eficaces a la hora de potenciar la supresión de células tumorales debida a las células madre de placenta. Por ejemplo, tal panel o conjunto de compuestos puede ser un panel o conjunto de compuestos contra el cáncer o antineoplásicos, tal como, sin limitación, los compuestos contra el cáncer o antineoplásicos enumerados en el apartado 5.6.2 anterior. En tal aspecto, por ejemplo, las células tumorales obtenidas de un individuo que tiene cáncer se pueden analizar con un panel de compuestos, en presencia de células madre de placenta, para identificar una o una gran cantidad de dichos compuestos contra el cáncer o antineoplásicos que mejor se adaptan para tratar al individuo.

Así pues, en un aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para seleccionar un compuesto entre una gran cantidad de compuestos, que comprende, para cada compuesto en dicha gran cantidad de compuestos, poner en contacto una primera gran cantidad de células madre con una segunda gran cantidad de células tumorales en presencia de un compuesto en dicha gran cantidad de compuestos en las condiciones que permiten la proliferación de células tumorales, e identificar uno o varios de dichos compuestos en dicha gran cantidad de compuestos que potencian la proliferación de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de células tumorales que no se han puesto en contacto con dicho compuesto, hasta un nivel mayor que un estándar predeterminado. Tal estándar predeterminado puede ser, por ejemplo, un compuesto en dicha gran cantidad de compuestos que muestra el mayor grado de potenciación de dichos compuestos en dicha gran cantidad de compuestos; los compuestos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 en dicha gran cantidad de compuestos que muestran el mayor grado de mejora; el 5%, 10%, 15%, 20% mejor de dichos compuestos en dicha gran cantidad de compuestos que muestran el mayor grado de potenciación; alguno de dicha gran cantidad de compuestos que potencia el efecto supresor de células tumorales que tienen las células madre de placenta, etc. Preferiblemente, el procedimiento se utiliza para seleccionar 1, 2, 3, 4, o 5 compuestos para administrarlos a dicho individuo que tiene cáncer.

6. Ejemplos

6.1 Ejemplo 1: cultivo de células madre de placenta

Las células madre de placenta se obtienen de una placenta de mamífero después del parto bien por perfusión o bien por rotura física, p. ej., digestión enzimática. Las células se cultivan en un medio de cultivo que comprende DMEM-LG (Gibco) al 60%, MCDM-201 (Sigma) al 40%, suero de ternera fetal (STF) al 2% (Hyclone Laboratories), insulina-transferrina-selenio (ITS) a 1 x, ácido linolénico-seroalbúmina bovina a 1 x (AL-SAB), dexametasona (Sigma) a 10^{-9} M, 2-fosfato de ácido ascórbico (Sigma) a 10^{-4} M, factor de crecimiento epidérmico (EGF) a 10 ng/ml (R&D Systems), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) a 10 ng/ml (R&D Systems), y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomina.

El frasco de cultivo en el cual se cultivan las células se prepara tal y como se describe a continuación. Los frascos T75 se revisten con fibronectina (FN), mediante la adición de 5 ml de PBS que contiene 5 ng/ml de FN humana (Sigma F0895) al frasco. Los frascos con la solución de FN se dejan a 37 °C durante 30 min. Después se retira la solución de FN antes de cultivar las células. No hay necesidad de secar los frascos después del tratamiento. Alternativamente, los frascos se dejan en contacto con la solución de FN a 4 °C durante una noche o más; antes del cultivo, se calientan los frascos y se retira la solución de FN.

Células madre de placenta aisladas por perfusión

Los cultivos de células madre de placenta de perfundido de la placenta se establecen como se indica a continuación. Las células de un gradiente de Ficoll se inoculan en frascos T75 revestidos con FN, preparados como se indica más arriba, a 50-100 x 10^6 células/frasco en 15 ml de medio de cultivo. Típicamente, se inoculan de 5 a 10 frascos. Los frascos se incuban a 37 °C durante 12-18 horas para permitir la adhesión de las células adherentes. Se añaden 10 ml de PBS caliente a cada frasco para retirar las células en suspensión, y se mezcla con suavidad. A continuación, se retiran 15 ml del medio y se reemplazan con 15 ml de medio de cultivo nuevo. Todo el medio se cambia a los 3-4 días del comienzo del cultivo. Se realizan más cambios del medio de cultivo, durante los cuales se retira el 50% o 7,5 ml del medio.

Comenzando el día 12, se comprueba el cultivo con el microscopio para examinar el crecimiento de las colonias de las células adheridas. Cuando los cultivos de células llegan a la confluencia de casi el 80%, típicamente entre el día 13 y el día 18 tras el comienzo del cultivo, las células adheridas se recogen mediante digestión con tripsina. Las células recogidas de estos cultivos primarios se denominan pase 0 (cero).

Células madre de placenta aisladas mediante rotura física y digestión enzimática

Los cultivos de células madre de placenta se establecen a partir de tejido de la placenta digerido como se explica a continuación. La placenta perfundida se coloca en una hoja de papel estéril con el lado materno hacia arriba. Se raspan con una hoja de bisturí aproximadamente 0,5 cm de la capa de la superficie del lado materno de la placenta, y se utiliza la hoja de bisturí para retirar un bloque de tejido de la placenta que mide aproximadamente 1 x 2 x 1 cm.

A continuación, este tejido de placenta se pica en trozos de aproximadamente 1 mm³. Estos trozos 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 al baño María. La solución resultante se centrifuga a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se retira la solución de la digestión. El sedimento se resuspende en 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 inoculan a 13 ml por frasco T-75 revestido con fibronectina. Las células se incuban a 37 °C con una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Las células madre de placenta se crioconservan opcionalmente en esta etapa.

10 Subcultivo y expansión de células madre de placenta

Las células crioconservadas se descongelan rápidamente en un baño María 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 10 minutos a 400 g a temperatura ambiente. Las células se resuspenden suavemente en 10 ml de medio de cultivo caliente mediante pipeteo, y se determina el número de células viables mediante exclusión con azul de tripano. A continuación, las células se inoculan a aproximadamente 6000-7000 células/cm² en los frascos revestidos con FN, preparados como se explica más arriba (aproximadamente 5 x 10⁵ células por frasco T-75). Las células se incuban a 37 °C, CO₂ al 5% y humedad al 90%. Cuando las células alcanzan una confluencia del 75-85%, todos los medios gastados se retiran de los frascos en asepsia y se tiran. Se añaden 3 ml de una solución de tripsina al 0,25%/EDTA (p/v) para cubrir la capa de células, y las células se incuban a 37 °C, CO₂ al 5% y humedad al 90% durante 5 minutos. El frasco se golpea ligeramente una vez o dos para acelerar el desprendimiento de las células. Una vez que >95% de las células son redondas y están sueltas, se añaden 7 ml de medio de cultivo caliente a cada frasco T-75, y la solución se dispersa por pipeteo repetido sobre la superficie de la capa de células.

Tras contar las células y determinar la viabilidad tal y como se explica más arriba, las células se centrifugan 5 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente. Las células se someten a pases por resuspensión suave del sedimento celular de un frasco T-75 con el medio de cultivo, y finalmente por la siembra de las células en dos frascos T-75 revestidos con FN.

Con los procedimientos anteriores se identifica que las poblaciones de células madre de placenta adheridas que expresan marcadores CD105, CD117, CD33, CD73, CD29, CD44, CD10, CD90 y CD133, y que no expresan CD34 ni CD45. Las células pueden o no pueden expresar HLA-ABC y/o HLA-DR.

30 6.2 Ejemplo 2: aislamiento de células madre de estructuras placentarias

6.2.1 Materiales y métodos

6.2.1.1 Aislamiento del fenotipo de interés

De las placentas de embarazos normales a término se obtuvieron cinco poblaciones diferentes de células de placenta. Todas las donantes otorgaron un consentimiento completo por escrito para el uso de su placenta con fines de investigación. Se examinaron cinco poblaciones de células de la placenta: (1) perfundido de la placenta (de perfusión de la vasculatura de la placenta); y digestiones enzimáticas de (2) amnios, (3) corion; (4) placa amniocoriónica; y (5) cordón umbilical. Los diferentes tejidos de la placenta se limpiaron en PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y se colocaron en placas Petri estériles distintas. Los diferentes tejidos se picaron con un escalpelo quirúrgico estéril y se colocaron en tubos cónicos Falcon de 50 ml. Los tejidos picados se digirieron con colagenasa a 1 x (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 20 minutos en un baño María a 37 °C, se centrifugaron y, a continuación, se digirieron con tripsina al 0,25%/EDTA (Gibco-Invitrogen Corp) durante 10 minutos en un baño María a 37 °C. Los diferentes tejidos se centrifugaron tras la digestión y se enjuagaron una vez con PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corp). A continuación, las células reconstituidas se filtraron dos veces, una vez con coladores de células de 100 µm y una vez con filtros de separación de 30 µm, para retirar todo resto de matriz extracelular o de desecho celular.

6.2.1.2 Valoración de la viabilidad celular y número de células

Se empleó el procedimiento manual de exclusión con azul de tripano después de la digestión para calcular el número de células y valorar la viabilidad celular. Las células se mezclaron con el colorante azul de tripano (Sigma-Aldrich) a una proporción de 1:1, y se determinó la viabilidad de las células con un hemocitómetro.

50 6.2.1.3 Caracterización de los marcadores de la superficie celular

Se seleccionaron las células que eran HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ para caracterizarlas. Las células que tienen este fenotipo se identificaron, cuantificaron y caracterizaron mediante dos citómetros de flujo de Becton-Dickinson, el FACS Calibur y el FACS Aria (Becton-Dickinson, San José, CA, EE.UU). Se tiñeron las diferentes células de la placenta a una proporción de aproximadamente 10 µl de anticuerpo por 1 millón de células, durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Se utilizaron los siguientes anticuerpos contra humano: anticuerpos monoclonales conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra HLA-G (Serotec, Raleigh, NC), CD10 (BD

- 5 Immunocytometry Systems, San José, CA), CD44 (BD Biosciences Pharmingen, San José, CA) y CD105 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN); anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina (PE) contra CD44, CD200, CD117 y CD13 (BD Biosciences Pharmingen); estreptavidina conjugada a ficoeritrina-Cy5 (PE Cy5) y anticuerpos monoclonales contra CD117 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) contra CD33 y CD10 (BD Biosciences); estreptavidina conjugada a alofococianina (APC) y anticuerpos monoclonales contra CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 biotinilado (BD Biosciences Pharmingen). Tras la incubación, se enjuagaron las células una vez para retirar los anticuerpos sin fijar y se fijaron durante una noche con paraformaldehído al 4% (USB, Cleveland, OH) a 4 °C. Al día siguiente, las células se enjuagaron dos veces, se filtraron a través de un filtro de separación de 30 µm y se evaluaron en un citómetro de flujo.
- 10 Las muestras que se tiñeron con anticuerpos contra la IgG de ratón (BD Biosciences Pharmingen) se utilizaron como controles negativos y se utilizaron para ajustar los tubos fotomultiplicadores (PMT). Las muestras que se tiñeron únicamente con anticuerpos antihumanos se utilizaron como controles positivos y se utilizaron para ajustar los solapamientos/compensaciones espectrales.

6.2.1.4 Clasificación de células y cultivo

- 15 Un conjunto de células de la placenta (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 proporción de 10 µl de anticuerpo por 1 millón de células, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. A continuación, estas células se clasificaron positivamente como células vivas que expresan el fenotipo de interés en el BD FACS Aria y se sembraron en placas en el cultivo. Las poblaciones de células de la placenta clasificadas (población de interés) y «Todas» (sin clasificar) se sembraron en placa para las comparaciones. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos revestidos con fibronectina (Sigma-Aldrich) a la densidad celular recogida en la tabla 1 (células/cm²). La densidad celular, y si el tipo de célula se sembró en placas por duplicado o triplicado, venía determinado y gobernado por el número de células que expresaban el fenotipo de interés.

25 Tabla 1: Densidad a la que se sembraron las células

Cultivo en placas de 96 pocillos			
Densidad de las células sembradas			
Condiciones	Clasificadas	Todas	Densidad máx. todas
Fuente de las células	A		
Conjunto n.º 1	40,6 K/cm ²	40,6 K/cm ²	93,8 K/cm ²
Conjunto n.º 2	40,6 K/cm ²	40,6 K/cm ²	93,8 K/cm ²
Conjunto n.º 3	40,6 K/cm ²	40,6 K/cm ²	93,8 K/cm ²
Fuente de las células	B		
Conjunto n.º 1	6,3 K/cm ²	6,3 K/cm ²	62,5 K/cm ²
Conjunto n.º 2	6,3 K/cm ²	6,3 K/cm ²	62,5 K/cm ²
Fuente de las células	C		
Conjunto n.º 1	6,3 K/cm ²	6,3 K/cm ²	62,5 K/cm ²
Conjunto n.º 2	6,3 K/cm ²	6,3 K/cm ²	62,5 K/cm ²

- 30 En cada pocillo de la placa de 96 pocillos se añadió medio completo [DMEM-LG al 60% (Gibco) y MCDB-201 al 40% (Sigma); suero bovino fetal al 2% (Hyclone Labs); insulina-transferrina-selenio (ITS) a 1 x; ácido linoleico-seroalbúmina bovina (AL-SAB) a 1 x; dexametasona a 10⁻⁹ M (Sigma); 2-fosfato de ácido ascórbico a 10⁻⁴ M (Sigma); factor de crecimiento epidérmico a 10 ng/ml (R&D Systems); y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) a 10 ng/ml (R&D Systems)], y la placa se colocó en un incubador de CO₂ al 5%/37 °C. El día 7 se añadieron 100 µl del medio completo a cada uno de los pocillos. La placa de 96 pocillos se monitorizó durante aproximadamente 2 semanas y se completó una valoración final del cultivo el día 12.

