

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 493**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

A61K 35/50 (2006.01)

A61M 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2002 E 10182485 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2314673**

54 Título: **Placenta de mamífero post-parto, su uso y células madre de la misma**

30 Prioridad:

14.02.2001 US 268560 P

05.12.2001 US 4942

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

03.12.2013

73 Titular/es:

ANTHROGENESIS CORPORATION (100.0%)

7 Powder Horn Drive

Warren NJ 07059, US

72 Inventor/es:

HARIRI, ROBERT J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 493 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

Placenta de mamífero post-parto, su uso y células madre de la misma

1. Introducción.

5 En el presente texto se describen métodos para exanguinar (desangrar) y perfundir una placenta después de la expulsión del útero, p. ej. después del alumbramiento. Se describen en el presente texto métodos para tratar y cultivar una placenta aislada para la propagación de células madre de tipo embrionario que se originan a partir de la placenta y fuentes exógenas. La presente invención se refiere además al uso de una placenta cultivada como biorreactor para producir materiales biológicos o células, tejidos y orgánulos de cultivo. En el presente texto se describe la recolección y propagación de células madre y en particular a la recolección de células madre de tipo 10 embrionario y otras células madre multipotentes a partir de placentas. En el presente texto se describen células madre de tipo embrionario procedentes de una placenta post-parto.

2. Fundamento de la invención.

15 Hay un interés considerable en la identificación, el aislamiento y la generación de células madre humanas. Las células madre humanas son células precursoras totipotenciales o pluripotenciales capaces de generar una diversidad de linajes de células humanas maduras. Esta capacidad sirve como la base para la diferenciación y la especialización celulares necesarias para el desarrollo de los órganos y los tejidos.

20 El reciente éxito en el trasplante de dichas células madre ha proporcionado nuevas herramientas clínicas para reconstituir y/o suplementar la médula ósea después de la mieloablación debida a una enfermedad, a la exposición a agentes químicos tóxicos y/o a la radiación. Además existe evidencia que demuestra que las células madre se pueden emplear para la repoblación de muchos tejidos, si es que no de todos, y restaurar la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de células madre en la ingeniería de tejidos, el suministro de terapia génica y la terapia de células está también avanzando con rapidez.

25 Se han caracterizado muchos tipos diferentes de células madre de mamíferos. Por ejemplo, se conocen las células madre embrionarias, las células germinales embrionarias, las células madre adultas u otras células madre o células progenitoras comprometidas. Ciertas células madre no sólo han sido aisladas y caracterizadas, sino que también se han cultivado bajo condiciones que permiten hasta cierto punto la diferenciación. Sin embargo, sigue habiendo un problema básico en el que es casi imposible la obtención de suficientes cantidades y poblaciones de células madre humanas que sean capaces de diferenciarse en todos los demás tipos de células. El suministro de células madre es críticamente corto. Estas son importantes para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos, incluyendo 30 tumores malignos, errores de metabolismo innatos, hemoglobinopatías e inmunodeficiencias. Sería muy ventajoso tener una fuente más de células madre embrionarias.

35 La obtención de un número suficiente de células madre humanas ha sido problemática por varias razones. En primer lugar, el aislamiento de poblaciones de células madre que ocurre normalmente en tejidos adultos ha sido difícil y costoso desde el punto de vista técnico debido, en parte, a la muy limitada cantidad que se encuentra en la sangre o el tejido. En segundo lugar, la obtención de estas células a partir de embriones o tejido fetal, incluyendo abortos, ha generado problemas éticos y religiosos. La creencia generalizada de que el embrión y el feto humanos constituyen una vida independiente ha suscitado restricciones gubernamentales acerca del uso de tales fuentes para todos los fines, incluida la investigación médica. Las fuentes alternativas que no requieren el uso de células obtenidas a partir de tejido embrionario o fetal son por lo tanto esenciales para seguir avanzando en el uso clínico de células madre. 40 Hay, sin embargo, pocas fuentes de células madre alternativas viables, en particular células madre humanas, y por lo tanto el suministro es limitado. Además, la recolección de células madre a partir de fuentes alternativas en cantidades adecuadas para fines terapéuticos y de investigación es generalmente laborioso, implicando, por ejemplo, la recolección de células o tejidos de un sujeto o paciente donante, el cultivo y/o la propagación de células *in vitro*, la disección, etc.

45 Por ejemplo, Caplan et al. (pat. de EE.UU. n° 5.486.359 titulada "Human mesenchymal stem cells" (Células madre mesenquimales humanas), expedida el 23 de enero de 1996), describe composiciones de células madre mesenquimales humanas (hMSC) derivadas de la médula ósea que sirven como progenitoras para linajes de células mesenquimales. Caplan et al. describen que las hMSC se identifican por marcadores de superficie celular específicos que se identifican con anticuerpos monoclonales. Las composiciones de hMSC homogéneas se obtienen por selección positiva de células adherente de la médula o del periostio que están libres de marcadores asociados con células hematopoiéticas o bien con células mesenquimales diferenciadas. Estas poblaciones de células mesenquimales aisladas muestran características epitépicas asociadas con las células madre mesenquimales, tienen la capacidad de regenerarse en cultivo sin diferenciación, y tienen la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales específicos cuando son inducidas *in vitro* o bien son puestas *in vivo* en el sitio del tejido dañado. El 50 inconveniente de tales métodos, sin embargo, es que requieren la recolección de médula ósea o células del periostio de un donante, de la que subsiguientemente deben ser aisladas las MSC.

Hu et al. documento (WO 00/73421 titulado "Methods of isolation, cryopreservation, and therapeutic use of human amniotic epithelial cells" (Métodos de aislamiento, criopreservación y uso terapéutico de las células epiteliales

amnióticas humanas", publicado el 7 de diciembre de 2000), describen células epiteliales amnióticas humanas derivadas de la placenta en el alumbramiento, que son aisladas, cultivadas, criopreservadas para su uso futuro, o inducidas a diferenciarse. De acuerdo con Hu et al., se recolecta una placenta inmediatamente después del parto y la membrana amniótica se separa del corion, por ejemplo mediante disección. Las células epiteliales amnióticas son aisladas de la membrana amniótica de acuerdo con técnicas estándar de aislamiento de células. Las células descritas pueden ser cultivadas en diversos medios, expandidas en cultivo, criopreservadas, o inducidas a diferenciarse. Hu et al. describen que las células epiteliales amnióticas son multipotenciales (y posiblemente pluripotenciales), y pueden diferenciarse en tejidos epiteliales tales como el epitelio de superficie de la córnea o el epitelio vaginal. El inconveniente de tales métodos, sin embargo, es que son laboriosos y el rendimiento de células madre es muy bajo. Por ejemplo, para obtener un número suficiente de células madre con fines típicos terapéuticos o de investigación, primero se deben aislar las células epiteliales amnióticas del amnios mediante técnicas de disección y de separación celular, y después deben ser cultivadas y expandidas *in vitro*.

La sangre de cordón umbilical (sangre de cordón) es una fuente alternativa conocida de células madre progenitoras hematopoiéticas. Las células madre de sangre del cordón umbilical son criopreservadas de forma rutinaria para su uso en la reconstitución hematopoiética, un procedimiento terapéutico ampliamente utilizado en los trasplantes de médula ósea y otros trasplantes relacionados (véase, por ejemplo, Boyse et al., patente de EE.UU. n° 5.004.681, "Preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood", Boyse et al., patente de EE.UU. n° 5.192.553, titulada "Isolation and preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood and methods of therapeutic use" (Aislamiento y conservación de células madre y progenitoras hematopoiéticas fetales y neonatales y métodos de uso terapéutico), expedida el 9 de marzo de 1993). Las técnicas convencionales para la recolección de sangre del cordón umbilical se basan en el uso de una aguja o una cánula, que se utiliza con la ayuda de la gravedad para drenar la sangre del cordón umbilical desde la placenta (es decir, sangrado o exanguinación) (Boyse et al., patente de EE.UU. n° 5.192.553, expedida el 9 de marzo de 1993; Boyse et al., patente de EE.UU. n° 5.004.681, expedida el 2 de abril de 1991; Anderson, patente de EE.UU. n° 5.372.581, titulada "Method and apparatus for placental blood collection" (Método y aparato para la recolección de sangre de la placenta), expedida el 13 de diciembre, de 1994; Hessel et al., patente de EE.UU. n° 5.415.665, titulada "Umbilical cord clamping, cutting, and blood collecting device and method" (Dispositivo y método para pinzar, cortar, y recolectar sangre del cordón umbilical), expedida el 16 de mayo de 1995). La aguja o la cánula se ponen generalmente en la vena umbilical y la placenta se masajea suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón umbilical de la placenta. Después de ello, sin embargo, se ha considerado que la placenta drenada no tiene ningún uso, y normalmente se desecha. Una importante limitación de la obtención de células madre a partir de la sangre del cordón umbilical, además, ha sido frecuentemente el volumen inadecuado de sangre del cordón umbilical que se obtiene, lo que tiene como resultado un número de células insuficiente para reconstituir eficazmente la médula ósea después del trasplante.

Naughton et al. (patente de EE.UU. n° 5.962.325 titulada "Three-dimensional stromal tissue cultures" (Cultivos tridimensionales de tejido estromal", expedida el 5 de octubre de 1999) describe que las células fetales, incluyendo las células similares a fibroblastos y progenitoras de condrocitos, puede obtenerse a partir de cordón umbilical o tejido de la placenta o sangre del cordón umbilical. Naughton et al. (patente de EE.UU. n° 5.962.325) describen que dichas células estromales fetales se pueden utilizar para preparar un tejido estromal o cartilaginoso "genérico". Naughton et al. también describen que se puede preparar un tejido estromal "específico" inoculando una matriz tridimensional con fibroblastos derivados de un individuo particular que posteriormente va a recibir las células y/o tejidos desarrollados en el cultivo de acuerdo con los métodos descritos. El inconveniente de tal planteamiento, sin embargo, es que es laborioso. De acuerdo con los métodos descritos en Naughton et al., recuperar las células estromales fetales del cordón umbilical o la placenta requiere la disección de estos tejidos, el desmenuzamiento del tejido en trozos y la desagregación. Además, obtener cantidades adecuadas de las células estromales fetales de la sangre del cordón umbilical, así como del cordón umbilical y la placenta, requiere la posterior expansión *ex vivo*.

Los métodos disponibles actualmente para la expansión *ex vivo* de las poblaciones celulares también son laboriosos. Por ejemplo, Emerson et al. (Emerson et al., patente de EE.UU. n° 6.326.198 titulada "Methods and compositions for the ex vivo replication of stem cells, for the optimization of hematopoietic progenitor cells cultures, and for increasing the metabolism, GM-CSF secretion and/or IL-6 secretion of human stromal cells" (Métodos y composiciones para la replicación *ex vivo* de células madre, para la optimización de cultivos de células progenitoras hematopoiéticas, y para el aumento del metabolismo, la secreción de GM-CSF y/o la secreción de IL-6 de las células estromales humanas", expedida el 4 de diciembre de 2001), describe métodos, y condiciones de medio de cultivo para el cultivo *ex vivo* de la división de células madre humanas y/o la optimización de las células madre progenitoras hematopoiéticas humanas. De acuerdo con los métodos descritos, las células madre humanas o células progenitoras derivadas de la médula ósea son cultivadas en un medio de cultivo líquido que se sustituye, preferiblemente se perfunde, de forma continua o bien de forma periódica, a una velocidad de 1 ml de medio por ml de cultivo durante un periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas. Los productos metabólicos se eliminan y los nutrientes gastados se reponen al mismo tiempo que se mantiene el cultivo bajo condiciones fisiológicamente aceptables.

Kraus et al. (Kraus et al., patente de EE.UU. n° 6.338.942, titulada "Selective expansion of target cell populations" (Expansión selectiva de poblaciones de células diana), expedida el 15 de enero de 2002) describe que una población diana predeterminada de células se puede expandir selectivamente mediante la introducción de una

muestra de partida de células de sangre del cordón umbilical o de la sangre periférica en un medio de crecimiento, haciendo que las células de la población de células diana se dividan, y poniendo en contacto las células en el medio de crecimiento con un elemento de selección que comprende moléculas de unión con afinidad específica (tal como un anticuerpo monoclonal para CD34) para una población de células predeterminada (tal como las células CD34), para seleccionar las células de la población diana predeterminada de entre otras células en el medio de crecimiento.

Rodgers et al. (patente de EE.UU. nº 6.335.195 titulada "Método for promoting hematopoietic and mesenchymal cell proliferation and differentiation" (Método para la promoción de la proliferación y la diferenciación de células hematopoiéticas y mesenquimales", expedida el 1 de enero de 2002) describe métodos para el cultivo *ex vivo* de células madre hematopoiéticas y mesenquimales y la inducción de la proliferación y diferenciación de células específicas del linaje mediante el crecimiento en presencia de angiotensinógeno, angiotensina I (AI), análogos de AI, fragmentos de AI y análogos de los mismos, angiotensina II (AII), análogos de AII, fragmentos de AII o análogos de los mismos o agonistas del receptor de AII AT₂ tipo 2, bien sea solos o en combinación con otros factores de crecimiento y citocinas. Las células madre son derivadas de la médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. El inconveniente de tales métodos, sin embargo, es que tales métodos *ex vivo* para la inducción de la proliferación y la diferenciación de las células madre requieren mucho tiempo, como se discutió anteriormente, y también tienen por resultado bajos rendimientos de células madre.

Naughton et al., (patente de EE.UU. nº 6.022.743 titulada "Three-dimensional culture of pancreatic parenchymal cells cultured living stromal tissue prepared *in vitro*" (Cultivo tridimensional de células parenquimales pancreáticas cultivadas en tejido estromal vivo preparado *in vitro*) expedida el 8 de febrero de 2000) describe un sistema de cultivo de tejido en el que las células madre o células progenitoras (por ejemplo, células estromales tales como las derivadas de las células del cordón umbilical, células de la placenta, células madre mesenquimales o células fetales) se propagan en un soporte tridimensional y no en forma de una monocapa bidimensional en, p. ej., un recipiente de cultivo como un matraz o una placa.

Debido a las restricciones en la recolección y el uso de las células madre, y el número inadecuado de células recogidas típicamente de la sangre del cordón umbilical, las células madre tienen un suministro críticamente corto. Las células madre tienen el potencial de ser utilizadas en el tratamiento de una amplia variedad de trastornos, incluyendo tumores malignos, errores innatos de metabolismo, hemoglobinopatías e inmunodeficiencias. Hay una necesidad crítica de una fuente fácilmente accesible de un gran número de células madre humanas para diversos fines terapéuticos y otros relacionados médicamente. La presente invención se dirige a esa necesidad y a otras.

3. Sumario de la invención.

La presente invención se refiere a un biorreactor que comprende una placenta de mamífero aislada que ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual, en donde dicha placenta de mamífero comprende células de mamífero exógenas. La presente invención se refiere además al uso del biorreactor de la presente invención para cultivar dichas células de mamífero exógenas. La presente invención se refiere también al uso de un biorreactor que comprende una placenta de mamífero aislada, en donde dicha placenta de mamífero aislada ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual, con el fin de propagar células madre placentarias, en donde dichas células madre placentarias (a) expresan antígenos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 y SH4; (b) no expresan antígenos MHC de clase 2; (c) son CD34- y CD38-; (d) son OCT-4+ y ABC-p+; (e) SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+; o (f) son CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+.

La presente invención se refiere a una placenta de mamífero, preferentemente humano, que, después de la expulsión del útero, ha sido tratada y cultivada para producir células madre multipotentes (p. ej. células progenitoras comprometidas), células madre similares a las embrionarias y otros materiales biológicos. En particular, se describen en el presente texto métodos de perfusión y exanguinación de una placenta después del alumbramiento. En el presente texto se describen métodos de exanguinación y perfusión de una placenta bajo condiciones estériles durante un periodo entre al menos dos y más de cuarenta y ocho horas después de la expulsión de la placenta del útero. En una realización preferida, la placenta es perfundida con una solución que contiene factores que potencian la exanguinación, tales como factores anticoagulantes. En otra realización, la placenta es perfundida con una solución que contiene factores que mejoran las condiciones estériles, tales como agentes antimicrobianos y antivirales. En una realización preferida, la placenta es perfundida con una solución que contiene factores de crecimiento. Tales soluciones que contienen factores de crecimiento y otros componentes de cultivo, pero sin anticoagulantes, se denominan soluciones de cultivo.

En otra realización preferida, la placenta se perfunde para eliminar la sangre, las células residuales, las proteínas y cualquier otro material residual. La placenta puede procesarse más intensamente para eliminar los residuos de material. La perfusión prosigue normalmente con un líquido de perfusión apropiado durante al menos entre dos y más de veinticuatro horas. En varias realizaciones adicionales de la invención, la placenta se perfunde durante por lo menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 22 horas antes de la recolección de las células madre. El perfundido recogido de cualquiera de estos momentos puede también proporcionar una fuente de células madre similares a las embrionarias. Se ha de entender que la primera recolección de la sangre de la placenta se denomina como sangre del cordón umbilical que contiene predominantemente células progenitoras hematopoiéticas CD34+ y CD38+.

