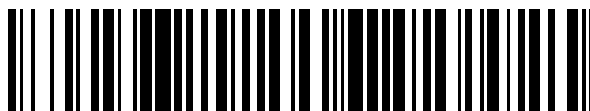


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 595**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2006** **E 06816901 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013** **EP 1957633**

54 Título: **Inmunomodulación usando células madre de la placenta**

30 Prioridad:

13.10.2005 US 727004 P
04.08.2006 US 835628 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.04.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 452 595 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

Inmunomodulación usando células madre de la placenta

1. Campo de la invención

En esta memoria se describen métodos para usar células madre de la placenta para modular el sistema inmune y las respuestas inmunes frente a antígenos. En esta memoria también se describen compuestos que comprenden células madre de la placenta para uso en inmunomodulación y métodos para el trasplante de tejidos y órganos que comprenden la administración de células madre de la placenta para evitar o inhibir el rechazo mediado por el sistema inmune

2. Antecedentes de la invención

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

Se han caracterizado muchos tipos diferentes de células madre de mamífero. Véase, por ejemplo, Caplan et al., documento de Patente de Estados Unidos nº 5.486.359 (células madre mesenquimatosas humanas); Boyse et al., documento de Patente de Estados Unidos nº 5.004.681 (células progenitoras y células madre hematopoyéticas fetales y neonatales); Boyse et al., documento U.S. nº 5.192.553 (lo mismo); Beltrami et al., *Cell* 114(6):763-766 (2003) (células madre cardíacas); Forbes et al., *J. Pathol.* 197(4):510-518 (2002) (células madre hepáticas). En trasplantes se ha utilizado sangre del cordón umbilical y células nucleadas totales obtenidas a partir de la sangre del cordón para restaurar, parcial o totalmente, la función hematopoyética en pacientes que han sido sometidos a una terapia de ablación.

Zhang Yi et al., *Experimental Hematology*, vol. 32, nº 7 (julio 2004) y Li Chang Dong, et al., *Cell Research - Yibao Yanjiu*, vol. 15, nº 7 (julio 2005) describen una población de células aisladas a partir de la placenta que puede inhibir la proliferación de los linfocitos T en un ensayo de MLR. Roth I, et al., *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 184, nº 2 (1 de Agosto, 1996) describen citotrofoblastos que expresan HLA-G, secretan citocinas e IL-10. McMaster M. T., et al., *Journal of Immunology*, The Williams and Wilkins Co., vol. 154, nº 8 (15 de abril, 1995) describen un estudio sobre la producción de proteína HLA-G en trofoblastos humanos *in vivo* e *in vitro*, para determinar la importancia de la expresión de HLA-G en la diferenciación de citotrofoblastos. Clark David A., et al., *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 50, nº 3 (septiembre 2003) describen que los trofoblastos placentarios expresan CD200. Poetgens A. J. G., et al., *Placenta*, W.B. Saunders, vol. 24, nº 4 (abril 2003) describen un método para aislar trofoblastos placentarios que expresan CD105 en HLA-I. Ninguno de estos documentos describe o sugiere la invención reivindicada.

La placenta es una fuente particularmente atractiva de células madre. Como las placentas de mamífero son abundantes y normalmente se desechan como residuo médico, representan una fuente excepcional de células madre útiles para fines médicos. En la presente invención se proporcionan tales células madre aisladas de la placenta, poblaciones de células madre de la placenta y métodos para utilizarlas.

3. Compendio de la invención

La presente invención proporciona células madre de la placenta para uso en un método para inhibir una respuesta inmune, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de los linfocitos T estimulada por linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr, en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos, y en donde al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G; y en donde dicha respuesta inmune es una respuesta inmune frente a un alotrasplante, una enfermedad autoinmune, diabetes, lupus eritematoso, artritis reumatoide o esclerosis múltiple. La presente invención proporciona adicionalmente un método para producir *in vitro* una población de células madre de la placenta que comprende (a) someter a ensayo una pluralidad de células madre de la placenta en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR, del inglés "mixed lymphocyte reaction"); y (b) seleccionar dicha pluralidad de células madre de la placenta, si dicha pluralidad de células madre de la placenta inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, estimulada por linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr, en donde dichas células madre de la placenta se adhieren a un sustrato; en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos; y en donde al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G. Además, la presente invención también proporciona una población aislada de células madre de la placenta producida de acuerdo con el método de la presente invención. La presente invención proporciona adicionalmente una población aislada de células madre de la placenta, en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos, en donde al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T estimulada por linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr.

En esta memoria se describen métodos de inmunosupresión que emplean una variedad de células madre placentarias o células madre del cordón umbilical, poblaciones de células madre de la placenta o células madre del cordón umbilical, y composiciones que comprenden y/o producidas por las células madre. En esta memoria también se describen composiciones, incluyendo composiciones que comprenden células madre placentarias o células madre del cordón umbilical, que tienen propiedades inmunosupresoras. En esta memoria también se describen poblaciones de células placentarias o células madre del cordón umbilical seleccionadas basándose en su capacidad para modular una respuesta inmune, y composiciones que tienen propiedades inmunomoduladoras.

En un aspecto, en esta memoria se describe un método para inhibir o reducir una respuesta inmune que comprende poner en contacto una pluralidad de células inmunes con una pluralidad de células madre de la placenta durante un tiempo suficiente para que dichas células madre de la placenta supriman de forma detectable una respuesta inmune, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T en una reacción mixta linfocitaria (MLR). En una realización específica, dichas células madre de la placenta: expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; expresan CD73, CD105 y HLA-G; expresan CD73 y CD105 y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende la pluralidad de células madre de la placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode y/o expresa OCT-4 y facilita la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende la pluralidad de células madre placentarias, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En otra realización específica, dicha pluralidad de células inmunes son linfocitos T o células NK (citotóxicas, del inglés "natural killer"). En una realización más específica, dichos linfocitos T son linfocitos T CD4⁺. En otra realización más específica, dichos linfocitos T son linfocitos T CD8⁺. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se lleva a cabo *in vitro*. En otra realización específica, dicha puesta en contacto se realiza *in vivo*. En una realización más específica, dicha puesta en contacto *in vivo* se realiza en un sujeto mamífero, por ejemplo, un sujeto humano. En otra realización más específica, dicha puesta en contacto comprende administrar dichas células placentarias por vía intravenosa, por vía intramuscular o en un órgano en dicho sujeto (por ejemplo, un páncreas). El método para inhibir una respuesta inmune, particularmente *in vivo*, puede comprender adicionalmente administrar (por ejemplo, a un mamífero), p. ej., una anti-proteína inflamatoria de macrófago (MIP)-1 α o un anticuerpo anti-MIP-1 β a dicho sujeto, en donde dicho anticuerpo se administra en una cantidad suficiente para causar una caída detectable en la cantidad de MIP-1 α o anti-MIP-1 β , por ejemplo, en la sangre de dicho sujeto.

En una realización más específica del método, dichas células madre de la placenta que expresan CD200 y HLA-G, también expresan CD73 y CD105, es decir, son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células placentarias son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En una realización más específica, dichas células madre de la placenta son CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dicha pluralidad de células madre de la placenta facilita el desarrollo de uno o varios cuerpos de tipo embriode a partir de una población de células aisladas de la placenta que comprenden células madre de la placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

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

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

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

En otra realización más específica, dichas células madre de la placenta que expresan CD73 y CD105, y facilitan la

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

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

En otra realización específica del método para reducir o inhibir una respuesta inmune, dicha respuesta inmune es la enfermedad de injerto contra hospedador. En otra realización específica, dicha respuesta inmune es una enfermedad autoinmune, por ejemplo, diabetes, lupus eritematoso o artritis reumatoide.

En otra realización específica del método, dicha pluralidad de células inmunes también se pone en contacto con una pluralidad de células no placentarias. Estas células no placentarias pueden comprender, por ejemplo, células CD34⁺. En una realización más específica, dichas células CD34⁺ son células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, células progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón o células progenitoras hematopoyéticas de sangre de la placenta. En otra realización específica, dichas células no placentarias comprenden células madre mesenquimatosas. En una realización más específica, dichas células madre mesenquimatosas son células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea. En otra realización específica, dichas células no placentarias están contenidas en un alotrasplante.

El método puede emplear tantas células madre de la placenta como se requieran para llevar a cabo una inhibición detectable de una respuesta inmune. Por ejemplo, la pluralidad de células madre placentarias requeridas para ponerse en contacto la pluralidad de células inmunes, puede comprender 1×10^5 células madre de la placenta, 1×10^6 células madre de la placenta, 1×10^7 células madre de la placenta o 1×10^8 células madre de la placenta, o más.

En esta memoria también se describen métodos para producir poblaciones de células que comprenden células madre de la placenta seleccionadas basándose en su capacidad para modular (por ejemplo, inhibir) una respuesta inmune. En una realización, por ejemplo, la invención proporciona un método para seleccionar una población de células madre de la placenta *in vitro* que comprende (a) someter a ensayo una pluralidad de células de la placenta en un ensayo de reacción mixta linfocitaria (MLR); y (b) seleccionar dicha pluralidad de células madre de la placenta si dicha pluralidad de células madre de la placenta inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ estimulados por linfocitos B presentadores de antígenos del virus Epstein-Barr, en donde dichas células madre de la placenta: (i) se adhieren a un sustrato, y (ii) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G.

En esta memoria también se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar a partir de una pluralidad de células, células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, e (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR (reacción mixta linfocitaria); y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células.

En esta memoria también se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar a partir de una pluralidad de células, células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y CD200, e (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células. En esta memoria también se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar a partir de una pluralidad de células, células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y OCT-4, e (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células. En esta memoria también se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar a partir de una pluralidad de células, células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, e (d) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células. En esta memoria también se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar a partir de una pluralidad de células, células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G, e (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células de la placenta de otras células para formar una población de células. En esta memoria también se describe un método para producir una población de células que comprende seleccionar a partir de una pluralidad de células, células de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, e (d) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células de la placenta de otras células para formar una población de células.

En realizaciones específicas de cualquiera de las realizaciones del presente documento, dichos linfocitos T y dichas células madre de la placenta están presentes en dicha MLR en una proporción de, por ejemplo, aproximadamente 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 2:2, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 o 1:20, preferiblemente 5:1.

En otra realización específica, los métodos comprenden seleccionar células que expresan ABC-p. En otra realización específica, los métodos comprenden seleccionar células que muestran al menos una característica específica de una célula madre mesenquimatosa. En una realización más específica, dicha característica específica de una célula madre mesenquimatosa es la expresión de CD29, la expresión de CD44, la expresión de CD90 o la expresión de una combinación de las anteriores. En otra realización específica de los métodos, dicha selección se lleva a cabo utilizando un anticuerpo. En otra realización específica, dicha selección se realiza mediante citometría de flujo. En otra realización específica, dicha selección se lleva a cabo usando perlas magnéticas. En otra realización específica, dicha selección se lleva a cabo mediante clasificación de células activada por fluorescencia. En otra realización específica de los métodos anteriores, dicha población celular se expande.

Las células madre de la placenta, utilizadas en los métodos de esta memoria se pueden obtener a partir de toda la placenta, o de cualquier parte de la placenta. Por ejemplo, en diversas realizaciones, dichas células madre de la placenta se obtienen principalmente, o únicamente, a partir del amnios o del amnios y el corion, o se obtienen de perfusado de la placenta recogido durante la perfusión placentaria. En realizaciones específicas, dichas células madre de la placenta inhiben la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en al menos un 50%, 70%, 90% o 95% en una MLR, en comparación con una cantidad de proliferación de linfocitos T en dicha MLR, en ausencia de dichas células madre de la placenta. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta, inhiben además de forma detectable una actividad de las células NK (citotóxicas).

En esta memoria también se describen poblaciones aisladas de células que comprenden células madre de la placenta producidas por cualquiera de los métodos descritos en este documento para seleccionar poblaciones de células placentarias inmunomoduladoras, en donde tal población se ha identificado como inhibidora detectable de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR. Por ejemplo, en una realización, en esta memoria se describe una población de células que comprende células madre de la placenta aisladas, en donde dichas células madre de la placenta: (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprende las células madre de la placenta, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embriode en una población de células de la placenta que comprenden las células madre de la placenta, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode, en donde dicha población se ha identificado como inhibidora detectable de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR.

En esta memoria se describe una población aislada de células que comprende células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G y (c) se han identificado como inhibidora detectable de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR. En esta memoria se describe una población aislada de células que comprende células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y CD200, y (c) se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR. En esta memoria se describe una población aislada de células que comprende células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y OCT-4, y (c) se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR. En esta memoria se describe una población aislada de células que comprende células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, (c) forman cuerpos de tipo embriode cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode y (d) se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR. En esta memoria se describe una población aislada de células que comprende células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G, y (c) se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR. En esta memoria se describe una población aislada de células que comprende células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, (c) forman cuerpos de tipo embriode cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode y (d) se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR.

En una realización más específica de la composición, dichas células madre de la placenta que expresan CD200 y HLA-G también expresan CD73 y CD105, es decir, son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células de la placenta son CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En una realización más específica, dichas células madre de la placenta son CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dicha pluralidad de células madre de la placenta facilita el desarrollo de uno o varios cuerpos de tipo embriode a partir de una población aislada de células de la placenta que comprenden las células madre de la placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

En otra realización más específica de la composición, dichas células madre de la placenta que expresan CD73, CD105 y CD200 son también HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta son CD34⁺, CD38⁺ o CD45⁺. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta son CD34⁺, CD38⁺ y CD45⁺. En

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

5 En otra realización más específica de la composición, dichas células madre de la placenta que expresan CD200 y OCT-4, también expresan CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta son HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta son CD34⁺, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta son CD34⁺, CD38⁻ y CD45⁻. En una realización más específica, dichas células madre de la placenta son CD34⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otra
10 realización específica, dichas células madre de la placenta facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide a partir de una población aislada de células de la placenta que comprenden células madre de la placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

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

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

En otra realización más específica de la composición, dichas células madre de la placenta que expresan OCT-4, y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide a partir de una población de células de la placenta que comprenden las células madre de la placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, también son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta son CD34⁺, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta son CD200⁺. En otra realización específica, dichas células madre de la placenta son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺, CD38⁻ y CD45⁻.
30

En esta memoria se describen composiciones inmunomoduladoras. En una realización, se describe en esta memoria una composición que comprende material sobrenadante procedente de un cultivo de cualquiera de las poblaciones celulares descritas en el presente documento. En otra realización, se describe en esta memoria una composición que comprende medio de cultivo procedente de un cultivo de células madre de la placenta, en donde dichas células de la placenta (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitar la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide en una población de células de la placenta que comprenden las células madre de la placenta, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide en una población de células de la placenta que comprenden las células madre de la placenta, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, e (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR (reacción mixta linfocitaria), en donde dicho cultivo de células madre de la placenta se ha cultivado en dicho medio durante 24 horas o más. En una realización específica, dicha composición comprende una pluralidad de dichas células madre de la placenta. En otra realización específica, dicha composición comprende una pluralidad de células no placentarias. En una realización más específica, dichas células no placentarias comprenden células CD34⁺. Las células CD34⁺ pueden ser, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, células progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón o células progenitoras hematopoyéticas de sangre de la placenta. En otra realización específica, dichas células no placentarias comprenden células madre mesenquimatosas. En una realización más específica, dichas células madre mesenquimatosas son células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea. En otra realización específica, la composición comprende además un anticuerpo anti-MIP-1 α o anti-MIP-1 β .
35
40
45
50
55

En otra realización específica, cualquiera de las composiciones anteriores comprende una matriz. En una realización más específica, dicha matriz es un entramado tridimensional. En otra realización más específica, dicha matriz comprende colágeno, gelatina, laminina, fibronectina, pectina, ornitina o vitronectina. En otra realización más específica, la matriz es una membrana amniótica o un biomaterial obtenido a partir de una membrana amniótica. En otra realización más específica, dicha matriz comprende una proteína de la membrana extracelular. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra realización más específica,
60

dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización más específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, una citocina, un anticuerpo o una molécula orgánica de menos de 5.000 daltons.

En esta memoria se describen poblaciones de células madre crioconservadas, por ejemplo, una población de células que comprende células madre de la placenta, en donde la población de células es inmunomoduladora, lo que se describe en el presente documento. Por ejemplo, en esta memoria se describe una población de células madre de la placenta CD200⁺, HLA-G⁺ que se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en un ensayo de reacción mixta linfocitaria (MLR), en donde dichas células se han crioconservado, y en donde dicha población está contenida dentro de un recipiente. En esta memoria se describe una población de células madre de la placenta CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ que se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta linfocitaria (MLR), en donde dichas células madre se han crioconservado, y en donde dicha población está contenida dentro de un recipiente. En esta memoria se describe una población de células madre de la placenta CD200⁺, OCT-4⁺ que se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta linfocitaria (MLR), en donde dichas células madre se han crioconservado, y en donde dicha población está contenida dentro de un recipiente. En esta memoria se describe una población de células madre de la placenta CD73⁺, CD105⁺ que se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta linfocitaria (MLR), en donde dichas células madre se han crioconservado, y en donde dicha población está contenida dentro de un recipiente, y en donde dichas células madre facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan con una población de células de la placenta en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En esta memoria se describe una población de células madre de la placenta CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ que se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta linfocitaria (MLR), en donde dichas células madre se han crioconservado, y en donde dicha población está contenida dentro de un recipiente. En esta memoria se describe una población de células madre de la placenta OCT-4⁺ que se han identificado como inhibidoras detectables de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción mixta linfocitaria (MLR), en donde dichas células madre se han crioconservado, y en donde dicha población está contenida dentro de un recipiente, y en donde dichas células madre facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan con una población de células de la placenta en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En una realización específica de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dicho recipiente es una bolsa. En diversas realizaciones específicas, dicha población comprende aproximadamente, al menos, o como máximo 1×10^6 de dichas células madre, 5×10^6 de dichas células madre, 1×10^7 de dichas células madre, 5×10^7 de dichas células madre, 1×10^8 de dichas células madre, 5×10^8 de dichas células madre, 1×10^9 de dichas células madre, 5×10^9 de dichas células madre o 1×10^{10} de dichas células madre. En otras realizaciones específicas de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células madre han tenido pases de aproximadamente, al menos, o no más de 5 veces, no más de 10 veces, no más de 15 veces o no más de 20 veces. En otra realización específica de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células madre se han expandido dentro de dicho recipiente.

3.1 Definiciones

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo en el marcador CD105. De esta manera, las células que se denominan SH2⁺ son CD105⁺.

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

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

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

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre de la placenta" se refiere a una célula madre o una célula progenitora que se obtiene a partir de una placenta de mamífero, independientemente de la morfología, de los marcadores de la superficie celular o del número de pases después de un cultivo primario, que se adhiere a un sustrato de cultivo tisular (por ejemplo, plástico para el cultivo de tejidos o placa para el cultivo de tejidos revestida de fibronectina). La expresión "célula madre de la placenta", tal y como se usa en la presente memoria, sin embargo, no se refiere a un trofoblasto. Una célula se considera una "célula madre" si la célula conserva al menos

un atributo de una célula madre, por ejemplo, la capacidad de diferenciarse en al menos otro tipo de célula o similar

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

Tal y como se usa en la presente memoria, "inmunomodulación" e "inmunomodulador" significa que causa o que tiene la capacidad de causar un cambio detectable en una respuesta inmune, y la capacidad de causar un cambio detectable en una respuesta inmune.

Tal y como se usa en la presente memoria, "inmunosupresión" e "inmunosupresor" significa que causa o que tiene la capacidad de causar una reducción detectable en una respuesta inmune, y la capacidad de causar una inhibición detectable de una respuesta inmune.

4. Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIGS. 10A y 10B: La reacción linfocitaria mixta (MLR) es un modelo para la respuesta inmune virgen, y se inhibe mediante células madre de la placenta. A partir de las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ y "vivos" acotadas, se supervisó el porcentaje de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE)^{Bajo} (FIGS. 10A y 10B, respectivamente). Este porcentaje aumentó después de una MLR de seis días y con la adición de células madre de la placenta, el efecto se invierte en los compartimentos de linfocitos T tanto CD8⁺ como CD4⁺.

FIG. 11: Células madre obtenidas a partir de placenta procedentes de amnios-placa coriónica (AC) y estroma del cordón umbilical (CU) inhiben la alo-MLR. La MLR se realiza con linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ o cantidades iguales de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺. Abscisas: porcentaje de inhibición de la proliferación.

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

FIG. 13: Las células madre de la placenta procedentes de diferentes donantes inhiben la alo-MLR en diferentes grados. La figura compara la inhibición en una MLR mediante células madre de la placenta procedentes de dos donantes de placenta, denominados 61665 y 63450. Las células madre de la placenta 63450 parecen inhibir la MLR en un mayor grado que las células madre procedentes de la placenta 61665.

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

5 FIG. 15: Inhibición mediante células madre de la placenta de la proliferación de linfocitos T en el ensayo de regresión de seis días. Se preparó un ensayo de regresión usando linfocitos T marcados con CFSE. Después de seis días, se evaluó la proliferación de los linfocitos T. Se muestra una inhibición relativa de la proliferación de los linfocitos T mediante células madre procedentes de amnios-corion (AC), cordón umbilical (CU), membrana amniótica (MA) o médula ósea (MO).

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

15 FIG. 17: Células madre del estroma de cordón umbilical (CU) añadidas a 12.500 (CU OP/TW 12.5) a 100.000 (CU OP/TW 100) estaban separadas de la MLR por una membrana (TW) o estaban en contacto con la MLR (OP). Se usaron números iguales de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺, y se calculó el porcentaje de inhibición de la MLR (% CFSE^{Bajo} = 89%).