6.2.1.5 Análisis de datos

- 35 Se analizaron los datos de FACS Calibur en FlowJo (Tree Star, Inc) con técnicas estándares de sincronización. Los datos de BD FACS Aria se analizaron con el programa informático FACSDiva (Becton-Dickinson). Los datos de FACS Aria se analizaron con sincronización de discriminación de dobletes para disminuir los dobletes al mínimo, así como técnicas de sincronización estándares. Todos los resultados se compilaron en Microsoft Excel y todos los valores, en la presente memoria se representan como la media ± desviación estándar (número, error estándar de la media).

6.2.2 Resultados

6.2.2.1 Viabilidad celular

Se valoró la viabilidad tras la digestión con el procedimiento manual de exclusión con azul de tripano (figura 1). La viabilidad media de las células obtenidas de la mayoría del tejido digerido (de amnios, corion o placa amniocoriónica) era de alrededor del 70%. El amnios produjo células con una viabilidad media del $74,35\% \pm 10,31\%$ ($n = 6$, EEM = 4,21), el corion tuvo una viabilidad media del $78,18\% \pm 12,65\%$ ($n = 4$, EEM = 6,32), la placa amniocoriónica tuvo una viabilidad media del $69,05\% \pm 10,80\%$ ($n = 4$, EEM = 5,40) y el cordón umbilical tuvo una viabilidad media del $63,30\% \pm 20,13\%$ ($n = 4$, EEM = 10,06). Las células de la perfusión, que no se sometieron a la digestión, conservaron la viabilidad media más alta, $89,98 \pm 6,39\%$ ($n = 5$, EEM = 2,86).

6.2.2.2. Cuantificación celular

Se analizaron las cinco poblaciones diferentes de células procedentes de la placenta para determinar el número de células HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺. A partir del análisis de los datos de BD FACS Calibur, se observó que el amnios, el perfundido y el corion contenían el mayor número total de estas células, $30,72 \pm 21,80$ células ($n = 4$, EEM = 10,90), $26,92 \pm 22,56$ células ($n = 3$, EEM = 13,02) y $18,39 \pm 6,44$ células ($n = 2$, EEM = 4,55) respectivamente. La placa amniocoriónica y el cordón umbilical contenían el menor número total de células que expresaban el fenotipo de interés, $4,72 \pm 4,16$ células ($n = 3$, EEM = 2,40) y $3,94 \pm 2,58$ células ($n = 3$, EEM = 1,49) respectivamente.

De igual forma, cuando se analizó el porcentaje de células totales que expresan el fenotipo de interés, se observó que el amnios y el perfundido de la placenta contenían los porcentajes más altos de células que expresan este fenotipo, $0,0319\% \pm 0,0202\%$ ($n = 4$, EEM = 0,0101) y $0,0269\% \pm 0,0226\%$ ($n = 3$, EEM = 0,0130), respectivamente (figura 2). Aunque el cordón umbilical contenía un pequeño número de células que expresan el fenotipo de interés (figura 2), contenía el tercer porcentaje más alto de células que expresan el fenotipo de interés, $0,020\% \pm 0,0226\%$ ($n = 3$, EEM = 0,0131) (figura 2). El corion y la placa amniocoriónica contenían los porcentajes más bajos de células que expresan el fenotipo de interés, $0,0184 \pm 0,0064\%$ ($n = 2$, EEM = 0,0046) y $0,0177\% \pm 0,0173\%$ ($n = 3$, EEM = 0,010), respectivamente (figura 2).

Acordes con los resultados del análisis de BD FACS Calibur, los datos de BD FACS Aria también identificaron que el amnios, el perfundido y el corion proporcionaban los números más altos de células HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ que las fuentes restantes. El número total medio de células que expresan el fenotipo de interés entre amnios, perfundido y corion fue de $126,47 \pm 55,61$ células ($n = 15$, EEM = 14,36), $81,65 \pm 34,64$ células ($n = 20$, EEM = 7,75) y $51,47 \pm 32,41$ células ($n = 15$, EEM = 8,37), respectivamente. La placa amniocoriónica y el cordón umbilical contenían el menor número total de células que expresaban el fenotipo de interés, $44,89 \pm 37,43$ células ($n = 9$, EEM = 12,48) y $11,00 \pm 4,03$ células ($n = 9$, EEM = 1,34), respectivamente.

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

Una vez que las células HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ se identificaron y cuantificaron de cada fuente de células, sus células se analizaron y caracterizaron adicionalmente por la expresión en su superficie celular de los marcadores HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 y CD105.

6.2.2.3 Células procedentes del perfundido de la placenta

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

6.2.2.4 Células procedentes del amnios

Las células procedentes del amnios eran siempre positivas para HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105, y CD13 (figura 5). La expresión media de cada marcador para las procedentes del amnios era la siguiente: el $57,27\% \pm 41,11\%$ ($n = 3$, EEM = 23,73) de las células expresaban HLA-G; el $16,23\% \pm 15,81\%$ ($n = 6$, EEM = 6,46) de las células expresaban CD33; el $62,32\% \pm 37,89\%$ ($n = 3$, EEM = 21,87) de las células expresaban

5 CD117; el 9,71% ± 13,73% (n = 3, EEM = 7,92) de las células expresaban CD10; el 27,03% ± 22,65% (n = 3, EEM = 13,08) de las células expresaban CD44; el 6,42% ± 0,88% (n = 2, EEM = 0,62) de las células expresaban CD200; el 57,61% ± 22,10% (n = 2, EEM = 15,63) de las células expresaban CD90; el 63,76% ± 4,40% (n = 2, EEM = 3,11) de las células expresaban CD38; el 20,27% ± 5,88% (n = 2, EEM = 4,16) de las células expresaban CD105; y el 54,37% ± 13,29% (n = 2, EEM = 9,40) de las células expresaban CD13.

6.2.2.5 Células procedentes del corion

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

6.2.2.6 Células de la placenta de la placa amniocoriónica

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

25 6.2.2.7 Células procedentes del cordón umbilical

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

35 En la figura 9 se muestra un resumen de la media de expresión de todos los marcadores.

6.2.2.8 Informe de clasificación de BD FACS Aria

40 Se tiñeron las tres diferentes poblaciones de células de la placenta que expresaban el mayor porcentaje de HLA ABC, CD45, CD34 y CD133 (células procedentes del perfundido, del amnios y del corion) con 7AAD y con los anticuerpos contra estos marcadores. Las tres poblaciones se clasificaron positivamente por células vivas que expresan el fenotipo de interés. Los resultados de la clasificación por BD FACS Aria se recogen en la tabla 2.

Tabla 2

Informe de clasificación de BD FACS Aria			
Fuente de las 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

45 Se sembraron en placa las tres poblaciones diferentes de células clasificadas positivamente («clasificadas») y sus correspondientes células sin clasificar, y los resultados del cultivo se valoraron el día 12 (tabla 3). Las células procedentes de perfundido clasificado, sembradas en placa a una densidad celular de 40.600/cm³, dieron lugar a pequeñas células redondas sin adherir. Dos de los tres conjuntos de células procedentes de perfundido sin clasificar, cada una sembrada en placa a una densidad de 40.600/cm³, dieron lugar a unas células mayoritariamente sin

adherir, redondas y pequeñas con varias células adheridas ubicadas en torno a la periferia del pocillo. Las células procedentes de perfundido sin clasificar, sembradas en placa a una densidad celular de 93.800/cm², dieron lugar en su mayoría a células sin adherir, pequeñas y redondeadas con varias células adheridas en torno a la periferia de los pocillos.

- 5 Las células clasificadas procedentes del amnios, al sembrarlas a una densidad celular de 6300/cm², dieron lugar a células redondas y pequeñas sin adherir. Las células sin clasificar, procedentes del amnios, al sembrarlas a una densidad celular de 6300/cm², dieron lugar a células sin adherir, redondas y pequeñas. Las células sin clasificar procedentes del amnios, al sembrarlas a una densidad celular de 62.500/cm², dieron lugar a células sin adherir redondas y pequeñas.
- 10 Las células clasificadas procedentes del corion, al sembrarlas a una densidad celular de 6300/cm², dieron lugar a células sin adherir redondas y pequeñas. Las células sin clasificar, procedentes del corion, al sembrarlas a una densidad celular de 6300/cm², dieron lugar a células sin adherir redondas y pequeñas. Las células sin clasificar procedentes del corion, al sembrarlas a una densidad celular de 62.500/cm², dieron lugar a células sin adherir redondas y pequeñas.
- 15 En otros experimentos, las poblaciones iniciales de las células redondas sin adherir que se describen más arriba, después del cultivo, se adherieron a la superficie para cultivo de tejidos, y tomaron una forma fibroblastoide característica. Típicamente, las células adheridas perdieron la expresión de CD117, y eran siempre CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ y CD200⁺.

6.3 Ejemplo 3: diferenciación de las células madre de placenta

- 20 Las células madre de placenta adheridas se diferenciaron en varias líneas celulares diferentes. Las células madre de placenta adheridas se aislaron de la placenta por alteración física del tejido de los sitios anatómicos dentro de la placenta, entre ellos la membrana amniótica, el corion, los cotiledones de la placenta o cualquier combinación de los mismos, y se obtuvieron células madre del cordón umbilical por rotura física del tejido del cordón umbilical.
- 25 Las células madre de placenta y las células madre de cordón umbilical se establecieron en un medio que contenía una concentración baja de suero de ternera fetal y pocos factores de crecimiento. El análisis de citometría de flujo mostró que las células madre de placenta presentaban típicamente un fenotipo CD200⁺ CD105⁺ CD73⁺ CD34⁻ CD45⁻ en porcentajes del \bar{y} %. Se encontró que las células madre de placenta se diferenciaban en líneas de adipocitos, condrocitos y osteocitos.
- 30 En un medio de inducción que contiene IBMX, insulina, dexametasona e indometacina, las células madre de placenta se convirtieron en adipocitos llenos de grasa al cabo de 3 a 5 semanas. Con unas condiciones de cultivo de inducción osteogénica, se encontró que las células madre de placenta forman nódulos de hueso y tienen depósitos de calcio en su matriz extracelular. La diferenciación condrogénica de las PDAC se realizó en microsedimentos y se confirmó mediante la formación de glucosaminoglucano en los agregados de tejido.

6.4 Ejemplo 4: supresión de células tumorales mediante el uso de células madre de placenta

- 35 Las células madre de placenta descritas en la presente memoria tienen la capacidad de suprimir el crecimiento y la proliferación de las células tumorales.

6.4.1 Materiales y métodos

- 40 Las líneas de células tumorales utilizadas incluían líneas de células linfoblastoides (LCL) de donantes de laboratorio, y líneas de células humanas compradas a la ATCC (LMC: CRL-2099; carcinoma canalicular de la mama: CRL-2343; leucemia linfoblástica aguda: CCL-119; carcinoma de colon: CRL-5942). Las líneas celulares utilizadas incluían retinoblastoma humano, linfoma histiocítico, carcinoma de pulmón, leucemia aguda, leucemia mielógena crónica, adenocarcinoma de colon y líneas de células de carcinoma de mama. Se obtuvieron las LCL mediante el cultivo de células mononucleares de la sangre periférica en presencia del VEB de la línea de VEB lítico B95.8 y ciclosporina A. Tras dos semanas en el medio R20 (RPMI 1640 y suero de ternera fetal (Celgro)), las células cancerosas se
- 45 mantuvieron en el medio R10. Las líneas de células tumorales se mantuvieron en el medio R10.

- 50 Las células madre del cordón umbilical (pase 3) obtenidas mediante digestión enzimática del tejido de cordón umbilical se sembraron en placas de 96 pocillos o en placas de 24 pocillos con o sin insertos Transwell[®]. Se realizaron cocultivos de células madre de placenta y de células tumorales utilizando la cantidad de células que se indica para los experimentos específicos (véase a continuación). Tras el cultivo, se recogieron las células tumorales sin adherir y se tiñeron con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) para valorar la viabilidad.

Para el análisis de las citocinas en el sobrenadante, se recogieron 50 μ l del sobrenadante de cultivo y se analizaron en un analizador LUMINEX[®] con una matriz de 25 citocinas: IL-1 β , IL-1ra, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL12p40, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- α , INF- α , IFN- γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, MIG, Eotaxina, RANTES y MCP-1.

6.4.2 Resultados

6.4.2.1 Supresión de distintas líneas de células tumorales

5 Para investigar la capacidad de supresión tumoral que tienen las células madre de placenta, se cultivaron células tumorales transformadas del VEB solas o con células madre de placenta procedentes de diferentes sitios de la placenta. Las células de LCL solas se hicieron crecer en cultivo durante 17 días hasta aproximadamente 40.000 células. Sin embargo, cuando las células de LCL se cultivaron en presencia de células madre de placenta de la placa amniocoriónica (AC) o de la membrana amniótica (MA), o células del cordón umbilical (CU), a una proporción de 1:2, el crecimiento se suprimió a aproximadamente 10.000 células, una supresión de aproximadamente el 75% (figura 10).