Dentro de las primeras veinticuatro horas de perfusión posterior al parto, las células progenitoras hematopoiéticas CD34+ y CD38- pueden ser aisladas de la placenta junto con células CD34+ y CD38-. Después de aproximadamente veinticuatro horas de perfusión, se pueden aislar células CD34- y CD38- a partir de la placenta junto con las células anteriormente mencionadas.

5 Se describe en el presente texto una placenta aislada que ha sido exanguinada y perfundida bajo condiciones estériles. En una realización preferida, se describe en el presente texto una placenta aislada que ha sido exanguinada y perfundida para eliminar todas las células residuales y cultivada durante un período de dos a veinticuatro horas después de la expulsión del útero. En el presente texto se describe una placenta aislada que ha sido tratada y cultivada para dar como resultado un órgano viable capaz de producir células madre embrionarias, células progenitoras y otros materiales biológicos.

10 La presente invención se refiere a un aparato de producción de células madre que comprende una placenta de mamífero post-parto que ha sido exanguinada y perfundida, un medio para la incubación o cultivo de la placenta, y un medio para la detección de células madre. En otra realización, el aparato de la invención comprende además un dispositivo de recolección y/o un medio para separar las células recolectadas. En otra realización, el aparato de la invención comprende además un medio para monitorizar y ajustar las condiciones de cultivo y la recolección de las células.

15 Se describe en el presente texto métodos de incubación y cultivo de una placenta exanguinada aislada bajo las condiciones apropiadas para permitir la producción de células madre similares a las embrionarias que se originan de la placenta. De acuerdo con la presente descripción, las células madre similares a las embrionarias se obtienen de una placenta después de la expulsión del útero. La placenta es exanguinada y perfundida durante un período de al menos dos a veinticuatro horas para eliminar todas las células residuales. La placenta exanguinada se cultiva después bajo las condiciones apropiadas para permitir la producción de células madre endógenas que se originan de la placenta, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, las células madre similares a las embrionarias y las células madre pluripotentes o multipotentes. En una realización preferida, la placenta exanguinada se cultiva en presencia de factores de crecimiento, tales como PDGF y EGF.

20 Se describen en el presente texto métodos de tratamiento y cultivo de una placenta aislada para su uso como biorreactor para la propagación de células madre endógenas que se originan de la placenta. La presente invención proporciona métodos de tratamiento y cultivo de una placenta aislada para su uso como biorreactor para la propagación de células exógenas y materiales biológicos, p. ej. anticuerpos, proteínas, oligonucleótidos, hormonas, virus, citocinas y enzimas. Se describe en el presente texto la reproducción y la recolección de células madre similares a las embrionarias y otras células madre pluripotentes y multipotentes procedentes de placentas. La placenta cultivada se puede usar repetidamente como biorreactor y se puede cultivar durante un período de días, meses e incluso años. La placenta cultivada puede ser mantenida eliminando periódica o continuamente una porción de un medio de cultivo o fluido de perfusión que se introduce en el sistema y del cual pueden recuperarse las células propagadas o los materiales biológicos producidos, y ser reemplazados con medio fresco o líquido de perfusión.

30 En otra realización, se describe en el presente texto un método de utilización como biorreactor de la placenta aislada y perfundida, en el que propagar las células endógenas, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, células madre similares a las embrionarias, células progenitoras, células pluripotentes y células multipotentes. Las células endógenas propagadas en el biorreactor placentario pueden ser recogidas, y/o las moléculas bioactivas pueden ser recuperadas del material perfundido, el medio de cultivo o de las propias células placentarias.

35 En otra realización, la invención proporciona un método de utilización como biorreactor de la placenta aislada y perfundida en el cual propagar células exógenas. De acuerdo con esta realización, la invención se refiere a una placenta aislada que contiene una célula que no deriva de la placenta, en el que el injerto de dicha célula en la placenta puede estimular a la placenta para que produzca células madre similares a las embrionarias o en donde la célula injertada produce señales tales como citocinas y factores de crecimiento, que pueden estimular a la placenta para producir células madre. De acuerdo con esta realización, la placenta puede ser injertada con células de origen no placentario obtenidas a partir del neonato asociado con la placenta. En otra realización, la placenta puede ser injertada con células no placentarias en origen obtenidas a partir de los padres o hermanos del neonato asociado con la placenta. Las células exógenas propagadas en el biorreactor placentario pueden ser recolectadas y/o pueden recuperarse moléculas bioactivas del material perfundido, el medio de cultivo o de las propias células de la placenta.

45 Se describen en el presente texto células madre similares a las embrionarias que se originan a partir de una placenta. Las células madre similares a las embrionarias descritas en el presente texto pueden ser caracterizadas midiendo cambios en la morfología y en los marcadores de la superficie celular utilizando técnicas tales como la citometría de flujo y la inmunocitoquímica, y midiendo los cambios en la expresión de genes utilizando técnicas tales como la PCR. En una realización de la invención, dichas células madre similares a las embrionarias pueden ser caracterizadas por la presencia de los siguientes marcadores de superficie celular : CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT- 4+ y ABC-p+. En una realización preferida, tales células madre similares a las embrionarias pueden ser caracterizadas por la presencia de marcadores de superficie celular OCT-4+ y APC-p+. Las células madre similares a las embrionarias procedentes de

- placenta tienen características de células madre embrionarias, pero no se derivan del embrión. En otras palabras, se describen en el presente texto células OCT-4+ y ABC-p+ que son células madre no diferenciadas que son aisladas de placenta perfundida post-parto. Tales células son tan versátiles (p. ej., pluripotentes) como las células madre similares a las embrionarias. Como se mencionó anteriormente, cierto número de diferentes células madre pluripotentes o multipotentes pueden ser aisladas de la placenta perfundida en diferentes momentos, por ejemplo, células hematopoiéticas CD34+/CD38+ CD34+/CD38-, y CD34-/CD38-. De acuerdo con los métodos descritos en el presente texto, la placenta humana se utiliza post-alumbramiento como fuente de células madre similares a las embrionarias.
- En otra realización, se describe en el presente texto un método para aislar otras células madre similares a las embrionarias y/o multipotentes o pluripotentes a partir de un agente de extracción o material perfundido de una placenta exanguinada.
- Se describen en el presente texto composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre similares a las embrionarias de la invención. Se describe en el presente texto una población homogénea aislada de células madre placentarias humanas que tiene el potencial de diferenciarse en todos los tipos de células. Se describen en el presente texto composiciones farmacéuticas que tienen altas concentraciones (o poblaciones más grandes) de células madre hematopoiéticas homogéneas incluyendo, pero si limitarse a ellas, células CD34+/CD38-, y células CD34-/CD38- una o más de estas poblaciones de células pueden usarse con o como mezcla con células hematopoiéticas de sangre del cordón umbilical, es decir, células hematopoiéticas CD34+/CD38+ para trasplante y otros usos.
- Las células madre obtenidas por los métodos descritos en el presente texto tienen una multitud de usos en trasplante para tratar o prevenir una enfermedad. En una realización que se describe en el presente texto, se utilizan para renovar y repoblar tejidos y órganos, reemplazando o reparando así tejidos y órganos enfermos, o partes de los mismos.
- 3.1. Definiciones.
- Como se usa en el presente texto, el término "biorreactor" se refiere a un sistema *ex vivo* para propagar células, producir o expresar materiales biológicos y desarrollar o cultivar tejidos de células, orgánulos, virus, proteínas, polinucleótidos y microorganismos.
- Como se utiliza en el presente texto, la expresión "célula madre embrionaria" se refiere a una célula que se deriva de la masa celular interna de un blastocisto (p. ej. un embrión humano de 4 a 5 días de edad) y que es pluripotente.
- Como se utiliza en el presente texto, la expresión "célula madre similar a las embrionarias" se refiere a una célula que no se deriva de la masa celular interna de un blastocisto. Como se usa en el presente texto, una "célula madre similar a las embrionarias" también puede denominarse como "célula madre placentaria". Una célula madre similar a las embrionarias es preferiblemente pluripotente. Sin embargo, las células madre que se pueden obtener a partir de la placenta incluyen células similares a las embrionarias, células pluripotentes y células progenitoras comprometidas. De acuerdo con los métodos descritos en el presente texto, las células madre similares a las embrionarias derivadas de la placenta pueden ser recolectadas de la placenta aislada una vez que ha sido exanguinada y perfundida durante un período de tiempo suficiente para eliminar las células residuales.
- Como se usa en el presente texto, la expresión "exanguinada" o "exanguinación", cuando se usa en relación con la placenta, se refiere a la eliminación y/o al drenaje de sustancialmente toda la sangre del cordón de la placenta. De acuerdo con la presente invención, la exanguinación de la placenta se puede lograr, por ejemplo, pero sin que suponga limitación, mediante drenaje, descarga líquida inducida por la gravedad, masajes, estrujamiento, bombeo, etc. En una realización preferida, la exanguinación de la placenta puede conseguirse además mediante perfusión, aclarado o lavado de la placenta con un fluido que puede o no contener agentes, tales como anticoagulantes, para colaborar en la exanguinación de la placenta.
- Como se utiliza en el presente texto, el término "perfundir" o "perfusión" se refiere al acto de verter o hacer pasar un fluido sobre un órgano o tejido, o a través del mismo, preferentemente el paso de fluido a través de un órgano o tejido con la fuerza o la presión suficientes para eliminar cualquier célula residual, p. ej. las células no unidas procedentes del órgano o el tejido. Como se usa en el presente texto, el término "perfundido" o "material perfundido" se refiere al fluido recogido después de su paso a través de un órgano o tejido. En una realización preferida, el perfundido contiene uno o más anticoagulantes.
- Como se usa en el presente texto, el término "célula exógena" se refiere a una célula "extraña", es decir, una célula heteróloga (es decir, una célula "no propia" ("*non-self*") derivada de una fuente distinta del donante de la placenta) o una célula autóloga (es decir, una célula "propia" ("*self*"), derivada del donante de la placenta) que se deriva de un órgano o tejido distinto de la placenta.
- Como se usa en el presente texto, el término "organoide u orgánulo" se refiere a una agregación de uno o más tipos de células reunidas en el aspecto superficial o en estructura real como cualquier órgano o glándula del cuerpo de un mamífero, preferiblemente el cuerpo humano.

Como se usa en el presente texto, la expresión "célula multipotente" se refiere a una célula que tiene la capacidad de crecer en cualquier subconjunto de los aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de un mamífero. A diferencia de una célula pluripotente, una célula multipotente no tiene la capacidad de formar todos los tipos de células.

5 Como se usa en el presente texto, la expresión "célula pluripotente" se refiere a una célula que tiene versatilidad de diferenciación completa, es decir, la capacidad de crecer en cualquiera de los aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de un mamífero. Una célula pluripotente puede ser auto-renovable, y puede permanecer latente o en reposo dentro de un tejido. A diferencia de una célula totipotente (por ejemplo, una célula huevo diploide fertilizada), una célula madre embrionaria no puede normalmente formar un nuevo blastocisto.

10 Como se usa en el presente texto, la expresión "célula progenitora" se refiere a una célula que está comprometida para diferenciarse en un tipo específico de célula o para formar un tipo específico de tejido.

15 Como se usa en el presente texto, la expresión "célula madre" se refiere a una célula maestra que se puede reproducir indefinidamente para formar las células especializadas de los tejidos y los órganos. Una célula madre es una célula pluripotente o multipotente desde el punto de vista del desarrollo. Una célula madre se divide para producir dos células madre hija, o una célula madre hija y una célula progenitora ("tránsito"), que luego prolifera en las células del tejido maduro, totalmente formadas.

Como se usa en el presente texto, la expresión "célula totipotente" se refiere a una célula que es capaz de formar un embrión completo (por ejemplo, un blastocisto).

4. Breve descripción de las figuras.

20 La figura 1 es una vista en sección transversal de la canulación de la vena y la arteria de una placenta para perfundir la placenta y luego recoger el perfundido.

Las figuras 2 a-e son esquemas que muestran la recolección, pinzado, perfusión, recolección y almacenamiento de una placenta exanguinada y perfundida.

25 La figura 3 es una vista esquemática en sección transversal de una placenta perfundida en un dispositivo para su uso como biorreactor.

La figura 4 es un esquema de selección para clasificación de células, incluyendo células madre similares a las embrionarias, recuperadas de una placenta perfundida.

5. Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere a un biorreactor que comprende una placenta de mamífero aislada que ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual, en donde dicha placenta de mamífero comprende células de mamífero exógenas. La presente invención se refiere además al uso del biorreactor de la presente invención para cultivar dichas células de mamífero exógenas. La presente invención se refiere también al uso de un biorreactor que comprende una placenta de mamífero aislada, en donde dicha placenta de mamífero aislada ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual, con el fin de propagar células madre placentarias, en donde dichas células madre placentarias (a) expresan antígenos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 y SH4; (b) no expresan antígenos del MHC de clase 2; (c) son CD34- y CD38-; (d) son OCT-4+ y ABC-p+; (e) SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+; o (f) son CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+.

40 El solicitante ha descubierto inesperadamente que después del alumbramiento la placenta contiene células en reposo que pueden ser activadas si la placenta se procesa apropiadamente después del alumbramiento. Por ejemplo, después de la expulsión del útero, la placenta se exanguina lo más rápidamente posible para evitar o minimizar la apoptosis. Posteriormente, lo antes posible después de la exanguinación, la placenta se perfunde para eliminar la sangre, las células residuales, proteínas, factores y cualquier otro material presente en el órgano. Los residuos de los materiales también pueden ser eliminados de la placenta. La perfusión prosigue normalmente con un perfundido apropiado durante al menos dos a más de veinticuatro horas. En varias realizaciones adicionales la placenta se perfundió durante al menos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 22 horas. En otras palabras, esta invención se basa al menos en parte en el descubrimiento de que las células de una placenta post-parto pueden ser activadas exanguinando y perfundiendo durante un período suficiente de tiempo. Por consiguiente, la placenta se puede usar fácilmente como una fuente rica y abundante de células madre similares a las embrionarias, las cuales células pueden ser utilizadas para la investigación, incluyendo el descubrimiento de fármacos, el tratamiento y la prevención de enfermedades, en particular, cirugías o terapias de trasplante, y la generación de células comprometidas, tejidos y órganos.

55 Además, sorprendente e inesperadamente, las células madre placentarias humanas producidas por la placenta exanguinada, perfundida y/o cultivada son células madre pluripotentes que pueden diferenciarse fácilmente en cualquier tipo de célula que se desee.

Se describen en el presente texto métodos de tratamiento y cultivo de una placenta aislada para su uso como biorreactor para la producción y propagación de células madre similares a las embrionarias que se originan a partir de la placenta o a partir de fuentes exógenas. La presente invención también se refiere al uso de una placenta cultivada como biorreactor para producir materiales biológicos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos, hormonas, citocinas, factores de crecimiento y virus. Se describen en el presente texto métodos de recolección y aislamiento de las células madre y los materiales biológicos procedentes la placenta cultivada.

Se describen en el presente texto métodos de perfusión y exanguinación de una placenta aislada una vez que ha sido retirada de un útero, para eliminar todas las células residuales. Se describe en el presente texto cultivar la placenta aislada y exanguinada bajo las condiciones apropiadas para permitir la producción y propagación de las células madre similares a las embrionarias.

Se describe en el presente texto un método de extracción y recuperación de las células madre similares a las embrionarias, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, células madre pluripotentes o multipotentes, a partir de una placenta humana exanguinada. Las células madre similares a las embrionarias tienen características de células madre embrionarias pero no se derivan del embrión. Tales células son tan versátiles (por ejemplo, pluripotentes) como las células madre embrionarias humanas. De acuerdo con los métodos descritos en el presente texto, la placenta humana se usa después del alumbramiento como fuente de células madre similares a las embrionarias.

De acuerdo con los métodos descritos en el presente texto, las células madre similares a las embrionarias se extraen de una placenta drenada por medio de una técnica de perfusión que utiliza la arteria umbilical o la vena umbilical, o ambas. La placenta se drena preferiblemente por exanguinación y recolección de sangre residual (por ejemplo, sangre del cordón umbilical residual). La placenta drenada se procesa entonces de manera que se establezca un entorno de biorreactor natural *ex vivo*, en el que son reclutadas las células madre similares a las embrionarias residentes dentro del espacio de parénquima y extravascular. Las células madre similares a las embrionarias migran a la microcirculación vacía drenada, en donde, de acuerdo con los métodos descritos en el presente texto, se recolectan, preferentemente mediante lavado en un recipiente colector por perfusión.