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

FIG. 19: Inhibición diferencial de respuestas de linfocitos T mediante células madre de la placenta y CMMO (células madre de médula ósea, siglas en inglés BMSC). El grado de inhibición conferida por las células madre de la placenta o CMMOs se calculó comparando el porcentaje de linfocitos T de MLR en la subpoblación CFSE^{Bajo}, mayor del 70%, con el de las MLRs de células adherentes. La MLR se separó de las células adherentes (Transwell) o se realizó en un pocillo abierto (abierto). El eje X proporciona los números de células adherentes, en miles, añadido a 500.000 linfocitos T y 50.000 CDs. La relación entre células adherentes y linfocitos T va de 1:5 a 1:40.

25

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

30

FIG. 21: No se requieren linfocitos T reguladores para la inhibición de linfocitos T mediada por células madre de la placenta. Se realizó un ensayo de regresión usando CMSPs (células madre de sangre periférica, siglas en inglés PBMC) completas o CMSPs con reducción de linfocitos T reguladores (gráfico verde), ambas teñidas con CFSE, añadiendo células madre de la placenta CU a algunos estados (gráficos azul y verde). N=1.

35

FIG. 22: Las células CFSE^{Alto} proliferan en una MLR secundaria. A partir de una MLR de células madre de la placenta usando células teñidas con CFSE, los linfocitos T CFSE^{Alto} se aislaron en un FACS Aria. Las células se usaron en una MLR. N=1.

FIG. 23: El material sobrenadante de una MLR de células madre inhibidas no inhibe una MLR con un reemplazo del 75%. Se realizaron MLRs de CU (CUP), AC (ACP) y CMMO (MOP) y todas inhibieron la MLR más del 50%. Se usó el material sobrenadante de los experimentos para reemplazar desde 10 a 150 µl de los 200 µl de medio usado para una nueva MLR. Como testigos, también se utilizó medio procedente de linfocitos T y AC (T/AC) o cocultivos de linfocitos T y células madre obtenidas a partir de médula ósea (T/MO) de la misma manera (N=2).

40

FIGS. 24A, 24B: La preincubación de linfocitos T y células adherentes no influye sobre la inhibición de la MLR. Se usaron linfocitos T procedentes de dos donantes en dos experimentos independientes. Se incubaron CDs maduras (A) o linfocitos T CD3⁺ teñidos con CFSE (B) con células madre del cordón umbilical (CU) o células madre obtenidas a partir de médula ósea durante el número indicado de días, antes de añadir las CDs (el día 0, A) o linfocitos T CD3⁺ CFSE⁺ (B), empezando de esta manera la MLR. Después se realizaron las MLRs de células adherentes durante seis días, de la manera normal. N=2.

45

FIGS. 25A, 25B: A. La secreción de MIP-1α y MIP-1β en la MLR, y la MLR con células madre de la placenta o células madre obtenidas a partir de médula ósea, se correlaciona inversamente con la inhibición de la MLR. B: datos de CFSE de linfocitos T y células NK del mismo experimento. Se recogieron materiales sobrenadantes de la MLR mostrada en la FIG. 14B y se analizaron con respecto a MIP-1α y MIP-1β. B: se realizó la MLR como se ha descrito, y se observaron un promedio de 55% (linfocitos T) o 83% (células NK) de células CFSE^{Bajo}. Se calculó el efecto inhibidor de la adición de células madre. N=2 (parte NK: N=1).

50

55

FIG. 26: En los materiales sobrenadantes de MLR y del ensayo de regresión modificado, se midió MCP-1. La

inhibición de células madre de la placenta de la MLR y del ensayo de regresión se correlaciona con la secreción del agente quimiotáctico MCP-1. AC: células madre procedentes de amnios-placa coriónica. CU: células madre procedentes del cordón umbilical. Barras claras: resultados del ensayo de MLR. Barras oscuras: resultados del ensayo de regresión. Eje Y: pg de MCP-1 en la solución del ensayo.

5 FIG. 27: Medición de IL-6 en el material sobrenadante de la MLR modificada y del ensayo de regresión. La inhibición de las células madre de la placenta de la MLR y el ensayo de regresión se correlaciona con la secreción de IL-6. AC: células madre procedentes de amnios-placa coriónica. CU: células madre procedentes del cordón umbilical. Barras claras: resultados del ensayo de MLR. Barras oscuras: resultados del ensayo de regresión. Eje Y: pg de IL-6 en la solución del ensayo.

10 5. Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona células madre de la placenta para uso en un método para inhibir una respuesta inmune, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T estimulada por los linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr, en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos, y en donde al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G; y en donde dicha respuesta inmune es una respuesta inmune frente a un alotrasplante, una enfermedad autoinmune, diabetes, lupus eritematoso, artritis reumatoide o esclerosis múltiple. La presente invención proporciona adicionalmente un método para producir *in vitro* una población de células madre de la placenta que comprende (a) someter a ensayo una pluralidad de células de la placenta en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR); y (b) seleccionar dicha pluralidad de células madre de la placenta si dicha pluralidad de células madre de la placenta inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, estimulada por linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr, en donde dichas células madre de la placenta se adhieren a un sustrato; en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos; y en donde al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G. Además, la presente invención también proporciona una población aislada de células madre de la placenta, producidas de acuerdo con el método de la presente invención. La presente invención proporciona adicionalmente una población aislada de células madre de la placenta, en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos, y en donde al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y HLA-G; expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T estimulada por linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr.

5.1 Inmunomodulación empleando células madre de la placenta

En esta memoria se describe la modulación, por ejemplo, la inhibición de la actividad, por ejemplo, proliferación, de una célula inmune o de una pluralidad de células inmunes, mediante la puesta en contacto de la célula o células inmunes con una pluralidad de células madre de la placenta. En una realización, se describe en esta memoria un método para inhibir una respuesta inmune que comprende poner en contacto una pluralidad de células inmunes con una pluralidad de células madre de la placenta durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células madre de la placenta inhiban de forma detectable una respuesta inmune, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR).

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

Una "células inmune" en el contexto de este método, significa cualquier célula del sistema inmune, particularmente linfocitos T y células NK (natural killer, también conocidas como citotóxicas). De esta manera, en diversas realizaciones del método, células madre de la placenta se ponen en contacto con una pluralidad de células inmunes, en donde la pluralidad de células inmunes son, o comprenden, una pluralidad de linfocitos T (por ejemplo, una pluralidad de linfocitos T CD3⁺, linfocitos T CD4⁺ y/o linfocitos T CD8⁺) y/o células citotóxicas. Una "respuesta inmune" en el contexto del método puede ser cualquier respuesta a través de una célula inmune frente a un estímulo percibido normalmente por una célula inmune, por ejemplo, una respuesta a la presencia de un antígeno. En diversas realizaciones, una respuesta inmune puede ser la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD3⁺, linfocitos T CD4⁺ y/o linfocitos T CD8⁺) como respuesta a un antígeno extraño, tal como un antígeno presente en una transfusión o injerto, o contra un autoantígeno, como en una enfermedad autoinmune. La respuesta inmune también puede ser una proliferación de linfocitos T contenidos dentro de un injerto. La respuesta inmune también puede ser cualquier actividad de una célula citotóxica (NK), la maduración de una célula dendrítica o similares. La respuesta inmune también puede ser un efecto local, específico de tejido u órgano, o sistémico de una actividad de una o varias clases de células inmunes, por ejemplo, la respuesta inmune puede ser una enfermedad de injerto

contra hospedador, una inflamación, una formación de tejido cicatricial relacionado con inflamación, una afección autoinmune (por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes de Tipo I, lupus eritematoso, etc.), y similares.

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

En esta memoria se describen métodos para usar células madre de la placenta para modular una respuesta inmune, o la actividad de una pluralidad de uno o más tipos de células inmunes, *in vitro*. La puesta en contacto de las células madre de la placenta y la pluralidad de células inmunes puede comprender combinar las células madre de la placenta y las células inmunes en el mismo espacio físico, de tal forma que al menos una parte de la pluralidad de células madre de la placenta interaccione con al menos una parte de la pluralidad de células inmunes; mantener las células madre de la placenta y las células inmunes en espacios físicos separados con un medio común; o puede comprender poner en contacto el medio de una célula o de un cultivo de células madre de la placenta o de células inmunes con el otro tipo de célula (por ejemplo, obtener el medio de cultivo a partir de un cultivo de células madre de la placenta y resuspender las células inmunes aisladas en el medio). En un ejemplo específico, la puesta en contacto se realiza en una reacción linfocitaria mixta (MLR).

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

La MLR puede usarse para determinar la capacidad inmunosupresora de una pluralidad de células madre de la placenta. Por ejemplo, una pluralidad de células madre de la placenta se puede someter a ensayo en una MLR que comprende combinar linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, células dendríticas (CD) y células madre de la placenta en una relación de aproximadamente 10:1:2, en donde los linfocitos T están teñidos con un colorante tal como, por ejemplo, CFSE que se reparte entre las células hijas, y en donde se permite que los linfocitos T proliferen durante aproximadamente 6 días. La pluralidad de células madre de la placenta es inmunosupresora si la proliferación de linfocitos T en 6 días, en presencia de células madre de la placenta, se reduce de forma detectable en comparación con la proliferación de linfocitos T en presencia de CD y en ausencia de células madre de la placenta. En dicha MLR, las células madre de la placenta se descongelan o se recogen de un cultivo. Se resuspenden aproximadamente 20.000 células madre de la placenta en 100 µl de medio (RPMI 1640, tampón HEPES 1 mM, antibióticos y suero humano combinado al 5%) y se deja que se fijen al fondo de un pocillo durante 2 horas. Se aíslan los linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ a partir de perlas magnéticas Miltenyi con células mononucleares de sangre periférica enteras. Las células se tiñen con CFSE y se añade un total de 100.000 linfocitos T (linfocitos T CD4⁺ solos, linfocitos T CD8⁺ solos o cantidades iguales de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺) por pocillo. El volumen en el pocillo se lleva a 200 µl y se deja que tenga lugar la MLR.

Por lo tanto, en una realización, se describe en esta memoria un método para inhibir una respuesta inmune que comprende poner en contacto una pluralidad de células inmunes con una pluralidad de células madre de la placenta, durante un periodo de tiempo suficiente para que dichas células madre de la placenta inhiban de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización, dichas células madre de la placenta usadas en la MLR representan una muestra o una parte alícuota de células madre de la placenta de una población mayor de células madre de la placenta.

Las poblaciones de células madre de la placenta obtenidas a partir de diferentes placentas, o diferentes tejidos dentro de la misma placenta, pueden diferir en su capacidad de modular una actividad de una célula inmune, por ejemplo, pueden diferir en su capacidad de inhibir la actividad de linfocitos T o la proliferación o la actividad de células NK. Por lo tanto, es deseable determinar, antes del uso, la capacidad de una población particular de células madre de la placenta para la inmunosupresión. Dicha capacidad puede determinarse, por ejemplo, sometiendo a ensayo una muestra de la población de células madre de la placenta en un ensayo de MLR o de regresión. En una realización, se realiza una MLR con la muestra, y se determina el grado de inmunosupresión en el ensayo atribuible

a las células madre de la placenta. Este grado de inmunosupresión puede atribuirse después a la población de células madre de la placenta que se muestreó. De esta manera, la MLR puede usarse como método para determinar la capacidad absoluta y relativa de una población particular de células madre de la placenta, para inhibir la función inmune. Los parámetros de la MLR se pueden variar para proporcionar más datos o para determinar mejor la capacidad de inmunosupresión de una muestra de células madre de la placenta. Por ejemplo, como la inmunosupresión a través de las células madre de la placenta parece aumentar de forma general en proporción con el número de células madre de la placenta presentes en el ensayo, la MLR puede realizarse, en una realización, con dos o más cantidades de células madre de la placenta, por ejemplo, 1×10^3 , 3×10^3 , 1×10^4 y/o 3×10^4 células madre de la placenta por reacción. También puede variarse el número de células madre de la placenta con respecto al número de linfocitos T en el ensayo. Por ejemplo, las células madre de la placenta y los linfocitos T en el ensayo pueden estar presentes en cualquier relación, por ejemplo, desde aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferentemente aproximadamente 1:5, aunque se puede usar un número relativamente mayor de células madre de la placenta o de linfocitos T.

El ensayo de regresión puede usarse de una forma similar.

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

Tal inmunosupresión usando células madre de la placenta sería ventajosa para cualquier afección producida o empeorada, o relacionada con una respuesta inmune inapropiada o indeseable. La inmunomodulación mediada por células madre de la placenta, por ejemplo, la inmunosupresión, sería útil, por ejemplo, en la inhibición de una respuesta inmune inapropiada producida por el sistema inmune del individuo contra uno varios de sus propios tejidos. En diversas realizaciones, por lo tanto, en esta memoria se describe un método para inhibir una respuesta inmune, en donde la respuesta inmune es una enfermedad autoinmune, por ejemplo, lupus eritematoso, diabetes, artritis reumatoide o esclerosis múltiple.

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

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

Las células madre de la placenta se administran al individuo preferentemente en una relación, con respecto al

número conocido o esperado de células inmunes, por ejemplo, linfocitos T, en el individuo, desde aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferentemente aproximadamente 1:5. Sin embargo, se puede administrar una pluralidad de células madre de la placenta a un individuo en una relación, en ejemplos no limitantes, desde aproximadamente 10.000:1, aproximadamente 1.000:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1.000 o aproximadamente 1:10.000. Generalmente, se puede administrar desde aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^8 células madre de la placenta por kilogramo de receptor, preferentemente desde aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^7 células madre de la placenta por kilogramo de receptor, para efectuar una inmunosupresión. En diversas realizaciones, la pluralidad de células madre de la placenta administradas a un individuo o un sujeto comprenden al menos, aproximadamente, o no más de 1×10^5 , 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 , 1×10^7 , 3×10^7 , 1×10^8 , 3×10^8 , 1×10^9 , 3×10^9 células madre de la placenta o más.

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

Para facilitar la puesta en contacto de las células madre de la placenta y las células inmunes *in vivo*, las células madre de la placenta pueden administrarse al individuo por cualquier vía que sea suficiente para poner en contacto las células madre de la placenta y las células inmunes entre sí. Por ejemplo, las células madre de la placenta pueden administrarse al individuo, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o directamente en un órgano, por ejemplo, el páncreas. Para la administración *in vivo*, las células madre de la placenta pueden formularse como una composición farmacéutica, tal como se describe más adelante en la Sección 5.6.1.

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

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

Los métodos de inmunosupresión descritos en esta memoria usan células madre de la placenta, es decir, células madre que pueden obtenerse a partir de una placenta o una parte de la misma que (1) se adhieren a un sustrato de cultivo de tejidos; (2) tienen la capacidad de diferenciarse en tipos celulares no placentarios; y (3) tienen, en cantidades suficientes, la capacidad de inhibir de forma detectable una función inmune, por ejemplo, la proliferación de células madre CD4⁺ y/o CD8⁺ en un ensayo de reacción linfocitaria mixta. Las células madre de la placenta no proceden de la sangre, por ejemplo, de sangre placentaria o sangre del cordón umbilical. Las células madre de la placenta usadas en los métodos de la presente invención tienen la capacidad, y se seleccionan por su capacidad, para inhibir el sistema inmune de un individuo.

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

5.2.1 Características físicas y morfológicas

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

5.2.2 Marcadores moleculares y genéticos de la superficie celular

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

Las células madre de la placenta generalmente expresan los marcadores CD73, CD105, CD200, HLA-G y/o OCT-4, y no expresan CD34, CD38 o CD45. Las células madre de la placenta también pueden expresar HLA-ABC (MHC-1) y HLA-DR. Estos marcadores pueden usarse para identificar células madre de la placenta, y para distinguir células madre de la placenta de otros tipos de células madre. Como las células madre de la placenta pueden expresar CD73 y CD105, pueden tener características parecidas a las células madre mesenquimatosas. Sin embargo, como las células madre de la placenta pueden expresar CD200 y HLA-G, un marcador específico del feto, pueden distinguirse de las células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de la médula ósea, que no expresan ni CD200 ni HLA-G. De la misma manera, la ausencia de expresión de CD34, CD38 y/o CD45 identifica a las células madre de la placenta como células madre no hematopoyéticas.

En otra realización, se describe en esta memoria una población aislada de células que comprende una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras que son CD200⁺, HLA-G⁺, en donde dicha pluralidad inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica de las poblaciones aisladas, dichas células madre son también CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En una realización más específica, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización, dicha población aislada produce uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otra realización, se describe en esta memoria una población aislada de células que comprende una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras que son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, en donde dicha pluralidad inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica de dichas poblaciones, dichas células madre son HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En una realización más específica, dichas células madre son células CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ y HLA-G⁺. En otra realización específica, dicha población de células produce uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En esta memoria se describe una población de células aislada que comprende una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras que son CD200⁺, OCT-4⁺, en donde dicha pluralidad inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica, dichas células madre son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células madre son HLA-G⁺. En otra realización específica, dichas células madre son CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En una realización más específica, dichas células madre son células CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺. En otra realización específica, la población produce uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En esta memoria se describe una población de células aislada que comprende una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras que son CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺, en donde dicha pluralidad inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica de la pluralidad anterior, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre son también OCT-4⁺. En otra realización específica, dichas células madre son también CD200⁺. En una realización más específica, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺.

En esta memoria se describe una población de células aislada que comprende una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras que son células madre CD73⁺, CD105⁺, en donde dicha pluralidad forma uno o varios cuerpos de tipo embrioide en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y en donde dicha pluralidad inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre son también OCT-4⁺. En una realización más específica, dichas células madre son también OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.

En esta memoria se describe una población de células aislada que comprende una pluralidad de células madre de la

placenta inmunosupresoras que son células madre OCT-4⁺, en donde dicha población forma uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y en donde dicha pluralidad inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En diversas realizaciones, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células placentarias aisladas son células madre OCT4⁺. En una realización específica de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dichas células madre son CD34⁺, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dichas células madre son CD200⁺. En una realización más específica, dichas células madre son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dicha población se ha ampliado, por ejemplo, se han realizado pases al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces.

En otra realización, se describe en esta memoria una población de células aislada que comprende una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras que son CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺ y CD133⁻.

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

Cada una de las pluralidades a las que se ha referido anteriormente, de células madre de la placenta, puede comprender células madre de la placenta obtenidas y aisladas directamente a partir de una placenta de mamíferos, o células madre de la placenta que han sido cultivadas y se han realizado pases al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 o más veces, o una combinación de los mismos.

Las pluralidades inmunosupresoras de las células madre de la placenta descritas anteriormente pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células madre de la placenta.

5.2.3 Selección y producción de poblaciones de células madre de la placenta

En otra realización, se describe en esta memoria un método para seleccionar una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras a partir de una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una pluralidad de células placentarias en donde al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células son células madre de la placenta CD200⁺, HLA-G⁺ y en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica, dicha selección comprende la selección de células madre que son también CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dicha selección comprende la selección de células madre que son también CD34⁺, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende la selección de células madre de la placenta que son también CD34⁺, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dicha selección comprende también la selección de una pluralidad de células madre de la placenta que forma uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otra realización, se describe en esta memoria un método para seleccionar una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras a partir de una pluralidad de células de la placenta, que comprende la selección de una pluralidad de células de la placenta en donde al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células son células madre de la placenta CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, y en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también HLA-G⁺. En otra realización específica, dicha selección comprende la selección de células madre de la placenta que son también CD34⁺, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD34⁺, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD34⁺, CD38⁻, CD45⁻ y HLA-G⁺. En otra realización específica, dicha selección comprende adicionalmente seleccionar una población de células de la placenta que produce uno o varios cuerpos de tipo embrioide cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otra realización, se describe en esta memoria un método para seleccionar una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras a partir de una pluralidad de células de la placenta, que comprende la selección de una pluralidad de células de la placenta en donde al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células son células madre de la placenta CD200⁺, OCT-4⁺, y en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica, dicha selección comprende la selección de células madre de la placenta que también son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también HLA-G⁺. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la

placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺.

En otra realización, se describe en esta memoria un método para seleccionar una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras a partir de una pluralidad de células de la placenta, que comprende seleccionar una pluralidad de células de la placenta en donde al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células son células madre de la placenta CD73⁺, CD105⁺ y HLA-G⁺, y en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD200⁺. En otra realización específica, dicha selección comprende la selección de células madre de la placenta que son también CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ y CD200⁺.

En otra realización, se describe en esta memoria un método para seleccionar una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras a partir de una pluralidad de células de la placenta, que comprende la selección de una pluralidad de células de la placenta en donde al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células son células madre de la placenta CD73⁺, CD105⁺, y en donde dicha pluralidad forma uno o varios cuerpos de tipo embrioide en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende la selección de células madre de la placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también OCT-4⁺. En una realización más específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.

En otra realización, se describe en esta memoria un método para seleccionar una pluralidad de células madre de la placenta inmunosupresoras a partir de una pluralidad de células de la placenta, que comprende la selección de una pluralidad de células de la placenta en donde al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células de la placenta aisladas son células madre OCT4⁺, y en donde dicha pluralidad forma uno o varios cuerpos de tipo embrioide en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En una realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que también son CD73⁺ y CD105⁺. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD34⁻, CD38⁻ o CD45⁻. En otra realización específica, dicha selección comprende seleccionar células madre de la placenta que son también CD200⁺. En una realización más específica, dicha selección comprende la selección de células madre de la placenta que también son CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ y CD45⁻.