10 La supresión de la proliferación de las LCL debida a las células madre de placenta se comparó con la supresión debida a las células madre mesenquimatosas procedentes de la médula ósea (CMM-MO). Las LCL se cultivaron solas, con células madre de placenta o de CU, o con CMM-MO, durante seis días, momento en el cual se contaron las células en cada condición. Durante el transcurso de seis días de cultivo, las LCL solas proliferaron a aproximadamente 23.000 células. En cambio, las LCL + CMM-MO a una proporción de 1:2 dieron lugar a aproximadamente 38.000 células LCL. Sin embargo, sorprendentemente, la condición LCL + células madre de placenta (1:2) dio lugar a solo aproximadamente 5000 células LCL en seis días de cultivo, lo que indica que las células madre de placenta o las células madre del cordón umbilical eran significativamente más supresoras del crecimiento de las LCL que las CMM-MO. Véase la figura 11.

20 Para determinar la especificidad de la supresión tumoral debida a las células madre de placenta, se diseñó un panel de líneas de células tumorales de acuerdo con su relevancia para la epidemiología del cáncer humano. Todas las líneas de células tumorales se hicieron crecer en suspensión para facilitar su separación a partir de las células madre de placenta adheridas. Se realizó un experimento de titulación para determinar el efecto supresor de células tumorales que tenían las células madre de placenta sobre células del linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena (CLM), células de carcinoma canalicular de la mama, células de leucemia linfoblástica aguda o células de carcinoma de colon combinadas en proporciones de 0:1, 1:2, 1:1, 1,5:1 o 2:1 (figura 12). Las líneas de células de la placenta parecieron suprimir el linfoma histiocítico y la LMC lo máximo posible, lo que dio lugar a una supresión de aproximadamente el 60% y el 48%, respectivamente, a una proporción de 2:1 de células madre de placenta por células tumorales. No obstante, estas líneas celulares respondían a la dosis sólo ligeramente en las proporciones analizadas. La línea celular del carcinoma canalicular de mama mostró una mayor tendencia a responder en función de la dosis, como hizo la línea de la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Notablemente, las células del carcinoma de colon mostraron una supresión más débil en los casos de mayor cantidad de células madre de placenta.

30 Un experimento posterior (figura 13A), realizado de la misma manera con una recogida más grande de líneas de células tumorales y una proporción de células madre de placenta por células tumorales de 1:1 confirmó y expandió los resultados anteriores. Todas las líneas de células tumorales excepto el carcinoma de mama y la LLA se suprimieron del 50% al 75%, en comparación con las células tumorales que crecieron en ausencia de las células madre de placenta. Sin embargo, el carcinoma de mama y la LLA, que en el experimento anterior se habían suprimido moderadamente (10% al 20%) parecían que fueran activadas por las células madre de placenta durante el cocultivo. Es decir, el cocultivo incrementaba el número de células del carcinoma de mama y de LLA.

40 La dependencia del contacto que presentaba la supresión se valoró en un experimento con Transwell® (figura 13B). HL mostró la menor dependencia del contacto para la supresión, el 12%. La supresión de la LMC fue dependiente del contacto al 22%, mientras que la supresión de CAC fue del 42%, y la LCL fue dependiente del contacto al 51%. Los resultados mostraron de forma general una relación inversa entre la tasa de crecimiento de la línea de células tumorales y la dependencia del contacto para la supresión.

45 En conjunto, los datos indican que el retinoblastoma, el linfoma histiocítico y la LMC son los que se suprimen de forma más estable por la acción de las células madre de placenta.

6.4.2.2 Perfil de secreción de citocinas

50 Para investigar el perfil de la secreción de la supresión de tumores por las células madre de placenta, se recogieron sobrenadantes de cultivos de células madre de placenta, y los sobrenadantes se analizaron con un analizador LUMINEX® y una matriz de 25 citocinas. Se realizaron dos experimentos, uno sólo con la LCL y el segundo con el conjunto de ocho líneas de células tumorales, entre ellas las células de la LCL. En el primer experimento, tras un cultivo de seis días de células madre de placenta con las células LCL, se recogieron las células tumorales en suspensión, y se contaron las células vivas 7-AAD-. Como se observa en la figura 14A, la supresión de la proliferación de las LCL debida a las células madre de placenta depende mucho del contacto, ya que las células madre de placenta suprimieron la proliferación de las LCL en el cocultivo de pocillos abiertos, pero no en el cocultivo de Transwell®. El perfil de secreción de las citocinas, sin embargo, cambió sólo ligeramente entre las condiciones de pocillo abierto y Transwell® (figura 14B). La LCL sola secretó MIP-1α y MIP-1β en el orden de nanogramos por mililitro, mientras que el cocultivo contenía IL-6, IL-8 y MCP-1 en una cantidad que corresponde a la observada para las células madre de placenta solas. Los valores de MIP-1α y MIP-1β no cambiaron significativamente.

Para determinar los perfiles de la secreción de citocinas de una muestra más amplia de líneas tumorales, los sobrenadantes del experimento del cocultivo descrito en las figuras 15A y 15B se analizaron con la misma matriz de 25 citocinas. El perfil de secreción del cocultivo para el cocultivo de LCL/PDAC fue en buena parte similar dado que se detectaron las cantidades esperadas de IL-6, IL-8 y MCP-1. Sin embargo, no se halló ninguna cantidad significativa de MIP-1 α/β . Entre las otras siete líneas escrutadas, el linfoma histiocítico mostró un perfil similar a la LCL, mientras que en las otras seis líneas decayó el perfil de secreción global.

6.4.2.3 Conclusiones

A partir de los datos presentados en el ejemplo se puede concluir que las células madre de placenta muestran efectos supresores del crecimiento de células tumorales sobre un amplio abanico de líneas de células tumorales, entre ellos el linfoma histiocítico, leucemia mielógena crónica, adenocarcinoma de colon, retinoblastoma y carcinoma de pulmón. Estas líneas de células tumorales proceden de tipos de células de origen diverso, p. ej., epitelial, glandular y hematopoyético, lo que indica que las células madre de placenta pueden ser eficaces contra un amplio abanico de tipos de células en un contexto clínico. Estos efectos son parcialmente dependientes del contacto, y la dependencia del contacto puede correlacionarse con la velocidad de crecimiento del tumor. De las ocho líneas tumorales analizadas, las células del carcinoma de mama y de la LLA aparecen activadas por el cocultivo con las células madre de placenta.

6.5 Ejemplo 5: supresión de las células de la leucemia mielógena crónica gracias al uso de células madre de placenta

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención muestran la capacidad para suprimir el crecimiento de las células de la leucemia megacarioblástica de una manera dependiente del contacto.

6.5.1 Materiales y métodos

Las líneas de células tumorales utilizadas en estos estudios incluían la línea de células de leucemia mielógena crónica MEG-01 (células de leucemia megacarioblástica; ATCC n.º CRL-2021), linfoma histiocítico y líneas de las células de retinoblastoma.

Las células madre de cordón umbilical (CU), las células madre amniocoriónicas (AC), las células madre mesenquimatosas de la médula ósea (CMM-MO) o las células endoteliales de la vena umbilical de humano (CEVUH) se cultivaron solas o se cocultivaron con células tumorales durante 6 días en placas para cultivo de tejidos de 24 pocillos con un número de células inicial de 5×10^4 por pocillo. Así pues, cuando las células madre de placenta se cocultivaron con células tumorales a una proporción de 1:1, se inocularon por pocillo 5×10^4 células de cada tipo celular. Cuando se utilizó la proporción de 5:1, se inocularon 25×10^4 células madre de placenta con 5×10^4 células tumorales. La supresión de células tumorales se calculó mediante la comparación del número de células vivas (anexina-V⁻ 7-AAD⁻) en cocultivo con el número de células vivas en los cultivos de control (células tumorales solas).

Para los estudios sobre la apoptosis, las células MEG-01 cocultivadas se recogieron y se tiñeron con anexina V y yoduro de propidio 0, 3 y 6 días después del inicio del cocultivo, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para el análisis del ciclo celular, las células cocultivadas se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con yoduro de propidio 0, 1, 2, 3, 4 y 6 días después del inicio del cocultivo y se les analizó la distribución del contenido de ADN mediante citometría de flujo.

Para el análisis de las citocinas del sobrenadante, se recogieron 50 μ l del sobrenadante de cultivo y se analizaron las siguientes citocinas en un analizador LUMINEX[®]: factor de crecimiento derivado de las plaquetas AA (PDGF-AA), factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), oncogén α relacionado con el crecimiento (GRO α), y secreción del factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor de la necrosis tumoral α (TNF- α), factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), factor de crecimiento epidérmico (EGF), interleucina 2 soluble (sIL2) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

6.5.2 Resultados

Para corroborar la mejoría de la supresión del crecimiento de células tumorales debida a las células madre de placenta respecto a las células CMM-MO en otra línea de células tumorales, se determinó la supresión del crecimiento por las células madre de placenta para las células de leucemia mielógena crónica (LMC). Las células MEG-01 (leucemia megacarioblástica) se cultivaron solas, o se cultivaron con CMM-MO, células madre de cordón umbilical (CU) o células madre amniocoriónicas (CA) durante seis días a una proporción de 1:1. Se determinó el porcentaje de supresión de acuerdo con la fórmula: $100 - ([n.º \text{ anexina-V}^-, \text{ 7-AAD}^- \text{ en cocultivo} / n.º \text{ células anexina-V}^-, \text{ 7-AAD}^- \text{ cultivadas solas}] * 100)$. El cocultivo de las células MEG-01 con las CMM-MO dio lugar grosso modo a un 25% de supresión del crecimiento tras seis días de cocultivo. Sin embargo, el cocultivo de células MEG-01 con células madre de cordón umbilical o células madre de CA de placenta dio lugar a una supresión de más del 75% tras seis días; el cocultivo con células amniocoriónicas dio lugar a una supresión de más del 90% (figura 16A). Las células de linfoma histiocítico y las células de retinoblastoma también se suprimieron mediante el cocultivo con células madre del cordón umbilical; no obstante, la supresión de estas líneas celulares (HL: aproximadamente el 20%; Rb: aproximadamente el 50%) fue moderado en comparación con la supresión vista en las células MEG-01.

La cinética temporal de la supresión de MEG-01 debida a las células madre de placenta respecto a la supresión por las CMM-MO se muestra en la figura 16B. La supresión considerable de las células MEG-01 se observa a día 2 para el cocultivo tanto con CMM-MO como con células madre del cordón umbilical; sin embargo, la supresión del crecimiento se mantiene fuertemente en el cocultivo de las CU a día 6, mientras que el crecimiento se suprime sólo moderadamente mediante el cocultivo con las CMM-MO. Estos resultados muestran que el crecimiento de células tumorales lo suprimen mejor las células madre de placenta que las CMM-MO en las células de leucemia mielógena crónica (LMC) y corrobora que las células madre de placenta suprimen mejor el tumor en las células de LCL. Los resultados también sugieren que las células de LMC son particularmente susceptibles a la supresión por las células madre de placenta respecto a otros tipos de células de neoplasias hemáticas, p. ej., linfoma histiocítico, o tipos de células de tumores macizos, p. ej., retinoblastoma.

Sin desear comprometerse con ningún mecanismo o teoría particulares, se llevó a cabo una investigación sobre la manera en la que la supresión del crecimiento de células tumorales puede ser efectuada por las células madre del cordón umbilical. En particular, a las células MEG-01 cocultivadas con células de cordón umbilical durante 6 días se les examinó la presencia de marcadores apoptóticos, se analizó la inducción de la parada del ciclo celular y se valoró la maduración junto con la línea megacariocítica. La supresión del crecimiento no pareció producirse mediante la inducción de la apoptosis, ya que no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de las células MEG-01 vivas (anexina V⁻, YP⁻), apoptóticas (anexina V⁺, YP⁻) y necróticas (anexina V⁺, YP⁺) cocultivadas con células madre de cordón umbilical cuando se compararon con las células MEG-01 cultivadas solas, o las MEG-01 cocultivadas con células CEVUH (no se muestran los datos). Además, el cocultivo con células madre del cordón umbilical no pareció inducir la parada del ciclo celular, ya que no se observaron diferencias significativas en la distribución del contenido del ADN en las células MEG-01 cocultivadas con células madre del cordón umbilical, CEVUH, CMM-MO, o células MEG-01 cultivadas solas (no se muestran los datos). Además, la supresión del crecimiento de las MEG-01 debido a las células madre de cordón umbilical no pareció ser resultado de la maduración junto con la línea megacariocítica, ya que las células MEG-01 cocultivadas con células madre del cordón umbilical, CMM-MO y CEVUH mostraban todas ellas niveles similares de inducción del marcador de maduración de megacarioblastos CD36 (no se muestran los datos). Así pues, la supresión del crecimiento de las MEG-01 debido a las células madre de cordón umbilical parece producirse de una manera independiente de la maduración, del ciclo celular y de la apoptosis.

6.5.2.1 Supresión del crecimiento de MEG-01 independiente del contacto con las células madre de placenta

Para investigar la dependencia del contacto que tiene la supresión del crecimiento de MEG-01 debida a las células madre de placenta, se realizó un ensayo de la supresión del crecimiento que utilizó medios acondicionados de cocultivos de células madre de placenta/MEG-01 suprimidas (figura 17). Las células MEG-01 se hicieron crecer en medio con base de RPMI, y el medio era reemplazado por medio acondicionado de cocultivos de MEG-01/células madre de cordón umbilical, cocultivos de MEG-01/CMM-MO o cocultivos de MEG-01/CEVUH a 1:2 o 1:10 (medio acondicionado por medio sin acondicionar). Las células de control negativo (MEG solas) crecieron sin que el medio de partida fuera reemplazado por el medio acondicionado. Las células MEG-01 también se cultivaron directamente con células madre de cordón umbilical como control positivo (MEG/CU). Las células MEG-01 tratadas con el medio acondicionado del cocultivo de MEG-01/células madre de cordón umbilical (1:2) se suprimió con la misma magnitud que las células MEG-01 directamente cocultivadas con células madre de cordón umbilical (MEG/CU), lo que sugiere que el factor o factores de crecimiento solubles producidos por las células madre de cordón umbilical son responsables de la supresión del crecimiento de las células MEG-01.