5.1. Métodos de aislamiento y cultivo de la placenta.

5.1.1. Pretratamiento de la placenta

De acuerdo con los métodos descritos en el presente texto, se recupera una placenta humana poco después de su expulsión después del alumbramiento y, en ciertas realizaciones, se recupera la sangre del cordón umbilical en la placenta. En ciertas realizaciones, la placenta se somete a un proceso de recuperación de la sangre del cordón convencional. Tal recuperación de sangre del cordón puede ser obtenida comercialmente, p. ej. LifeBank Inc., Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell. La sangre del cordón puede ser drenada poco después de la expulsión de la placenta.

Tras el parto la placenta se drena de la sangre del cordón. La placenta almacenada puede estar en condiciones estériles y a temperatura ambiente o bien a una temperatura de 5 a 25 °C (grados centígrados). La placenta puede ser almacenada durante un período de tiempo de más de cuarenta y ocho horas y preferiblemente durante un período de cuatro a veinticuatro horas antes de perfundir la placenta para eliminar cualquier sangre del cordón residual.

Típicamente, se transporta una placenta desde la sala de partos a otro punto, por ejemplo un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón umbilical y/o drenaje y perfusión. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte estéril con aislamiento térmico (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20 y 28 °C), por ejemplo poniendo la placenta, con el cordón umbilical proximal pinzado, en una bolsa de plástico de cierre de cremallera estéril, que se pone después en un recipiente aislado, como se muestra en las figuras 2a - e. Preferiblemente, la placenta se entrega al laboratorio entre cuatro y hasta veinticuatro horas después del parto.

La placenta se recupera preferiblemente después de la expulsión bajo condiciones asépticas, y se almacena en una solución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25 °C (grados centígrados). En la técnica son bien conocidas soluciones anticoagulantes adecuadas. Por ejemplo, se puede utilizar una solución de heparina o warfarina sódica. En una realización preferida, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (1 % p/p en solución 1:1000). La placenta drenada se almacena preferentemente durante no más de 36 horas antes de haberse recolectado las células madre similares a las embrionarias. La solución que se utiliza para la perfusión de la placenta para eliminar las células residuales puede ser la misma solución utilizada para perfundir y cultivar la placenta para la recuperación de las células madre. Cualquiera de estos perfundidos puede recolectarse y utilizarse como fuente de células madre similares a las embrionarias.

En ciertas realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza, preferentemente dentro de 4 a 5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de sangre de cordón. En otras realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza después de recuperar la sangre del cordón, pero antes del procesamiento posterior de la placenta.

Pueden utilizarse técnicas convencionales para la recolección de sangre del cordón umbilical. Típicamente se utiliza una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para drenar de la placenta la sangre del cordón (es decir,

exanguinar) (Boyse et al, patente de EE.UU. nº 5.192.553, expedida el 9 de marzo de 1993; Boyse et al., patente de EE.UU. n 5.004.681, expedida el 2 de abril de 1991; Anderson, patente de EE.UU. nº 5.372.581, titulada "Method and apparatus for placental blood collection (Método y aparato para la recolección de sangre de la placenta), expedida el 13 de diciembre de 1994; Hessel et al, patente de EE.UU. nº 5.415.665, titulada "Umbilical cord clamping, cutting, and blood collecting device and method" (Dispositivo y método para el pinzado, corte y recogida de sangre del cordón umbilical), expedida el 16 de mayo de 1995). La aguja o cánula se coloca generalmente en la vena umbilical y la placenta se masajea suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón umbilical de la placenta.

En una realización preferida, se recupera la placenta de un paciente con consentimiento informado y también se toma una historia médica completa del paciente antes de, durante y después del embarazo, y se asocia con la placenta. Estos registros médicos se pueden usar para coordinar el uso subsiguiente de la placenta o de las células madre obtenidas de la misma. Por ejemplo, las células madre placentarias humanas pueden ser utilizadas fácilmente para la medicina personalizada para el neonato en cuestión, los padres, hermanos u otros familiares. En realidad, las células madre placentarias humanas son más versátiles que la sangre del cordón. Sin embargo, ha de hacerse observar que la descripción incluye la adición de células madre placentarias humanas producidas por la placenta exanguinada, perfundida y/o cultivada, a sangre del cordón de las mismas o diferentes placentas y cordón umbilical. La sangre del cordón resultante tendrá una mayor concentración/población de células madre humanas y por lo tanto es más útil para trasplantes, p. ej. para trasplantes de médula ósea.

5.1.2. Exanguinación de la placenta y eliminación de las células residuales.

Se describe en el presente texto un método para la recuperación de células madre o progenitoras, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, las células madre similares a las embrionarias, a partir de una placenta que es exanguinada, es decir, completamente drenada de la sangre del cordón que queda después del alumbramiento y/o un procedimiento de recuperación de sangre del cordón convencional. De acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto, la placenta es exanguinada y perfundida con un fluido de perfusión acuoso adecuado, tal como un fluido isotónico acuoso en el que se disuelve un anticoagulante (por ejemplo heparina, warfarina sódica). Tales fluidos isotónicos acuosos para la perfusión son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, una solución de cloruro sódico 0,9 N. El fluido de perfusión comprende preferiblemente el anticoagulante, tal como heparina o warfarina sódica, a una concentración que es suficiente para evitar la formación de coágulos de cualquier posible sangre del cordón umbilical residual. En una realización específica, se emplea una concentración de 1 a 100 unidades de heparina, preferiblemente una concentración de 1 a 10 unidades de heparina por ml. En una realización, pueden utilizarse inhibidores de la apoptosis, tales como eliminadores de radicales libres, en particular eliminadores de radicales libres de oxígeno, durante e inmediatamente después de la exanguinación y después estos agentes pueden ser lavados de la placenta. De acuerdo con esta realización, la placenta aislada puede ser almacenada bajo condiciones hipotérmicas con el fin de evitar o inhibir la apoptosis.

De acuerdo con los métodos descritos en el presente texto, la placenta se exanguina haciendo pasar el fluido de perfusión a través de la arteria umbilical, de la vena umbilical, o de ambas, utilizando un flujo a la placenta por gravedad. La placenta se orienta preferiblemente (por ejemplo, se suspende) de manera tal que la arteria umbilical y la vena umbilical se encuentren en el punto más alto de la placenta. En una realización preferida, la arteria umbilical y la vena umbilical se conectan simultáneamente, como se muestra en la figura 1, a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito de fluido de perfusión. Se hace pasar el fluido de perfusión a la vena y a la arteria umbilical y se recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que fue fijado al útero de la madre durante la gestación. El fluido de perfusión puede también ser introducido a través de la abertura del cordón umbilical y puede dejarse fluir o percolar fuera de las aberturas de la pared de la placenta que está en interfase con la pared uterina materna.

En una realización preferida, el cordón umbilical proximal se pinza durante la perfusión y, más preferiblemente, se pinza dentro de 4 a 5 cm (centímetros) de la inserción del cordón en el disco placentario.

En una realización, se utiliza una cantidad suficiente de fluido de perfusión que tendrá por resultado la eliminación de toda la sangre del cordón residual y la subsiguiente recolección o la recuperación de las células placentarias, incluyendo pero sin limitarse a ellas células madre similares a las embrionarias y células progenitoras, que quedan en la placenta después de la eliminación de la sangre del cordón.

Se ha observado que cuando se recoge primero el fluido de perfusión de una placenta durante el proceso de exanguinación, el fluido está coloreado con glóbulos rojos de la sangre residuales de la sangre del cordón. El fluido de perfusión tiende a hacerse más claro a medida que tiene lugar la perfusión y las células de la sangre del cordón residuales son lavadas de la placenta. Generalmente son adecuados de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión para exanguinar la placenta y para recuperar una población inicial de células similares a las embrionarias de la placenta, pero se puede utilizar más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

5.1.3. Cultivo de la placenta.

Después de la exanguinación y de un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se observa que las células madre embrionarias migran a la microcirculación exanguinada y perfundida de la placenta donde, de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto, se recolectan, preferentemente mediante el lavado en un recipiente colector por perfusión. La perfusión de la placenta aislada no sólo sirve para eliminar la sangre del cordón residual sino que también proporciona a la placenta los nutrientes apropiados, incluyendo el oxígeno. La placenta puede ser cultivada y perfundida con una solución similar que se usó para eliminar las células de sangre de cordón residuales, preferiblemente sin adición de agentes anticoagulantes.

En ciertas realizaciones de la invención, la placenta drenada exanguinada se cultiva como un biorreactor, es decir, un sistema *ex vivo* para la propagación de las células o la producción de materiales biológicos. El número de células propagadas o el nivel de material biológico producido en el biorreactor placentario se mantiene en un estado continuo de crecimiento equilibrado eliminando de forma periódica o continua una parte de un medio de cultivo o fluido de perfusión que se introduce en el biorreactor placentario, y de la cual pueden ser recuperadas las células propagadas o los materiales biológicos producidos. Se introduce medio fresco o líquido de perfusión a la misma velocidad o en la misma cantidad.

El número y tipo de células propagadas puede monitorizarse fácilmente midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular utilizando técnicas de detección estándar de células, tales como la citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (por ejemplo, la tinción con anticuerpos específicos del tejido o específicos del marcador celular), clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), clasificación de células activada magnéticamente (MACS), mediante el examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal, o mediante la medida de cambios en la expresión de genes utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como la PCR y obtención de los perfiles de expresión génica.

En una realización, las células pueden ser clasificadas usando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluyendo células, basándose en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151:150-165). La excitación por láser de restos fluorescentes en las partículas individuales tiene por resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, anticuerpos o ligandos específicos del marcador de la superficie de las células se señalan con distintas etiquetas fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador de células, permitiendo la separación de las células basándose en su capacidad para unirse a los anticuerpos usados. Las partículas clasificadas por FACS pueden ser depositadas directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o de 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En otra realización, pueden utilizarse perlas magnéticas para separar las células. Las células pueden ser clasificadas usando una técnica de clasificación magnética de células activadas (MACS), un método para la separación de partículas basándose en su capacidad para unirse a perlas magnéticas (0,5 a 100 μm de diámetro). Se puede realizar una diversidad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpo que reconoce específicamente una molécula de superficie de la célula - fase sólida o hapteno. Entonces se aplica un campo magnético para manipular físicamente las perlas seleccionadas. Las perlas se mezclan después con las células para permitir la unión. Las células se hacen pasar luego a través de un campo magnético para separar las células que tienen marcadores de la superficie celular. Estas células pueden entonces ser aisladas y re-mezcladas con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de superficie celular adicionales. Las células se pasan de nuevo a través de un campo magnético, aislando las células que se unieron a ambos anticuerpos. Tales células pueden ser diluidas en platos separados, tales como platos de microtítulo para el aislamiento clonal.

En realizaciones preferidas, la placenta a usar como biorreactor se exanguina y se lava bajo condiciones estériles para que se elimine cualquier contaminante celular coagulado adherentes y no adherente. La placenta se cultiva después o se cultiva bajo condiciones asépticas en un contenedor u otro recipiente adecuado, y se perfunde con solución de perfundido (p. ej. una solución salina normal, tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (p. ej. heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxycumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (por ejemplo, β -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomycin (p. ej. a 40 - 100 $\mu\text{g/ml}$), penicilina (p. ej. a 40 U/ml), anfotericina B (p. ej. a 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

El perfundido efluente comprende tanto perfundido circulado, que ha fluido a través de la circulación placentaria, como perfundido extravasado, que exuda de las paredes de los vasos sanguíneos o pasa a través de las mismas a los tejidos de la placenta circundantes. El perfundido efluente se recolecta, y preferiblemente se recolectan tanto los perfundidos circulados como los extravasados, preferiblemente en un recipiente estéril. Se pueden hacer alteraciones en las condiciones en las que se mantiene la placenta y la naturaleza del perfundido para modular el volumen y la composición del perfundido efluente.

Los tipos de células son luego aislados del perfundido recolectado empleando técnicas conocidas por los expertos en este campo, tales como por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, centrifugación en gradiente de densidad, separación magnética de células, citometría de flujo, separación de células por afinidad o técnicas de adhesión diferencial.

En una realización, se pone una placenta en un cuenco estéril y se lava con 500 ml de solución salina normal tamponada con fosfato. Después se desecha el fluido de lavado. A continuación se canula la vena umbilical, con una cánula, por ejemplo una cánula de TEFLON® o una de plástico, que se conecta a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión, como se muestra en la figura 3. El recipiente que contiene la placenta se cubre entonces y la placenta se mantiene a temperatura ambiente (20 a 25 °C) durante el período de tiempo deseado, preferiblemente de 2 a 24 horas, y preferiblemente no más de 48 horas. La placenta puede ser perfundida continuamente, con volúmenes iguales de perfundido introducido y perfundido efluente eliminado o recolectado. Alternativamente, la placenta puede ser perfundida periódicamente, por ejemplo, cada 2 horas o 4, 8, 12, y 24 horas, con un volumen de perfundido, por ejemplo, 100 ml de perfundido (solución salina normal estéril suplementada con o sin 1.000 µg/l de heparina y/o HDTA y/o CPDA (creatina fosfato dextrosa)). En el caso de la perfusión periódica, se introducen y se retiran del medio de cultivo de la placenta preferiblemente volúmenes iguales de perfundido, de forma que un volumen estable de perfundido baña la placenta en todo momento.

El perfundido efluente que escapa de la placenta, p. ej. en la superficie opuesta de la placenta, se recoge y se procesa para aislar células madre similares a las embrionarias, células progenitoras u otras células de interés.

Se pueden usar varios medios como fluido de perfusión para el cultivo de la placenta, tal como DMEM, F-12, M199, RPMI, medio de Fisher, medio de Iscore, medio de McCoy y combinaciones de los mismos, suplementados con suero bovino fetal (FBS), suero humano entero (WHS), o suero de cordón umbilical humano recolectado en el momento de la expulsión de la placenta. El mismo fluido de perfusión utilizado para exanguinar la placenta de la sangre del cordón residual, puede ser usado para cultivar la placenta, sin la adición de agentes anticoagulantes.

En ciertas realizaciones, las células madre similares a las embrionarias son inducidas a propagarse en el biorreactor de placenta por la introducción de nutrientes, hormonas, vitaminas, factores de crecimiento, o cualquier combinación de los mismos, en la solución de perfusión. Puede añadirse suero y otros factores de crecimiento a la solución de perfusión o medio de propagación. Los factores de crecimiento son normalmente proteínas e incluyen, pero sin limitarse a ellos: citocinas, linfocinas, interferones, factores estimulantes de colonias (CSF), quimiocinas e interleucinas. Otros factores de crecimiento que pueden usarse incluyen factores de crecimiento hematopoiéticos humanos recombinantes incluyendo ligandos, factores de células madre, trombopoeitina (Tpo), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), factor inhibidor de la leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento derivado de la placenta y factor de crecimiento epidérmico.

Los factores de crecimiento introducidos en la solución de perfusión pueden estimular la propagación de células madre similares a las embrionarias no diferenciadas, células progenitoras comprometidas, o células diferenciadas (por ejemplo, células hematopoiéticas diferenciadas). Los factores de crecimiento pueden estimular la producción de materiales biológicos y moléculas bioactivas, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, inmunoglobulinas, hormonas, enzimas o factores de crecimiento, como se ha descrito con anterioridad.

En una realización de la invención, la placenta se utiliza como biorreactor para propagar células endógenas (es decir, células que se originan de la placenta), incluyendo pero sin limitarse a ellas, varios tipos de células madre similares a las embrionarias pluripotentes y/o totipotentes y linfocitos. Para usar la placenta como biorreactor, puede ser cultivada durante varios períodos de tiempo bajo condiciones estériles por perfusión con solución de perfundido, como se describe en el presente texto. En realizaciones específicas, la placenta se cultiva durante al menos 12, 24, 36, o 48 horas, o durante 3 a 5 días, 6 a 10 días, o durante una a dos semanas. En una realización preferida, la placenta se cultiva durante 48 horas. La placenta cultivada debe ser "alimentada" periódicamente para eliminar el medio gastado, despoblar las células liberadas, y añadir medio fresco. La placenta cultivada se debe almacenar bajo condiciones estériles para reducir la posibilidad de contaminación, y mantenerse bajo presurización intermitente y periódica para crear condiciones que mantienen un suministro adecuado de nutrientes a las células de la placenta. Debe reconocerse que la perfusión y el cultivo de la placenta pueden ser tanto automatizados como informatizados para una mayor eficiencia y aumento de la capacidad.

En otra realización, la placenta se procesa para eliminar todas las células proliferantes endógenas, tales como las células madre similares a las embrionarias, y para permitir que las células extrañas (es decir, exógenas) sean introducidas y propagadas en el entorno de la placenta perfundida. La invención contempla una gran variedad de células madre o progenitoras que pueden ser cultivadas en el biorreactor placentario, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, células madre similares a las embrionarias, células madre mesenquimales, células estromales, células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos, y células madre o progenitoras para un tipo particular de célula, tejido u órgano, incluyendo pero sin limitarse a ellas neuronas, mielina, músculo, sangre, médula ósea, piel, corazón, tejido conjuntivo, pulmón, riñón, hígado y páncreas (por ejemplo, células de los islotes pancreáticos).