En esta memoria se describen métodos para producir poblaciones inmunosupresoras, o pluralidades, de células madre de la placenta. Por ejemplo, se describe en esta memoria un método para producir una población de células, que comprende la selección de cualquiera de las pluralidades de células madre de la placenta descritas anteriormente, y aislar la pluralidad de células madre de la placenta a partir de otras células, por ejemplo, otras células de la placenta. En una realización específica, se describe en esta memoria un método para producir una población de células que comprende seleccionar células de la placenta, en donde dichas células de la placenta (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitar la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide en una población de células de la placenta que comprende la célula madre, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, o expresar OCT-4 y facilitar la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide en una población de células de la placenta que comprende la célula madre, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, y (c) inhibir de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR (reacción linfocitaria mixta), y aislar dichas células de la placenta a partir de otras células para formar una población de células.

En una realización más específica, se describe en esta memoria un método para producir una población de células que comprende la selección de células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y HLA-G, e (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR (reacción linfocitaria mixta); y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células.

En otra realización específica, se describe en esta memoria un método para producir una población de células que comprende la selección de células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y CD200, y (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células. En otra realización específica, se describe en esta memoria un método para producir una población de células que comprende la selección de células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y OCT-4, y (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células. En otra realización específica, se describe en

esta memoria un método para producir una población de células que comprende la selección de células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, e (d) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células. En otra realización específica, se describe en esta memoria un método para producir una población de células que comprende la selección de células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G, e (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células. Un método para producir una población de células que comprende la selección de células madre de la placenta que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, (c) forman cuerpos de tipo embrioide cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide e (d) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR; y aislar dichas células madre de la placenta de otras células para formar una población de células.

En una realización específica de los métodos para producir una población de células madre de la placenta inmunosupresora, dichos linfocitos T y dichas células de la placenta están presentes en dicha MLR en una proporción de aproximadamente 5:1. Las células de la placenta utilizadas en el método se pueden obtener de toda la placenta, o principalmente del amnios, o amnios y corion. En otra realización específica, las células de la placenta inhiben la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en al menos 50%, al menos 75%, al menos 90% o al menos 95% en dicha MLR, en comparación con una cantidad de proliferación de linfocitos T en dicha MLR en ausencia de dichas células de la placenta. El método puede comprender adicionalmente la selección y/o la producción de una población de células madre de la placenta capaz de inmunomodular, por ejemplo, la inhibición de la actividad de otras células inmunes, por ejemplo, una actividad de una célula citotóxica (NK).

5.2.4 Crecimiento en cultivo

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

Las poblaciones de células placentarias aisladas que comprenden las células madre de la placenta descritas en la presente memoria, cuando se cultivan en condiciones apropiadas, forman cuerpos de tipo embrioide, es decir, agrupamientos tridimensionales de células que crecen encima de la capa de células madre adherentes. Las células dentro de los cuerpos de tipo embrioide expresan marcadores asociados con células madre en una fase muy temprana, por ejemplo, OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células dentro de los cuerpos de tipo embrioide generalmente no se adhieren al sustrato del cultivo, como lo hacen las células madre de la placenta descritas en la presente memoria, pero permanecen fijadas a las células adherentes durante el cultivo. Las células de los cuerpos de tipo embrioide dependen de las células madre de la placenta adherentes para la viabilidad, ya que no se forman cuerpos de tipo embrioide en ausencia de las células madre adherentes. De esta manera, las células madre de la placenta adherentes facilitan el crecimiento de uno o varios cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende las células madre de la placenta adherentes. Sin deseo de estar limitado por ninguna teoría, se cree que las células de los cuerpos de tipo embrioide crecen sobre las células madre de la placenta adherentes aunque las células madre embrionarias crecen sobre una capa de células de alimentación. Las células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de la médula ósea, no desarrollan cuerpos de tipo embrioide en cultivo.

5.2.5 Diferenciación

Las células madre de la placenta, útiles en los métodos de la presente invención, se pueden diferenciar en diferentes linajes celulares comprometidos. Por ejemplo, las células madre de la placenta pueden diferenciarse en células de un linaje adipogénico, condrogénico, neurogénico u osteogénico. Tal diferenciación puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica de la diferenciación, por ejemplo, células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea en linajes celulares similares.

5.3 Métodos para obtener células madre de la placenta

5.3.1 Composición de recogida de células madre

En esta memoria se describen métodos para recoger y aislar células madre de la placenta. Generalmente, las células madre se obtienen a partir de una placenta de mamífero usando una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una composición de recogida de células madre. En el documento de Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n° 60/754.969 relacionada, titulada "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition" presentada el 29 de diciembre de 2005, se describe con detalle una composición de recogida de células madre.

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

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

15 La composición de recogida de células madre puede comprender una o varias enzimas de degradación de tejidos, por ejemplo, una metaloproteasa, una serinoproteasa, una proteasa neutra, una ARNasa o una ADNasa, o similares. Tales enzimas incluyen, pero sin limitación, colagenasas (por ejemplo colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa procedente de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASE, hialuronidasa y similares.

20 La composición de recogida de células madre puede comprender una cantidad eficaz de un antibiótico desde el punto de vista bactericida o bacteriostático. En ciertas realizaciones no limitantes, el antibiótico es un macrólido (por ejemplo, tobramicina), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina, cefradina, cefuroxima, cefprozil, cefaclor, cefixima o cefadroxil), una claritromicina, una eritromicina, una penicilina (por ejemplo, penicilina V) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina), una tetraciclina, una estreptomina, etc. En una realización particular, el antibiótico es activo contra bacterias Gram(+) y/o Gram(-), por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y similares.

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

45 5.3.2 Recogida y manipulación de la placenta

En general, una placenta humana se recupera justo después de su expulsión después del parto. En una realización preferida, la placenta se recupera de una paciente después del consentimiento con conocimiento de causa y después de haber obtenido un historial médico completo del paciente y que se asocia con la placenta. Preferentemente, el historial médico continúa después del parto. Dicho historial médico puede usarse para coordinar el uso posterior de la placenta o de las células madre recogidas a partir de la misma. Por ejemplo, las células madre de la placenta humanas pueden usarse, en vista del historial médico, para una medicina personalizada para el bebé asociado con la placenta, o para los padres, hermanos u otros parientes del bebé.

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

Registry y Cryocell. Preferentemente, la placenta se drena por gravedad sin una manipulación adicional para minimizar la ruptura de tejidos durante la recuperación de la sangre del cordón.

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

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

La placenta de mamífero o una parte de la misma, una vez recogida y preparada en general como se ha mencionado anteriormente, puede tratarse de cualquier manera conocida en la técnica, por ejemplo, puede perfundirse o romperse, por ejemplo, digerir con una o varias enzimas de ruptura de tejidos, para obtener células madre.

5.3.3 Ruptura física y digestión enzimática del tejido placentario

En una realización, las células madre de una placenta de mamífero se recogen mediante ruptura física, por ejemplo, digestión enzimática del órgano. Por ejemplo, la placenta, o una parte de la misma, se puede, por ejemplo, machacar, partir, cortar, picar, cortar en dados, triturar, macerar o similares, mientras está en contacto con la composición de recogida de células madre descrita en esta memoria, y el tejido puede digerirse posteriormente con una o varias enzimas. La placenta, o una parte de la misma, también se puede romper físicamente y digerir con una o varias enzimas, y el material resultante se puede sumergir después, o mezclar con la composición de recogida de células madre descrita en esta memoria. Se puede utilizar cualquier método de ruptura física, siempre que el método de ruptura deje una pluralidad, más preferentemente una mayoría, y aún más preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicho órgano viables, como se determina, por ejemplo, por exclusión de azul de tripano.

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

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

Se puede utilizar cualquier combinación de enzimas de digestión de tejidos. Las concentraciones típicas para las enzimas de digestión de tejidos incluyen, por ejemplo, 50-200 U/ml para la collagenasa I y la collagenasa IV, 1-10

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

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

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

5.3.4 Perfusión de la placenta

Las células madre de la placenta también se pueden obtener por perfusión de la placenta del mamífero. Los métodos de perfusión de placenta de mamífero para obtener células madre se describen, por ejemplo, en Hariri, documento de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos nº 2002/0123141, y en el documento de Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos relacionada nº 60/754.969, titulada "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition", presentada el 29 de diciembre de 2005.

Las células madre de la placenta se pueden recoger por perfusión, por ejemplo, a través del sistema vascular placentario, usando, por ejemplo, una composición de recogida de células madre como solución de perfusión. En una realización, una placenta de mamífero se perfunde mediante el paso de solución de perfusión a través de la arteria umbilical, la vena umbilical o ambas. El flujo de la solución de perfusión a través de la placenta se puede conseguir usando, por ejemplo, flujo por gravedad en el interior de la placenta. Preferentemente, la solución de perfusión se hace pasar a través de la placenta usando una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica. La vena umbilical, por ejemplo, se puede canular con una cánula, por ejemplo, una cánula de TEFLON® o de plástico, que está conectada a un aparato de conexión estéril, tal como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.

En la preparación para la perfusión, la placenta preferentemente está orientada (por ejemplo, suspendida) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical están localizadas en el punto más alto de la placenta. La placenta se puede perfundir mediante el paso de un fluido de perfusión, por ejemplo, la composición de recogida de células madre descrita en esta memoria, a través del sistema vascular de la placenta, o a través del sistema vascular de la placenta y el tejido circundante. En una realización, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se pasa por el interior de la vena y la arteria umbilical. La solución de perfusión se exuda y/o se hace pasar a través de las paredes de los vasos sanguíneos a los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estaba fijada al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también puede introducirse a través de la abertura del cordón umbilical y dejar que fluya o percole hacia el exterior de las aberturas en la pared de la placenta que contactaba con la pared uterina materna. En otra realización, la solución de perfusión se hace pasar a través de las venas umbilicales y se recoge desde la arteria umbilical, o se hace pasar a través de la arteria umbilical y se recoge desde las venas umbilicales.

En una realización, la parte proximal del cordón umbilical está pinzada durante la perfusión, y más preferentemente, está pinzada en los 4-5 cm (centímetros) próximos a la inserción del cordón en el disco placentario.

La primera recogida de fluido de perfusión procedente de una placenta de mamífero durante el proceso de exanguinación, generalmente está coloreada con glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón y/o de la sangre de la placenta. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro a medida que continúa la perfusión y los glóbulos rojos residuales del cordón se retiran por lavado de la placenta. Generalmente es adecuada una cantidad de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión para exanguinar inicialmente la placenta, pero se puede usar más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

El volumen de líquido de perfusión usado para recoger las células madre de la placenta puede variar dependiendo del número de células madre que se va a recoger, el tamaño de la placenta, el número de recogidas que se van a realizar a partir de una sola placenta, etc. En diversas realizaciones, el volumen del líquido de perfusión puede ser de 50 ml a 5000 ml, de 50 ml a 4000 ml, de 50 ml a 3000 ml, de 100 ml a 2000 ml, de 250 ml a 2000 ml, de 500 ml a

2000 ml o de 750 ml a 2000 ml. Generalmente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después de la exanguinación.

La placenta se puede perfundir una pluralidad de veces durante el transcurso de varias horas o varios días. Cuando la placenta se va a perfundir una pluralidad de veces, se puede mantener o cultivar en condiciones asépticas en un recipiente u otro contenedor adecuado, y perfundir con una composición de recogida de células madre, o una solución de perfusión convencional (por ejemplo, una solución salina normal tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (por ejemplo, heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxycumarina) y/o con o sin un agente antimicrobiano (por ejemplo, β -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomicina (por ejemplo, a 40-100 μ g/ml), penicilina (por ejemplo, a 40 U/ml), anfotericina B (por ejemplo, a 0,5 μ g/ml). En una realización, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un periodo de tiempo sin recoger el perfundido, de tal forma que la placenta se mantiene o cultiva durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o 2 o 3 o más días antes de la perfusión y la recogida del perfundido. La placenta perfundida se puede mantener durante uno o más periodos de tiempo adicionales, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundir una segunda vez con, por ejemplo, 700-800 ml de fluido de perfusión. La placenta puede perfundirse 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En una realización preferida, la perfusión de la placenta y la recogida de la solución de perfusión, por ejemplo, la composición de recogida de células madre, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes puntos de tiempo se pueden procesar adicionalmente de forma individual para recuperar poblaciones de células dependientes del tiempo, por ejemplo, células madre. También se pueden agrupar los perfundidos de diferentes puntos de tiempo.

Sin deseo de estar limitado por alguna teoría, después de la exanguinación y de que haya transcurrido un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se cree que las células madre de la placenta migran al interior de la microcirculación exanguinada y perfundida de la placenta en donde se recogen, preferentemente por lavado en un recipiente de recogida mediante perfusión. La perfusión de la placenta aislada no solo sirve para retirar la sangre residual del cordón, sino que también proporciona a la placenta los nutrientes apropiados, incluyendo oxígeno. La placenta se puede cultivar y perfundir con una solución similar que se había utilizado para retirar las células de sangre residual del cordón, preferentemente, sin la adición de agentes anticoagulantes.

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

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

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

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

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

Los sedimentos celulares se pueden resuspender en una composición de recogida de células madre nueva, o un medio adecuado para el manteamiento de células madre, por ejemplo, medio IMDM sin suero que contiene 2 U/ml

de heparina y EDTA 2 mM EDTA (Gibco BRL, NY). La fracción total de células mononucleares se puede aislar, por ejemplo, usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendando por el fabricante.

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

10 Las células placentarias obtenidas por perfusión o digestión, por ejemplo, pueden aislarse adicionalmente, o inicialmente, por tripsinización diferencial usando, por ejemplo, una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial es posible porque las células madre de la placenta generalmente se separan de las superficies de plástico al cabo de un periodo de aproximadamente cinco minutos mientras que otras poblaciones adherentes generalmente requieren más de 20-30 minutos de incubación. Las células madre de la placenta separadas se pueden recoger después de la tripsinización y neutralización con tripsina, usando, por
15 ejemplo, Solución de Neutralización de Tripsina (TNS, Cambrex). En una realización de aislamiento de células adherentes, se ponen partes alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente $5-10 \times 10^6$ células en cada uno de diversos matraces T-75, preferentemente matraces T75 revestidos con fibronectina. En tal realización, las células pueden cultivarse con Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimatosas (MSCGM) (Cambrex) disponible en el mercado, y ponerse en una incubadora de cultivo de tejidos (37°C, 5% de CO₂). Después de 10 a 15 días, las
20 células no adherentes se retiran de los matraces lavando con PBS. El PBS se reemplaza a continuación por MSCGM. Los matraces preferentemente se examinan diariamente con respecto a la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y la expansión de grupos de células fibroblastoides.

25 El número y el tipo de células recogidas a partir de una placenta de mamífero se pueden supervisar, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular, usando técnicas de detección de células convencionales, tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (por ejemplo tinción con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcadores celulares), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas por magnetismo (MACS), por examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal, y/o midiendo cambios en la expresión génica usando técnicas bien conocidas en este campo, tales como PCR y formación de un perfil de la expresión génica.
30 Estas técnicas pueden usarse, también, para identificar células que son positivas para uno o varios marcadores particulares. Por ejemplo, usando anticuerpos para CD34, se puede determinar, usando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si es así, la célula es CD34⁺. De forma similar, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 para ser detectable por RT-PCR, o significativamente más ARN de OCT-4 que una célula adulta, la célula es OCT-4⁺. Los anticuerpos contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre, tales como OCT-4, son
35 bien conocidos en la técnica.

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

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

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

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

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

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

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

5.4 Cultivo de células madre de la placenta

5.4.1 Medios de cultivo

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

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

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

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

5.4.2 Expansión y proliferación de células madre de la placenta

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

Las células madre de la placenta se pueden sembrar en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. Por ejemplo, las células se pueden sembrar a baja densidad (por ejemplo, desde aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm²) o a alta densidad (por ejemplo, aproximadamente 50.000 o más células/cm²). En una realización preferida, las células se cultivan desde aproximadamente 0 hasta aproximadamente 5 por ciento por volumen de CO₂ en aire. En algunas realizaciones preferidas, las células se cultivan desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 25 por ciento de O₂ en aire, preferentemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20% de O₂ en aire. Las células preferentemente se cultivan desde aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 40°C, preferentemente a 37°C. Las células preferentemente se cultivan en una incubadora. El medio de cultivo puede ser estático o estar agitado, por ejemplo usando un biorreactor. Las células madre de la placenta se desarrollan preferentemente en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína o similares).

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

5.4.3 Poblaciones de células madre de la placenta

En esta memoria se describen poblaciones de células madre de la placenta. La población de células madre de la placenta se puede aislar directamente a partir de una o varias placentas; es decir, la población de células madre de la placenta puede ser una población de células placentarias que comprende células madre de la placenta obtenidas a partir de, o contenidas dentro de un perfundido, u obtenidas a partir de, o contenidas dentro de un producto de digestión (es decir, el conjunto de células obtenidas por digestión enzimática de una placenta o de una parte de la misma). Las células madre de la placenta aisladas de la invención también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células madre de la placenta. Las poblaciones de células placentarias que comprenden células madre de la placenta también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células madre de la placenta.

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

En esta memoria se describen métodos para producir una población aislada de células madre de la placenta, por ejemplo, mediante la selección de células madre de la placenta, obtenidas por digestión enzimática o perfusión, que expresan marcadores particulares y/o características de cultivo o morfológicas particulares. En una realización, por ejemplo, se describe en esta memoria un método para producir una población celular que comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población celular. En otra realización, el método para producir una población celular

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

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

Las células, por ejemplo, las células madre de la placenta se pueden seleccionar para una población de células madre de la placenta por cualquier medio conocido en la técnica de selección de células. Por ejemplo, las células se pueden seleccionar usando un anticuerpo o anticuerpos contra uno o más marcadores de la superficie celular, por ejemplo, en citometría de flujo o FACS. La selección puede realizarse usando anticuerpos junto con perlas magnéticas. En la técnica se conocen anticuerpos que son específicos para ciertos marcadores relacionados con las células madre. Por ejemplo, anticuerpos contra OCT-4 (Abcam, Cambridge, MA), CD200 (Abcam), HLA-G (Abcam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), CD105 (Abcam; BioDesign International, Saco, ME), etc. También están disponibles en el mercado anticuerpos contra otros marcadores, por ejemplo, CD34, CD38 y CD45 están disponibles, por ejemplo, en StemCell Technologies o BioDesign International.

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

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

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

5.5 Conservación de células madre de la placenta

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

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

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

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

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

Las células madre de la placenta de la invención se pueden crioconservar, por ejemplo, en un medio de crioconservación en recipientes pequeños, por ejemplo, ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, pero sin limitación, medio de cultivo que incluye, por ejemplo, medio de crecimiento o medio de congelación de células, por ejemplo, medio de congelación de células disponible en el mercado, por ejemplo, C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación comprende preferentemente DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 10% (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células madre de la placenta se enfrían

preferentemente a aproximadamente 1°C/min durante la criopreservación. Una temperatura de criopreservación preferida es desde aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, preferentemente desde aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células criopreservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido antes de descongelarse para el uso. En algunas realizaciones, por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células criopreservadas se descongelan preferentemente a una temperatura desde aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 37°C.

5.6 Usos de las células madre de la placenta

5.6.1 Composiciones que comprenden células madre de la placenta

- 10 Los métodos de inmunosupresión de la presente invención pueden usar composiciones que comprenden células madre de la placenta o biomoléculas de las mismas. De la misma manera, las pluralidades y las poblaciones de células madre de la placenta de la presente invención se pueden combinar con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable para su uso, por ejemplo, en investigación o terapia.

5.6.1.1 Células madre de la placenta criopreservadas

- 15 Las poblaciones de células madre de la placenta inmunosupresoras de la invención se pueden conservar, por ejemplo, criopreservadas para un uso posterior. Los métodos para la criopreservación de células, tales como las células madre, son bien conocidos en la técnica. Se pueden preparar poblaciones de células madre de la placenta en una forma que se pueda administrar fácilmente a un individuo. Por ejemplo, en esta memoria se describe una población de células madre de la placenta que está contenida dentro de un recipiente que es adecuado para el uso
- 20 médico. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, una bolsa de plástico, matraz, frasco u otro recipiente estéril a partir del cual se pueda dispensar fácilmente la población de células madre de la placenta. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico aceptable desde el punto de vista médico, adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente es preferentemente uno que permite la criopreservación de la población de células madre combinada.
- 25 Las poblaciones de células madre de la placenta inmunosupresoras criopreservadas pueden comprender células madre de la placenta obtenidas a partir de un solo donante o de múltiples donantes. La población de células madre de la placenta puede tener compatibilidad HLA total con un receptor deseado, o incompatibilidad HLA parcial o total.

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

5.6.1.2 Composiciones farmacéuticas

- 45 Las poblaciones inmunosupresoras de células madre de la placenta, o las poblaciones de células que comprenden células madre de la placenta, se pueden formular en composiciones farmacéuticas para su uso *in vivo*. Tales composiciones farmacéuticas comprenden una población de células madre de la placenta, o una población de células que comprende células madre de la placenta, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable aceptada para la administración *in vivo*. Las
- 50 composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender cualquiera de las poblaciones de células madre de la placenta, o tipos de células madre de la placenta, descritas en otras partes de este documento. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células madre de la placenta fetales, maternas o tanto fetales como maternas. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender además células madre de la placenta obtenidas a partir de un solo individuo o placenta, o de una pluralidad de individuos o placentas.
- 55

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender cualquier cantidad inmunosupresora de células madre de la placenta. Por ejemplo, una sola dosis unitaria de células madre de la placenta puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de 1×10^5 , 5×10^5 , 1

1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} o más células madre de la placenta.