6.5.2.2. Perfil de secreción de citocinas

Para investigar si los factores solubles presentes en los medios de cocultivo pueden estar implicados en la supresión de las células MEG-01, los sobrenadantes de MEG-01, células madre de CU, CMM-MO y CEVUH cultivadas solas, o células MEG-01 cocultivadas con células madre de CU, CMM-MO y CEVUH, respectivamente, se recogieron tras un cultivo de 6 días y se les analizó la presencia de las siguientes citocinas: FGF-2, TNF- α , GM-CSF, PDGF, EGF, GRO- α , sIL-2, VEGF y LIF. Se encontró que el PDGF-AA y el GM-CSF se secretaban mucho cuando las células PDAC se cultivaron con las células MEG-01, a unos niveles más allá de los observados cuando cualquiera de las líneas celulares se cultivaba sola (figura 18). El GRO- α se secretó mucho en los cocultivos de PDAC/MEG-01, y se encontraron concentraciones similares de GRO- α en las células PDAC cultivadas solas.

6.5.2.3 Conclusiones

Los resultados de los estudios de supresión del crecimiento de la línea de células de la leucemia megacarioblástica MEG-01 indican que el cocultivo con las células madre de placenta da lugar a una mejoría de la supresión del crecimiento de las células tumorales en comparación con el cocultivo con células madre mesenquimatosas de la médula ósea. Aunque los autores no quieren comprometerse con ninguna teoría de funcionamiento concreta, la supresión aparece como resultado de la inhibición del crecimiento, y no por la inducción de la apoptosis, parada del ciclo celular o maduración de las células MEG-01 junto con la línea de megacariocitos. La supresión debida a las células madre de placenta puede implicar la acción de factores de crecimiento solubles. Los factores candidatos incluyen PDGF-AA, GM-CSF, GRO- α y LIF. Aunque los autores no pretenden comprometerse con ninguna teoría, se cree que la secreción de estos factores puede ofrecer efectos beneficiosos *in vivo* al mejorar el efecto supresor del

crecimiento debido a las células madre de placenta a través de la atracción de la función inmunitaria innata y adaptativa.

5 Las células de la leucemia megacarioblástica mostraron una mayor sensibilidad al cocultivo de las células madre de placenta que otras líneas de células tumorales ensayadas (linfoma histiocítico, retinoblastoma), lo que sugiere que la leucemia mielógena crónica puede responder particularmente a aplicaciones terapéuticas de las composiciones de células madre de placenta.

6.6 Ejemplo 6. supresión de las células de linfoma y de leucemia mediante el uso de células madre de placenta

6.6.1 Materiales y métodos

10 Para confirmar y expandir adicionalmente los resultados obtenidos en la línea del linfoma mielógeno crónico MEG-01, se analizaron otras líneas de células de linfoma y de leucemia en busca de la supresión independiente del contacto debida a las células madre de cordón umbilical y a las células madre amniocoriónicas. Las líneas celulares utilizadas en este estudio incluían un número de líneas de células de leucemia disponibles de la ATCC, entre ellas la línea de linfoma megacarioblástico MEG-01 (ATCC n.º CRL-2021); línea de leucemia linfoblástica aguda CCRF-CEM (ATCC n.º CCL-119); línea de leucemia aguda de linfocitos T J.RT3-T3.5 (ATCC n.º TIB-153); linfoma histiocítico U937
15 (ATCC n.º CRL-1593.2); línea de leucemia mielógena aguda de la médula ósea KG-1 (ATCC n.º CRL-8031); y línea de leucemia mielógena crónica KU812 (ATCC n.º CRL. 2099).

20 Brevemente, líneas de células tumorales se cultivaron solas o se cocultivaron con células madre de cordón umbilical (CU) o con células madre de placenta amniocoriónicas (AC), en un formato de cocultivo directo (CD) y Transwell® (TW) sembradas en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (a menos que se especifique de otra manera) a una proporción de 1:1 y 5:1 (células madre por células tumorales). Tras siete días en cultivo, se recogieron las células tumorales de la suspensión, se resuspendieron en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato y se tiñeron con anexina V y yoduro de propidio. El número de células vivas (células anexina V⁻, YP⁻) se determinó con un citómetro de flujo FACS Calibur de Becton Dickinson.

6.6.2 Resultados

25 Los resultados de los análisis de supresión del crecimiento en líneas celulares de linfoma y de leucemia se presentan en la tabla 3. Los porcentajes representan el porcentaje de células vivas que permanecen tras un cocultivo de 7 días, respecto a las células de control cultivadas solas.

Tabla 3: supresión de las líneas celulares de linfoma y de leucemia debida a las células madre de cordón umbilical o a las células madre amniocoriónicas

Línea de células madre (cordón umbilical (CU); amniocoriónicas (AC))	Línea tumoral	1:1 TW	1:1 CD	5:1 TW	5:1 CD	1:1 TW MEG-01	1:1 CD MEG-01
CU1	CCRF-CEM	49%	32%	16%	3%	42%	16%
CU1	CCRF-CEM	48%	34%	16%	7%	60%	21%
AC1	CCRF-CEM	79%	49%	43%	31%	55%	41%
CU1	J.RT3-T3.5	56%	27%	28%	19%	71%	45%
AC1	J.RT3-T3.5	74%	105%	69%	34%	34%	28%
CU1	U937	50%	19%	11%	16%	45%	20%
CU1	KG1	76%	18%	60%	27%	43%	31%
CU1	KG1	68%	44%	50%	21%	53%	47%
CU2	KG1	131%	88%	139%	27%	50%	51%
CU3	KG1	117%	74%	17%	10%	31%	23%
CU4	KG1	118%	21%	82%	22%	38%	34%
AC1	KG1	87%	81%	102%	62%	68%	44%
CU4	KU812	47%	8%	23%	5%	67%	26%
AC1	KU812	91%	71%	42%	16%	58%	27%
AC1	KU812	21%	8%	17%	NA	48%	27%
AC1	KU812	12%	17%	12%	NA	69%	87%
AC2	KU812	42%	10%	42%	9%	49%	56%

La línea de células CCRF-CEM fue suprimida por las líneas de células de placenta CU1 y AC1 tanto en un formato de cultivo directo como en Transwell®. El cultivo directo con las células madre de placenta fue ligeramente más eficaz a la hora de suprimir el crecimiento de las CCRF-CEM que el formato Transwell®. Una proporción de cultivo de 5:1 fue más eficaz a la hora de suprimir el crecimiento de CCRF-CEM tanto en el formato directo como en el Transwell®.

Se observaron unos resultados similares para la línea U937. La supresión mediante el cocultivo directo fue sólo ligeramente más eficaz que la supresión mediante Transwell®, en donde 5:1 es la proporción de cultivo óptima. Las células KG-1 generalmente mostraron menos sensibilidad al cocultivo con células madre de placenta o de cordón umbilical; sin embargo, la supresión del crecimiento todavía se observó tanto en el cultivo directo como con el formato Transwell® cuando se cocultivó con las líneas de células madre de cordón umbilical CU1, CU3 y CU4. La supresión de las células KG-1 debido al cultivo directo fue más eficaz que la supresión mediante Transwell®, en donde una proporción de cultivo de 5:1 mostró mayor efecto supresor que una 1:1. Las células KU812 mostraron la sensibilidad más alta al cocultivo con células madre de placenta, ya que la supresión superó el 50% en casi todas las condiciones analizadas. La supresión mediante el cultivo directo fue más eficaz que la supresión mediante Transwell®; no obstante, la supresión de KU812 mediante Transwell® superó el 50% en una proporción de cultivo de 1:1.

Para eliminar la posibilidad de que la supresión del crecimiento se deba a un agotamiento de nutrientes tras siete días de cocultivo en un pocillo de cultivo de tejidos T24, los cocultivos se llevaron a cabo en frascos T25 con el mismo número de células de partida que el que utilizó en los ensayos con 24 pocillos (50 x 10³ células MEG-01). Así pues, los cocultivos se llevaron a cabo con eficacia en 10x la cantidad de nutriente que se proporcionó en el protocolo de T24. Las células MEG-01 cocultivadas con células madre del CU durante siete días a una proporción de 1:1 se suprimieron en un 51%; cuando se cultivaron a una proporción de 5:1, las células MEG-01 se suprimieron un 69%. De igual forma, cuando las células MEG-01 se cultivaron con células madre AC de placenta durante siete días a una proporción de 1:1, se observó una supresión del 53%; cuando se cocultivaron a una proporción de 5:1, se observó una supresión del 66% (no se muestran los datos). Estos resultados indican que la supresión *in vitro* de las células MEG-01 debida a las células madre de placenta no se debe al agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo.

6.6.2.1 Conclusiones

En conjunto, estos resultados demuestran que la supresión del crecimiento de las líneas de células de linfoma y de leucemia debida a las células madre de cordón umbilical y a las células madre amniocoriónicas es robusta y puede producirse de una manera independiente del contacto. Aunque la variabilidad entre experimentos se dejó notar en el grado de supresión dentro del mismo tipo de células tumorales, estos resultados reflejan de forma general la capacidad que las células madre de placenta, p. ej., células madre de cordón umbilical y células madre amniocoriónicas, tienen para suprimir el crecimiento de una serie de tipos de células tumorales de una manera independiente del contacto o directa. Tanto las células madre de cordón umbilical como las células madre amniocoriónicas mostraron siempre efectos supresores de más del 50% en cada una de las líneas tumorales ensayadas cuando se cocultivaron directamente a una proporción de 5:1 de células madre por células tumorales (con la excepción de las células KG1 tratadas con la línea de células madre AC1; se observó una supresión del 38%). Así pues, estos datos apoyan aún más la utilización de células madre de placenta en un contexto terapéutico para el tratamiento de diferentes tumores y, en particular, corroboran el uso de células madre de placenta para el tratamiento de tumores sanguíneos de distintos tipos celulares, entre ellos linfoma megacarioblástico, leucemia linfoblástica aguda, leucemia aguda de linfocitos T, linfoma histiocítico, leucemia mielógena aguda de la médula ósea y leucemia mielógena crónica.

6.7 Ejemplo 7: migración de las células madre de placenta en respuesta a SDF-1

Las células madre de placenta para el uso de acuerdo con la invención muestran la capacidad de migrar en respuesta a la presencia de la quimiostatina SDF-1.

6.7.1 Materiales y métodos

Para analizar la capacidad de migración de las células madre de placenta en respuesta a una quimiostatina, se midió la migración de las células madre de placenta en presencia del factor 1 derivado de las células del estroma (SDF-1) utilizando el kit de ensayo de migración celular CYTOSELECT™ de Cell Biolabs. El ensayo proporciona insertos membranosos de policarbonato (con un tamaño de poro de 8 µm) en una placa de 24 pocillos. La membrana sirve de barrera para discriminar las células migratorias de las células no migratorias. Las células migratorias son capaces de extender proyecciones hacia las quimiostatinas (a través de la reorganización del citoesqueleto de actina) y, finalmente, pasan a través de los poros de la membrana de policarbonato. A continuación, estas células migratorias se disocian de la membrana y posteriormente se detectan con un colorante que emite fluorescencia tras fijarse a los ácidos nucleicos celulares (colorante CYQUANT® GR; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Brevemente, se prepararon células madre de placenta del cordón umbilical en una suspensión celular en medio libre de suero. Se añadió única y directamente el SDF-1 a la suspensión celular, o se añadió en combinación con un bloqueante (AMD3100) de CXCR4, el receptor de SDF-1. Las células se analizaron tras 24 horas de incubación en un incubador

de cultivo celular.

6.7.2 Resultados

5 La figura 19 muestra que las células madre de placenta del cordón umbilical migraron al suero de ternera fetal y SDF-1. Las células madre de placenta incubadas sin añadir suero o SDF-1 mostraron una migración de células equivalente a 6,0 unidades de fluorescencia tras 24 horas en cultivo. La adición del 10% de STF a la suspensión celular dio lugar a la migración de células equivalente a 12,7 unidades de fluorescencia tras 24 horas. La adición de 10 1 µg/ml de SDF-1 dio lugar a la migración de células equivalente a 15,0 unidades de fluorescencia tras 24 horas. Sin embargo, la adición de AMD3100, un inhibidor del CXCR4, el receptor de SDF-1, suprimió significativamente la migración de células madre de placenta en respuesta al SDF-1. La migración de las células madre de placenta en presencia de SDF-1 y de AMD3100 dio lugar a 7,0 unidades de fluorescencia tras 24 horas, próximo al nivel de migración observado sin la adición de SDF-1 o suero.

Conclusiones

15 Estos resultados demuestran que las células madre de placenta tienen la capacidad de migrar en respuesta a una quimiotaxina específica. El CXCR4, que es el receptor de SDF-1, se expresa en muchas células tumorales. Así pues, estos resultados indican que la coadministración de SDF-1 y de células madre de placenta en un sitio tumoral puede prolongar la localización de las células madre de placenta al sitio tumoral deseado y facilitar la interacción entre las células tumorales y las células madre de placenta, lo que mejora los efectos supresores del crecimiento de células tumorales que presentan las células madre de placenta.