Las fuentes de células madre mesenquimales incluyen la médula ósea, el saco vitelino embrionario, la placenta, el cordón umbilical, la piel fetal y adolescente y la sangre. Pueden obtenerse células de la médula ósea procedentes de la cresta ilíaca, fémures, tibias, espina dorsal, costillas u otros espacios medulares.

Los métodos para la destrucción selectiva, la ablación o eliminación de células proliferantes o que se dividen rápidamente a partir de un tejido u órgano, son bien conocidos en la técnica, p. ej. métodos de tratamiento del

cáncer o de tumores. Por ejemplo, la placenta perfundida puede ser irradiada con radiación electromagnética, UV, rayos X, gamma o beta, para erradicar todas las células endógenas viables que quedan. Las células extrañas que se van a propagar se introducen en el biorreactor placentario irradiado, por ejemplo, por perfusión.

5.2. Recolección de células de la placenta.

5 Como se ha descrito anteriormente, después de la exanguinación y la perfusión de la placenta, las células madre similares a las embrionarias migran a la microcirculación drenada vacía donde, de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto, son recolectadas, preferiblemente recogiendo el perfundido efluente en un recipiente colector.

10 En realizaciones preferidas, las células cultivadas en la placenta se aíslan del perfundido efluente usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad, separación de células por imán, citometría de flujo, u otros métodos de separación o clasificación de células bien conocidos en la técnica, y clasificadas, por ejemplo, de acuerdo con el esquema que se muestra en la figura 4.

15 En una realización específica, las células recolectadas de la placenta son recuperadas del perfundido efluente mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo cual separa las células de los restos y las plaquetas contaminantes. Los sedimentos de células se resuspenden en medio IMDM libre de suero que contiene 2 U/ml de heparina y 2 EDTA mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares total se aisló usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante, y la fracción de células mononucleares fue resuspendida. Las células se contaron usando un hemocitómetro. La viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul de tripano. El aislamiento de las células se realiza por medio de la "tripsinización diferencial" usando una solución de tripsina al 0,05% con 0,2 % de EDTA (Sigma, St, Louis MO). La tripsinización diferencial fue posible porque las células fibroblastoides se despegaron de las superficies de plástico dentro de aproximadamente cinco minutos, mientras que las otras poblaciones adherentes requirieron más de 20 – 30 minutos de incubación. Las células fibroblastoides despegadas fueron recolectadas después de la tripsinización, usando Solución Neutralizante de Tripsina (TNS, Bio Whittaker). Las células se lavaron en H.DMEM y se resuspendieron en MSCGM.

20

25

En otra realización, las células cultivadas en el biorreactor placentario son aisladas de la placenta por disección física de las células de la placenta.

30 En otra realización, las células cultivadas en el biorreactor placentario son aisladas de la placenta disociando los tejidos de la placenta o una porción de los mismos, y recuperando las células cultivadas por métodos de separación o clasificación de células bien conocidos en la técnica tales como centrifugación en gradiente de densidad, separación de células por imán, citometría de flujo, etc.

35 En una realización preferida, la perfusión de la placenta y la recolección de perfundido efluente se repite una o dos veces durante el cultivo de la placenta, hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos se juntan y se someten a una centrifugación ligera para eliminar las plaquetas, los desechos y las membranas las células nucleadas. Las células nucleadas son entonces aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y después del lavado se resuspenden en H.DMEM. Para el aislamiento de las células adherentes, se ponen partes alícuotas de 5 - 10 x 10⁶ células en cada uno de varios frascos T-75 y se cultivan con célula medio de desarrollo de células madre mesenquimales (MSCGM) disponible comercialmente obtenido de BioWhittaker, y se ponen en un incubador para cultivo de tejidos (37 °C, 5 % de CO₂).

40 Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se sacan de los matraces mediante lavado con PBS. El PBS es reemplazado por MSCGM. Los frascos se examinaron preferiblemente todos los días para observar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y la expansión de racimos de células fibroblastoides.

45 En otras realizaciones, las células recolectadas de la placenta son criopreservadas para usarlas más tarde. Los métodos para la crioconservación de células tales como células madre, son bien conocidos en la técnica, por ejemplo la crioconservación usando los métodos de Boyse et al. (patente de EE.UU. nº 5.192.553, expedida el 9 de marzo de 1993) o Hu et al. (documento WO 00/73421, publicado el 7 de diciembre de 2000).

5.3. Poblaciones de células obtenidas de la placenta o cultivadas en la misma.

50 Las células madre similares a las embrionarias obtenidas de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto pueden incluir células pluripotentes, es decir, células que tienen una versatilidad de diferenciación completa, que son autorrenovables, y pueden permanecer latentes o dormidas dentro del tejido. Las células madre que se pueden obtener a partir de la placenta incluyen células similares a las embrionarias, células madre pluripotentes, células progenitoras comprometidas, y las células fibroblastoides.

55 La primera colección de la sangre de la placenta se denomina sangre del cordón que contiene predominantemente células progenitoras hematopoiéticas CD34+ y CD38+. Dentro de las primeras veinticuatro horas de perfusión posterior al parto, se pueden aislar altas concentraciones de células progenitoras hematopoiéticas CD34+ y CD38-. Después de aproximadamente veinticuatro horas de perfusión, pueden aislarse de la placenta altas concentraciones

de células CD34- y CD38- junto con las células antes mencionadas. La placenta perfundida aislada de la invención proporciona una fuente de grandes cantidades de células madre enriquecidas para células madre CD34+ y CD38- y células madre CD34- y CD38+. La placenta aislada que ha sido perfundida durante veinticuatro horas o más proporciona una fuente de grandes cantidades de células madre enriquecidas para células madre CD34- y CD38-.

5 En una realización preferida, las células madre similares a las embrionarias obtenidas por los métodos descritos en el presente texto son células madre viables, quiescentes (en reposo), pluripotentes, que existen dentro de una placenta humana a término y que se pueden recuperar después de tener lugar con éxito el alumbramiento y la expulsión de la placenta, lo que tiene por resultado la recuperación de tantas como mil millones de células nucleadas, que producen 50 a 100 millones de células madre multipotentes y pluripotentes.

10 Las células madre de la placenta humana proporcionadas por la placenta son sorprendentemente similares a las embrionarias, por ejemplo, para estas células se ha identificado la presencia de los siguientes marcadores de superficie celular: SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC - p+. Preferiblemente, las células madre similares a las embrionarias que se describen en el presente texto se caracterizan por la presencia de marcadores de superficie celular OCT-4+ y ABC-p+. Así pues, se describe en el presente texto células madre que no han sido aisladas u
15 obtenidas de otro modo a partir de una fuente embrionaria pero que puede ser identificadas por los siguientes marcadores: SSAE3-, SSAE4-, OCT-4 + y ABC-p+. En una realización, las células madre de placenta humana no expresan antígenos del MHC de clase 2.

Las células madre aisladas de la placenta son homogéneas, y estériles. Además, las células madre se obtienen fácilmente en una forma adecuada para su administración a seres humanos, es decir, son de calidad farmacéutica.

20 Las células madre similares a las embrionarias preferidas obtenidas por los métodos descritos en el presente texto pueden ser identificadas por la presencia de los siguientes marcadores de superficie celular: OCT-4+ y ABC-pt. Además, la invención abarca las células madre embrionarias que tiene los siguientes marcadores: CD10+, CD38-, CD29+, CD34-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4 +, y ABC-p+. Tales marcadores de superficie celular se determinan rutinariamente de acuerdo con métodos bien conocidos en la
25 técnica, por ejemplo, mediante la citometría de flujo, seguida por lavado y tinción con un anticuerpo anti-marcador de la superficie celular. Por ejemplo, para determinar la presencia de CD-34 o CD-38, las células pueden ser lavadas en PBS y luego sometidas a doble tinción con ficoeritrina anti-CD34 y isotiocianato de fluoresceína anti-CD38 (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

30 En otra realización, las células cultivadas en el biorreactor placentario se identifican y se caracterizan por un ensayo unitario de formación de colonias, que se conoce comúnmente en la técnica, tal como medio Mesen Cult™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia Británica).

35 Las células madre similares a las embrionarias obtenidas por los métodos que se describen en el presente texto pueden ser inducidas a diferenciarse a lo largo de linajes celulares específicos, incluyendo adipogénicas, condrogénicas, osteogénicas, hematopoiéticas, miogénicas, vasogénicas, neurogénicas, y hepatogénicas. En ciertas realizaciones, las células madre similares a las embrionarias obtenidas de acuerdo con los métodos descritos en el presente texto son inducidas a diferenciarse para su uso en trasplantes y protocolos de tratamiento *ex vivo*. En ciertas realizaciones, las células madre similares a las embrionarias obtenidas por los métodos descritos en el presente texto son inducidas a diferenciarse en un tipo de célula particular y modificarse genéticamente para proporcionar un producto génico terapéutico. En una realización específica, las células madre similares a las
40 embrionarias obtenidas por los métodos que se describen en el presente texto se incuban con un compuesto *in vitro* que las induce a diferenciarse, seguido por el trasplante directo de las células diferenciadas a un sujeto. Por lo tanto, se describen en el presente texto métodos de diferenciación de las células madre de la placenta humana utilizando medios de cultivo estándar. Además, se describen en el presente texto células hematopoiéticas, células neuronales, células de fibroblastos, células strand, células mesenquimales y células hepáticas.

45 Las células madre similares a las embrionarias pueden ser también cultivadas adicionalmente después de la recolección a partir de la placenta utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el cultivo de células de alimentación, tales como fibroblastos irradiados, obtenidas a partir de la misma placenta que las células madre similares a las embrionarias o de otras fuentes humanas o no humanas, o en medio acondicionado obtenido a partir de cultivos de tales células alimentadoras, con el fin de obtener cultivos continuos a largo plazo de
50 células madre similares a las embrionarias. Las células madre similares a las embrionarias pueden también ser expandidas, bien sea dentro de la placenta antes de la recolección a partir del biorreactor placentario, o bien *in vitro* después de la recuperación de la placenta. En ciertas realizaciones, las células madre embrionarias que van a ser expandidas son expuestas a un agente que suprime la diferenciación celular, o cultivadas en presencia de dicho agente. Tales agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, polipéptidos Delta - 1 humano y Serrate - 1 humano (ver, Sakano y col., patente de EE.UU. Nº 6.337.387 titulada "Differentiation-suppressive polypeptide" (Polipéptido de supresión de la diferenciación", expedida el 8 de enero de 2002), factor inhibidor de la leucemia (LIF) y factor de células madre. Los métodos para la expansión de las poblaciones de células son también conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Emerson et al ., patente de EE.UU. nº 6.326.198 titulada "Methods and compositions for the *ex vivo* replication of stem cells, for the optimization of hematopoietic
60 progenitor cell cultures, and for increasing the metabolism, GM-CSF secretion and/or IL-6 secretion of human

- stromal cells" (Métodos y composiciones para la replicación ex vivo de células madre, para la optimización de cultivos de células progenitoras hematopoiéticas, y para el aumento del metabolismo, la secreción de GM-CSF y/o la secreción de IL-6 de las células estromales humanas", expedida el 4 de diciembre de 2001; Kraus et al, patente de EE.UU. N° 6.338.942, titulada "Selective expansion of target cell populations" (Expansión selectiva de poblaciones de células diana), emitida el 15 de enero 2002).
- Las células madre similares a las embrionarias pueden ser evaluadas en cuanto a su viabilidad, potencial de proliferación y longevidad utilizando técnicas estándar conocidas en este campo, tales como el ensayo de exclusión con azul de tripano, ensayo de absorción de diacetato de fluoresceína, ensayo de absorción de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad), y ensayo de absorción de timidina, ensayo de proliferación de células MTT (para evaluar la proliferación). La longevidad puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante la determinación del número máximo de duplicación de la población en un cultivo prolongado.
- En ciertas realizaciones, la diferenciación de las células madre o células progenitoras que se cultivan en la placenta exanguinada, perfundida y/o cultivada se modula usando un agente o composiciones farmacéuticas que comprenden una dosis y/o dosis eficaces después en la administración única o múltiple, para ejercer un efecto suficiente para inhibir, modular y/o regular la diferenciación de una célula recolectada de la placenta.
- Los agentes que pueden inducir la diferenciación de células madre o progenitoras son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, Ca^{2+} , EGF, aFGF, bFGF, PDGF, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), TGF- β , citocinas (por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , TFN), ácido retinoico, transferrina, hormonas (por ejemplo andrógenos, estrógenos, insulina, prolactina, triyodotironina, hidrocortisona, dexametasona), butirato sódico, TPA, DMSO, NMF, DMF, elementos matriz (por ejemplo, colágeno, laminina, sulfato de heparán, Matrigel™), o combinaciones de los mismos .
- Los agentes que suprimen la diferenciación celular también son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a ellos, polipéptidos Delta-1 humano y Serrate-1 humano (véase Sakano et al., patente de EE.UU. n° 6.337.387 titulada "Differentiation-suppressive polypeptide" (Polipéptido supresor de la diferenciación), expedida el 8 de enero de 2002), factor inhibidor de la leucemia (LIF), y factor de células madre.
- El agente usado para modular la diferenciación se puede introducir en el biorreactor placentario para inducir la diferenciación de las células que se están cultivando en la placenta. Alternativamente, el agente puede ser utilizado para modular la diferenciación *in vitro* después de que las células han sido recolectadas o retiradas de la placenta.
- La determinación de que una célula madre se ha diferenciado en un tipo de célula particular, puede realizarse por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular usando técnicas tales como citometría de flujo o inmunocitoquímica (por ejemplo, tiñendo las células con anticuerpos específicos del tejido o específicos del marcador celular), mediante el examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal, o midiendo los cambios en la expresión génica usando técnicas bien conocidas en este campo, tales como PCR y la obtención de perfiles de expresión génica.
- En otra realización, las células cultivadas en la placenta son estimulados para producir moléculas bioactivas, tales como inmunoglobulinas, hormonas, enzimas .
- En otra realización, las células cultivadas en la placenta son estimuladas para proliferar, por ejemplo, mediante la administración de eritropoietina, citocinas, linfocinas, interferones, factores estimuladores de colonias (CSF), interferones, quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento hematopoiéticos humanos recombinantes incluyendo ligandos, factores de células madre, trombopoietina (Tpo), interleucinas, y factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento.
- En otra realización, las células cultivadas en la placenta son modificadas por ingeniería genética, bien sea antes, o bien después de la recolección a partir de la placenta, usando, por ejemplo, un vector viral tal como un vector adenoviral o retroviral, o usando medios mecánicos tales como la absorción del DNA mediada por liposomas o productos químicos.
- Puede introducirse un vector que contiene un transgén en una célula de interés por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, transformación, transducción, electroporación, infección, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, liposomas, LIPOFECTIN™, fusión de liposomas, lípidos catiónicos sintéticos, uso de una pistola génica o un transportador de vectores de DNA, de forma que el transgén se transmite a las células hija, por ejemplo, las células madre similares a las embrionarias hija o células progenitoras hija producidas por la división de una célula madre similar a las embrionarias. Para diversas técnicas para la transformación o transfección de células de mamífero, véase Keown et al., 1990, Methods Enzymol. 185: 527-37; Sambrook et al, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Preferiblemente, el transgén se introduce utilizando cualquier técnica, siempre y cuando no sea destructiva para la membrana nuclear de la célula u otras estructuras celulares o genéticas existentes. En ciertas realizaciones, el

transgén se inserta en el material genético nucleico mediante microinyección. La microinyección de células y estructuras celulares es comúnmente conocida y practicada en la técnica.

Para la transfección estable de células de mamífero cultivadas, tales como el cultivo de células en una placenta, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el DNA extraño en su genoma. La eficiencia de la integración depende del vector y de la técnica de transfección utilizada. Con el fin de identificar y seleccionar los integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para la resistencia a los antibióticos) en la célula madre similar a la embrionaria hospedadora junto con la secuencia génica de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren). Tales métodos son particularmente útiles en métodos que implican la recombinación homóloga en células de mamífero (por ejemplo, en las células madre similares a las embrionarias) antes de la introducción o el trasplante de las células recombinantes en un sujeto o paciente.

Puede utilizarse cierto número de sistemas de selección para seleccionar las células similares a las embrionarias hospedadoras transformadas. En particular, el vector puede contener ciertos marcadores detectables o seleccionables. Otros métodos de selección incluyen, pero sin limitarse a ello, seleccionar para otro marcador, tal como: timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler y col, 1977, Cell, 11: 223), hipoxantina - guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al, 1980, Cell, 22: 817) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, puede usarse la resistencia antimetabolito como base de selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, el cual confiere resistencia al aminoglicósido G- 418 (Colberre - Garapin et al., 1981, J. Mol Biol. 150:1); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147).