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

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

5.6.1.3 Medios condicionados de células madre de la placenta

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

De esta manera, en una realización, en esta memoria se describe una composición que comprende un medio de cultivo procedente de un cultivo de células madre de la placenta, en donde dichas células madre de la placenta (a) se adhieren a un sustrato; (b) expresan CD200 y HLA-G, o expresan CD73, CD105 y CD200, o expresan CD200 y OCT-4, o expresan CD73, CD105 y HLA-G, o expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende las células madre de la placenta, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide, o expresan OCT-4 y facilitan la formación de uno o varios cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende las células madre de la placenta cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide; e (c) inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en una MLR (reacción linfocitaria mixta), en donde dicho cultivo de células madre de la placenta se ha cultivado en dicho medio durante 24 horas o más. En una realización específica, la composición comprende además una pluralidad de dichas células madre de la placenta. En otra realización específica, la composición comprende una pluralidad de células no placentarias. En una realización más específica, dichas células no placentarias comprenden células CD34⁺, por ejemplo, células progenitoras hematopoyéticas tales como células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, células progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón o células progenitoras hematopoyéticas de sangre placentaria. Las células no placentarias también pueden comprender otras células madre, tales como células madre mesenquimatosas, p. ej., células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea. Las células no placentarias también pueden ser de uno o varios tipos de células adultas o de líneas celulares. En otra realización específica, la composición comprende un agente antiproliferativo, p. ej., un anticuerpo anti-MIP-1 α o anti-MIP-1 β .

5.6.1.4 Matrices que comprenden células madre de la placenta

En esta memoria además se describen matrices, hidrogeles, entramados y similares que comprenden una población inmunosupresora de células madre de la placenta.

Las células madre de la placenta de la invención se pueden sembrar sobre una matriz natural, por ejemplo, un biomaterial placentario tal como un material de membrana amniótica. Un material de membrana amniótica de este tipo puede ser, por ejemplo, una membrana amniótica diseccionada directamente a partir de una placenta de mamífero; una membrana amniótica fijada o tratada térmicamente, una membrana amniótica sustancialmente seca (es decir, <20% de H₂O), una membrana coriónica, una membrana coriónica sustancialmente seca, una membrana amniótica y coriónica sustancialmente seca y similares. Biomateriales placentarios preferidos sobre los que se pueden sembrar las células madre de la placenta se describen en Hariri, documento de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n° 2004/0048796.

Las células madre de la placenta de la invención se pueden suspender en una solución de hidrogel adecuada, por ejemplo, para inyección. Los hidrogeles adecuados para tales composiciones incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. En una realización, una solución de hidrogel que comprende las células se puede dejar endurecer, por ejemplo en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersas en su interior para la implantación. Las células madre de la placenta en dicha matriz también se pueden cultivar de forma que las células

se expandan por mitosis antes de la implantación. El hidrogel es, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura reticulada tridimensional de celdas abiertas que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los materiales formadores de hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliacrilatos, que están reticulados iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o la matriz descrita en esta memoria, es biodegradable.

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

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

Las células madre de la placenta de la invención o cocultivos de las mismas se pueden sembrar sobre una estructura o soporte tridimensional e implantar *in vivo*. Dicha estructura se puede implantar en combinación con uno cualquiera o varios factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación de tejidos o que aumentan de otra manera o mejoran la puesta en práctica de la invención.

Ejemplos de soportes que se pueden utilizar incluyen mallas no tejidas, espumas porosas o péptidos de autoensamblaje. Las mallas no tejidas pueden formarse usando fibras compuestas de un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólico y láctico (por ejemplo PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). También pueden usarse espumas como soportes, compuestas, por ejemplo, de copolímero de poli(ε-caprolactona)/poli(ácido glicólico) (PCL/PGA), formado por procesos tales como liofilización o secado por congelación (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos nº 6.355.699).

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

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

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

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

5.6.2 Líneas de células madre de la placenta inmortalizadas

Células de la placenta de mamíferos se pueden inmortalizar condicionalmente mediante transfección con cualquier vector adecuado que contiene un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifica una proteína que, en condiciones apropiadas, promueve el crecimiento de la célula transfectada, de modo que la producción y/o la actividad de la proteína promotora del crecimiento es regulable a través de un factor externo. En una realización preferida, el gen promotor del crecimiento es un oncogén, tal como pero sin limitación, v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande de SV40, antígeno T grande de polioma, adenovirus E1A o proteína E7 de virus de papiloma humano.

La regulación externa de la proteína promotora del crecimiento se puede lograr colocando el gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor regulable externamente, por ejemplo, un promotor cuya actividad se puede controlar, por ejemplo, mediante la modificación de la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células, en una realización se puede emplear un sistema de expresión génica controlado con tetraciclina (tet) (véase, Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:5547-5551, 1992; Hoshimaru et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1518-1523, 1996). En ausencia de tet, un transactivador controlado por tet (tTA) dentro de este vector activa fuertemente la transcripción de ph_{CMV}^{-1} , un promotor mínimo de citomegalovirus humano fusionado con secuencias del operador tet. tTA es una proteína de fusión del inhibidor (tetR) del operón de resistencia a tet obtenido a partir del transposón-10 de *Escherichia coli* y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simple. Las bajas concentraciones no tóxicas de tet (por ejemplo, 0,01-1,0 µg/ml) eliminan casi completamente la transactivación mediante tTA.

En una realización, el vector contiene además un gen que codifica un marcador seleccionable, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a los fármacos. El gen bacteriano de resistencia a la neomicina (neo^R) es uno de tales marcadores que se puede emplear en la presente descripción. Las células portadoras de neo^R se pueden seleccionar por medios conocidos por los expertos normales en la técnica, tales como la adición de, por ejemplo, 100-200 µg/ml de G418 al medio de crecimiento.

La transfección se puede lograr por cualquiera entre una variedad de medios conocidos por los expertos normales en la técnica que incluyen, sin limitación, la infección retroviral. En general, un cultivo de células se puede transfectar mediante incubación con una mezcla de medio condicionado recogido a partir de la línea celular productora del vector y DMEM/F12 que contiene suplementos de N2. Por ejemplo, un cultivo de células de la placenta preparado tal y como se ha descrito anteriormente, puede estar infectado después de, por ejemplo, cinco días *in vitro* mediante incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio condicionado y dos volúmenes de DMEM/F12 que contiene suplementos de N2. Las células transfectadas que son portadoras de un marcador seleccionable, se pueden seleccionar entonces tal y como se ha descrito anteriormente.

Después de la transfección, se hacen pasar los cultivos sobre una superficie que permite la proliferación, por ejemplo, que permite que al menos 30% de las células se duplique en un período de 24 horas. Preferiblemente, el sustrato es un sustrato de poliornitina/laminina, que consiste en plástico de cultivo de tejidos recubierto con poliornitina (10 µg/ml) y/o laminina (10 µg/ml), un sustrato de polilisina/laminina o una superficie tratada con fibronectina. Los cultivos se alimentan entonces cada 3-4 días con medio de crecimiento, que puede estar suplementado o no con uno o varios factores que mejoran la proliferación. Los factores que mejoran la proliferación se pueden añadir al medio de crecimiento cuando los cultivos tienen menos del 50% de confluencia.

Con las líneas de células madre de la placenta inmortalizadas de forma condicional se pueden realizar pases usando técnicas convencionales, tales como por tripsinización, cuando se tiene un 80-95% de confluencia. Hasta aproximadamente el vigésimo pase, en algunas realizaciones es beneficioso mantener la selección (por ejemplo, mediante la adición de G418 para células que contienen un gen de resistencia a neomicina). Las células también pueden congelarse en nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo.

Las líneas celulares clónicas se pueden aislar a partir de una línea de células madre de placenta humana inmortalizada de forma condicional, preparada tal y como se ha descrito anteriormente. En general, tales líneas celulares clónicas se pueden aislar usando técnicas convencionales, tales como por dilución límite o utilizando anillos de clonación, y expandir. Las líneas celulares clónicas se pueden alimentar y realizar pases con las mismas generalmente tal y como se ha descrito anteriormente.

Las líneas de células madre de placenta humana inmortalizadas de forma condicional que pueden ser clónicas, pero no es necesario, se pueden inducir en general para diferenciarse mediante la inhibición de la producción y/o actividad de la proteína promotora del crecimiento en condiciones de cultivo que facilitan la diferenciación. Por ejemplo, si el gen que codifica la proteína promotora del crecimiento está bajo el control de un promotor regulable externamente, las condiciones, por ejemplo, la temperatura o la composición del medio, se pueden modificar para inhibir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión del gen controlado por tetraciclina descrito anteriormente, la diferenciación se puede lograr mediante la adición de tetraciclina para inhibir la transcripción del gen promotor del crecimiento. En general, 1 µg/ml de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para promover aún más la diferenciación, se pueden incluir agentes adicionales en el medio de crecimiento.

5.6.3 Ensayos

Las células madre de la placenta para la presente invención se pueden utilizar en ensayos para determinar la influencia de las condiciones del cultivo, los factores ambientales, las moléculas (por ejemplo, biomoléculas, pequeñas moléculas inorgánicas, etc.) y similares, sobre la proliferación, la expansión y/o la diferenciación de las células madre, en comparación con células madre de la placenta no expuestas a tales condiciones.

En una realización preferida, las células madre de la placenta de la presente invención se someten a ensayo en cuanto a cambios en la proliferación, la expansión o la diferenciación al entrar en contacto con una molécula. En una realización, por ejemplo, en esta memoria se describe un método para identificar un compuesto que modula la proliferación de una pluralidad de células madre de la placenta, que comprende poner en contacto dicha pluralidad de células madre con dicho compuesto en condiciones que permiten la proliferación, en donde si dicho compuesto causa un cambio detectable en la proliferación de dicha pluralidad de células madre en comparación con una pluralidad de células madre que no se han puesto en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la proliferación de las células madre de la placenta. En una realización específica, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la proliferación. En otra realización específica, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la proliferación.

En otra realización, se describe en esta memoria un método para identificar un compuesto que modula la expansión de una pluralidad de células madre de la placenta, que comprende poner en contacto dicha pluralidad de células madre con dicho compuesto en condiciones que permiten la expansión, en donde si dicho compuesto causa un cambio detectable en la expansión de dicha pluralidad de células madre en comparación con una pluralidad de células madre que no se han puesto en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la expansión de las células madre de la placenta. En una realización específica, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la expansión. En otra realización específica, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la expansión.

En otra realización, se describe en esta memoria un método para identificar un compuesto que modula la diferenciación de una célula madre de la placenta, que comprende poner en contacto dichas células madre con dicho compuesto en condiciones que permiten la diferenciación, en donde si dicho compuesto produce un cambio detectable en la diferenciación de dichas células madre en comparación con una célula madre que no se ha puesto en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la proliferación de las células madre de la placenta. En una realización específica, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la diferenciación. En otra realización específica, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la diferenciación.

5.6.4 Banco de células madre de la placenta

Las células madre de placentas después del parto se pueden cultivar según una variedad de formas diferentes para producir un conjunto de lotes, por ejemplo, un conjunto de dosis, administrables de forma individual, de células madre de la placenta. Estos lotes se pueden obtener, por ejemplo, a partir de células madre procedentes de la perfusión de la placenta o a partir de tejido placentario digerido con enzimas. Conjuntos de lotes de células madre de la placenta, obtenidos a partir de una pluralidad de placentas, se pueden organizar en un banco de células madre de la placenta, por ejemplo, para el almacenamiento a largo plazo. Generalmente, las células madre adherentes se obtienen a partir de un cultivo inicial de material de la placenta para formar un cultivo de siembra, que se expande bajo condiciones controladas para formar poblaciones de células con un número aproximadamente equivalente de duplicaciones. Los lotes se obtienen preferiblemente a partir del tejido de una sola placenta, pero se pueden obtener a partir del tejido de una pluralidad de placentas.

En una realización, los lotes de células madre se obtienen de la siguiente manera. El tejido placentario primero se rompe, por ejemplo, mediante trituración, se digiere con una enzima adecuada, por ejemplo, colagenasa (véase, la Sección 5.2.3, más arriba). El tejido de la placenta comprende preferiblemente, por ejemplo, todo el amnios, todo el corion, o ambos, de una sola placenta, pero puede comprender solo una parte ya sea del amnios o del corion. El tejido digerido se cultiva, por ejemplo, durante aproximadamente 1-3 semanas, preferiblemente aproximadamente 2 semanas. Después de la eliminación de las células no adherentes, las colonias de alta densidad que se forman se recogen, por ejemplo, por tratamiento con tripsina. Estas células se recogen y se resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo, y se definen como células del pase 0.

Las células del pase 0 se utilizan entonces para sembrar cultivos de expansión. Los cultivos de expansión pueden ser cualquier disposición de aparatos de cultivo celular distintos, por ejemplo, una factoría celular de NUNC™. Las células en el cultivo del pase 0 pueden subdividirse hasta cualquier grado, con el fin de sembrar cultivos de expansión, por ejemplo, con 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 o 10×10^4 células madre. Preferiblemente, se utilizan desde aproximadamente 2×10^4 a aproximadamente 3×10^4 células en el pase 0 para sembrar cada cultivo de expansión. El número de cultivos de expansión puede depender del número de células en el pase 0, y puede ser mayor o menor en número dependiendo de la placenta(s) particular, a partir de la cual(es) se obtienen las células madre.

Los cultivos de expansión se cultivan hasta que la densidad de las células en cultivo alcanza un valor determinado, por ejemplo, alrededor de 1×10^5 células/cm². Las células se pueden recoger y crioconservar en este punto, o realizar pases en nuevos cultivos de expansión como los descritos anteriormente. Se pueden realizar pases con las células, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces antes de su uso. Un registro de la cantidad acumulada de duplicaciones de la población se mantiene preferentemente durante el cultivo(s) de expansión. Las células procedentes de un cultivo del pase 0 se pueden expandir en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones, o hasta 60 duplicaciones. Preferiblemente, sin embargo, el número de duplicaciones de la población, antes de dividir la población de células en dosis individuales, está entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30, preferiblemente aproximadamente 20 duplicaciones. Las células se pueden cultivar continuamente durante todo el proceso de expansión, o se pueden congelar en uno o varios momentos durante la expansión.

Las células que se van a utilizar para las dosis individuales se pueden congelar, por ejemplo, crioconservadas para un uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, por ejemplo, desde aproximadamente 1 millón a aproximadamente 100 millones de células por ml, y pueden comprender entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^9 células en total.

En una realización específica del método, las células del pase 0 se cultivan durante aproximadamente 4 duplicaciones, después se congelan en un primer banco de células. Las células del primer banco de células se congelan y se utilizan para sembrar un segundo banco de células, cuyas células se expanden durante otras ocho duplicaciones. Las células en esta etapa se recogen y se congelan y se utilizan para sembrar nuevos cultivos de expansión que se dejan proceder durante aproximadamente ocho duplicaciones adicionales, con lo que el número acumulado de duplicaciones celulares es de aproximadamente 20. Las células en los puntos intermedios en los pases se pueden congelar en unidades de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 10 millones de células por ml, preferiblemente aproximadamente 1 millón de células por ml, para uso en el cultivo de expansión posterior. Las células de aproximadamente 20 duplicaciones se pueden congelar en dosis individuales de entre aproximadamente 1 millón a aproximadamente 100 millones de células por ml para la administración, o emplear en la preparación de una composición que contiene células madre.

En una realización preferida, el donante a partir del que se obtiene la placenta (p. ej., la madre) se examina en busca de al menos un agente patógeno. Si la madre da positivo para un agente patógeno del ensayo, se desecha la totalidad del lote de la placenta. Tal prueba se puede realizar en cualquier momento durante la producción de lotes de células madre de la placenta, incluyendo antes o después del establecimiento de las células del pase 0, o durante el cultivo de expansión. Agentes patógenos a los que se somete a ensayo su presencia pueden incluir, sin limitación, virus de la hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, virus de la inmunodeficiencia humana (tipos I y II), citomegalovirus, virus del herpes, y similares.

5.6.5 Tratamiento de la Esclerosis Múltiple

En otro aspecto, en esta memoria se describe un método para tratar a un individuo que tiene esclerosis múltiple, o un síntoma asociado con la esclerosis múltiple, que comprende administrar al individuo una pluralidad de células madre de la placenta en una cantidad y durante un tiempo suficiente para modular de forma detectable, por ejemplo, inhibir una respuesta inmune en el individuo.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica, recurrente del sistema nervioso central. La enfermedad produce una lesión en las vainas de mielina que rodean los axones del SNC y el SNP, los oligodendrocitos y las células nerviosas mismas. La enfermedad está mediada por linfocitos T autorreactivos, particularmente linfocitos T CD4⁺, que proliferan, cruzan la barrera hematoencefálica y entran en el sistema nervioso central bajo la influencia de moléculas de adhesión celular y citocinas proinflamatorias. Los síntomas de la EM incluyen alteraciones sensoriales en las extremidades, disfunción del nervio óptico, disfunción del tracto piramidal, disfunción de la vejiga, disfunción intestinal, disfunción sexual, ataxia y diplopía.

Se han identificado cuatro tipos diferentes o cursos clínicos de la EM. El primero, EM recidivante/remitente (EMRR) se caracteriza por ataques de autolimitación de la disfunción neurológica que se manifiestan de forma aguda, en el transcurso de días a semanas, seguido por un período de recuperación, a veces incompleta, durante varios meses. El segundo tipo, EM progresiva secundaria (EMSP), comienza como EMRR pero cambia de forma que el curso clínico se caracteriza por un deterioro constante de la función no relacionada con los ataques agudos. El tercero, EM progresiva primaria (EMPP), se caracteriza por una disminución constante en función de la aparición, sin ataques agudos. El cuarto tipo, EM progresiva/recidivante (EMPR), también comienza con un curso progresivo, con ataques ocasionales que se solapan con la disminución progresiva de la función.

Las personas que tienen EM se valoran generalmente por medio de una evaluación de las habilidades motoras, opcionalmente con una resonancia magnética. Por ejemplo, una evaluación de las habilidades motoras, la escala del estado de incapacidad expandida, puntuaciones de gradaciones de las habilidades de un individuo afectado, de la siguiente manera:

0.0 Examen neurológico normal.

- 1.0 Sin incapacidad, signos mínimos en un FS.
- 1.5 Sin incapacidad, signos mínimos en más de un FS.
- 2.0 Incapacidad mínima en un FS.
- 2.5 Incapacidad leve en un FS o incapacidad mínima en dos FS.
- 5 3.0 Incapacidad moderada en un FS o incapacidad leve en tres o cuatro FS. Deambula sin limitación.
- 3.5 Deambula sin limitaciones pero con incapacidad moderada en un FS y más de una incapacidad mínima en varios otros.
- 4.0 Deambula sin limitaciones sin ayuda, es autosuficiente, y se mueve de un lado para otro alrededor de 12 horas por día pese a una incapacidad relativamente importante, capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.
- 10 4.5 Deambula sin limitaciones y sin ayuda, va de un lado para otro gran parte del día, capaz de trabajar un día completo, pero tiene ciertas limitaciones para una actividad plena, o bien requiere un mínimo de ayuda; caracterizado por una incapacidad relativamente importante; es capaz de caminar sin ayuda ni descanso alrededor de 300 metros.
- 5.0 Deambula sin ayuda o descanso en torno a unos 200 metros; su incapacidad es suficientemente grave para afectarle en funciones de la vida diaria (trabaja un día completo sin medidas especiales).
- 15 5.5 Deambula sin ayuda o descanso por espacio de unos 100 metros; la incapacidad es lo suficientemente grave como para impedirle plenamente las actividades de la vida diaria.
- 6.0 Requiere ayuda constante, bien unilateral o de forma intermitente (bastón, muleta o abrazadera) para caminar en torno a 100 metros, sin o con descanso.
- 20 6.5 Ayuda bilateral constante (bastones, muletas o abrazaderas) para caminar unos 20 metros sin descanso.
- 7.0 Incapaz de caminar más de cinco metros, incluso con ayuda, básicamente confinado a silla de ruedas; posibilidad de impulsarse solo en una silla convencional y puede salir de ella solo; puede manejarse durante 12 horas al día en silla de ruedas.
- 7.5 Incapaz de caminar más de unos pasos; limitado a silla de ruedas; puede necesitar ayuda para salir de ella; puede impulsarse solo pero no en una silla normal un día completo; puede requerir una silla de ruedas motorizada.
- 25 8.0 Básicamente limitado a la cama o a una silla, aunque puede dar alguna vuelta en la silla de ruedas, puede mantenerse fuera de la cama gran parte del día; es capaz de realizar gran parte de las actividades de la vida diaria; generalmente usa con eficacia los brazos.
- 8.5 Básicamente confinado en cama la mayor parte del día; tiene un cierto uso útil de los brazos, capaz de realizar algunas actividades propias.
- 30 9.0 Inválido en cama; todavía puede comunicarse y comer.
- 9.5 Totalmente inválido en cama; incapaz de comunicarse bien o de comer/tragar.
- 10.0 Muerte por ES.
- 35 En el sistema de puntuación anterior, "FS" se refiere a los ocho sistemas funcionales medidos, incluyendo el piramidal, del cerebelo, troncal cerebral, sensorial, intestinal y de la vejiga, visual, cerebral, y otros sistemas.
- Otros sistemas, de puntuación similares son conocidos, incluyendo la escala de calificación neurológica de Scripps, el índice de deambulación y la puntuación compuesta funcional de la esclerosis (MSFC).
- El avance de la EM también se ha evaluado mediante la determinación de la tasa de ataque.
- 40 El avance de la EM también se ha evaluado mediante resonancia magnética, que puede detectar lesiones neuronales asociadas con la EM (por ejemplo, nuevas lesiones, mejora de lesiones, o lesiones combinadas activas únicas).
- 45 Por lo tanto, en una realización, se describe en esta memoria un método para tratar un individuo que padece EM, por ejemplo, y un individuo que ha sido diagnosticado con EM, que comprende administrar al individuo una pluralidad de células madre de la placenta suficiente para inhibir una respuesta inmune en el individuo. En una realización específica, la administración mejora de forma detectable uno o varios síntomas de la EM en el individuo. En realizaciones más específicas, el síntoma es, por ejemplo, una o más alteraciones sensoriales en las extremidades, una disfunción del nervio óptico, una disfunción del tracto piramidal, una disfunción de la vejiga, una

disfunción del intestino, una disfunción sexual, ataxia o diplopía. En otra realización específica, dicha administración da como resultado una mejora en la escala EDSS de al menos medio punto. En otra realización específica, dicha administración da como resultado una mejora en la escala EDSS de al menos un punto. En otra realización específica, dicha administración da como resultado una mejora en la escala EDSS de al menos dos puntos. En otras realizaciones específicas, dicha administración da como resultado una mejora detectable en una escala de evaluación de la esclerosis múltiple o en una resonancia magnética.