REIVINDICACIONES

1. Células madre de placenta para el uso en un procedimiento para el tratamiento de un individuo que tiene células tumorales, en donde dichas células madre de placenta suprimen la proliferación de dichas células tumorales cuando se ponen en contacto con dichas células tumorales, y en donde dichas células madre de placenta:
 - 5 expresan C200 y HLA-G;
 - expresan CD73, CD105 y CD200;
 - expresan CD200 y OCT-4; o
 - expresan CD73, CD105 y HLA-G.
- 10 2. Procedimiento *in vitro* para suprimir la proliferación de una gran cantidad de células tumorales que comprende poner en contacto dicha gran cantidad de células tumorales con células madre de placenta durante un tiempo suficiente para que dichas células madre de placenta supriman la proliferación de dicha gran cantidad de células tumorales, en comparación con una gran cantidad de dichas células tumorales que no se pone en contacto con células madre de placenta, y en donde dichas células madre de placenta:
 - 15 expresan CD73, CD105 y CD200;
 - expresan CD200 y OCT-4; o
 - expresan CD73, CD105 y HLA-G.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células tumorales son parte de un tumor macizo.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células tumorales son parte de una neoplasia hemática.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células tumorales son células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer de colon, células de cáncer de células escamosas, células de cáncer microcítico de pulmón,
 - 25 células de cáncer no microcítico de pulmón, células de cáncer digestivo, células de cáncer pancreático, glioblastoma, células de cáncer cervical, células de cáncer de ovario, células de cáncer de hígado, células de cáncer de vejiga, células de hepatoma, células de cáncer colorrectal, células de carcinoma de endometrio, células de carcinoma de glándulas salivales, células de cáncer de riñón, células de cáncer de hígado, células de cáncer vulvar, células de cáncer de tiroides, células de carcinoma hepático, células de linfoma megacarioblástico, células de leucemia aguda
 - 30 de linfoblastos o células de la leucemia mielógena aguda de la médula ósea.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha gran cantidad de células tumorales son células de linfoma histiocítico, células de leucemia mielógena crónica, células de leucemia aguda de linfocitos T, células de leucemia mielógena aguda, células de adenocarcinoma de colon, células de retinoblastoma o células de carcinoma de pulmón.
- 35 7. Células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho individuo es un mamífero o un humano.
8. Células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el procedimiento comprende la administración intravenosa de células madre de placenta a dicho individuo.
9. Células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el procedimiento
 - 40 comprende la administración de células madre de placenta en el sitio de dichas células tumorales, o adyacente a ellas.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células madre de placenta se han manipulado genéticamente para que expresen una citocina.
- 45 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células madre de placenta se han manipulado genéticamente para que expresen el IFN- β o la IL-2.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente poner en contacto dichas células tumorales con un compuesto contra el cáncer.

13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la gran cantidad de células madre de placenta es 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 o 1×10^8 células madre de placenta.
- 5 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células madre de placenta han proliferado *in vitro* durante no más de 5, 10, 20 o 30 duplicaciones de población.
- 10 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o células madre de placenta para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células madre de placenta suprimen dicha proliferación de células tumorales al menos al 50% o 75% en comparación con la proliferación de un número equivalente de células tumorales en ausencia de dichas células madre de placenta.