El transgén puede integrarse en el genoma de la célula de interés, preferiblemente por integración al azar. En otras realizaciones, el transgén puede integrarse mediante un método dirigido, por ejemplo, por recombinación homóloga directa (es decir, "knock-in" o "knock-out" de un gen de interés en el genoma de la célula de interés), Chappel, patente de EE.UU. nº 5.272.071, y la publicación PCT Nº WO 91/06667, publicada el 16 de Mayo de 1991; patente de EE.UU. nº 5.464.764; Capecchi et al, expedida el 7 de noviembre de 1995; Patente de EE.UU. Nº 5.627.059, Capecchi et al. expedida el 6 de mayo de 1997; patente de EE.UU. nº 5.487.992, Capecchi et al., expedida el 30 de enero de 1996).

Los métodos para generar células que tienen modificaciones génicas dirigidas mediante recombinación homóloga son conocidos en la técnica. El material construido comprenderá al menos una porción de un gen de interés con una modificación genética deseada, e incluirán regiones de homología con el locus diana, es decir, la copia endógena del gen dirigido en el genoma del hospedador. Los materiales construidos o construcciones de DNA para la integración al azar, al contrario que los utilizados para la recombinación homóloga, no necesitan incluir regiones de homología para mediar la recombinación. Se pueden incluir marcadores en el material construido objetivo o material construido aleatorio para llevar a cabo la selección positiva y negativa para la inserción del transgén.

Para crear una célula recombinante homóloga, por ejemplo una célula madre similar a la embrionaria recombinante homóloga, célula placentaria endógena o célula exógena cultivada en la placenta, se prepara un vector de recombinación homólogo en el que está flanqueado un gen de interés en sus extremos 5' y 3' por secuencias génicas que son endógenas al genoma de la célula objetivo, para permitir que ocurra la recombinación homóloga entre el gen de interés portado por el vector y el gen endógeno en el genoma de la célula objetivo. Las secuencias de ácidos nucleicos flanqueantes adicionales son de longitud suficiente para que tenga lugar con éxito la recombinación homóloga con el gen endógeno en el genoma de la célula objetivo. Típicamente se incluyen en el vector varias kilobases de DNA flanqueante (tanto en el extremo 5' y como en el 3'). Los métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos a partir de células madre recombinantes son conocidos comúnmente en la técnica (véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, 1987, Cell, 51: 503; Bradley, 1991, Curr. Opin. Bio/Technol. 2: 823-29, y publicación PCT números WO 90/11354, WO 91/01140, y WO 93/04169.

En una realización, el genoma de una célula exógena cultivada en la placenta de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto es una diana del señalamiento de genes por medio de la recombinación homóloga o por medio de la integración al azar.

En una realización específica, los métodos de Bonadio et al. (patente de EE.UU. nº 5.942.496 titulada "Methods and compositions for multiple gene transfer into bone cells" (Métodos y composiciones para transferencia génica múltiple en células óseas", publicada el 24 de agosto de 1999; y el documento PCT WO95/22611, titulado "Methods and compositions for stimulating bone cells" (Métodos y composiciones para la estimulación de las células óseas), publicado el 24 de agosto de 1995) se utilizan para introducir ácidos nucleicos en una célula de interés, tal como una célula madre, célula progenitora o célula exógena cultivada en la placenta, por ejemplo, células progenitoras óseas.

5.4 usos como biorreactor de la placenta cultivada

Las células placentarias exanguinadas y/o cultivadas pueden utilizarse como biorreactor para el cultivo de células, tejidos y órganos. El mesodermo placentario proporciona un entorno estromal ideal, incluyendo una abundancia de pequeñas moléculas y factores de crecimiento, lipopolisacáridos, y proteínas de matriz extracelulares, necesarios para la organogénesis y la neogénesis de tejido.

En una realización, se describe en el presente texto un método de utilización de la placenta perfundida aislada como biorreactor para la propagación de células exógenas. De acuerdo con esta realización, la invención se refiere a un biorreactor que comprende una placenta aislada que contiene una célula no derivada de la placenta, en donde el injerto de dicha célula en la placenta puede estimular a la placenta para producir células madre similares a las embriónicas, o en donde la célula implantada produce señales, tales como citocinas y factores de crecimiento, que pueden estimular a la placenta para producir células madre. La placenta puede ser injertada con células no placentarias en origen obtenidas de los padres, hermanos u otros consanguíneos del recién nacido asociado con la placenta. En otra realización, la placenta aislada puede ser injertada con células no placentarias en origen obtenidas de un individuo que no es el neonato ni tiene relación con el neonato. Del mismo modo, las células, tejidos, orgánulos y órganos que se propagan y se cultivan en la placenta pueden ser trasplantados al neonato asociado con la placenta, los padres, hermanos u otros consanguíneos de dicho neonato o a un individuo no relacionado con el neonato.

En una realización de la invención, la placenta se puede poblar con cualquier tipo particular de célula y se utiliza como biorreactor para el cultivo *ex vivo* de células, tejidos u órganos. Tales cultivos de células, tejidos u órganos pueden ser recolectados y utilizados en trasplantes y en protocolos de tratamiento *ex vivo*. En esta realización, la placenta se procesa para eliminar todas las células endógenas y para permitir que las células extrañas (es decir, exógenas) se introduzcan y se propaguen en el entorno de la placenta perfundida. Los métodos para la eliminación de las células endógenas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la placenta perfundida se irradia con radiación electromagnética, UV, rayos X, rayos gamma o beta para erradicar todas las células endógenas viables restantes. En una realización, la exposición sub-letal a las radiaciones, por ejemplo, de 500 a 1500 CGy, se puede utilizar para preservar la placenta, pero erradicar las células no deseadas. Para información internacional acerca de la radiación ionizante letal frente a la no letal véase el Capítulo 5 "Biophysical and biological effects of ionizing radiation" (Efectos biofísicos y biológicos de la radiación ionizante) del Departamento de Defensa de Estados Unidos. Las células extrañas de interés para propagarse en el biorreactor placentario irradiado se introducen, por ejemplo, por perfusión vascular o inyección intraparenquimal directa.

En otra realización, el biorreactor se puede utilizar para producir y propagar nuevas células quiméricas, tejidos u órganos. Tales quimeras pueden ser creadas usando células placentarias y uno o más tipos adicionales de células como materiales de partida en un biorreactor. La interacción, o "*cross-talk*" entre los diferentes tipos de células puede inducir patrones de expresión distintos de cualquiera de los tipos de células de partida. En una realización, por ejemplo, se genera una quimera autóloga propagando células placentarias autólogas de un paciente en un biorreactor con otro tipo de célula derivado de la misma paciente. En otra realización, por ejemplo, se puede generar una quimera heteróloga mediante la adición de células de un paciente, es decir, células sanguíneas, a un biorreactor que tiene células placentarias heterólogas. En otra realización más, se pueden derivar células placentarias de un paciente, y un segundo tipo de células de un segundo paciente. Entonces se recuperan células quiméricas que tienen diferentes características fenotípicas y/o genéticas a partir de cualquiera de las células de partida. En una realización específica, las células heterólogas son del mismo haplotipo, y las células quiméricas se reintroducen en el paciente.

En otras realizaciones, el biorreactor se puede utilizar para aumentar el crecimiento de un tipo de célula en particular, bien sea nativa o de origen sintético, o para la producción de un producto específico del tipo de célula. Por ejemplo, en una realización, el biorreactor placentario puede utilizarse para estimular células de los islotes del páncreas para que produzcan insulina. El biorreactor es particularmente ventajoso para la producción de proteínas terapéuticas de mamíferos, cuya eficacia terapéutica puede ser dependiente de la adecuada modificación post-traducciona. Por lo tanto, el biorreactor es útil para la producción de proteínas terapéuticas, factores de crecimiento, citocinas, y otras moléculas terapéuticas naturales o recombinantes, tales como, pero sin limitarse a ellas, la eritropoietina, interleucinas e interferones.

En otra realización, el biorreactor puede usarse para propagar células sometidas a ingeniería genética para proporcionar un producto génico terapéutico, y puede ser empleado para la producción a gran escala del producto recombinante. En una realización, por ejemplo, el reactor puede usarse para potenciar la producción de anticuerpos. La placenta se puede poblar con células productoras de anticuerpos, tales como hibridomas, que producen anticuerpos monoclonales específicos, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un antígeno en particular. Los hibridomas pueden obtenerse por cualquier técnica, incluyendo, pero sin limitarse a ella, la técnica de hibridomas de Kohler y Milstein (1975, Nature 256, 495-497; y patente de EE.UU. Nº 4.376.110), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor et al, 1983, Immunology Today 4, 72; Cole et al, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030), y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapie (Anticuerpos monoclonales y terapia del cáncer), Alan R. Liss, Inc., pp 77-96). Los hibridomas que

producen mAbs (anticuerpos monoclonales) pueden ser cultivados en el biorreactor para producir títulos de mAb elevados.

5 Alternativamente, cuando se desconoce un antígeno, el biorreactor se puede usar para generar anticuerpos específicos para un tipo de célula en particular, que después puede ser utilizado para identificar el antígeno desconocido. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos contra un antígeno específico de un tumor desconocido en un paciente con cáncer cultivando una muestra de sangre entera de un paciente de cáncer, expandiendo las células en un biorreactor, y luego cribando en relación a anticuerpos que reaccionan específicamente contra las células tumorales de un paciente .

10 En otra realización, el biorreactor se puede usar para producir virus en cultivo y para el cribado de agentes antivirales en cultivo. Este método es de particular interés para aquellos virus, tales como parvovirus y virus de la inmunodeficiencia humana, que son difíciles de propagar en condiciones de cultivo de células.

15 El biorreactor puede también ser utilizado como soporte para el cribado de moléculas terapéuticas que modulan la actividad de un tipo de célula en particular, tales como la actividad o expresión de un producto génico de interés o la activación de una vía de transducción de señal. En esta realización, un tipo de célula de interés puede ser cultivado y expandido en el biorreactor. La célula puede ser de origen natural, o una célula diseñada por ingeniería genética para expresar un producto génico recombinante. El biorreactor se pone después en contacto con moléculas terapéuticas candidatas, tales como moléculas pequeñas, no péptidos, anticuerpos, etc, o bibliotecas de tales moléculas terapéuticas candidatas. Las células se analizan después para ver si hay un cambio en una actividad deseada en presencia o ausencia de la molécula terapéutica candidata. Por ejemplo, dicha actividad deseada podría ser un aumento o una disminución en la tasa de crecimiento, y el cambio en la expresión génica, o un cambio en la unión o absorción de la molécula terapéutica candidata.

25 Es probable que varios tipos de métodos sean particularmente convenientes y/o útiles para el cribado de agentes de ensayo. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, métodos que miden la unión de un compuesto, métodos que miden un cambio en la capacidad de las células para interactuar con un anticuerpo o ligando, y métodos que miden la actividad o expresión de la proteína "reporter" (informadora), esto es, una enzima u otra proteína detectable o seleccionable, que se ha puesto bajo el control de una región de control de interés. Así pues, en una realización preferida, tanto los compuestos de origen natural como los sintéticos (por ejemplo, bibliotecas de moléculas pequeñas o péptidos), pueden ser cribados en cuanto a su actividad terapéutica. Los ensayos de cribado pueden utilizarse para identificar compuestos y composiciones que incluyen péptidos y moléculas no proteicas orgánicas que modulan una actividad específica del tipo de célula. Los compuestos recombinantes, sintéticos y exógenos de otra manera, pueden tener capacidad de unión y, por lo tanto, pueden ser candidatos para agentes farmacéuticos. Alternativamente, las proteínas y compuestos incluyen componentes celulares endógenos que interactúan con los genes identificados y proteínas *in vivo*. Tales componentes endógenos pueden proporcionar nuevos objetivos para intervenciones farmacéuticas y terapéuticas.

35 En otra realización que se describe en el presente texto, la placenta se utiliza como biorreactor para la propagación de células endógenas (es decir, células que se originan de la placenta), incluyendo pero sin limitarse a ellas, varios tipos de células madre similares a las embrionarias pluripotentes y/o totipotentes y linfocitos. En una realización, la placenta se incuba con solución de perfundido durante períodos de tiempo variables, como se describe en el presente texto. Tales células endógenas de origen placentario pueden ser transformadas para expresar de forma recombinante un gen de interés, para expresar mutaciones, y/o puede estar tratado por ingeniería genética para borrar un locus genético, usando tecnología de "knock out". Por ejemplo, se puede utilizar un gen diana endógeno puede ser borrado inactivando o "noqueando" el gen diana o su promotor usando recombinación homóloga dirigida (por ejemplo, véase Smithies, et al, 1985, Nature 317, 230-234; Thomas y Capecchi, 1987, Cell, 51, 503-512; Thompson, et al, 1989, Cell, 5, 313-321). Por ejemplo, un gen diana no funcional mutante (o una secuencia de DNA completamente no relacionada) flanqueada por DNA homólogo al gen diana endógeno (bien sea las regiones codificantes o las regiones reguladoras del gen diana), con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar células que expresan el gen diana *in vivo*. La inserción de la construcción de DNA, a través de recombinación homóloga dirigida, tiene por resultado la desactivación del gen diana. Tales planteamientos pueden ser utilizados para eliminar, reemplazar, o alterar la expresión de genes de interés en células, tejidos, y/o órganos. Este planteamiento puede ser usado para alterar el fenotipo de una célula, tejido u órgano, que puede entonces ser introducido en un sujeto humano.

50 En otras realizaciones, una célula de placenta puede ser inducida a diferenciarse en un tipo de célula particular, bien sea *ex vivo* o bien *in vivo*. Por ejemplo, se pueden inyectar células madre similares a las embrionarias pluripotentes en un órgano dañado, y para la neogénesis de órganos y la reparación de una lesión *in vivo*. Dicha lesión puede ser debida a tales condiciones y trastornos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, infarto de miocardio, trastorno convulsivo, esclerosis múltiple, ictus, hipotensión, paro cardíaco, isquemia, inflamación, pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad, daños por radiación, parálisis cerebral, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia por SIDA, pérdida de la memoria, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad renal isquémica, traumatismo cerebral o de la médula espinal, bypass corazón-pulmón, glaucoma, isquemia retiniana, o trauma retiniano.

Las células madre similares a las embrionarias aisladas de la placenta se pueden utilizar, en realizaciones específicas, en la terapia de reemplazo enzimático autólogo o heterólogo para tratar enfermedades o condiciones específicas, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, enfermedades de almacenamiento lisosómico, tales como los síndromes de Tay- Sachs, de Niemann - Pick, Fabry, Gaucher, Hunter, y Hurler, así como otras gangliosidosis, mucopolisacaridosis, y glucogenosis.

En otras realizaciones, las células se pueden usar como portadores del transgén autólogos o heterólogos en la terapia génica para corregir errores del metabolismo innatos, la adrenoleucodistrofia, la fibrosis quística, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, hipotiroidismo, anemia de células falciformes, síndrome de Pearson, enfermedad de Pompe, fenilcetonuria (PKU), porfirias, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, homocistinuria, mucopolisacárido nosis, enfermedad granulomatosa crónica y tirosinemia y la enfermedad de Tay -Sachs o para tratar el cáncer, tumores u otras condiciones patológicas.

En otras realizaciones, las células se pueden usar en la regeneración del tejido autólogo o heterólogo o terapias o protocolos de reemplazo, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, el tratamiento de defectos epiteliales corneales, la reparación del cartílago, la dermabrasión facial, membranas mucosas, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (por ejemplo, la retina, las neuronas auditivas en la membrana basilar, las neuronas olfativas en el epitelio olfativo), reparación de quemaduras y heridas para las lesiones traumáticas de la piel, o para la reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos .

El gran número de células madre similares a las embrionarias y/o progenitoras que se obtienen usando los métodos que se describen en el presente texto, en ciertas realizaciones, reduciría la necesidad de grandes donaciones de médula ósea. Aproximadamente deben ser infundidas de 1×10^8 a 2×10^8 células mononucleares de médula ósea por kilogramo de peso del paciente para el injerto en un trasplante de médula ósea (es decir, aproximadamente 70 ml de médula ósea para un donante de 70 kg). Obtener 70 ml requiere una donación intensiva y la pérdida significativa de sangre en el proceso de donación. En una realización específica, las células de una donación pequeña de médula ósea (por ejemplo, 7 a 10 ml) podrían expandirse por propagación en un biorreactor placentario antes de la infusión en un receptor.

Además, un pequeño número de células madre y células progenitoras circulan normalmente en el torrente sanguíneo. En otra realización, tales células madre exógenas o células progenitoras exógenas son recolectadas por aféresis, un procedimiento en el que se saca la sangre, se eliminan uno o más componentes de forma selectiva, y el resto de la sangre se reinfunde en el donante. Las células exógenas recuperadas por aféresis se expanden mediante propagación en un biorreactor placentario, eliminando así completamente la necesidad de la donación de médula ósea.