La EM ha sido tratada con otros agentes terapéuticos, por ejemplo agentes inmunomoduladores o inmunosupresores, por ejemplo, interferón beta (IFN β), incluyendo IFN β -1a e IFN-1b; acetato de gliatramer (Copaxone[®]); ciclofosfamida; metotrexato; azatioprina (Imuran[®]); cladribina (Leustatin[®]); ciclosporina; mitoxantrona; y similares. La EM también ha sido tratada con agentes terapéuticos antiinflamatorios, tales como glucocorticoides, incluyendo hormona adrenocorticotrópica (ACTH), metilprednisolona, dexametasona, y similares. La EM también ha sido tratada con otros tipos de agentes terapéuticos, tales como inmunoglobulina intravenosa, intercambio de plasma o sulfasalazina.

Por lo tanto, en esta memoria se describe el tratamiento de un individuo que tiene EM, por ejemplo, un individuo al que se ha diagnosticado que padece EM, que comprende administrar al individuo una pluralidad de células madre de la placenta, suficiente para inhibir una respuesta inmune en el individuo, en donde la administración mejora de forma detectable uno o más síntomas de la EM en el individuo, y uno o más agentes terapéuticos. En una realización, el agente terapéutico es un glucocorticoide. En realizaciones específicas, el glucocorticoide es hormona adrenocorticotrópica (ACTH), metilprednisolona o dexametasona. En otra realización, el agente terapéutico es un agente inmunomodulador o inmunosupresor. En diversas realizaciones específicas, el agente inmunomodulador o inmunosupresor es IFN β -1a, IFN-1b, acetato de gliatramer, ciclofosfamida, metotrexato, azatioprina, cladribina, ciclosporina o mitoxantrona. En otras realizaciones, el agente terapéutico es inmunoglobulina intravenosa, intercambio de plasma o sulfasalazina. En otra realización, al individuo se administra cualquier combinación de los agentes terapéuticos anteriores.

Un individuo que tiene EM, por ejemplo, un individuo diagnosticado con EM, se puede tratar con una pluralidad de células madre de la placenta, y, opcionalmente, uno o varios agentes terapéuticos, en cualquier momento durante la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, el individuo se puede tratar inmediatamente después del diagnóstico, o 1, 2, 3, 4, 5, 6 días después del diagnóstico, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años después del diagnóstico. El individuo se puede tratar una vez, o varias veces durante el curso clínico de la enfermedad. El individuo se puede tratar, si es adecuado, durante un ataque agudo, durante la remisión o durante una fase degenerativa crónica. En otra realización, las células madre de la placenta se administran a una hembra que tiene EM, después del parto, para mantener el estado de remisión o reducir la aparición de recaídas experimentadas durante el embarazo.

En una realización, al individuo se le administra una dosis de aproximadamente 300 millones de células madre de la placenta. Sin embargo, la dosificación puede variar según las características físicas del individuo, por ejemplo, el peso, y puede variar desde 1 millón de células madre de la placenta hasta 10 billones por dosis, preferiblemente entre 10 millones y 1 billón por dosis, o entre 100 millones y 50 millones de células madre de la placenta por dosis. La administración se realiza preferiblemente por vía intravenosa, pero puede ser por cualquier vía aceptada en la técnica para administración de células vivas. En una realización, las células madre de la placenta proceden de un banco de células.

6. Ejemplos

6.1 Ejemplo 1: Cultivo de células madre de la placenta

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

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

Células madre de la placenta aisladas por perfusión

Se establecen cultivos de células madre de la placenta procedentes de perfundido placentario, tal como se indica a continuación. Se siembran células de un gradiente de Ficoll en matraces T75 revestidos con FN, preparados como

se ha indicado anteriormente, a $50-100 \times 10^6$ células/matraz en 15 ml de medio de cultivo. Generalmente, se siembran de 5 a 10 matraces. Los matraces se incuban a 37°C durante 12-18 horas para permitir la fijación de las células adherentes. Se añaden 10 ml de PBS caliente a cada matraz para retirar las células en suspensión, y se mezclan suavemente. Después se retiran 15 ml del medio y se reemplazan con 15 ml de medio de cultivo limpio. Todo el medio se cambia 3-4 días después de iniciar el cultivo. Se realizan cambios posteriores del medio de cultivo, durante los cuales se retira 50% o 7,5 ml del medio.

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

Células madre de la placenta aisladas por ruptura física y digestión enzimática

Se establecen cultivos de células madre de la placenta a partir de tejido placentario digerido tal y como se indica a continuación. La placenta perfundida se coloca en una hoja de papel estéril con el lado materno hacia arriba. Se retiran por raspado aproximadamente 0,5 cm de la capa superficial en el lado materno de la placenta con una cuchilla, y la cuchilla se usa para retirar un bloque de tejido placentario que mide aproximadamente $1 \times 2 \times 1$ cm. Este tejido placentario se corta después en pedazos de aproximadamente 1 mm^3 . Estos pedazos se recogen en un tubo Falcon de 50 ml y se digieren con colagenasa IA (2 mg/ml, Sigma) durante 30 minutos, seguido de tripsina-EDTA (0,25%, GIBCO BRL) durante 10 minutos, a 37°C en un baño de agua. La solución resultante se centrifuga a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se retira la solución de digestión. El sedimento se resuspende hasta aproximadamente 10 volúmenes con PBS (por ejemplo, un sedimento de 5 ml se resuspende con 45 ml de PBS) y los tubos se centrifugan a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de tejido/células se resuspende en 130 ml de medio de cultivo y las células se siembran a 13 ml por matraz T75 recubierto con fibronectina. Las células se incuban a 37°C con una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Las células madre de la placenta se crioconservan opcionalmente en esta etapa.

Subcultivo y expansión de células madre de la placenta

Las células crioconservadas se pueden descongelar rápidamente en un baño de agua a 37°C. Las células madre de la placenta se retiran inmediatamente del criovial con 10 ml de medio caliente y se transfieren a un tubo estéril de 15 ml. Las células se centrifugan a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspenden suavemente en 10 ml de medio de cultivo caliente por pipeteo y se determinan los recuentos de células viables por exclusión con azul de tripano. Las células se siembran a continuación, a aproximadamente 6000-7000 células por cm² en matraces revestidos con FN, preparados como se ha indicado anteriormente (aproximadamente 5×10^5 células por matraz T75). Las células se incuban a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Cuando las células alcanzan una confluencia de 75-85%, todo el medio agotado se retira asépticamente de los matraces y se desecha. Se añaden 3 ml de solución de tripsina/EDTA al 0,25% (p/v) para cubrir la capa celular, y las células se incuban a 37°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad durante 5 minutos. El matraz se golpea suavemente una o dos veces para inducir la separación de las células. Una vez que >95% de las células tienen un aspecto redondeado y se han separado, se añaden 7 ml de medio de cultivo caliente a cada matraz T75 y la solución se dispersa por pipeteo sobre la superficie de la capa de células, varias veces.

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

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

6.2 Ejemplo 2: Aislamiento de células madre de la placenta a partir de estructuras placentarias

6.2.1 Materiales y métodos

6.2.1.1 Aislamiento del fenotipo de interés

Se obtuvieron cinco poblaciones distintas de células placentarias a partir de las placentas de embarazos normales a término. Todas las donantes proporcionaron un consentimiento por escrito completo para el uso de sus placentas con fines investigativos. Se examinaron cinco poblaciones de células: células placentarias procedentes de (1) perfundido placentario (procedente de la perfusión del sistema vascular placentario); y digestiones enzimáticas de (2) amnios, (3) corion, (4) amnios-placa coriónica y (5) células del cordón umbilical obtenidas por digestión enzimática. Los diversos tejidos se limpiaron en PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y se colocaron en placas Petri estériles distintas. Los diversos tejidos se cortaron usando un bisturí quirúrgico estéril y se pusieron en tubos cónicos Falcon de 50 ml. Los tejidos cortados se digirieron con Colagenasa 1X (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO) durante 20 minutos en un baño de agua a 37°C, se centrifugaron y después se digirieron con Tripsina-EDTA al 0,25% (Gibco-Invitrogen Corp) durante 10 minutos en un baño de agua a 37°C. Los diversos tejidos se centrifugaron después de la digestión y se aclararon una vez con PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corp). Las células reconstituidas se filtraron después dos veces, una vez con coladores celulares de 100 µm y otra vez con filtros de separación de 30 µm, para retirar cualquier matriz extracelular residual o resto celular.

6.2.1.2 Evaluación de la viabilidad celular y recuentos de células

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

6.2.1.3 Caracterización de los marcadores de la superficie celular

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

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

6.2.1.4 Clasificación y cultivo de células

Un conjunto de células placentarias (procedentes de perfundido, amnios o corion) se tiñó con 7-amino-actinomicina D (7AAD; BD Biosciences Pharmingen) y anticuerpos monoclonales específicos para el fenotipo de interés. Las células se tiñeron con una relación de 10 µl de anticuerpo por 1 millón de células, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Estas células se clasificaron después positivamente con respecto a las células vivas que expresaban el fenotipo de interés en el BD FACS Aria y se cultivaron. Para realizar una comparación, se cultivaron poblaciones de células placentarias clasificadas (población de interés) y "Todas" (no clasificadas). Las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos revestida con fibronectina (Sigma-Aldrich) a las densidades celulares indicadas en la Tabla 1 (células/cm²). Se determinó la densidad celular y si el tipo celular se cultivaba por duplicado o por triplicado y estaba dirigido por el número de células que expresaban el fenotipo de interés.

Tabla 1: Densidades de cultivo de células

Cultivo en una placa de 96 pocillos			
Densidad de las células cultivadas			
Condiciones	Clasificadas	Todas	Todas con Densidad Máxima
Fuente de células	A		
Conjunto n° 1:	40,6 K/cm ²	40,6 K/cm ²	93,8 K/cm ²
Conjunto n° 2:	40,6 K/cm ²	40,6 K/cm ²	93,8 K/cm ²
Conjunto n° 3:	40,6 K/cm ²	40,6 K/cm ²	93,8 K/cm ²
Fuente de células	B		
Conjunto n° 1:	6,3 K/cm ²	6,3 K/cm ²	62,5 K/cm ²
Conjunto n° 2:	6,3 K/cm ²	6,3 K/cm ²	62,5 K/cm ²

Cultivo en una placa de 96 pocillos			
Densidad de las células cultivadas			
Condiciones	Clasificadas	Todas	Todas con Densidad Máxima
Fuente de células	C		
Conjunto nº 1:	6,3 K/cm ²	6,3 K/cm ²	62,5 K/cm ²
Conjunto nº 2:	6,3 K/cm ²	6,3 K/cm ²	62,5 K/cm ²

En cada pocillo de la placa de 96 pocillos se añadieron medio completo (DMEM-LG al 60% (Gibco) y MCDB-201 al 40% (Sigma); suero bovino fetal al 2% (Hyclone Laboratories); insulina-transferrina-selenio (ITS) 1x; ácido linolénico albúmina de suero bovino (LA-BSA) 1x, dexametasona 10⁻⁹ M (Sigma), 2-fosfato de ácido ascórbico 10⁻⁴ M (Sigma), factor de crecimiento epidérmico a 10 ng/ml (R&D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) a 10 ng/ml (R&D Systems) y la placa se puso en una incubadora con 5% de CO₂/37°C. El día 7 se añadieron 100 µl de medio completo a cada uno de los pocillos. La placa de 96 pocillos se supervisó durante aproximadamente dos semanas y se completó una evaluación final del cultivo el día 12.

6.2.1.5 Análisis de los datos

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

6.2.2 Resultados

6.2.2.1 Viabilidad celular

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

6.2.2.2 Cuantificación de las células

Se analizaron las cinco poblaciones distintas de células obtenidas a partir de la placenta para determinar los números de células HLA ABC⁺/CD45⁺/CD34⁺/CD133⁺. A partir del análisis de los datos de BD FACSCalibur, se observó que el amnios, el perfundido y el corion contenían el mayor número total de estas células, 30,72 ± 21,80 (n=4, ETM=10,90), 26,92 ± 22,56 (n=3, ETM=13,02) y 18,39 ± 6,44 (n=2, ETM=4,55), respectivamente (datos no mostrados). El amnios-placa coriónica y el cordón umbilical contenían el menor número total de células que expresaban el fenotipo de interés, 4,72 ± 4,16 (n=3, ETM=2,40) y 3,94 ± 2,58 (n=3, ETM=1,49), respectivamente (datos no mostrados).

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

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

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

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

6.2.2.3 Células obtenidas a partir de perfundido placentario

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

6.2.2.4 Células obtenidas a partir del amnios

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

6.2.2.5 Células obtenidas a partir del corion

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

6.2.2.6 Células placentarias procedentes de amnios-placa coriónica

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

6.2.2.7 Células obtenidas a partir del cordón umbilical

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

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

6.2.2.8 Informe de la clasificación por BD FACS Aria

5 Las tres poblaciones distintas de células placentarias que expresaban los mayores porcentajes de HLA ABC, CD45, CD34 y CD133 (células obtenidas a partir de perfundido, amnios y corion) se tiñeron con 7AAD y los anticuerpos para estos marcadores. Las tres poblaciones se clasificaron positivamente para las células vivas que expresaban el fenotipo de interés. Los resultados de la clasificación BD de FACS Aria se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2:

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

10 Se cultivaron las tres poblaciones distintas de células clasificadas positivamente ("clasificadas") y sus células no clasificadas correspondientes y los resultados del cultivo se evaluaron el día 12 (tabla 3). Las células obtenidas a partir de perfundido clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 40.600/cm², dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes. Dos de las tres series de células obtenidas a partir de perfundido no clasificadas, cada una cultivada a una densidad celular de 40.600/cm², dieron como resultado principalmente células pequeñas, redondas no adherentes con varias células adherentes localizadas alrededor de la periferia del pocillo. Las células obtenidas a partir del perfundido no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 93.800/cm², dieron como resultado principalmente células pequeñas, redondas no adherentes con varias células adherentes localizadas alrededor de la periferia de los pocillos.

15 Las células obtenidas a partir del amnios, clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm², dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes. Las células obtenidas a partir del amnios no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm², dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes. Las células obtenidas a partir del amnios, no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 62.500/cm² dieron como resultado células pequeñas redondas no adherentes.

20 Las células obtenidas a partir del corion clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm², dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes. Las células obtenidas a partir del corion no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm², dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes. Las células obtenidas a partir del corion, no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 62.500/cm², dieron como resultado células pequeñas, redondas no adherentes.

6.3 Ejemplo 3: Diferenciación de las células madre de la placenta

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

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

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

6.4 Ejemplo 4: Inmunomodulación usando células madre de la placenta

45 Las células madre de la placenta poseen un efecto inmunomodulador, incluyendo la inhibición de la proliferación de linfocitos T y células citotóxicas naturales. Los siguientes experimentos demuestran que las células madre de la placenta tienen la capacidad de modular la respuesta de linfocitos T frente a una estimulación en dos ensayos, el ensayo de reacción linfocitaria mixta y el ensayo de regresión.

6.5.1 Ensayos de reacción linfocitaria mixta

La MLR mide la reacción de una población efectora contra una población diana. Los efectores pueden ser linfocitos o subpoblaciones purificadas, tales como linfocitos T CD8⁺ o células NK. La población diana es CMSPs irradiadas alogénicas, o, como en los presentes estudios, CDs maduras. La población respondedora consiste en células alogénicas, estimadas en 20% de los linfocitos T totales. La MLR de células madre de la placenta modificada usa células madre de la placenta en la reacción.

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

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

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

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

Se aislaron linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y monocitos CD14⁺, a partir de las capas leucocitarias usando perlas y columnas Miltenyi MACS, usadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron células dendríticas a través de un cultivo de seis días de los monocitos en RPMI 1640 suplementado con plasma de donante al 1%, IL-4 y GM-CSF, y un cultivo de dos días en RPMI 1640 suplementado con IL-1 β , TNF- α e IL-6. Se incubaron linfocitos T alogénicos y CD en la relación T:CD de 10:1 para producir una MLR clásica de 6 días. La proliferación de linfocitos T se evaluó tiñendo los linfocitos T con CFSE (succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína) antes de añadirse al ensayo. El CFSE se usa para evaluar el grado de proliferación midiendo la dilución de la tinción entre las poblaciones de células hijas.

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

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

Resultados. Cuando se añaden células madre de la placenta a la MLR, se inhibe la proliferación de linfocitos T (FIG. 11). Las células madre de la placenta, usadas en los experimentos reflejados en la FIG. 12, procedían de una placenta denominada 61665. Para todas las células madre de la placenta sometidas a ensayo, cuando se usaban linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, pero de forma individual, el compartimento de CD4⁺ se inhibía en un mayor grado que el compartimento de CD8⁺ (FIG. 12A). La inhibición mediante células madre de la placenta MA y CU de la activación de CD4⁺ era aproximadamente equivalente a la inhibición mediada por CMMs, con una inhibición de aproximadamente un 60%-75%. Cuando la MLR se realizó usando linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺, las células madre de la placenta inhibían la proliferación en el compartimento de CD4⁺ en un grado mucho mayor que en el compartimento CD8⁺ (FIG. 12B). En particular, la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ por células madre de la placenta MA se aproximaba al 90%, superando la inhibición mostrada por CMMs. La diferencia en la inhibición entre estos dos compartimentos fue muy sorprendente para las células madre de la placenta MA y AC.

Las células madre de la placenta de diferentes donantes inhiben la proliferación de linfocitos T en la MLR en un grado diferente (FIG. 13). Células madre de la placenta procedentes de una placenta diferente, denominada 65450, inhibían la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en la MLR de forma diferente que las células madre de la placenta procedentes de la placenta 61665. Sorprendentemente, las CMPs AC y CU de la placenta 65450 inhibían la

proliferación de linfocitos T desde 80% a 95%, superando la inhibición en este ensayo por las CMMs. Sin embargo, las células madre de la placenta AC procedentes de la placenta 65450 no inhibían la proliferación de linfocitos T en un grado apreciable (compárese la inhibición de las células madre de la placenta MA en la FIG. 12A).

Las células madre de la placenta también inhibían la actividad de las células citotóxicas (NK) en la MLR.

5 6.4.2 Ensayo de regresión

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

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

En un ensayo de regresión diferente, se obtuvieron linfocitos T y células dendríticas a partir de donantes de laboratorio. Se obtuvieron líneas de linfocitos B transformadas con virus de Epstein-Barr, LCLs, incubando células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) con material sobrenadante procedente de una línea de EBV lítica, B95.8, y ciclosporina A durante dos semanas. La LCL expresaba 9 antígenos de EBV. El crecimiento de la línea LCL se mantiene en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%. El ensayo de regresión se realizó mezclando linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ con una LCL autóloga en una relación T:LCL de 10:1. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en 200 µl de RPMI 1640 suplementado con suero humano combinado al 5% (R5). A este ensayo, se añadieron células madre de la placenta en una relación T:TCL:CMF de 10:1:2. El ensayo se realizó durante 6, 10 o 17 días.

Se realizó un ensayo de regresión de seis días usando linfocitos T marcados con CFSE. Las células madre de la placenta procedentes de la placenta 65450 inhibían la proliferación de linfocitos T en el ensayo de regresión aproximadamente en 65% hasta aproximadamente 97%, un resultado que se corresponde con los resultados de esas CMFs en la MLR (Figura 12). De nuevo, las líneas CU y AC de la placenta 65450 inhibían significativamente la proliferación de linfocitos T, mientras que las CMFs MA de 65450 no inhibían la proliferación.

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

Las células madre de la placenta no son inmunogénicas. En ningún caso se observó más de 5% de proliferación de linfocitos B de ruido de fondo frente a células madre de la placenta procedentes de cualquier donante o cualquier sitio anatómico de la placenta.

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

Un ensayo distinto confirmó que la inmunosupresión de linfocitos T mediante células madre de la placenta parece implicar al menos parcialmente, un factor soluble. Para determinar si la inmunosupresión mediada por células madre de la placenta depende del contacto célula-célula, se realizaron ensayos Transwell en los que se pusieron células madre de la placenta en un inserto en la parte inferior, en donde una membrana permitía el paso únicamente de factores solubles. En el suelo del pocillo, separadas de las células madre de la placenta, estaban la MLR o los linfocitos T solos. Para determinar si un efecto observado dependía de la dosis relativa de células madre de la

placenta, las células madre se añadieron a diferentes densidades relativas a linfocitos T y CDs. Cuando se separaron células madre de la placenta del cordón umbilical de la MLR, se anuló parcialmente el efecto inhibitor. Cuando se usaron células madre de la placenta con densidades similares a las usadas en la Figura 11, la inhibición de la MLR se anuló un 75% para linfocitos T CD4⁺, y un 85% para linfocitos T CD8⁺ (Figura 17, Figura 18). El efecto inhibitor era aún un 66% cuando se usó solo un cuarto de la dosis de células madre de la placenta (CU OP 25) y se redujo hasta los niveles de fondo cuando se añadieron 12.500 células madre de la placenta CU. No se observó ningún cambio en la inhibición con la separación usando un inserto (Figura 17). A 25.000 células madre de la placenta, a pesar del efecto inhibitor aún vigoroso, se observó la menor reducción relativa en la inhibición sobre la introducción del inserto (Figura 18).