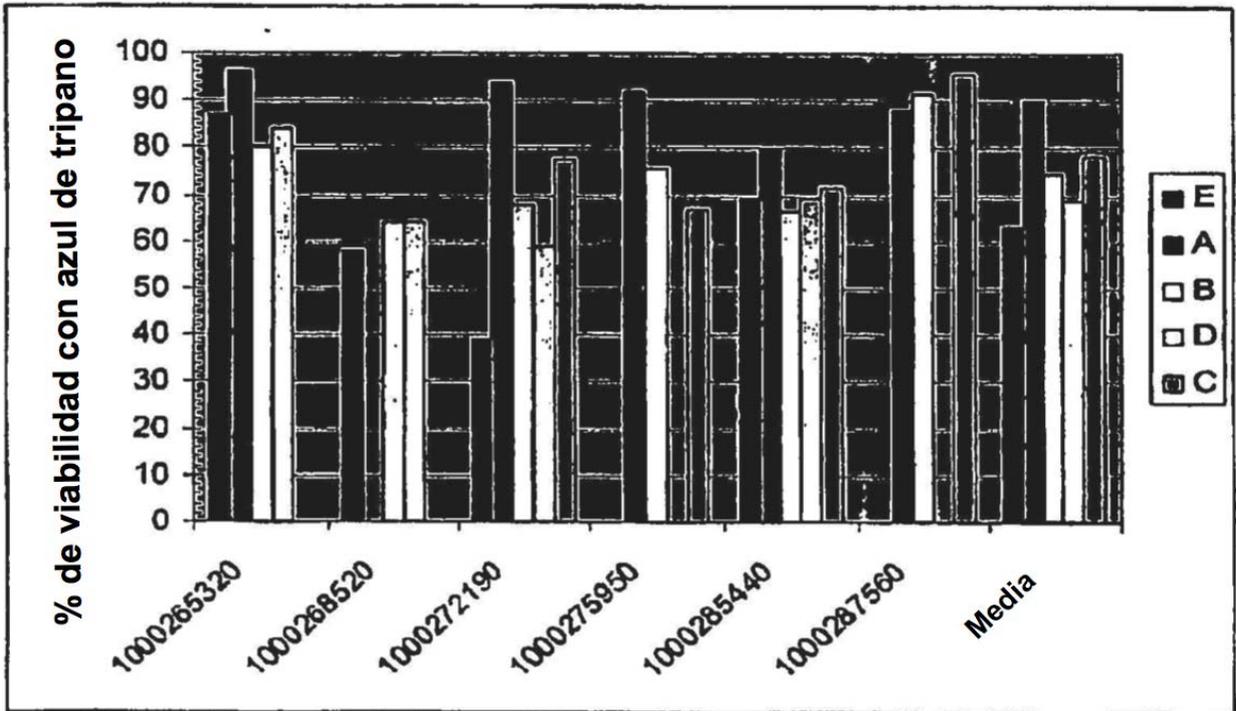


Figura 1

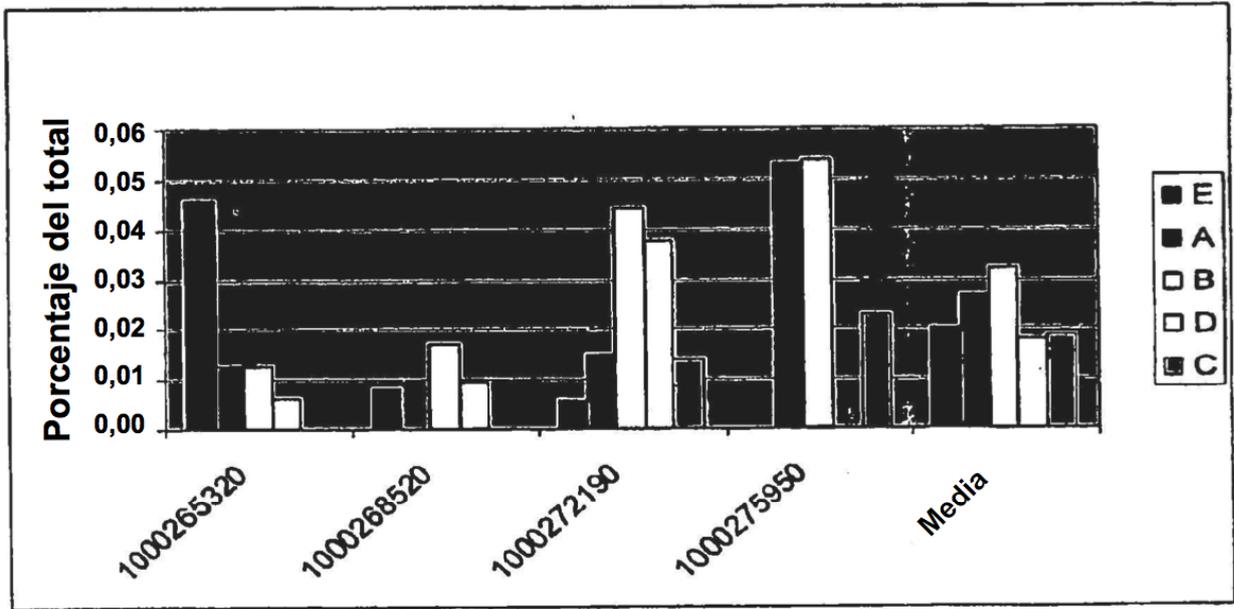


FIG. 2

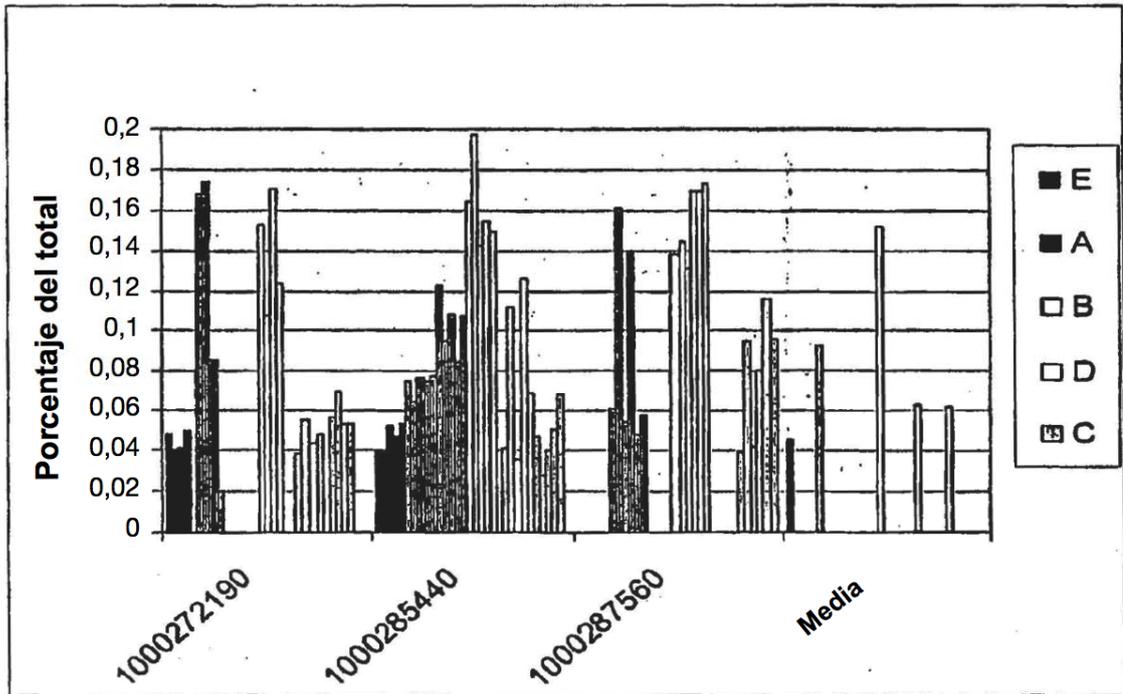


Figura 3

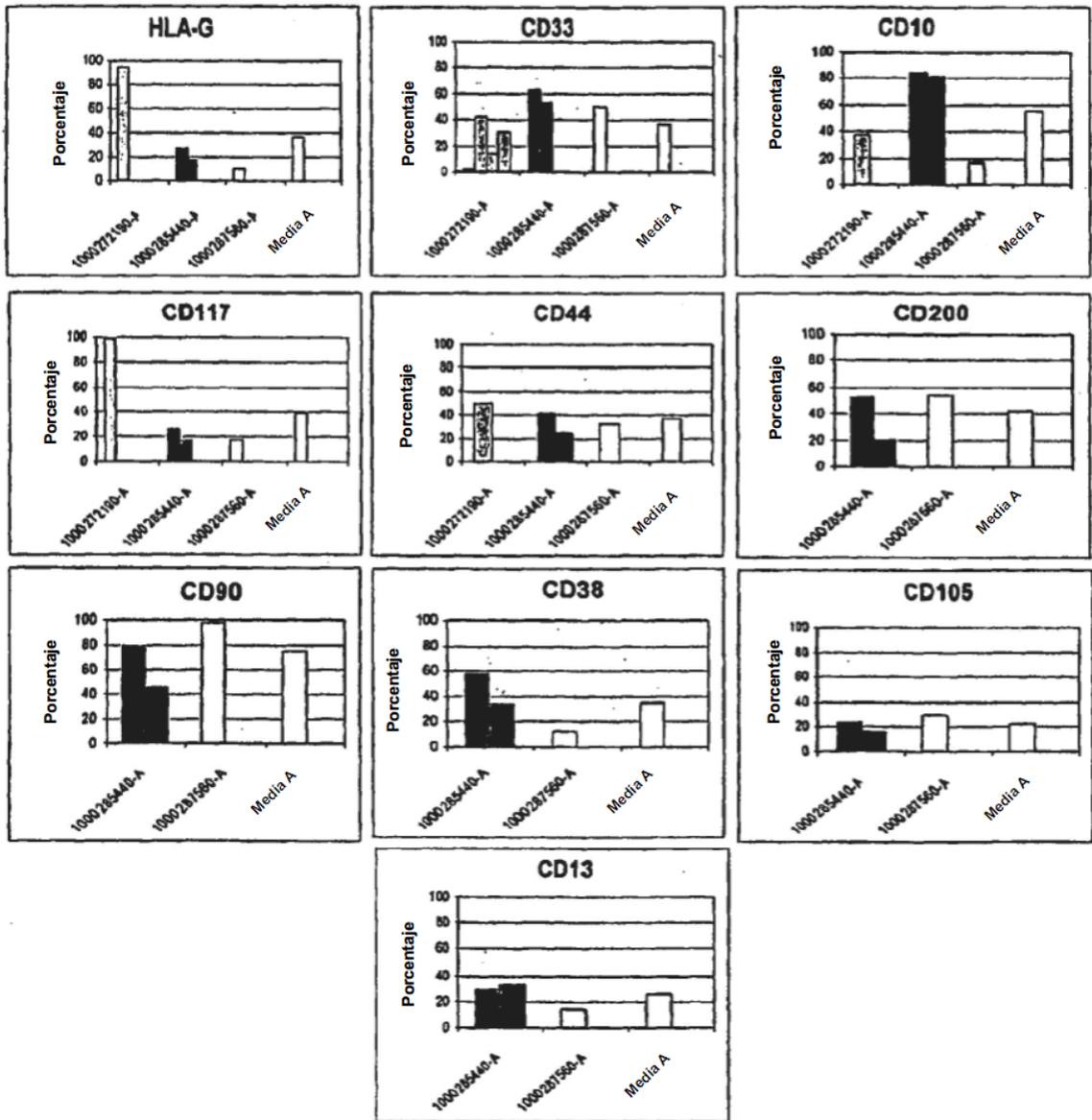


Figura 4

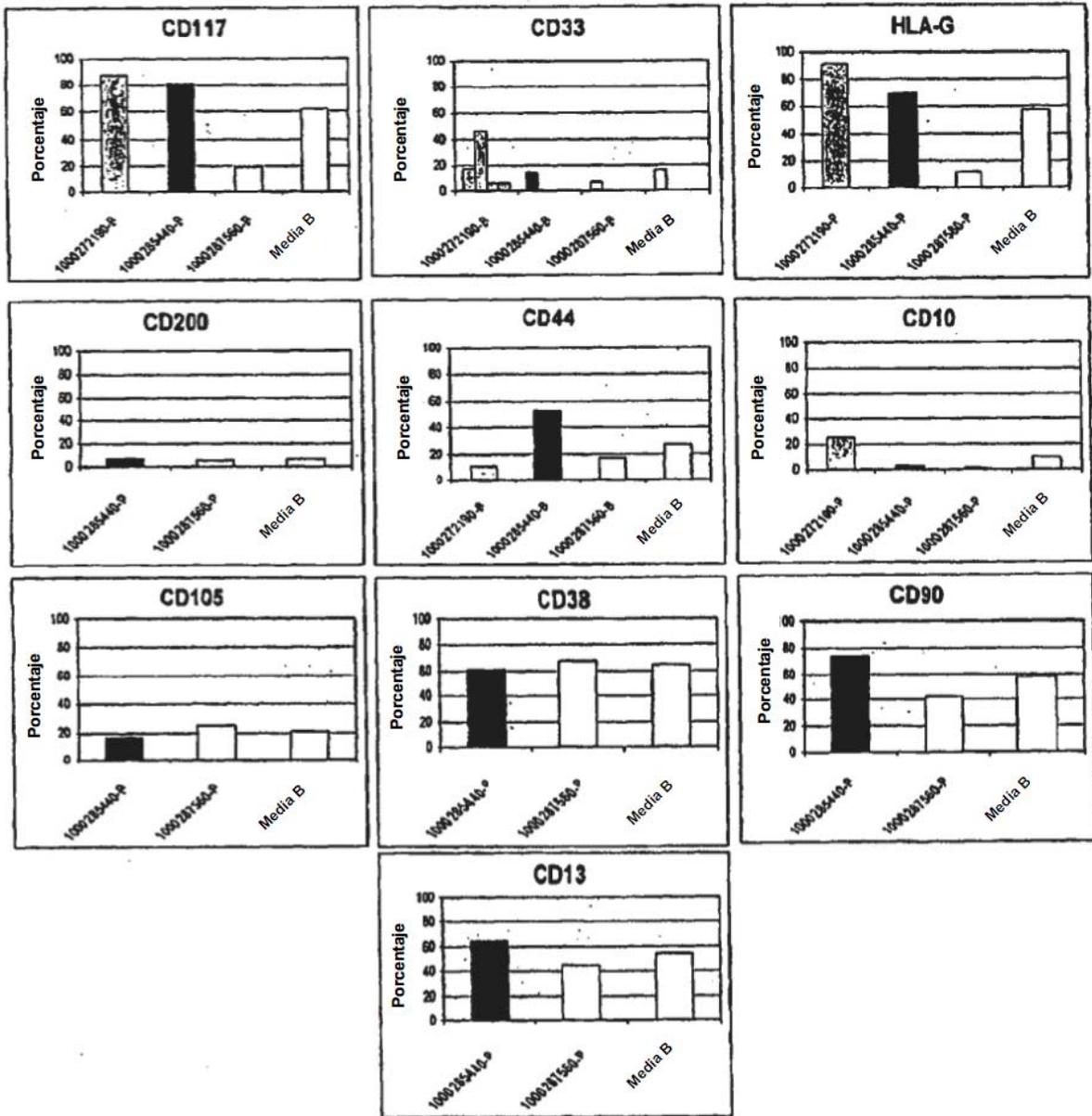


Figura 5

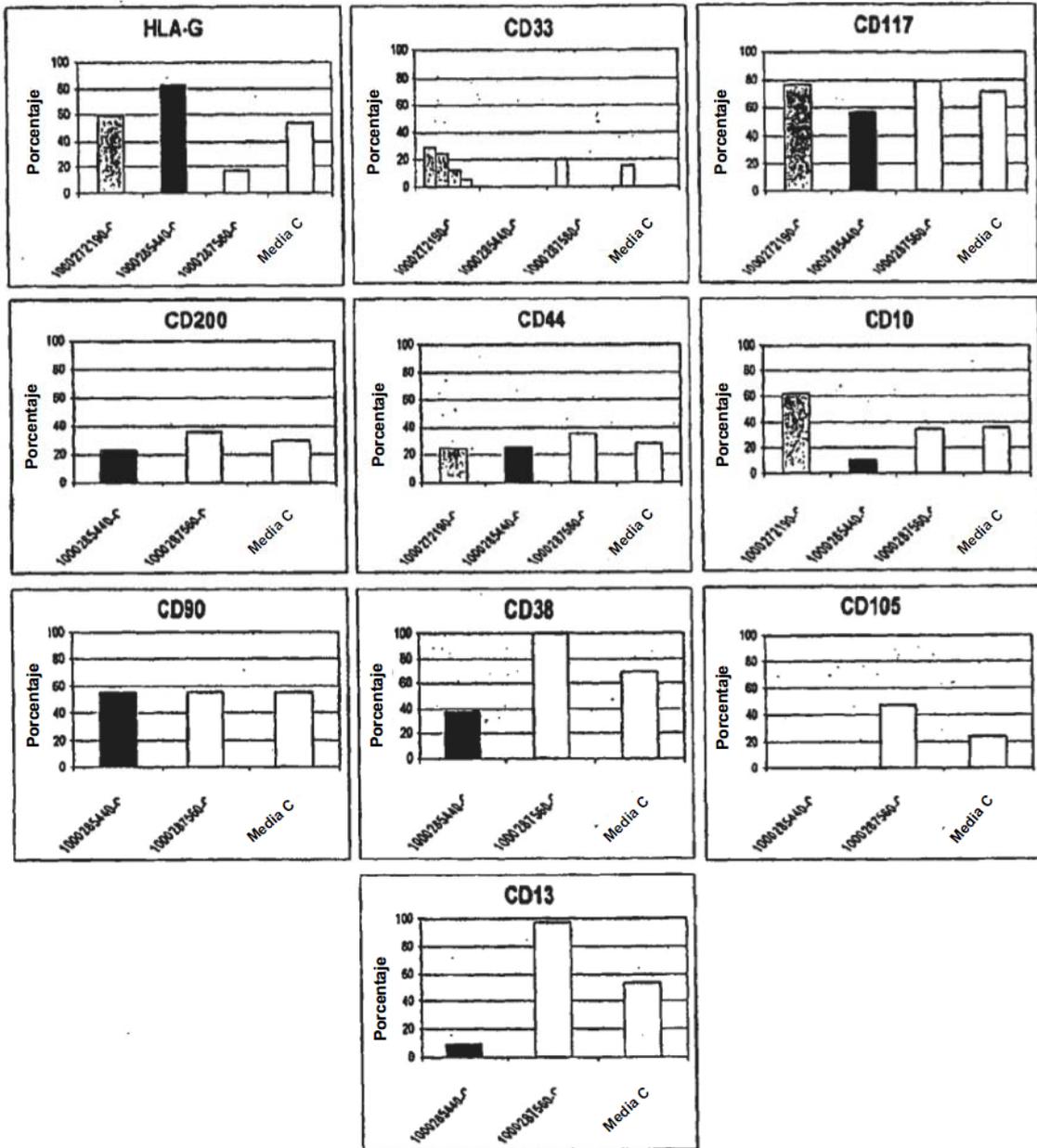


Figura 6

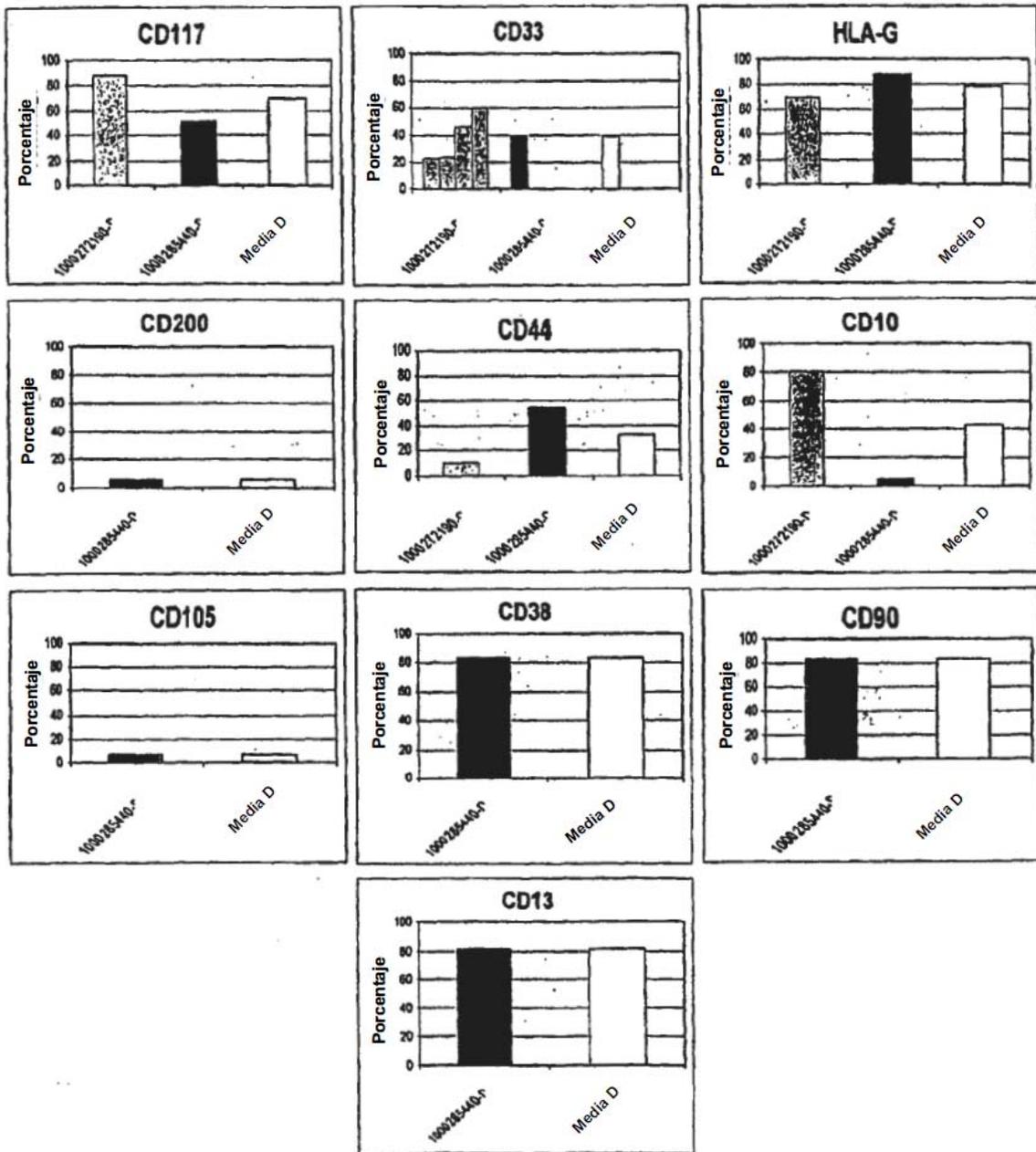