En otra realización, la expansión de las células exógenas en un biorreactor placentario se utiliza como tratamiento suplementario además de la quimioterapia. La mayoría de los agentes de quimioterapia usados para atacar y destruir las células cancerosas actúan matando todas las células en proliferación, es decir, las células que pasan por la división celular. Dado que la médula ósea es uno de los tejidos del cuerpo más activamente proliferantes, las células madre hematopoiéticas son con frecuencia dañadas o destruidas por los agentes de quimioterapia y, en consecuencia, la producción de células sanguíneas disminuye o cesa. La quimioterapia debe terminarse en intervalos para permitir que el sistema hematopoiético del paciente reponga el suministro de células sanguíneas antes de reanudar la quimioterapia. Puede necesitarse un mes o más para que las células madre antes en reposo proliferen y aumente el recuento de glóbulos blancos de la sangre a niveles aceptables para que pueda reanudarse la quimioterapia (cuando de nuevo, se destruyen las células madre de la médula ósea).

Aunque las células sanguíneas se regeneran entre tratamientos de quimioterapia, sin embargo, el cáncer tiene tiempo para crecer y, posiblemente, hacerse más resistente a los medicamentos de quimioterapia, debido a la selección natural. Por consiguiente, cuanto más larga es la administración de la quimioterapia y más corta es la duración entre los tratamientos, tanto mayor será la probabilidad de matar el cáncer con éxito. Para acortar el tiempo entre los tratamientos de quimioterapia, podrían ser introducidas en el paciente las células madre embrionarias o células progenitoras recolectadas de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto. Este tratamiento reduciría el tiempo que el paciente mostrará un bajo recuento de glóbulos rojos, y por lo tanto permitiría la reanudación más temprana del tratamiento de quimioterapia.

Las células madre similares a las embrionarias, células progenitoras, células extrañas, o células modificadas por ingeniería genética obtenidas a partir de una placenta de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto se pueden usar en la elaboración de un tejido u órgano *in vivo*. Los métodos que se describen en el presente texto abarcan el uso de células obtenidas a partir de la placenta, por ejemplo, las células madre similares a las embrionarias, células progenitoras, o células madre o progenitoras extrañas, para sembrar una matriz y ser cultivadas en las condiciones apropiadas para permitir que las células se diferencien y pueblen la matriz. Los tejidos y órganos obtenidos por los métodos que se describen en el presente texto pueden ser utilizados para una variedad de fines, incluyendo fines de investigación y terapéuticos.

5.5 usos de las células madre similares a las embrionarias

Las células madre similares a las embrionarias descritas en el presente texto se pueden utilizar para una amplia variedad de protocolos terapéuticos en los que un tejido u órgano del cuerpo es aumentado, reparado o reemplazado por el injerto, el trasplante o la infusión de una población de células deseada, tal como una célula madre o población de células progenitoras. Las células madre similares a las embrionarias descritas en el presente texto se pueden utilizar para reemplazar o aumentar los tejidos existentes, para introducir tejidos nuevos o alterados, o para unir tejidos o estructuras biológicas. Las células madre similares a las embrionarias de la invención también pueden sustituir a células madre embrionarias en los protocolos terapéuticos en los que se usarían típicamente células madre embrionarias.

En una realización preferida descrita en el presente texto, las células madre similares a las embrionarias y otras células madre procedentes de la placenta pueden utilizarse como trasplantes hematopoiéticos de tipo HLA autólogos y alogénicos, incluyendo coincidentes y no coincidentes. De acuerdo con el uso de células madre similares a las embrionarias como trasplantes hematopoiéticos alogénicos, puede ser necesario tratar el hospedador para reducir el rechazo inmunológico de las células donantes, tales como las descritas en la Patente de EE.UU. n° 5.800.539, expedida el 1 de septiembre de 1998, y Patente de EE.UU. n° 5.806.529, expedida el 15 de septiembre de 1998.

Por ejemplo, las células madre similares a las embrionarias que se describen en el presente texto pueden ser utilizadas en protocolos de trasplantes terapéuticos, por ejemplo, para aumentar o reemplazar células madre o progenitoras del hígado, páncreas, riñón, pulmón, sistema nervioso, sistema muscular, hueso, médula ósea, timo, bazo, tejido mucoso, gónadas, o cabello.

Las células madre similares a las embrionarias pueden utilizarse en vez de clases específicas de células progenitoras (por ejemplo, condrocitos, hepatocitos, células hematopoiéticas, células del parénquima pancreático, neuroblastos, células progenitoras musculares, etc) en protocolos terapéuticos o de investigación en los que se utilizarían típicamente células progenitoras.

Las células madre similares a las embrionarias descritas en el presente texto se pueden utilizar para el aumento, la reparación o la sustitución de cartílago, tendón o ligamentos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las prótesis (por ejemplo, prótesis de cadera) están recubiertas con construcciones de tejido cartilaginoso de reemplazo desarrolladas a partir de células madre similares a las embrionarias de la invención. En otras realizaciones, las articulaciones (por ejemplo, la rodilla) se reconstruyen con construcciones de tejido cartilaginoso desarrollado a partir de células madre similares a las embrionarias. Las construcciones de tejido cartilaginoso también se pueden emplear en cirugía reconstructiva mayor para diferentes tipos de articulaciones (para información de los protocolos, véase, por ejemplo, Resnick, D., y Niwayama, G., eds., 1988, Diagnosis of bone and joint disorders (Diagnóstico de trastornos óseos y articulares), 2ª ed., WB Saunders Co.).

Las células madre similares a las embrionarias de la invención pueden usarse para reparar daños de los tejidos y órganos que resultan de una enfermedad. En tal realización, pueden administrarse a un paciente células madre similares a las embrionarias para regenerar o restaurar tejidos u órganos que han sido dañados como consecuencia de una enfermedad, por ejemplo, potenciar el sistema inmunitario después de la quimioterapia o la radiación, reparar el tejido cardíaco después de un infarto de miocardio.

Las células madre similares a las embrionarias descritas en el presente texto se pueden utilizar para aumentar o reemplazar células de médula ósea en un trasplante de médula ósea. El trasplante de médula ósea humana autólogo y alogénico se utilizan actualmente como terapias para enfermedades tales como leucemia, linfoma y otros trastornos con riesgo de muerte. El inconveniente de estos procedimientos, sin embargo, es que se debe sacar una gran cantidad de donante de médula ósea para asegurarse de que hay suficientes células para el injerto.

Las células madre similares a las embrionarias recolectadas de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto pueden proporcionar células madre y células progenitoras que reducirían la necesidad de una donación de médula ósea de gran tamaño. También sería, de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto, obtener una pequeña donación de médula y luego aumentar el número de células madre y células progenitoras mediante cultivo y expansión en la placenta antes de la infusión o el trasplante a un receptor.

Las células madre similares a las embrionarias aisladas de la placenta se pueden usar, en realizaciones específicas, en terapia de reemplazo enzimático autólogo o heterólogo para tratar enfermedades o condiciones específicas, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, enfermedades de almacenamiento lisosómico, tales como los síndromes de Tay-Sachs, de Niemann-Pick, de Fabry, de Gaucher, de Hunter, de Hurler, así como otras gangliosidosis, mucopolisacaridosis, y glucogenosis.

En otras realizaciones, las células se pueden utilizar como portadores transgénicos autólogos o heterólogos en terapia génica para corregir errores innatos del metabolismo, tales como adrenoleucodistrofia, fibrosis quística, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, hipotiroidismo, anemia de las células falciformes, síndrome de Pearson, enfermedad de Pompe, fenilcetonuria (PKU), y la enfermedad de Tay -Sachs, porfirias, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, homocistinuria, mucopolisacárido, enfermedad granulomatosa crónica y tirosinemia. o para tratar el cáncer, tumores u otras condiciones patológicas.

En otras realizaciones, las células se pueden usar en terapias o protocolos de regeneración o reemplazo tisular autólogo o heterólogo, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, el tratamiento de defectos epiteliales corneales, la reparación de cartílago, la dermoabrasión facial, membranas mucosas, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (por ejemplo, la retina, las neuronas auditivas en la membrana basilar, neuronas olfativas en el epitelio olfativo), reparación de quemaduras y heridas por lesiones traumáticas de la piel, trasplante de cuero cabelludo (pelo), o para la reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos .

El gran número de células madre embrionarias y/o progenitoras que se obtienen usando los métodos que se describen en el presente texto reducirían, en ciertas realizaciones, la necesidad de grandes donaciones de médula ósea. Aproximadamente de 1×10^8 a 2×10^8 células mononucleares de médula ósea por kilogramo de peso del paciente debe ser infundidas para injerto en un trasplante de médula ósea (es decir, aproximadamente 70 ml de médula para un donante de 70 kg). Obtener 70 ml requiere una donación intensiva y la pérdida significativa de sangre en el proceso de donación. En una realización específica, las células de una donación de médula ósea pequeña (por ejemplo, 7-10 ml) podrían ampliarse por la propagación en un biorreactor placentario antes de la infusión en un receptor.

En otra realización, las células madre embrionarias pueden ser utilizadas en un tratamiento suplementario además de la quimioterapia. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos usados para dirigirse y destruir las células cancerosas actúan matando todas las células en proliferación, es decir, las células que están pasando por la división celular. Dado que la médula ósea es uno de los tejidos en una proliferación más activa en el cuerpo, las células madre hematopoiéticas son frecuentemente dañadas o destruidas por los agentes quimioterapéuticos y, en consecuencia, la producción de células sanguíneas se reduce o cesa. La quimioterapia debe terminarse en intervalos para permitir que el sistema hematopoiético del paciente reponga el suministro de células sanguíneas antes de reanudar la quimioterapia. Puede necesitarse un mes o más para que las células madre antes en reposo o quiescentes proliferen y aumenten el número de leucocitos de la sangre a niveles aceptables de forma que pueda reiniciarse la quimioterapia (cuando es de nuevo, las células madre de la médula ósea se destruyen).

Aunque las células sanguíneas se regeneran entre los tratamientos de quimioterapia, el cáncer tiene sin embargo tiempo para crecer y, posiblemente, se hace más resistente a los medicamentos de quimioterapia, debido a la selección natural. Por tanto, cuanto más se prolongue la administración de la quimioterapia y más corta sea la duración entre los tratamientos, tanto mayor será la probabilidad de matar el cáncer con éxito. Para acortar el tiempo entre los tratamientos de quimioterapia podrían introducirse en el paciente las células madre embrionarias o células progenitoras recolectadas de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto. Tal tratamiento reduciría el tiempo que el paciente mostraría un recuento bajo de glóbulos rojos, y por lo tanto permitiría la reanudación más temprana del tratamiento de quimioterapia.

En otra realización, las células madre de la placenta humana se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades genéticas tales como la enfermedad granulomatosa crónica .

5.6 composiciones farmacéuticas

Se describen en el presente texto composiciones farmacéuticas que comprenden una dosis y/o dosis efectivas al hacer una administración única o múltiple, antes o después del trasplante de células madre progenitoras humanas acondicionadas o no acondicionadas, ejerciendo un efecto suficiente para inhibir, modular y/o regular la diferenciación de las células madre progenitoras humanas pluripotentes y multipotentes de origen placentario en células de linaje hematopoiético y/o mesodérmico.

De acuerdo con esta realización, las células madre similares a las embrionarias que se describen en el presente texto pueden formularse en forma de inyectable (por ejemplo, el documento PCT WO 96/39101). En una realización alternativa, las células y tejidos que se describen en el presente texto se pueden formular usando hidrogeles polimerizables o entrecruzables como se describe en la patente de EE.UU. Nos. 5.709.854, 5.516.532, 5.654.381.

6. Ejemplo

6.1. Ejemplo 1: análisis de tipos de células recuperadas de un perfundido de placenta drenada.

Este ejemplo describe el análisis de los tipos de células recuperadas del perfundido efluente de una placenta cultivada de acuerdo con los métodos de la invención.

Se añadieron 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) al líquido de perfusión y se recogió una porción de 10 ml y se centrifugó durante 25 minutos a 3000 rpm (revoluciones por minuto). El efluente se dividió en cuatro tubos y se puso en un baño de hielo. Se añadieron 2,5 ml de una solución de suero de ternera fetal (FCS) al 1% en PBS y los tubos se centrifugaron (140 minutos \times 10 g (aceleración de la gravedad)). El sedimento se resuspendió en 5 ml de FCS al 1% y se combinaron dos tubos. Se calcularon los mononucleocitos totales mediante la suma de los linfocitos totales y los monocitos totales, y luego multiplicando el resultado por el volumen de la suspensión de células total.

La siguiente tabla describe los tipos de células obtenidas por perfusión de una placenta cultivada de acuerdo con los métodos descritos anteriormente en el presente texto.

	WBC (1000/ml)	Lym %	MID %	GRA %	Volumen total	Nº de células
CB (sangre del cordón)	10,5	43,2	8	48,8	60 ml	$6,3 \times 10^8$
PP (perfundido de la placenta temperatura ambiente)	12,0	62,9	18,2	18,9	15 ml	$1,8 \times 10^8$
PP ₂ (perfundido de la placenta, 37°C)	11,7	56,0	19,2	24,8	30 ml	$3,5 \times 10^8$

Las muestras de PP eran tras Ficoll.

5 El número total de células de PP después de Ficoll fue de $5,3 \times 10^8$ y el número de CB antes del procesado de $6,3 \times 10^8$. Lym % indica el tanto por ciento de linfocitos; MID % indica el tanto por ciento de glóbulos blancos de la sangre de rango medio; y GRA % indica el tanto por ciento de granulocitos.

6.2. Ejemplo 2: análisis de las células obtenidas por perfusión e incubación de la placenta.

El ejemplo que sigue describe un análisis de las células obtenidas por perfusión e incubación de la placenta de acuerdo con los métodos que se describen en el presente texto.

10 6.2.1. Materiales y métodos

15 Se reclutaron donantes de placenta entre mujeres embarazadas que se inscribieron en programas de bancos de sangre de cordón umbilical privados y proporcionaron consentimiento informado permitiendo el uso de la placenta exanguinada después de recuperar la sangre del cordón umbilical para fines de investigación. Los datos del donante pueden ser confidenciales. Estos donantes permitieron también el uso de los datos generados a partir del procesamiento de sus muestras de sangre del cordón umbilical para crioconservación. Esto permitió la comparación entre la composición de la sangre del cordón umbilical recolectada y el perfundido efluente recuperado utilizando el método experimental que se describe a continuación.

20 Después de la exanguinación de la sangre del cordón umbilical y de la placenta, se almacena a temperatura ambiente y se entrega al laboratorio en el plazo de cuatro a veinticuatro horas, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente en el presente texto, se pone la placenta en un recipiente estéril aislado a temperatura ambiente y se entregado al laboratorio dentro del plazo de las 4 horas siguientes al alumbramiento. Las placentas eran desechadas si, al realizar su inspección, daban pruebas de daños físicos tales como la fragmentación del órgano o la avulsión de los vasos umbilicales. Las placentas se mantuvieron a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) o refrigeradas (4 °C) en recipientes estériles durante 2 a 20 horas. Periódicamente, las placentas se sumergieron y se lavaron en solución salina estéril a 25 ± 3 °C para eliminar cualquier sangre o desechos visibles en la superficie.

30 El cordón umbilical se cortó transversalmente aproximadamente 5 cm desde su inserción en la placenta y los vasos umbilicales se canularon con TEFLON® o catéteres de polipropileno conectados a una vía de fluido estéril permitiendo la perfusión bidireccional de la placenta y la recuperación del fluido efluente. Los métodos descritos anteriormente en el presente texto permitieron todos los aspectos del acondicionamiento de la placenta, la perfusión y recolección del efluente a realizar bajo condiciones atmosféricas ambientales controladas, así como la monitorización en tiempo real de la presión intravascular y las velocidades de flujo, temperaturas del núcleo y el perfundido y volúmenes de efluente recuperados. Se evaluó una gama de protocolos de acondicionamiento a lo largo de un período de 24 horas después del alumbramiento, y la composición celular del fluido efluente fue analizada por citometría de flujo, microscopía óptica y ensayos unitarios de formación de colonias.

35 6.2.2. Acondicionamiento placentario.

Las placentas de donantes se procesaron a temperatura ambiente dentro del plazo de 12 a 24 horas después del alumbramiento. Antes de su procesamiento, se retiraron las membranas y el sitio materno se lavó de sangre residual. Los vasos umbilicales se canularon con catéteres hechos de agujas Butterfly de calibre 20 usadas para tomar muestras de sangre.

40 Las placentas de donantes se mantuvieron bajo condiciones variables tales como el mantenimiento a 5-37 °C con 5% de CO₂, pH 7,2 a 7,5, preferiblemente pH 7,45, en un intento de simular y mantener un entorno fisiológicamente compatible con la proliferación y el reclutamiento de células madre similares a las embrionarias residual. La cánula se limpió interiormente con medio IMDM libre de suero (Gibco BRL, NY) que contiene 2 U/ml de heparina (Elkins-Sinn, NJ). La perfusión de la placenta continuó a una velocidad de 50 ml por minuto hasta que se recogieron aproximadamente 150 ml de perfundido. Este volumen de perfundido fue etiquetado como "fracción temprana". La perfusión continuada de la placenta a la misma velocidad tuvo por resultado la recolección de una segunda fracción de aproximadamente 150 ml y se etiquetó como "fracción tardía". En el curso del procedimiento, la placenta fue masajeadada suavemente para ayudar en el proceso de perfusión y contribuir a la recuperación de material celular. El

fluido efluente fue recogido del circuito de perfusión tanto mediante drenaje por gravedad y como por aspiración a través de la cánula arterial.