6.5 Ejemplo 5: La dependencia del contacto de la inmunosupresión de células madre de la placenta difiere de la de células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea

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

Las células madre obtenidas a partir de médula ósea (CMMOs) y las células madre del cordón umbilical (CU) tienen diferentes requisitos para el contacto célula-célula, dependiendo de la relación entre células adherentes y linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR). En un experimento Transwell, en el que se separaron células madre de la placenta de linfocitos T y células dendríticas (CDs) en la MLR, la inhibición variaba entre los dos tipos de células adherentes. La Figura 15 presenta resultados del pocillo abierto y Transwell unos al lado de los otros. Cuando se usaron aproximadamente 100.000 o 75.000 CU o CMMOs en el formato de pocillo abierto, se observó una inhibición similar. Sin embargo, en el formato Transwell, las CUs inhiben la MLR en un menor grado que las CMMOs, indicando una mayor dependencia del contacto con esas relaciones elevadas entre células madre de la placenta/linfocitos T. cuando se usaron menores relaciones entre células placentarias y linfocitos T, las células madre de la placenta eran más inhibitoras célula a célula.

A partir de los datos de la inhibición, se calculó el grado de dependencia del contacto. La Figura 19 muestra la dependencia del contacto de las MLRs de CMMO y CU. Las células obtenidas a partir de médula ósea son menos dependientes del contacto a mayores relaciones MO/linfocitos T que las CUs. En otras palabras, las células madre de la placenta CU y las CMMOs se comportan de forma diferente con respecto a un parámetro importante para el mecanismo, la necesidad de contacto célula-célula.

Se necesitan linfocitos T reguladores (Tregs) para la inhibición de linfocitos T mediada por CMMO. Véase Aggarwal & Pittenger, "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses", *Blood* 105(4):18151822 (2004). Se retiraron Tregs CD4⁺CD25⁺ de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de donantes sanos, y se realizó un ensayo de regresión usando células transformadas con EBV (virus de Epstein-Barr) autólogas. Se añadieron CUs en algunas condiciones. Como puede verse en la Figura 20, no hay diferencia en la inhibición mediada por células madre de la placenta, de la respuesta de linfocitos T en el ensayo de regresión si están presentes o no los Tregs. De esta manera, aunque se ha notificado que los linfocitos T reguladores son necesarios para la inhibición de linfocitos T mediada por CMMO, los linfocitos T reguladores no parecen intervenir en la inmunosupresión mediada por células madre de la placenta.

Se realizó una MLR en la que los linfocitos T se tomaban de una MLR inhibida por células madre de la placenta, y se añadieron células dendríticas de nuevo aporte. Los linfocitos T se tiñeron con CFSE, que se distribuye igualmente en las células hijas durante la proliferación. Las células CFSE^{Alto} son linfocitos T que no han proliferado (por ejemplo, los picos más a la izquierda en los paneles de la Figura 21). Esta población se obtuvo por clasificación de linfocitos T teñidos en un FACS Aria. Estas células se usaron en una segunda MLR con células dendríticas de nuevo aporte. Como puede verse en la Figura 22, no se observó una inhibición duradera, ya que las células inhibidas inicialmente proliferaban bien frente a las CDs. Es poco probable que las células CFSE^{Bajo} (es decir, las células hijas) fueran responsables de la inhibición, ya que estas células proliferaron por sí mismas posteriormente. La población de CFSE^{Alto} está constituida por células no aloespecíficas que no habrían proliferado contra este donante de CD, así como los linfocitos T inhibidos por las células madre de la placenta. Una vez retiradas las células madre de la placenta, las células inhibidas proliferaban.

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

Es posible que las CDs o los linfocitos T en reposo se vean afectados por la incubación con células madre de la placenta durante diferentes periodos de tiempo antes de iniciar la MLR. Esto se sometió a ensayo incubando células madre de la placenta o CMMOs con linfocitos T (Figura 24A) o CDs (Figura 24B) durante periodos de tiempo variables antes de empezar el ensayo. La preincubación de los linfocitos T y las células madre de la placenta no

altera el fenotipo inhibitor de forma apreciable (Figura 24A). Sin embargo, la inhibición de linfocitos T mediante CMMOs cambia dependiendo de la duración de la preincubación de CD/células madre de la placenta. Como se muestra en la Figura 24B, la inhibición mediante CMMOs es más fuerte cuando las CDs se añaden un día después que los linfocitos T. Sin embargo, aparece una inhibición mucho menor cuando las CDs se añaden al mismo tiempo que los linfocitos T. La incubación de CDs durante un periodo mayor con CMMOs puede invertir esta pérdida de inhibición. A los dos días de preincubación, la inhibición alcanza el escenario en donde las CDs se añaden un día después que los linfocitos T (+1 día). No se observa una tendencia similar con la inhibición mediada por células madre de la placenta.

6.6 Ejemplo 6: Perfil de citocinas de células madre de la placenta y células madre del cordón umbilical en la MLR y el ensayo de regresión

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

En algunos ensayos, se usó una serie de citocinas para medir los niveles de citocinas y quimiocinas en los materiales sobrenadantes. Se descubrió que en los materiales sobrenadantes se secretaban varios factores, siendo el más relevante para la MLR y los ensayos de regresión la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α y MIP-1 β . Estos dos agentes quimiotácticos atraen a los linfocitos T y son secretados por linfocitos T CD8⁺ como respuesta a una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Cuando se sometió a ensayo en la MLR, esta secreción de agentes quimiotácticos se correlacionaba inversamente con la inhibición de células madre de la placenta y CMM de la MLR (Figura 25). Ni las células madre de la placenta ni las CMMs secretaban MIP-1 α y MIP-1 β .

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

En un estudio separado, las AC usadas en una MLR o un ensayo de regresión se analizaron con respecto a la secreción de citocinas. Las citocinas se midieron en un sistema Luminex en materiales sobrenadantes de cultivos de 6 días de células madre, MLRs de células madre o ensayos de regresión de células madre. Las MLRs incluían células madre, células dendríticas (CD) y linfocitos T en una relación de 2/1/10. Los ensayos de regresión del virus de Epstein-Barr (EBV) incluían células madre, células tumorales EBV (TS) y linfocitos T en una relación TS:célula madre:linfocito T de 2:1:10.

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

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

Las concentraciones de IL-2 se correlacionaban con la inhibición. Por ejemplo, una MLR de linfocitos T CD4⁺ que mostraba una inhibición del 85% contenía 330 pg/ml de IL-2 y una MLR de linfocitos T CD8⁺ que mostraba una inhibición del 85%, usando células madre AC contenía 66 pg/ml de IL-2. Estos resultados indican que la IL-2 y MCP-1, tradicionalmente conocidas como estimuladoras de la respuesta inmune, pueden tener un papel en la inhibición inmune.

REIVINDICACIONES

1. Células madre de la placenta para uso en un método para inhibir una respuesta inmune, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T estimulada por linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr, en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos, y en donde al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y HLA-G;
expresan CD73, CD105 y CD200;
expresan CD200 y OCT-4; o
expresan CD73, CD105 y HLA-G;
- 10 y
en donde dicha respuesta inmune es una respuesta inmune frente a un aloinjerto, una enfermedad autoinmune, diabetes, lupus eritematoso, artritis reumatoide o esclerosis múltiple.
2. Las células madre de la placenta para uso según la reivindicación 1, en donde dichos linfocitos T son linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD8⁺.
- 15 3. Las células madre de la placenta para uso según la reivindicación 1, en donde dicho método comprende adicionalmente el uso de un anticuerpo anti-proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α o anti-MIP-1 β , en donde dicho anticuerpo está presente en una cantidad suficiente para causar una disminución detectable de la cantidad de MIP-1 α o anti-MIP-1 β en la sangre de un sujeto que recibe dicho medicamento.
- 20 4. Las células madre de la placenta para uso según la reivindicación 1, en donde dicho método comprende adicionalmente el uso de células CD34⁺, o células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de la médula ósea.
5. Las células madre de la placenta para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho al menos 80% de dichas células madre de la placenta son OCT-4⁺.
6. Las células madre de la placenta para uso según la reivindicación 1, en donde dicho al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD73, CD105 y CD200.
- 25 7. Las células madre de la placenta para uso según la reivindicación 1, en donde dicho al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y OCT-4.
8. Las células madre de la placenta para uso según la reivindicación 1-7, en donde dicha respuesta inmune es una respuesta inmune contra la esclerosis múltiple.
9. Un método para producir una población de células madre de la placenta *in vitro* que comprende
- 30 (a) someter a ensayo una pluralidad de células de la placenta en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR); y
(b) seleccionar dicha pluralidad de células madre de la placenta si dicha pluralidad de células madre de la placenta inhibe de forma detectable la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ estimulada por linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr, en donde dichas células madre de la placenta se adhieren a un sustrato; en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos; y en donde al menos 80% de dichas células madre
- 35 expresan CD200 y HLA-G;
expresan CD73, CD105 y CD200;
expresan CD200 y OCT-4; o
expresan CD73, CD105 y HLA-G.
- 40 10. El método según la reivindicación 9, en donde dichas células madre de la placenta se obtienen a partir del amnios o amnios y corion.
11. El método según la reivindicación 9, en donde dichas células madre de la placenta inhiben la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en al menos un 50%, en al menos un 75%, en al menos un 90% o en al menos un 95% en comparación con una cantidad de proliferación de linfocitos T en ausencia de dichas células madre de la placenta.
- 45 12. El método según la reivindicación 9, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable una actividad de las células citotóxicas naturales (NK).

13. Una población aislada de células madre de la placenta producida según el método de la reivindicación 9.
14. Una población aislada de células madre de la placenta, en donde dichas células madre de la placenta no son trofoblastos, en donde al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y HLA-G;
- 5 expresan CD73, CD105 y CD200; expresan CD200 y OCT-4; o expresan CD73, CD105 y HLA-G, en donde dichas células madre de la placenta inhiben de forma detectable la proliferación de linfocitos T estimulada por linfocitos B que presentan antígenos del virus Epstein-Barr.
- 10 15. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 14, en donde dicho al menos 80% de dichas células madre de la placenta son OCT-4⁺.
16. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 14, en donde dicho al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD73, CD105 y CD200.
- 15 17. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 14, en donde dicho al menos 80% de dichas células madre de la placenta expresan CD200 y OCT-4.
18. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 14, en donde dichas células madre de la placenta inhiben una respuesta inmune.
19. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 18, en donde dicha respuesta inmune es una respuesta inmune contra un aloinjerto.
- 20 20. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 18, en donde dicha respuesta inmune es una enfermedad autoinmune.
21. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 20, en donde dicha enfermedad autoinmune es diabetes.
22. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 20, en donde dicha enfermedad autoinmune es lupus eritematoso.
- 25 23. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 20, en donde dicha enfermedad autoinmune es artritis reumatoide.
24. La población aislada de células madre de la placenta según la reivindicación 20, en donde dicha enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple

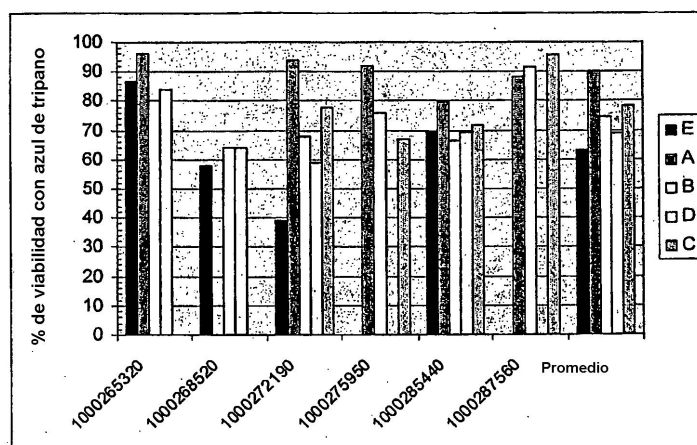


FIG. 1

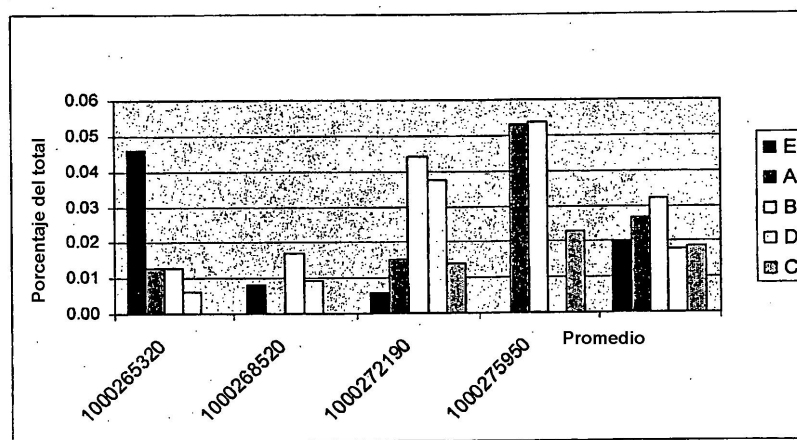


FIG. 2

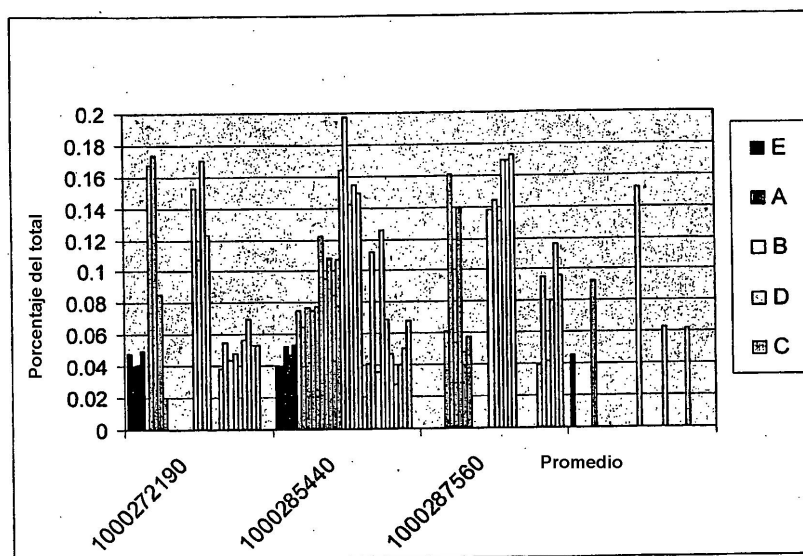


FIG. 3

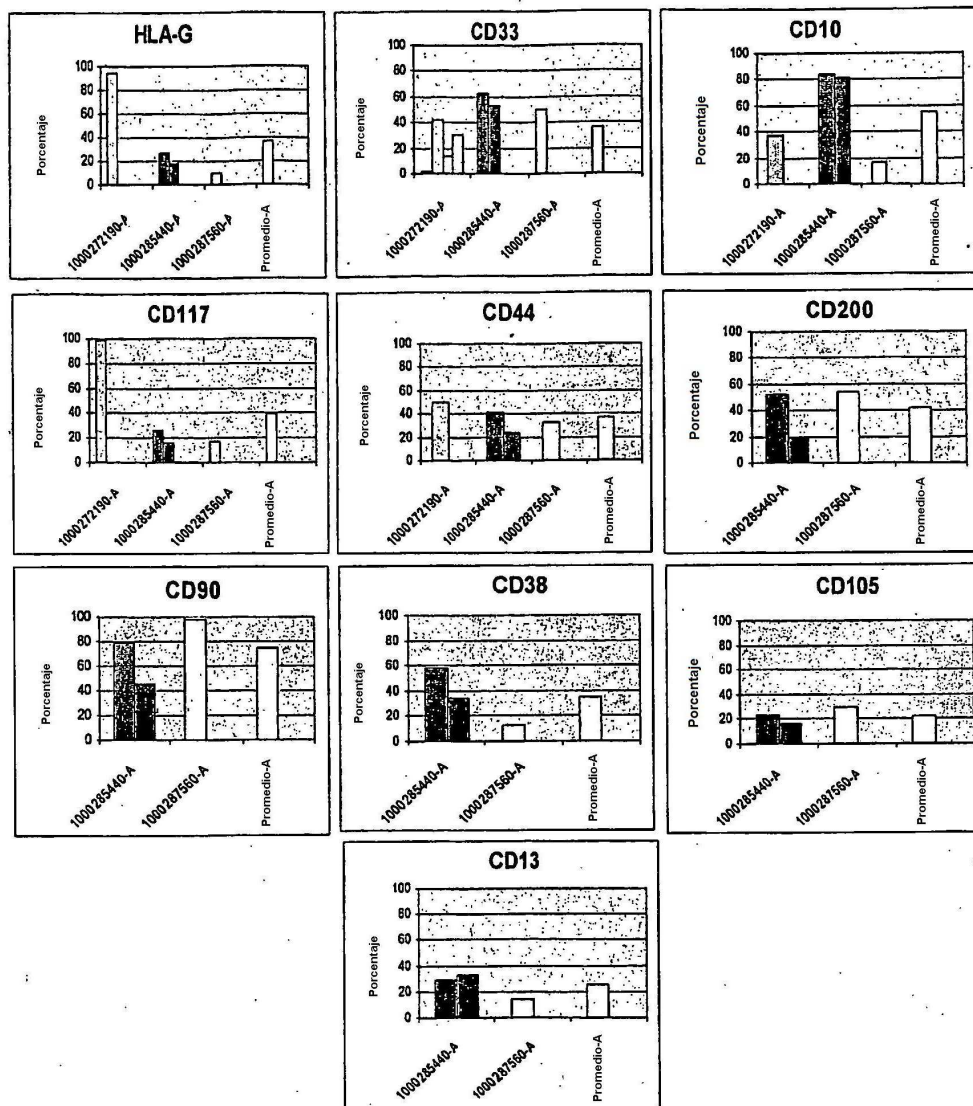


FIG. 4

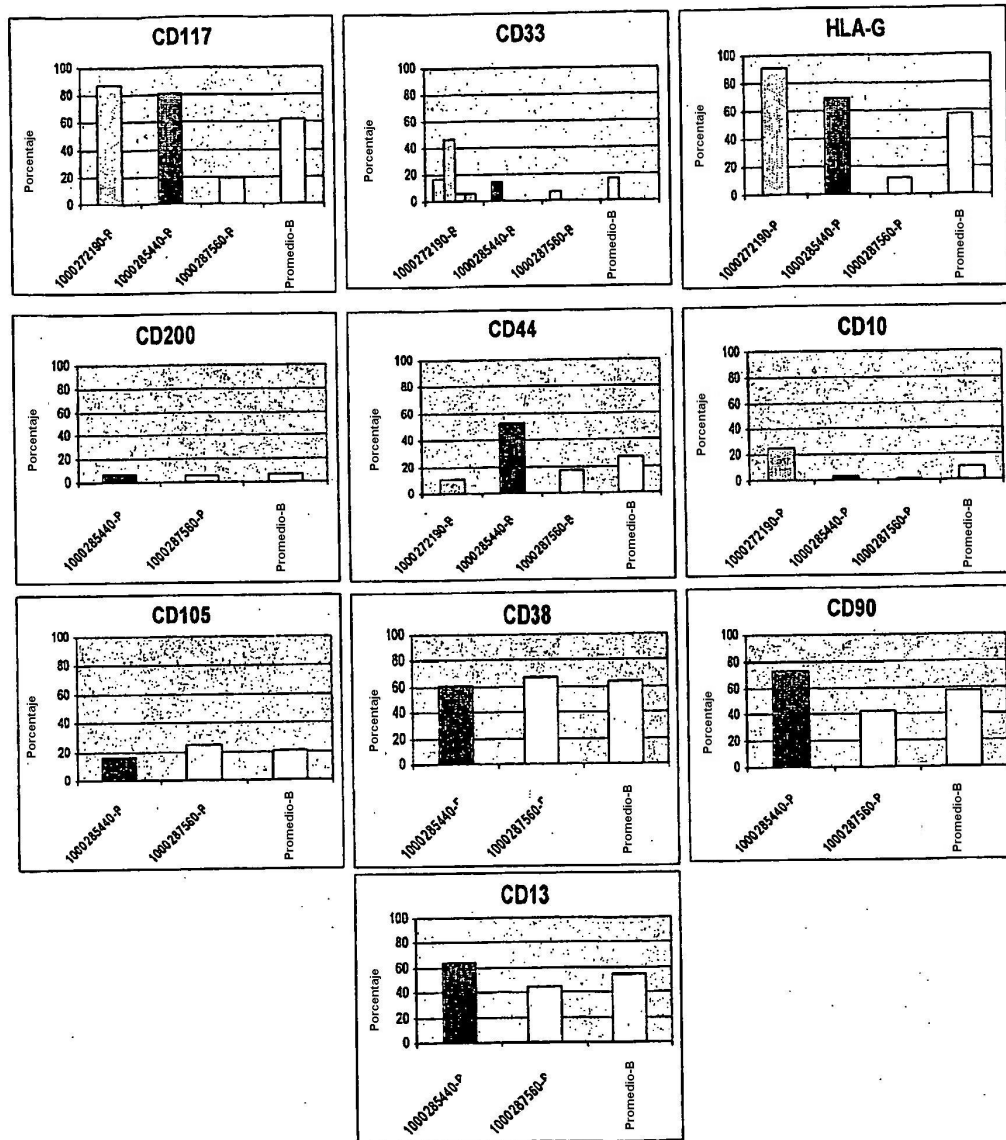


FIG. 5

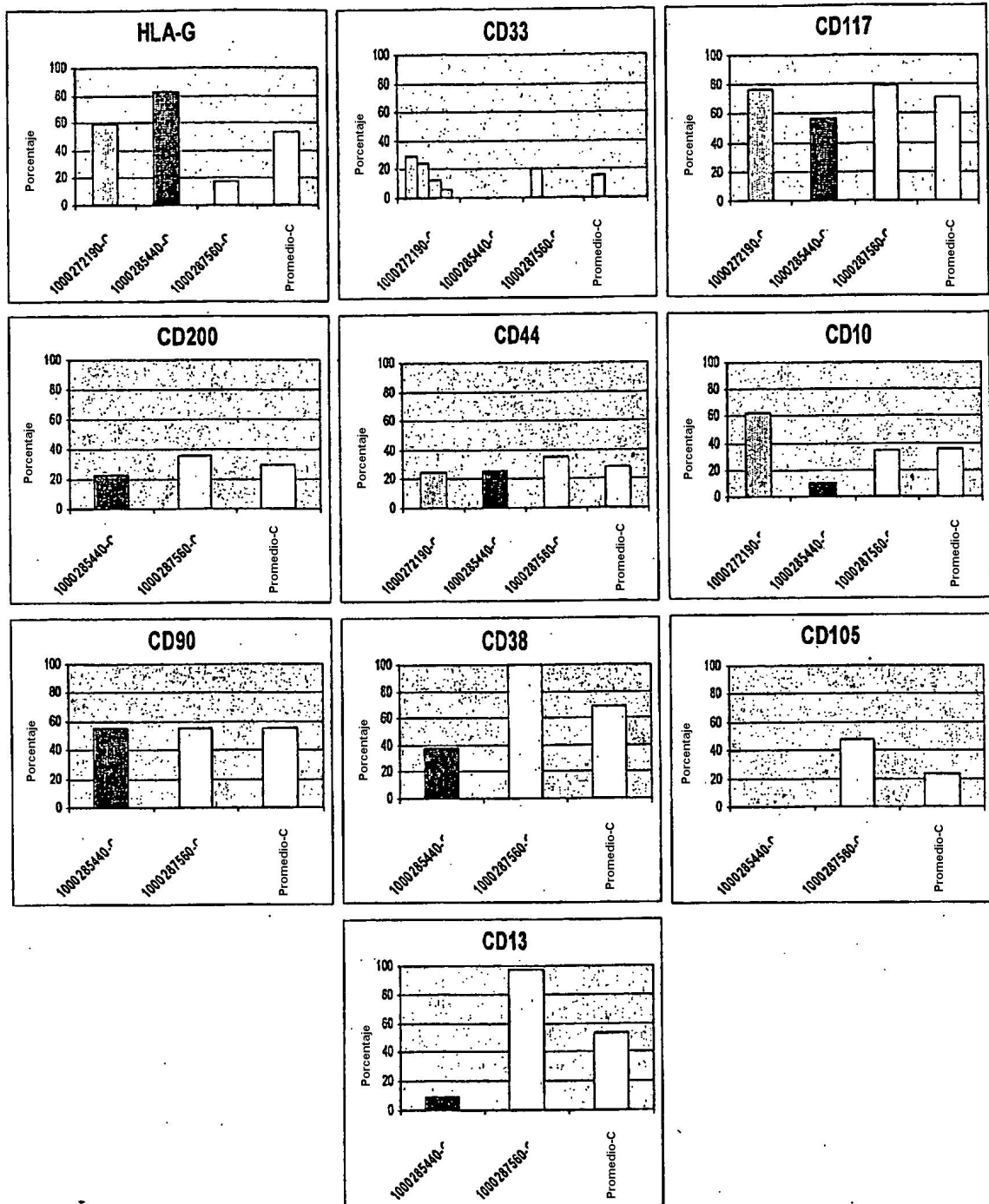


FIG. 6

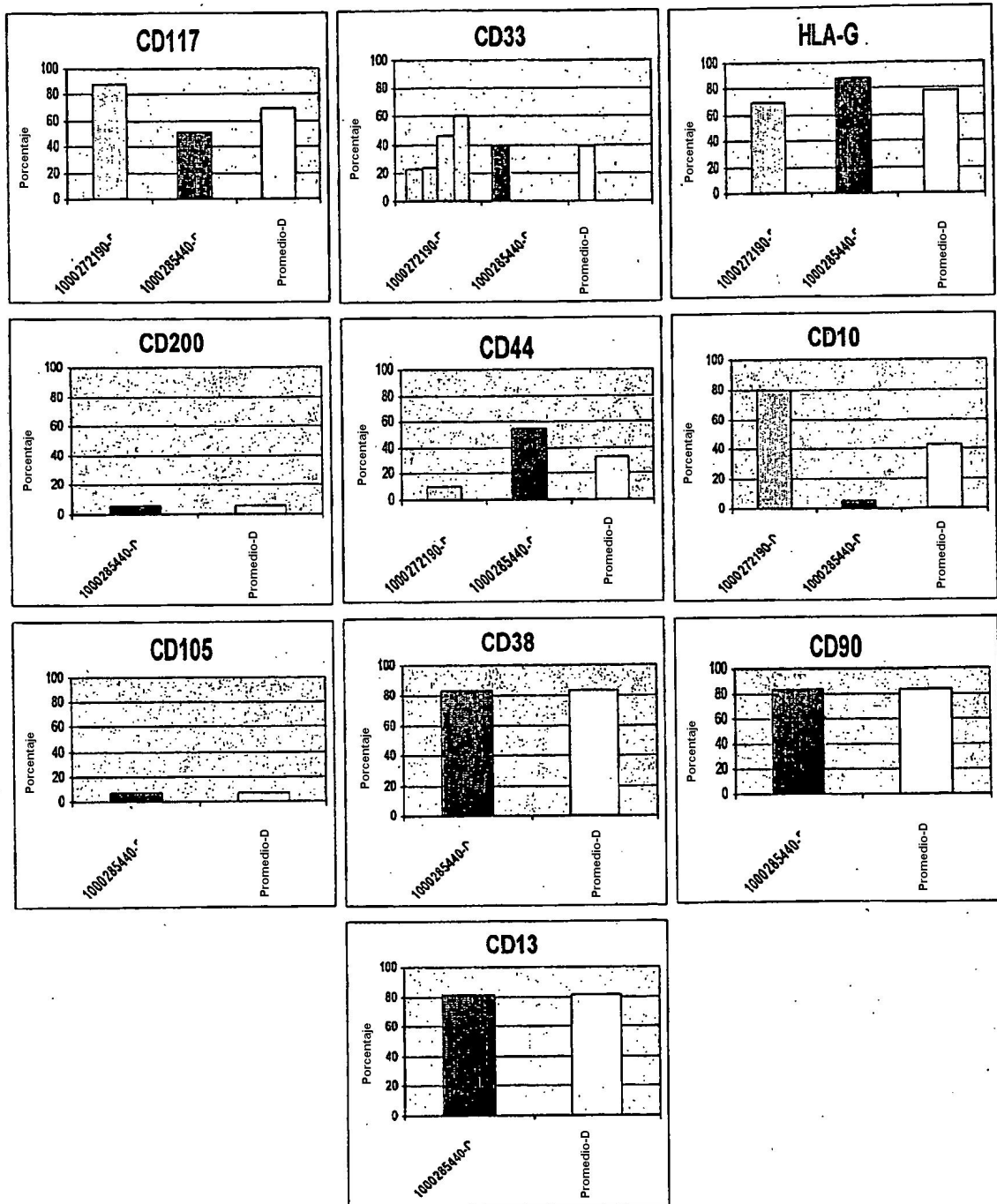


FIG. 7

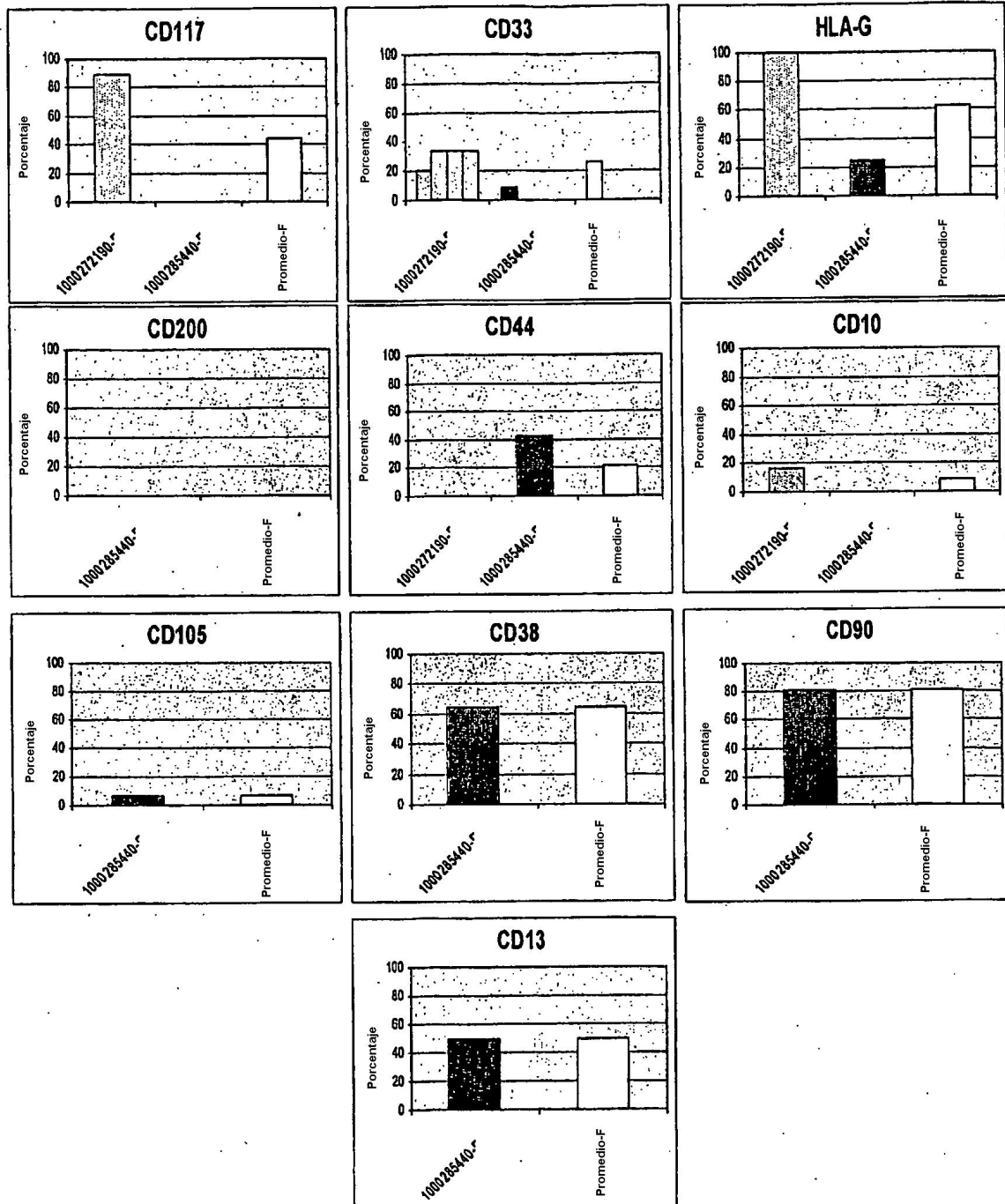


FIG. 8

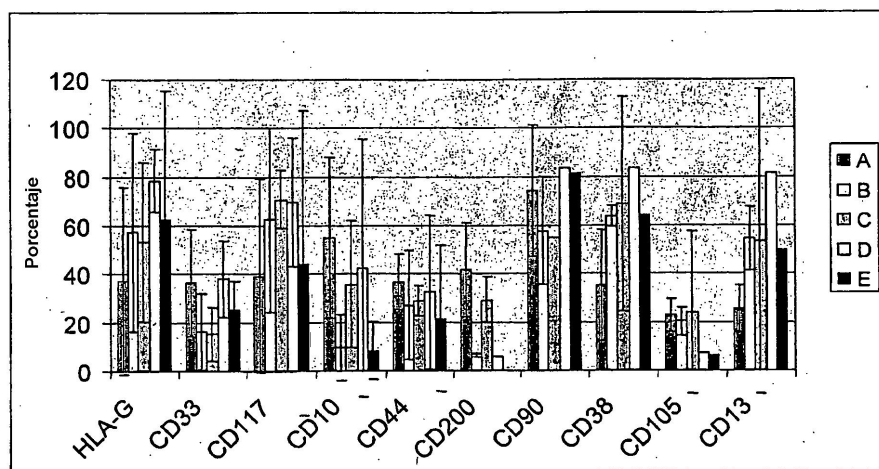
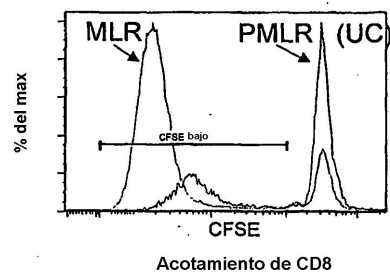
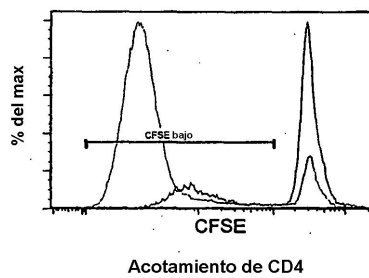