Figura 7

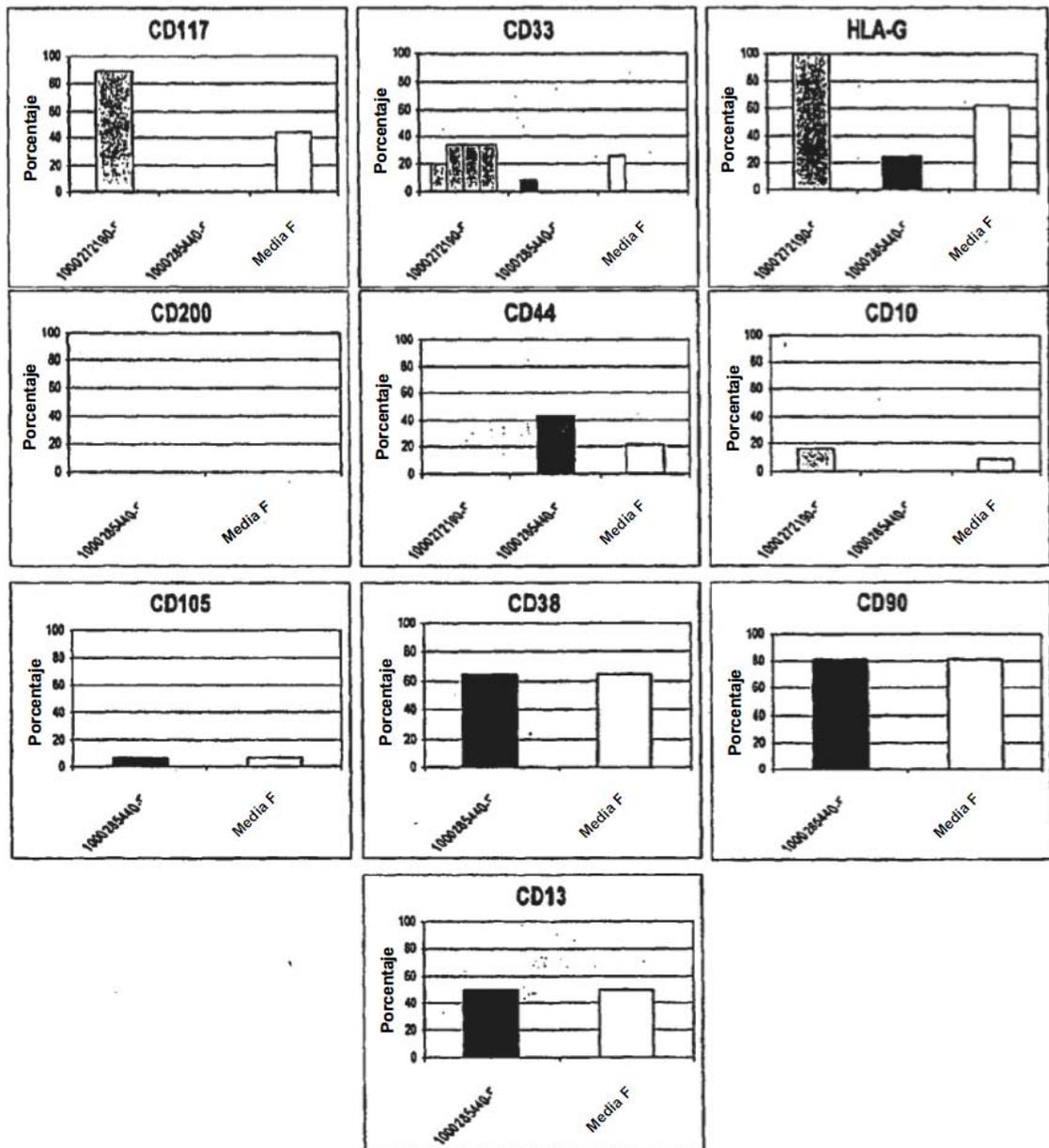


Figura 8

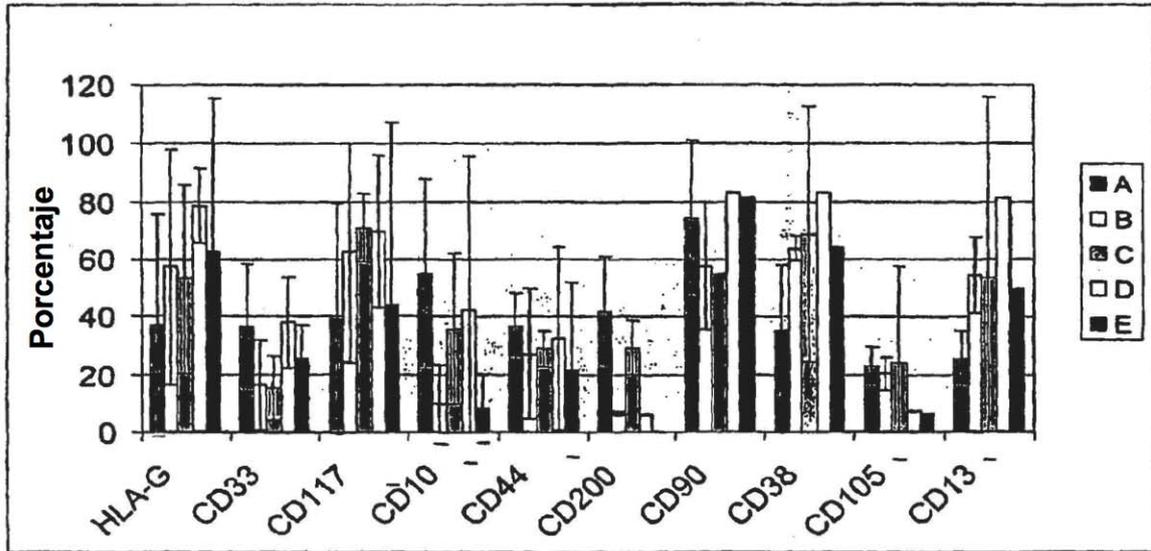


Figura 9

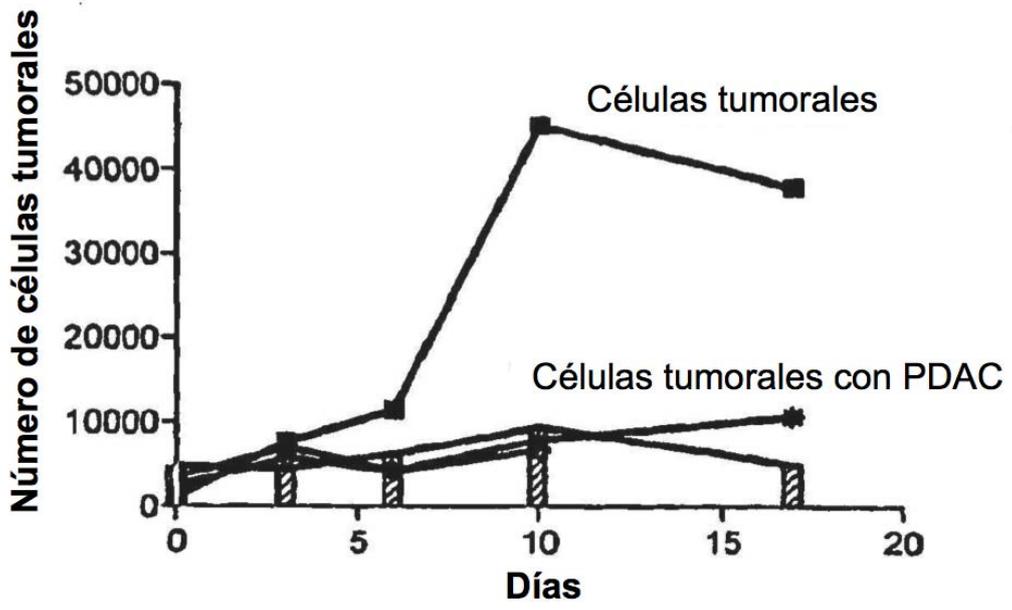


Figura 10

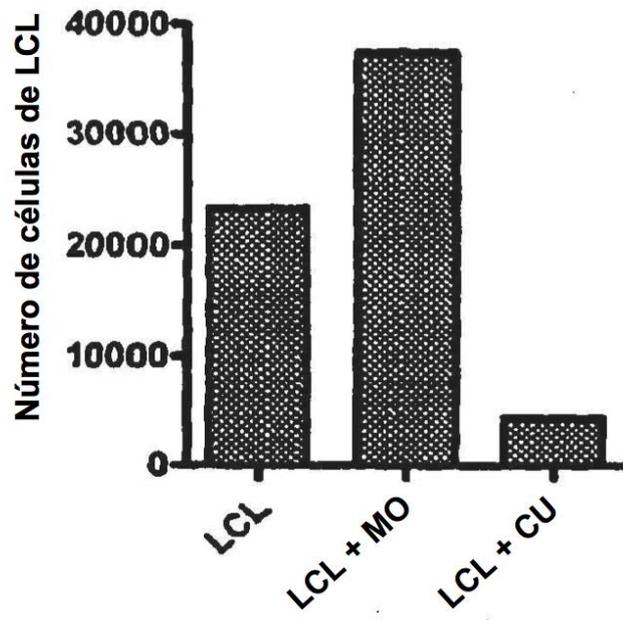


Figura 11

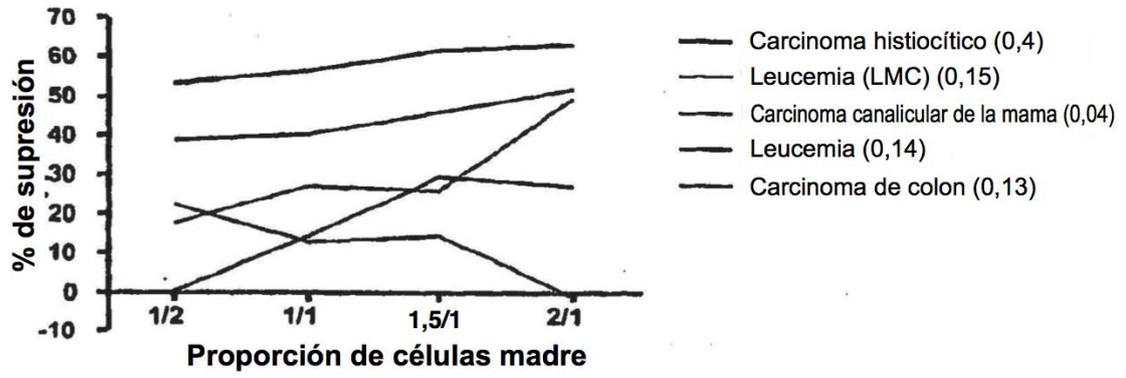
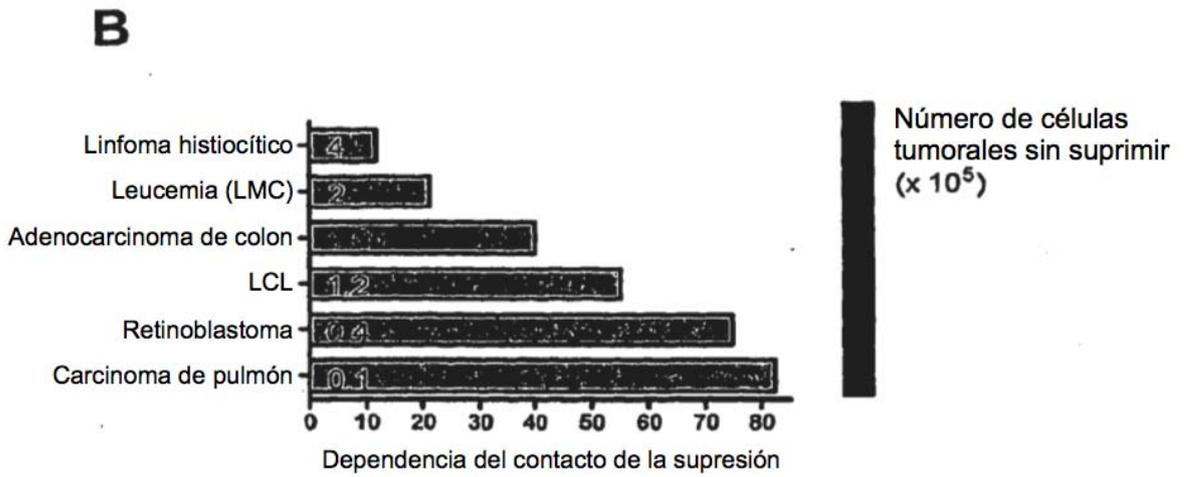
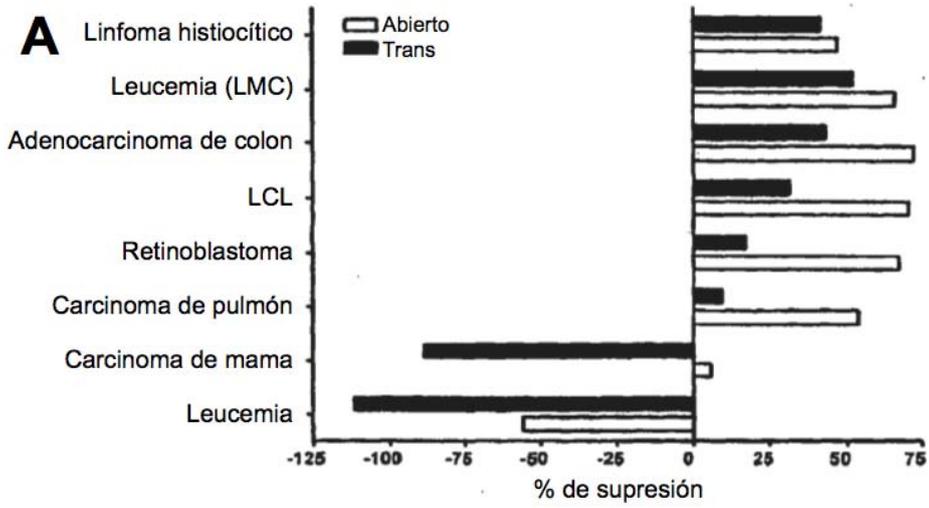