5 Las placentas fueron perfundidas después con (2 U/ml) medio de Eagle modificado por Dulbecco heparinizado (H.DMEM) a razón de 15 ml/minuto durante 10 minutos y los perfundidos se recogieron de los sitios maternos dentro de una hora y las células nucleadas se contaron. Los procedimientos de perfusión y recolección se repitieron una o dos veces hasta que el número de células nucleadas recuperadas cayó por debajo de 100/ml. Los perfundidos se agruparon y se sometieron a centrifugación ligera para eliminar las plaquetas, los residuos y las membranas de las células desnucleadas. Las células nucleadas se aislaron entonces mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y, después del lavado, se resuspendieron en H.DMEM. Para el aislamiento de las células adherentes, se pusieron partes alícuotas de 5 a 10 x 10⁶ células en cada uno de varios frascos T - 75 y se cultivaron con medio de crecimiento de células madre mesenquimales disponible comercialmente (MSCGM) obtenido de BioWhittaker, y se pusieron en un incubador para cultivo de tejidos (37 °C, 5 % de CO₂). Al cabo de 10 a 15 días, las células no adherentes se eliminaron mediante lavado con PBS, que fue después sustituido por MSCGM. Los frascos fueron examinados diariamente para observar la presencia de varios tipos de células adherentes y en particular para la identificación y la expansión de racimos de células fibroblastoides.

6.2.3. Recuperación y aislamiento de células.

20 Las células se recuperaron de los perfundidos mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este procedimiento sirvió para separar las células de los residuos y plaquetas contaminantes. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio IMDM libre de suero que contiene 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (Gibco BRL, NY). La fracción de células mononucleares total se aisló usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante y la fracción de células mononucleares fue resuspendida. Las células se contaron usando un hemocitómetro. La viabilidad se evaluó mediante exclusión de azul de tripano. El aislamiento de las células mesenquimales se realizó mediante la "tripsinización diferencial", usando una solución de tripsina al 0,05% con 0,2 % de EDTA (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial era posible porque las células fibroblastoides se separaron de las superficies de plástico dentro de aproximadamente cinco minutos, mientras que las otras poblaciones adherentes requerían más de 20 a 30 minutos de incubación. Las células fibroblastoides despegadas fueron recolectadas después de la tripsinización y neutralización de tripsina, utilizando solución neutralizante de tripsina (TNS, BioWhittaker). Las células se lavaron en H.DMEM y se resuspendieron en MSCGM.

30 La citometría de flujo se llevó a cabo utilizando un instrumento FACSCalibur de Becton-Dickinson y FITC y PE etiquetado con anticuerpos monoclonales (mAbs), elegidos basándose en marcadores conocidos para MSC (células madre mesenquimales) derivadas de la médula ósea, se adquirieron de B.D. y laboratorios Caltag (South San Francisco, California), y se obtuvieron hibridomas productores de anticuerpos SH2, SH3 y SH4 y las reactividades de los mAbs en sus sobrenadantes cultivados fueron detectadas mediante anticuerpos anti - ratón de cabra F(ab)'₂ marcados con FITC o PE. Se llevó a cabo la diferenciación de linaje utilizando medios de cultivo de mantenimiento e inducción disponibles comercialmente (Bio Whittaker), utilizado según las instrucciones del fabricante.

6.2.4. Aislamiento de células madre similares a las embrionarias placentarias.

40 El examen microscópico de las células adherentes en los frascos de cultivo reveló tipos de células morfológicamente diferentes. Se observaron células fusiformes, células redondas con grandes núcleos y numerosas pequeñas vacuolas perinucleares, y células en forma de estrella con varias proyecciones (a través de una de las cuales las células en forma de estrella se fijan al frasco) adhiriéndose a los frascos de cultivo. Aunque no se hizo ningún intento para caracterizar más estas células adherentes, se observaron células similares en el cultivo de médula ósea, sangre del cordón umbilical y periférica, y por tanto se consideró que no eran de naturaleza similar a las células madre. Las células fibroblastoides, que aparecen como racimos, eran candidatas para ser MSC (células madre mesenquimales) y se aislaron mediante tripsinización diferencial y se subcultivaron en frascos secundarios. La microscopía de fase de las células redondeadas, después de la tripsinización, reveló que las células eran altamente granuladas; indistinguibles de MSC derivadas de la médula ósea producidas en el laboratorio o adquiridas de BioWhittaker. Cuando se subcultivaron, las células madre similares a las embrionarias derivadas de la placenta, al contrario que con su fase temprana, se adhirieron en horas, asumieron la forma fibroblastoide característica, y formaron un patrón de crecimiento idéntico a las MSC derivadas de médula ósea de referencia. Durante el subcultivo y la realimentación, además, las células mononucleares poco unidas se eliminaron por lavado y los cultivos se mantuvieron homogéneos y desprovistos de cualquier contaminante de células no fibroblastoides visibles.

6.2.5. Resultados

55 La expresión de CD-34, CD-38, y otros marcadores de superficie asociados a las células madre sobre las células mononucleares purificadas de la fracción temprana y tardía, fue evaluada por citometría de flujo. Las células recuperadas y clasificadas fueron lavadas en PBS y luego sometidas a doble tinción con ficoeritrina antiCD34 e isotiocianato de fluoresceína anti-CD38 (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

ES 2 432 493 T3

El aislamiento de las células se consiguió usando separación magnética de células, tal como, por ejemplo, Auto Macs (Miltenyi). Preferiblemente, el aislamiento de células CD34+ se lleva a cabo primero.

6.3 ejemplo 3: medio de perfusión.

5 El ejemplo que sigue proporciona una fórmula de la solución de perfundido preferida para el cultivo de placentas aisladas.

Producto químico	Fuente	Concentración de la solución madre	Concentración final	500 ml
DMEM - LG	GibcoBRL11885-084			300 ml
MCDB201	Sigma M-6770	Disuelto en agua	pH a 7,2 filtrar.	200 ml
FCS	Hyclone	100%	2%	10 ml
ITS	Sigma I-3146 o GibcoBRL41400-045	100x	1x	5 ml
Pen & Strep	GibcoBRL15140-122	100x	1x	5 ml
LA + BSA	Sigma + GibcoBRL BSA	100x (1 µg/ml de LA	10 ng/ml de LA	5 ml
Dexametasona	Sigma D-2915	0,25 mM en H ₂ O	0,05 µM	100 µl
Acido L-ascórbico	Sigma A-8960	1000x (100 mM)	1x (0,1 mM)	500 µl
PDGF (50 µg)	RD 220BD	10 µg/ml en HCl 4 mM + 0,1% de BSA	10 ng/ml	500 µl
BGF (200 µg)	Sigma E-9644	10 µg/ml en HAc 10 mM + 0,1% de BSA	10 ng/ml	500 µl

La anterior composición es un perfundido que puede usarse a diversas temperaturas para perfundir placentas. Debe hacerse observar que pueden ser usados componentes adicionales, tales como antibióticos, anticoagulantes y otros factores de crecimiento, en el perfundido o medio de cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Un biorreactor que comprende una placenta de mamífero aislada que ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual, en donde dicha placenta de mamífero comprende células de mamífero exógenas.
- 5 2. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde dichas células de mamífero exógenas se obtienen de un padre, hermano u otro consanguíneo del neonato asociado con la placenta.
3. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde las células de dicha placenta han sido expuestas a radiación sub-letal.
4. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde células de dicha placenta han sido expuestas a radiación letal.
- 10 5. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde dicha placenta de mamífero aislada ha sido perfundida o incubada durante al menos 48 horas.
6. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde dicha placenta aislada ha sido perfundida o incubada durante un tiempo entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 24 horas.
- 15 7. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde la solución usada para perfundir la placenta comprende una solución anticoagulante.
8. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde la solución usada para perfundir la placenta comprende un agente antimicrobiano.
9. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde las células de mamífero exógenas han sido modificadas por ingeniería genética.
- 20 10. El biorreactor según la reivindicación 1ª, en donde las células de mamífero son hibridomas.
11. El uso del biorreactor según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 10ª para cultivar dichas células de mamífero exógenas.
12. El uso según la reivindicación 11ª, en donde el biorreactor se usa para propagar dichas células de mamífero exógenas.
- 25 13. El uso según la reivindicación 11ª, en donde las células de mamífero exógenas son hibridomas y el biorreactor se usa para generar anticuerpos a partir de dichos hibridomas.
14. El uso según la reivindicación 11ª, en donde el biorreactor se usa para cribar moléculas terapéuticas que modulan una actividad de dichas células de mamífero exógenas.
- 30 15. El uso de un biorreactor que comprende una placenta de mamífero aislada, en donde dicha placenta de mamífero aislada ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual, con el fin de propagar células madre placentarias, en donde dichas células madre placentarias:
 - (a) expresan antígenos reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3 y SH4;
 - (b) no expresan antígenos del MHC Clase 2;
 - (c) son CD34- y CD38-;
 - 35 (d) son OCT-4+ y ABC-p+;
 - (e) son SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+; o
 - (f) son CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, y ABC-p+.