FIG. 9

A



B



FIGS. 10A, 10B

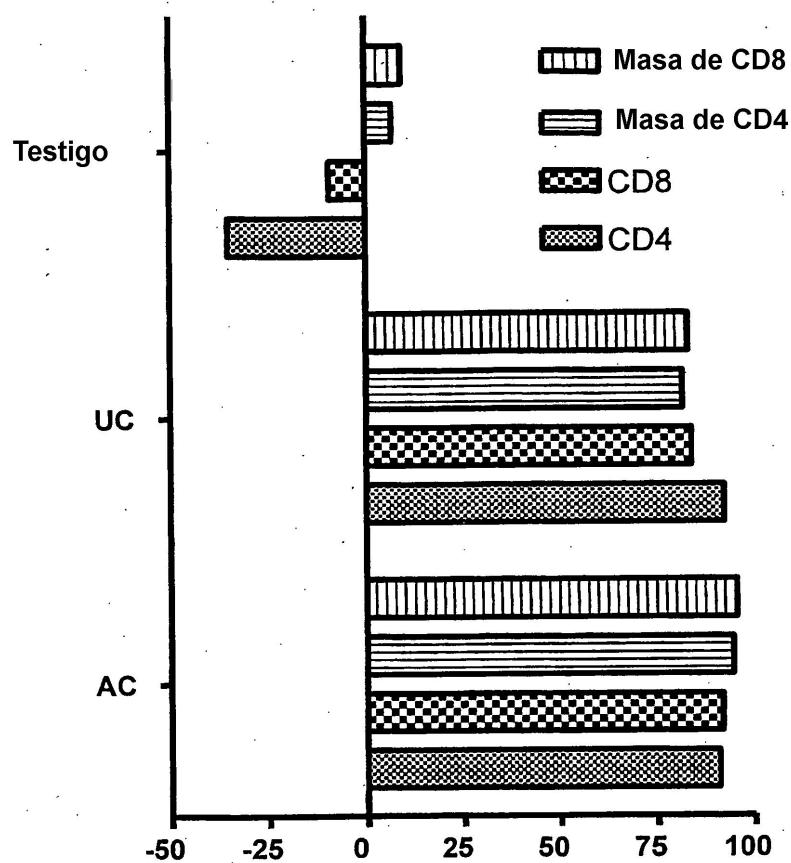


FIG. 11

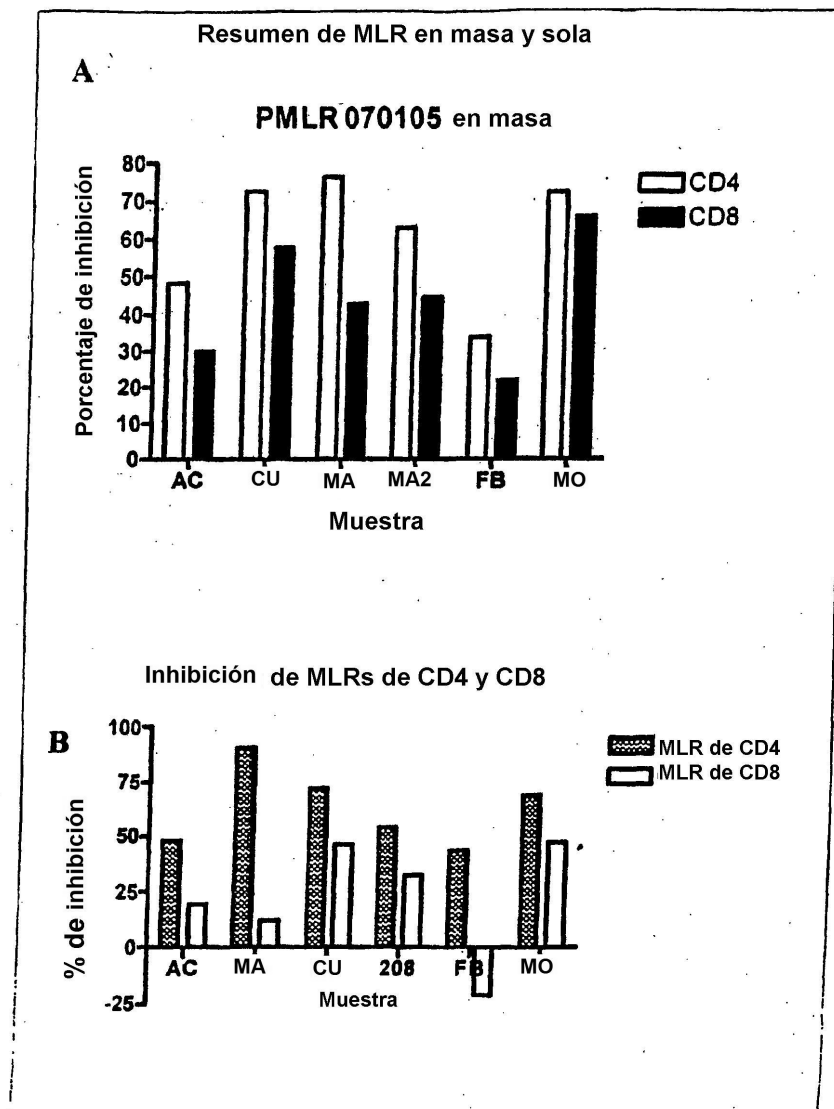


FIG. 12

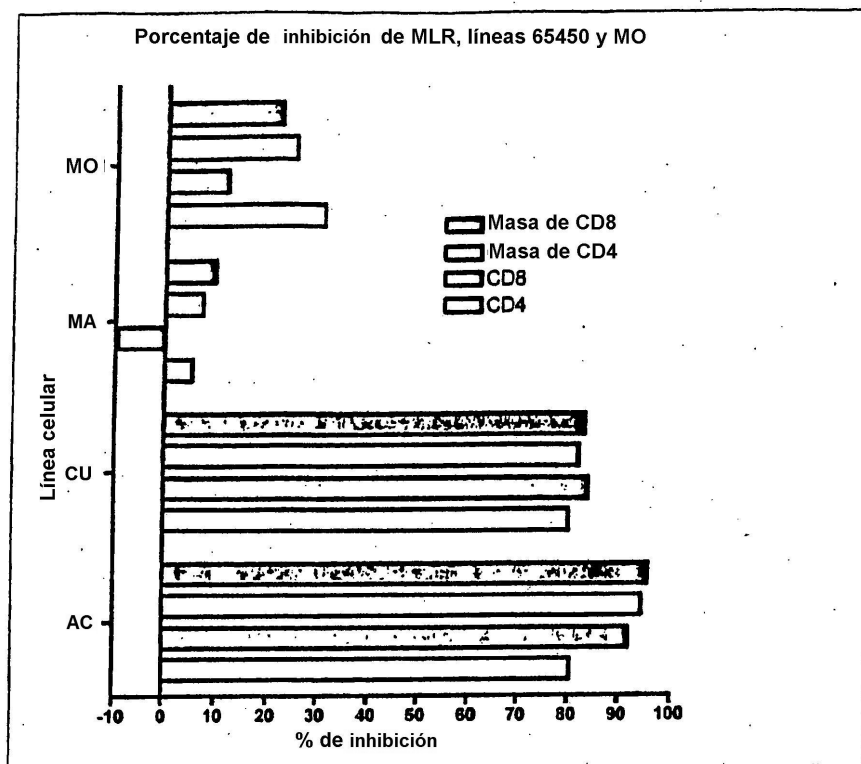


FIG. 13

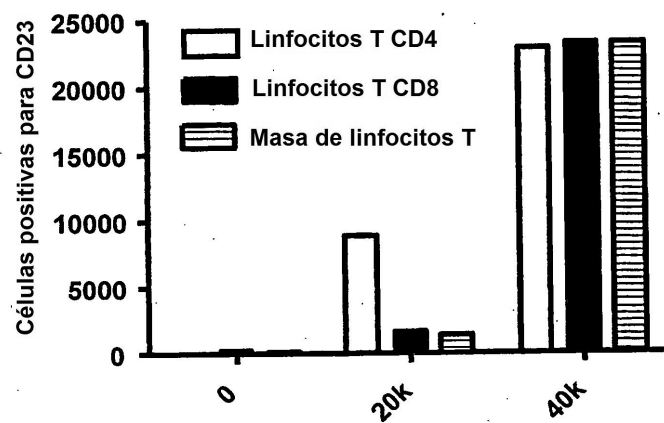


FIG. 14

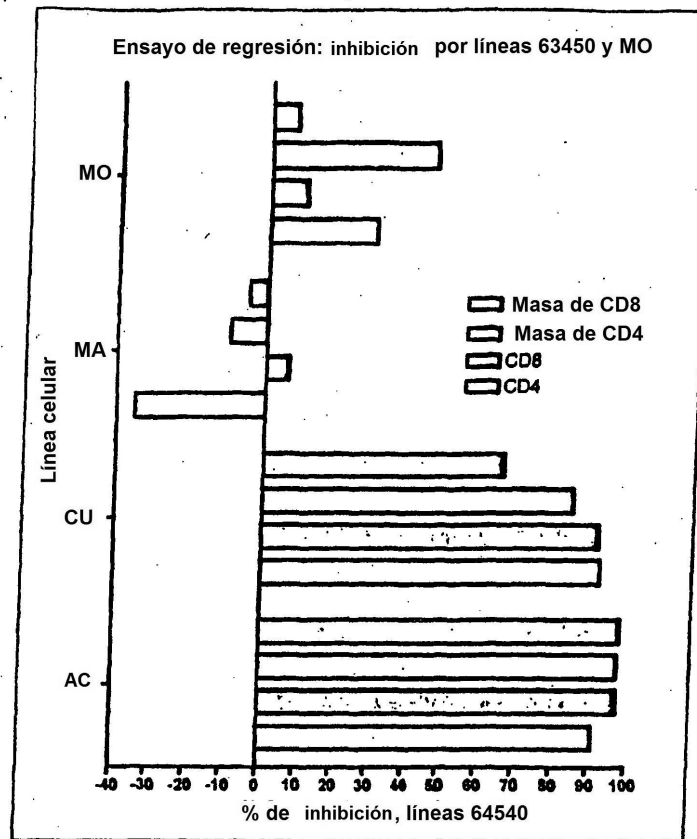


FIG. 15

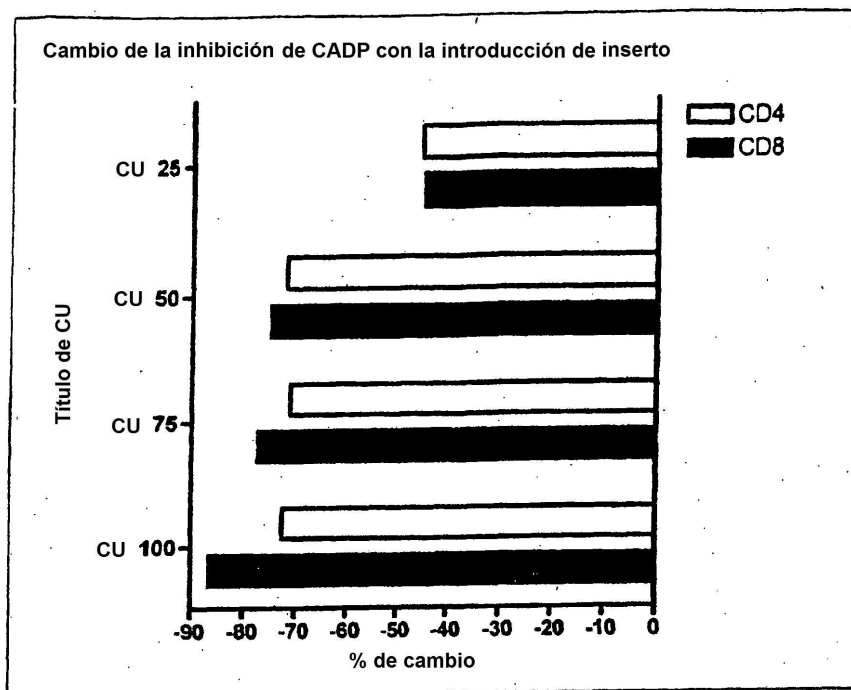


FIG. 16

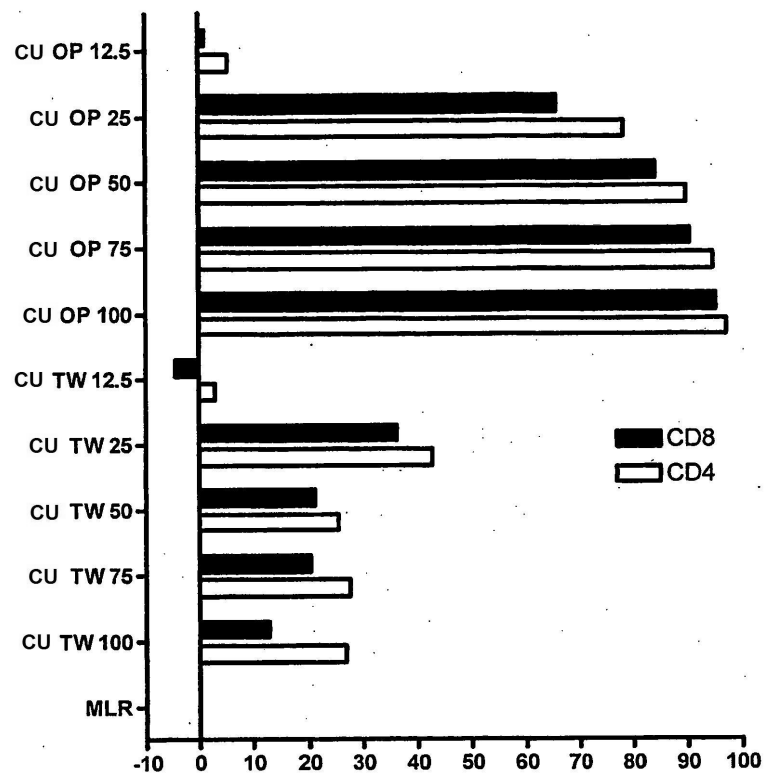


FIG. 17

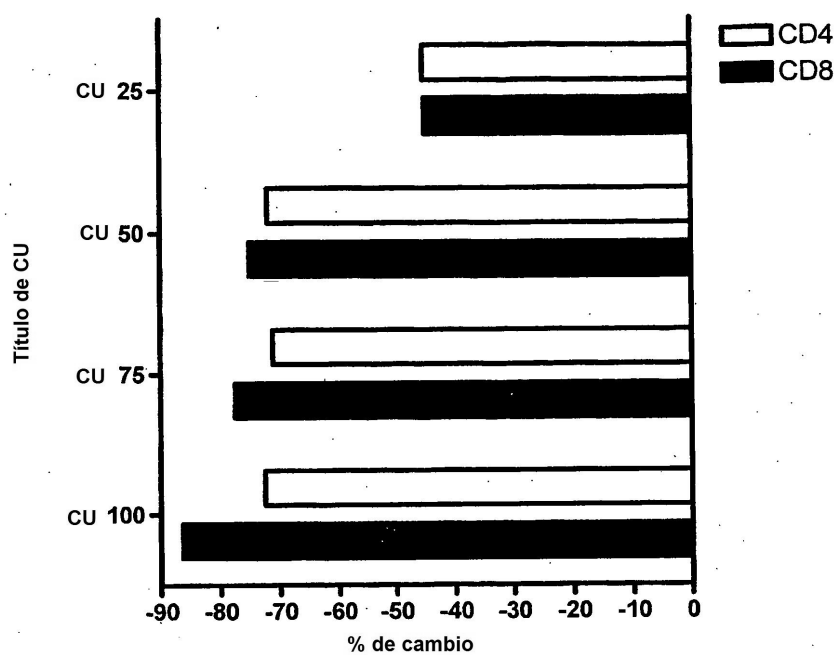


FIG. 18

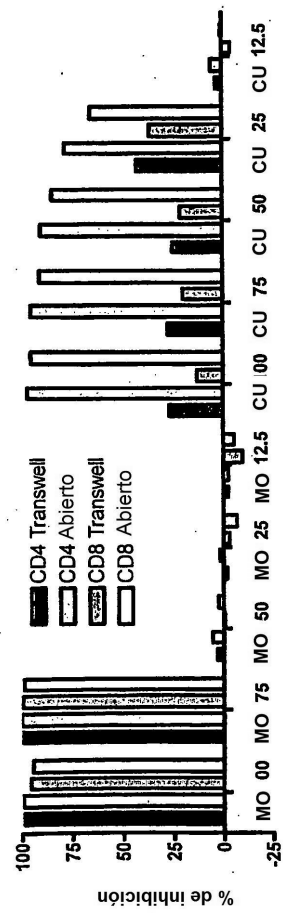


FIG. 19

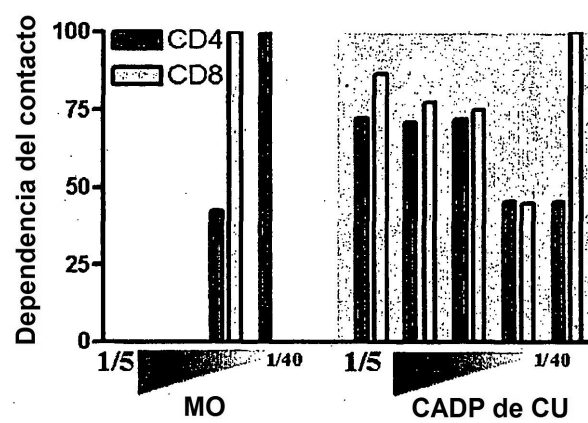


FIG. 20

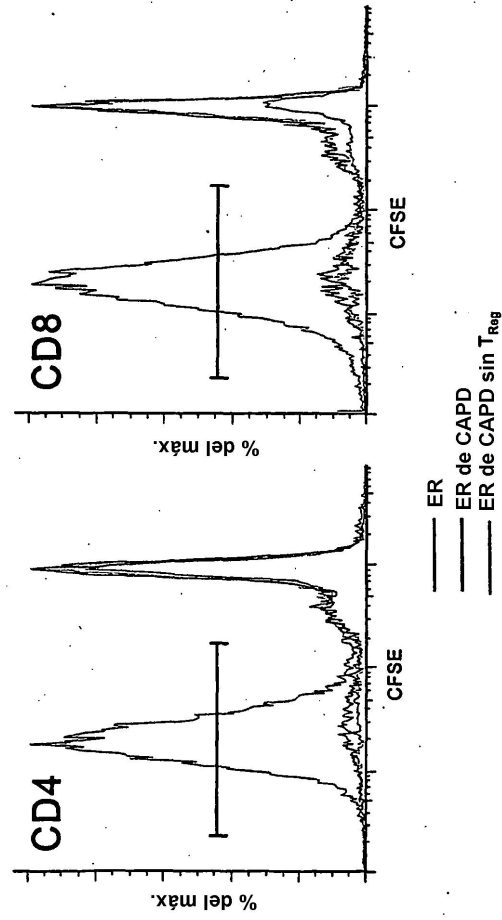


FIG. 21

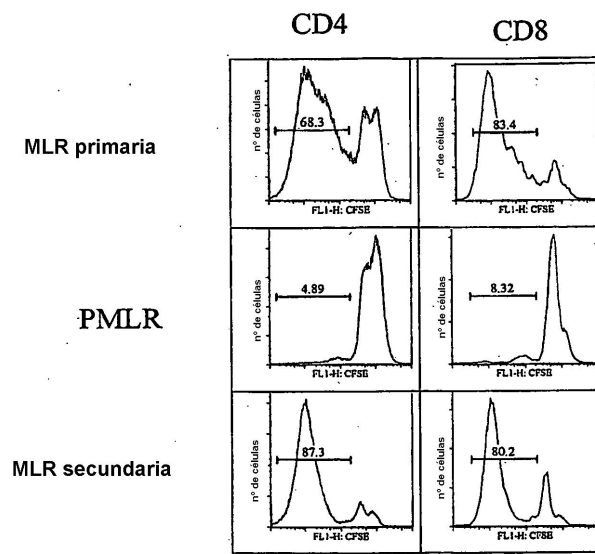


FIG. 22

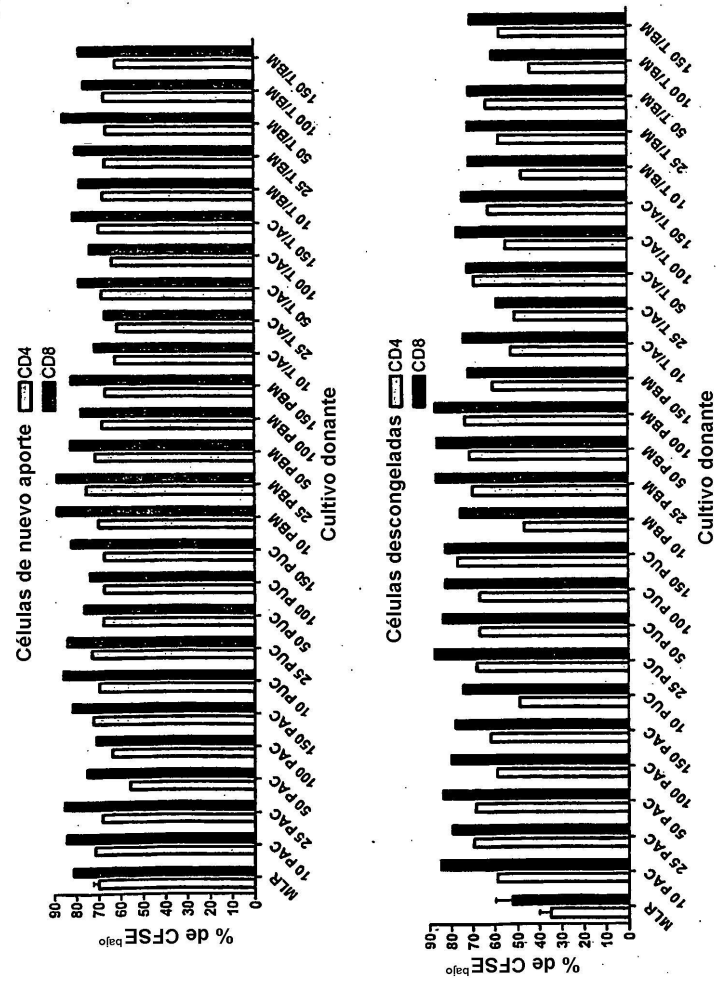
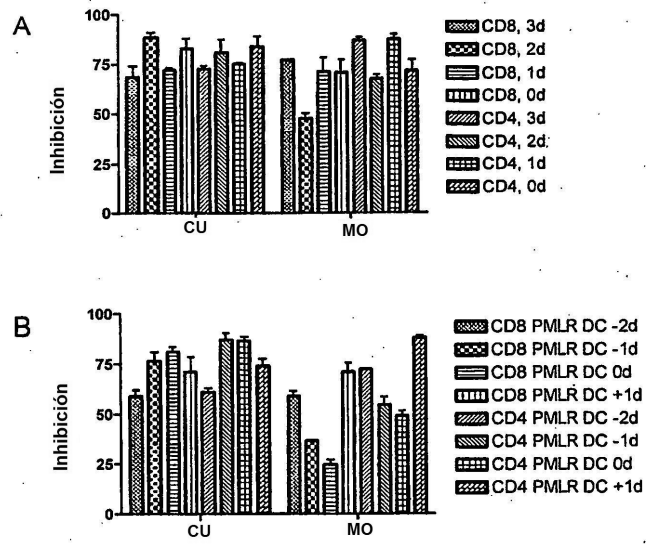


FIG. 23



FIGS. 24A, 24B

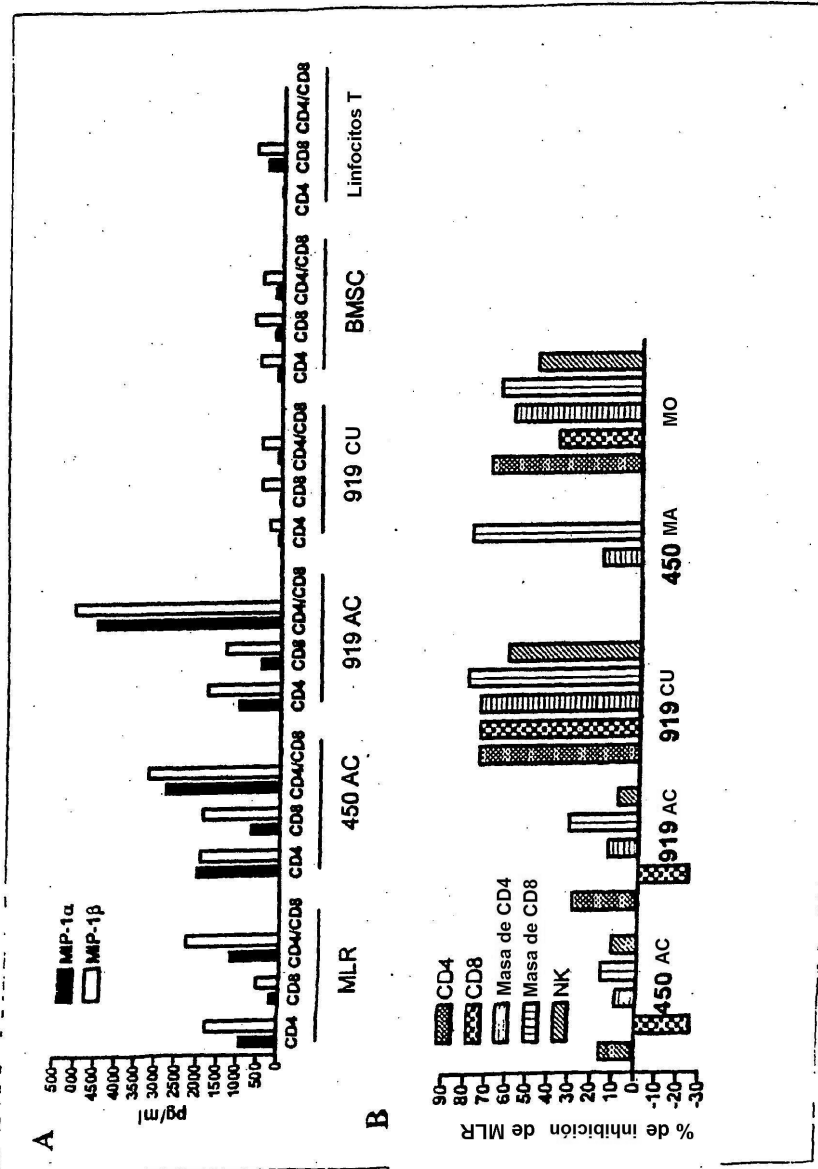


FIG. 25

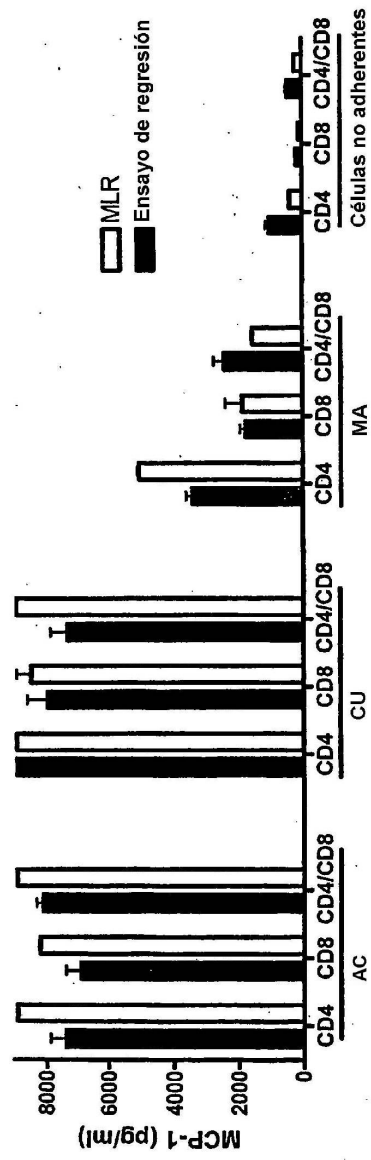


FIG. 26

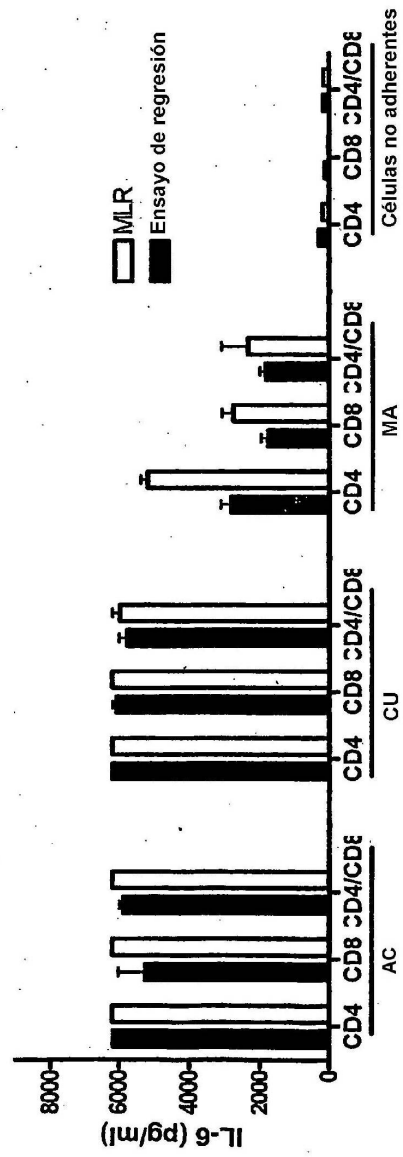


FIG. 27