Figura 12



FIGS. 13A, 13B

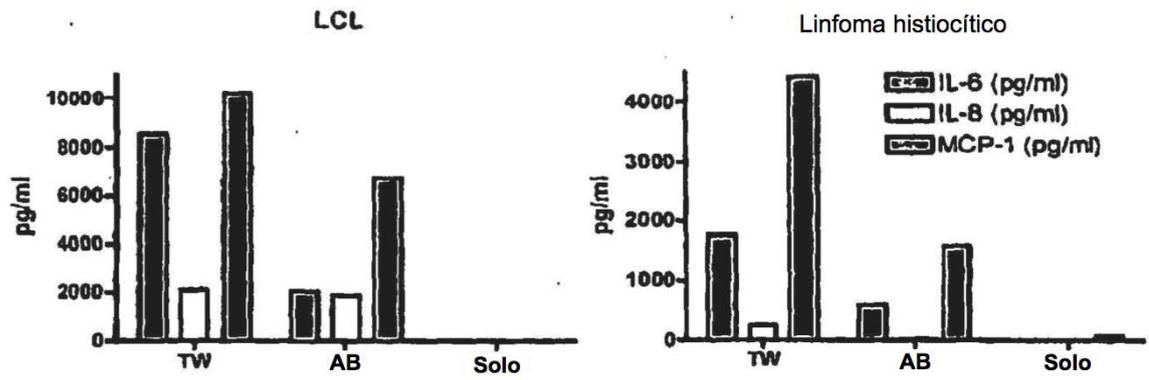
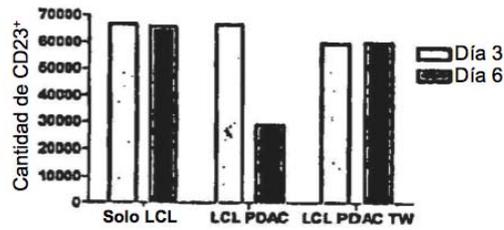
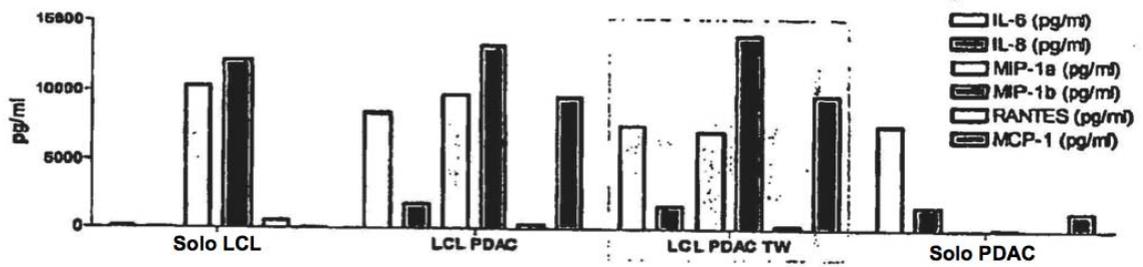


FIGURA 14

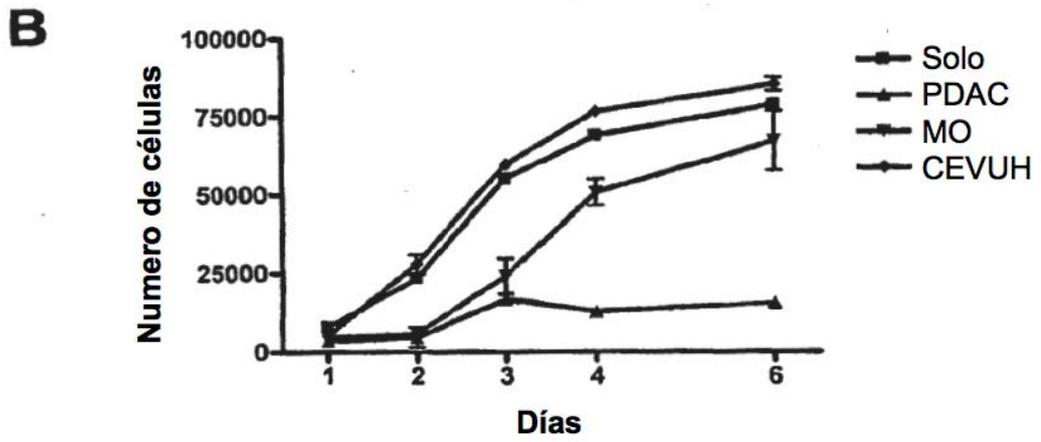
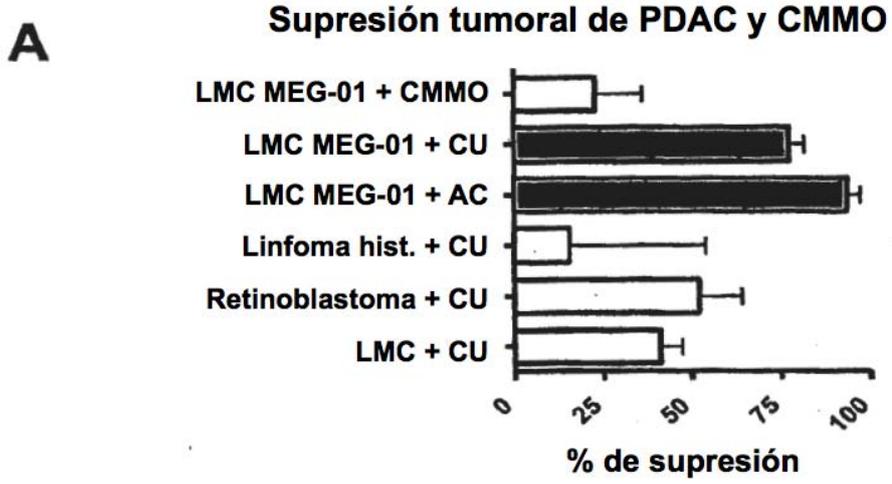
A



B



FIGS. 15A, 15B



FIGS. 16A, 16B

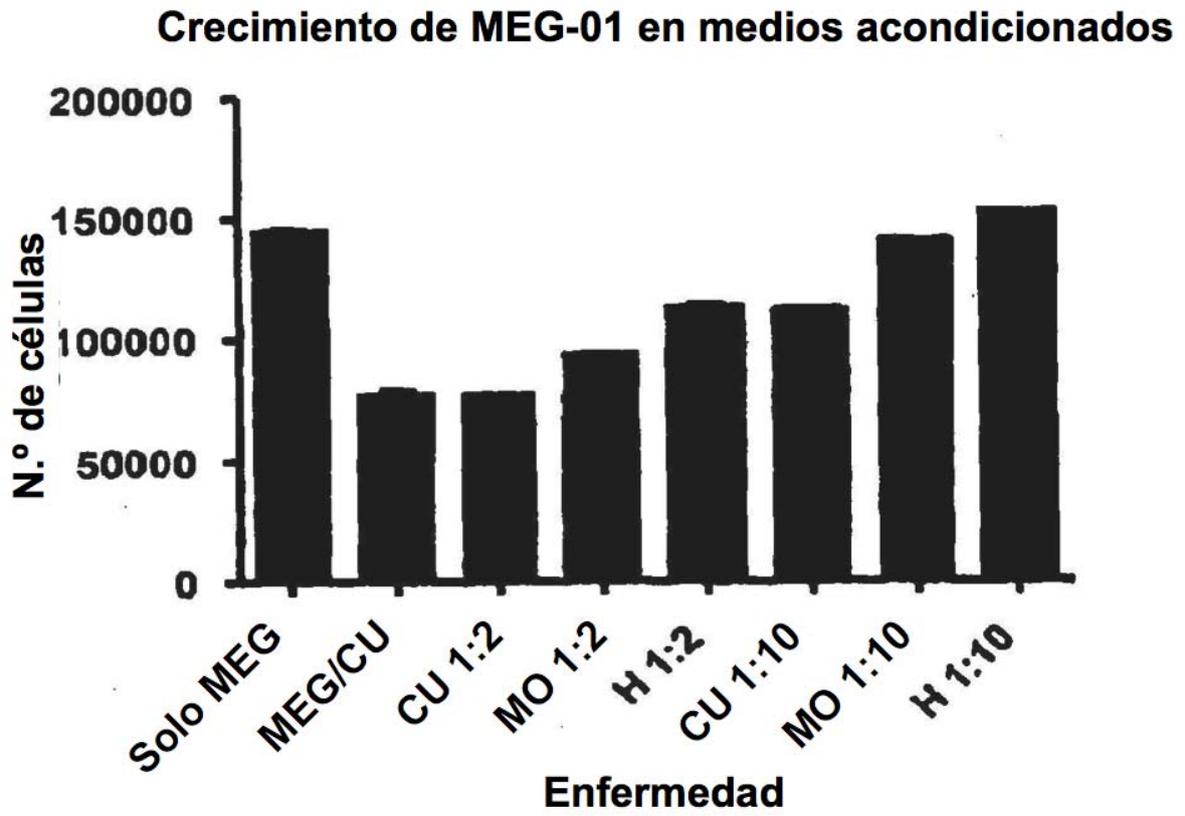


FIGURA 17

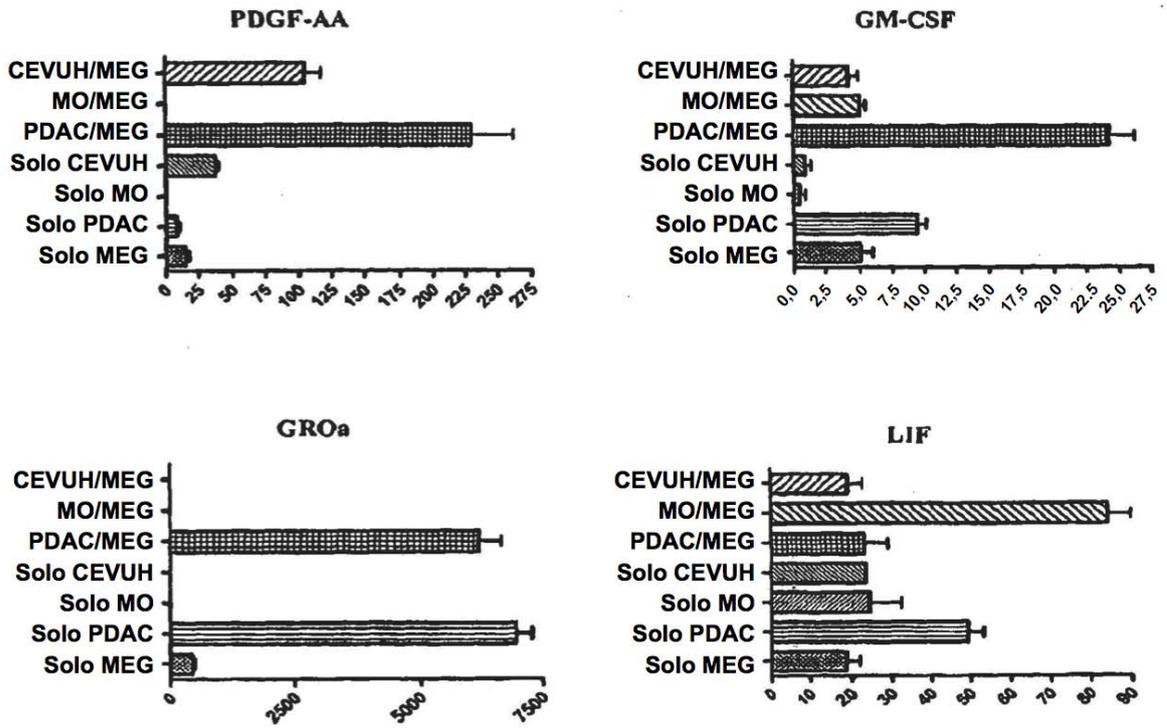


Figura 18

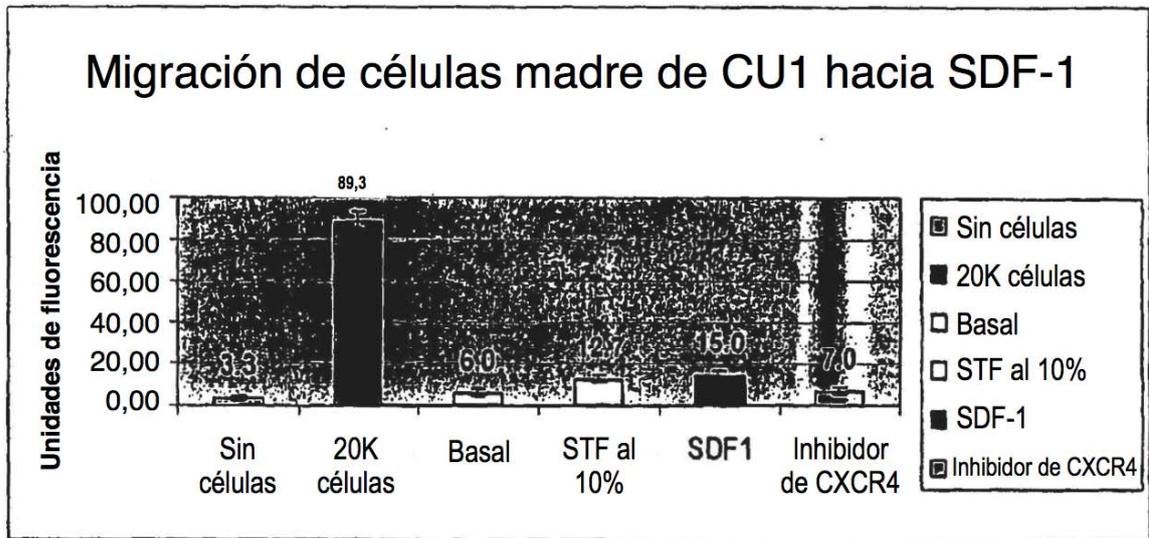


Figura 19