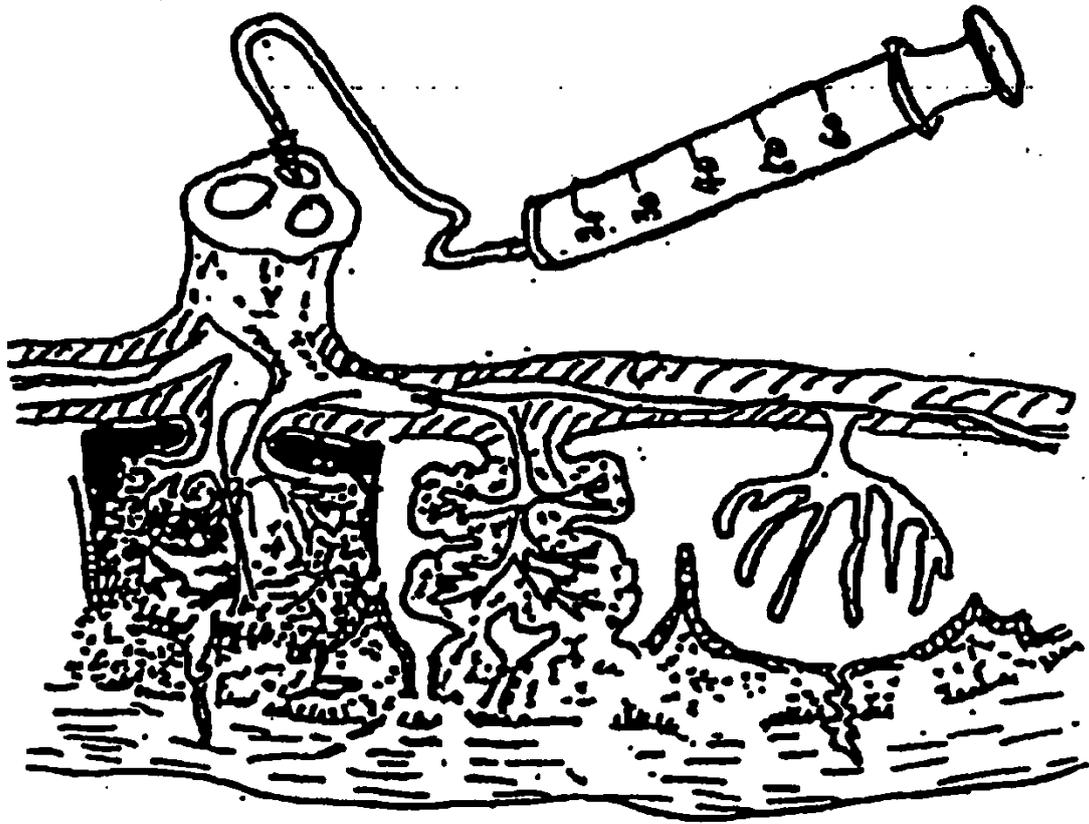


FIGURA 1

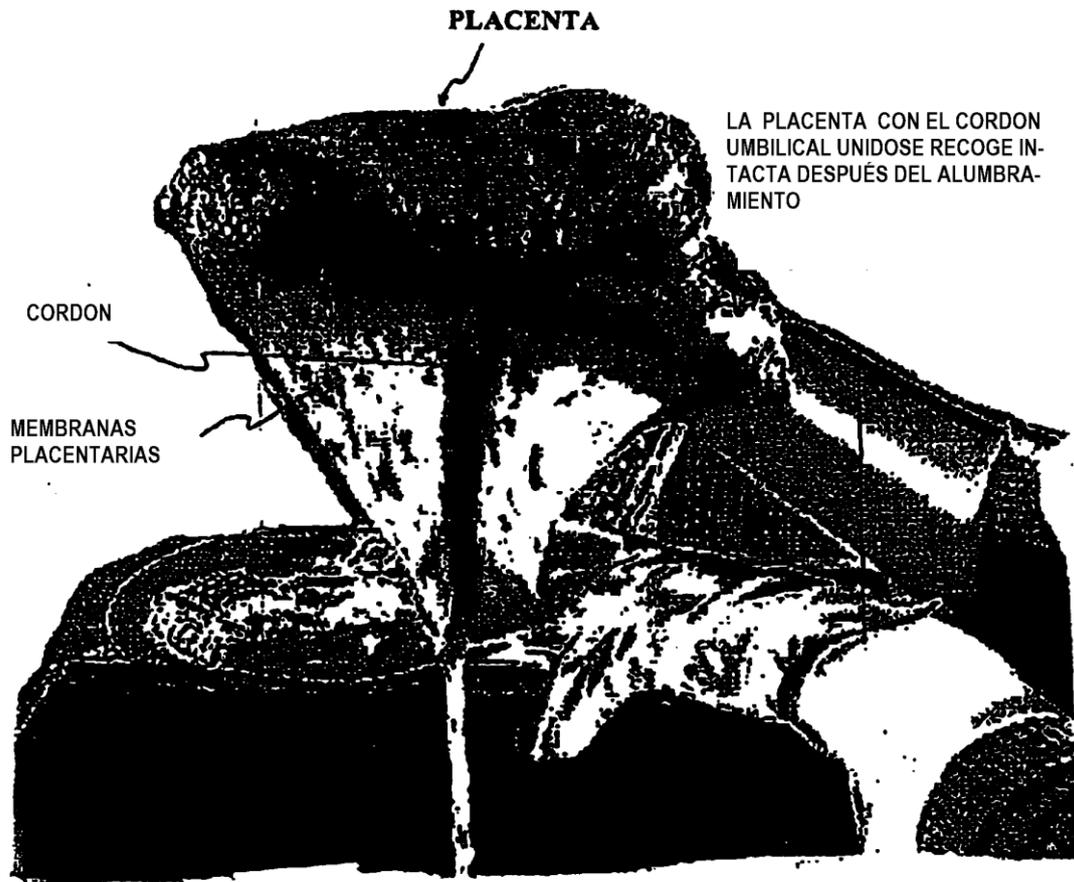


Figura 2a

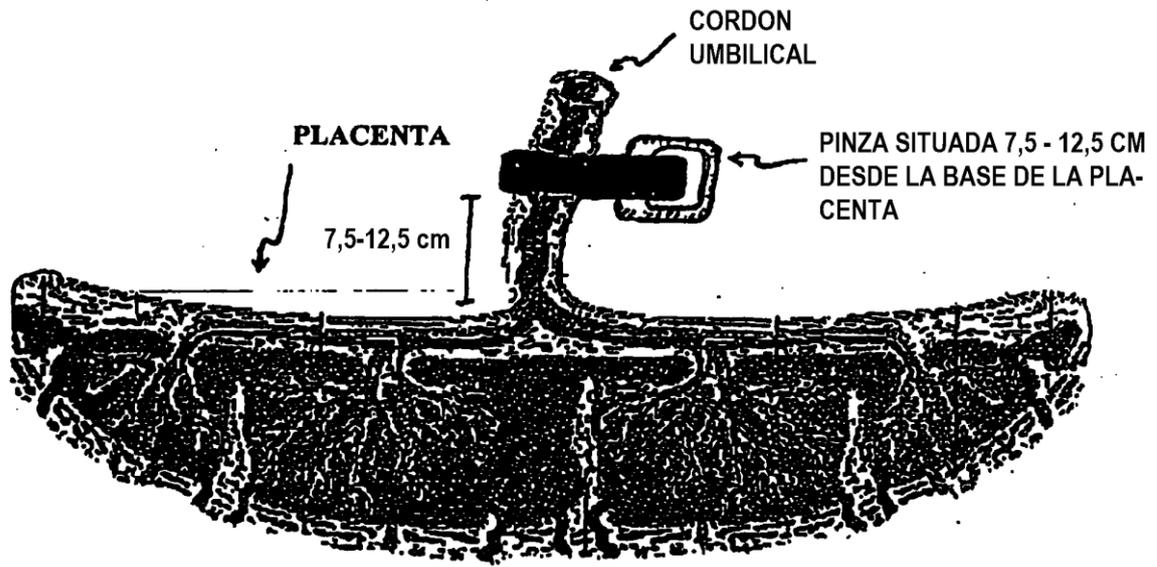


Figura 2b

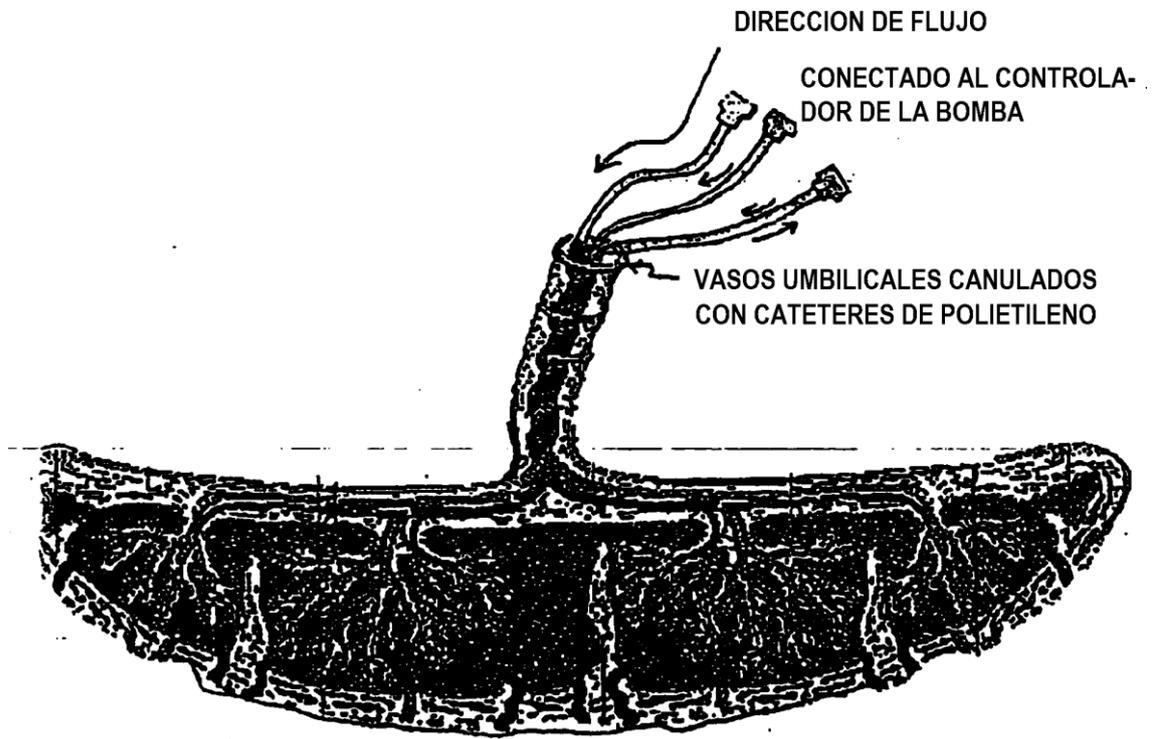


Figura 2c

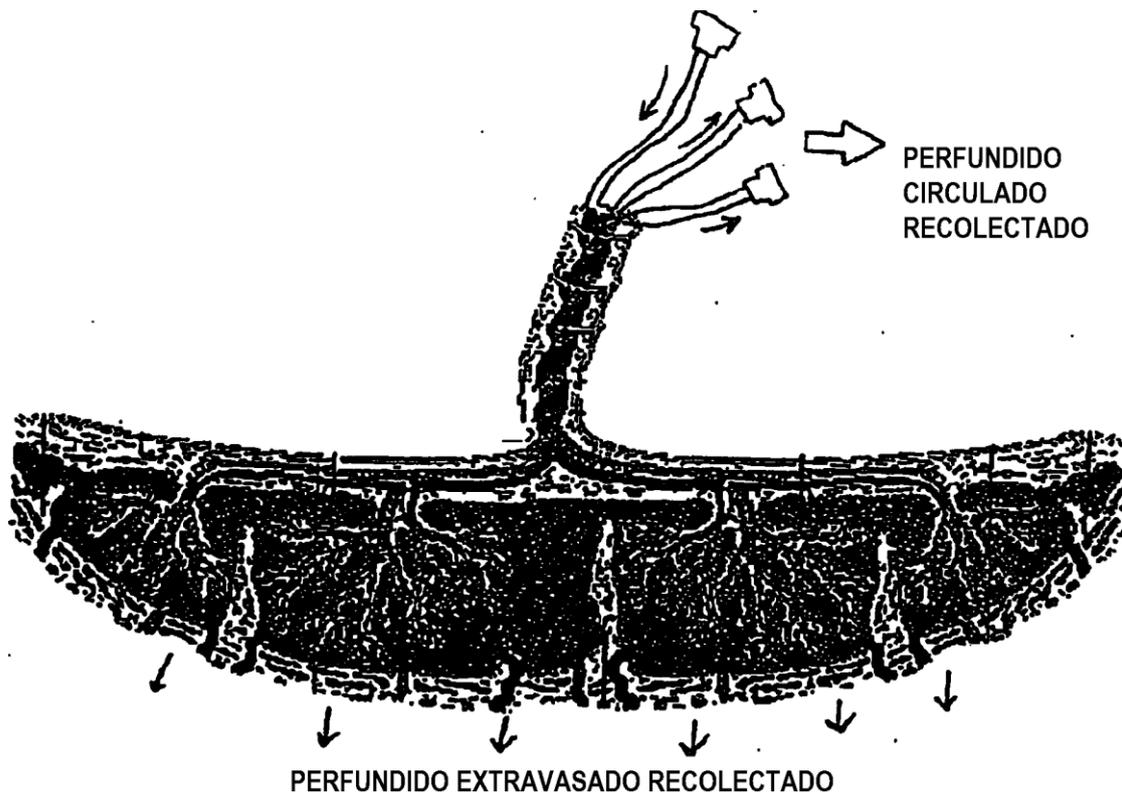
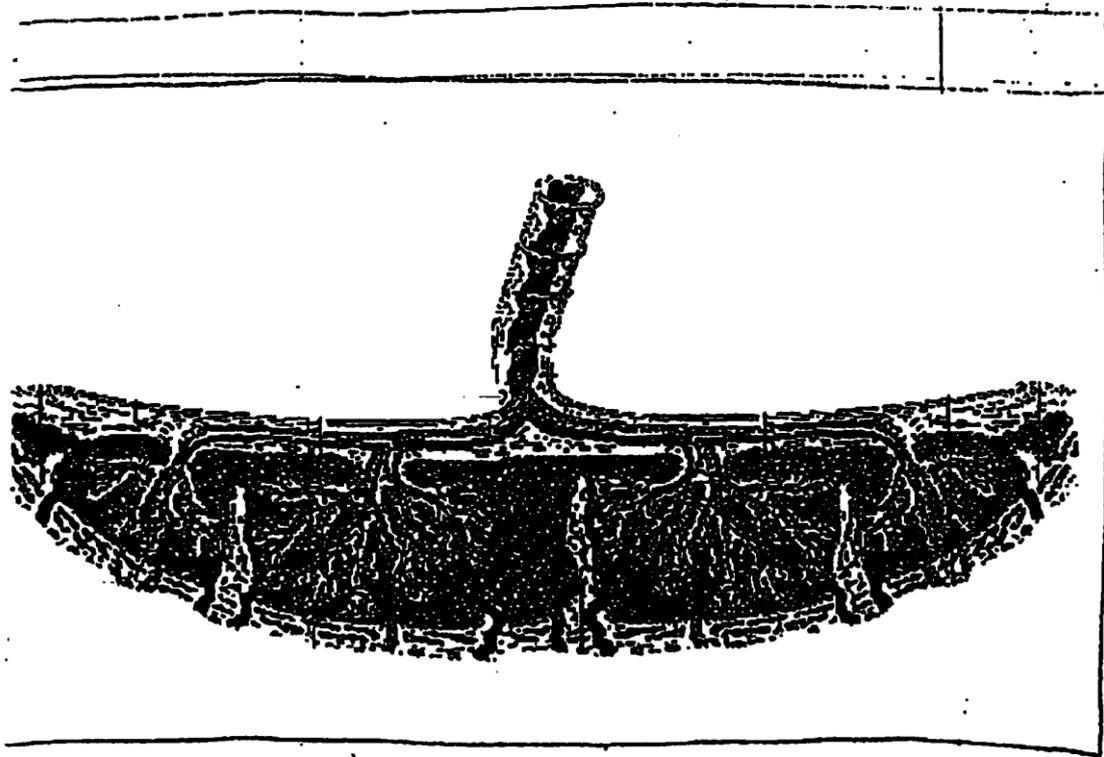


Figura 2d



PLACENTA PERFUNDIDA DRENADA
ALMACENADA EN UN RECIPIENTE
HERMÉTICO AL AIRE

Figura 2e

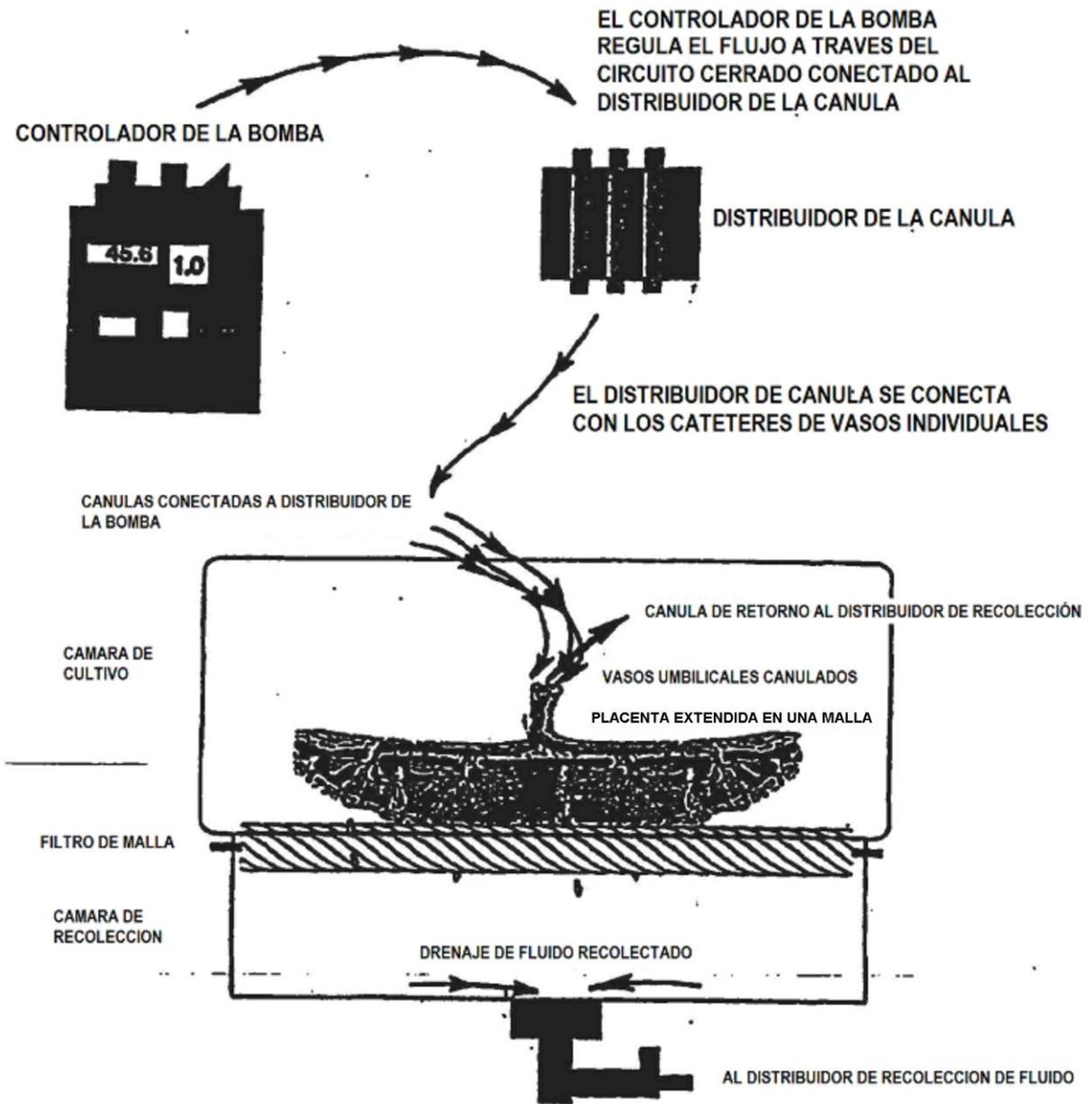


Figura 3

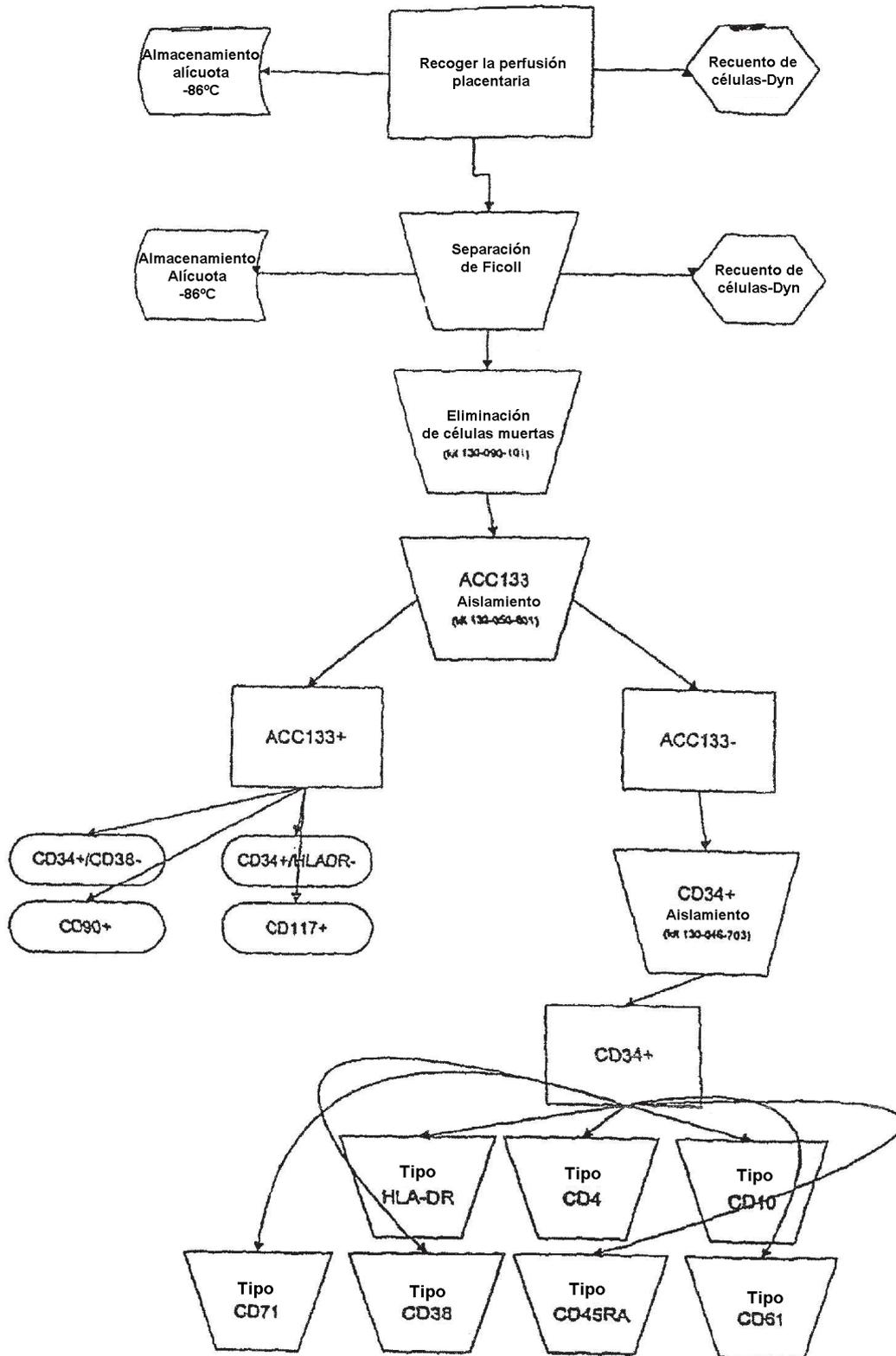


FIGURA 4