

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 890**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**C12N 5/073** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2001 E 01999637 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1349918**

54 Título: **Método para recolectar células troncales placentarias**

30 Prioridad:

**06.12.2000 US 251900 P**

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

**19.11.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARIRI, ROBERT J.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 522 890 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**

Método para recolectar células troncales placentarias

**Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención**

5 La presente invención pertenece, en general, al área de la recolección de células troncales y, en particular, a la recuperación de células troncales CD34+ o células troncales similares a MSC adherentes a plástico para cultivo de tejidos fibroblastoides procedentes de placentas. Estas células troncales se obtienen de placenta recogida después del nacimiento. Estas células troncales tienen características de células troncales embrionarias pero no se derivan del embrión.

**10 2. Descripción de la técnica anterior**

Las células troncales humanas son células precursoras totipotenciales o pluripotenciales capaces de generar una diversidad de linajes de células humanas maduras. Esta capacidad sirve como base para la diferenciación celular y la especialización necesaria para el desarrollo de órganos y tejidos. Los éxitos recientes en el trasplante de dichas células troncales han proporcionado nuevas herramientas clínicas para reconstituir y/o complementar la médula ósea después de una mieloablación debido a enfermedad, exposición a químicos tóxicos o radiación. Existen más pruebas que demuestran que las células troncales pueden emplearse para repoblar muchos, o todos, los tejidos y restablecer la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de células troncales en la ingeniería de tejidos, la administración de terapias génicas y la terapéutica celular también está avanzando con rapidez.

La obtención de suficientes células troncales humanas ha resultado problemático por varias razones. En primer lugar, el aislamiento de poblaciones naturales de células troncales en tejidos adultos ha resultado difícil desde el punto de vista técnico, es caro y muy limitado en cuanto a cantidad. En segundo lugar, la obtención de estas células a partir de embriones o tejido fetal, que incluye abortos, ha generado muchos problemas éticos y morales. La creencia muy extendida de que el embrión y el feto humano constituyen vida independiente ha justificado una moratoria sobre el uso de dichas fuentes para cualquier fin. Otras fuentes alternativas que no vulneren la inviolabilidad de la vida independiente serían fundamentales para un mayor avance en el uso de células troncales desde un punto de vista clínico.

La sangre de cordón umbilical (sangre de cordón umbilical) es una fuente conocida de células troncales progenitoras pluripotentes hemopoyéticas, que son crioconservadas para su uso en la reconstitución hemopoyética. La utilización de sangre de cordón umbilical para este fin es muy conocido y se está convirtiendo en un procedimiento terapéutico de amplio uso. La técnica convencional para la recolección de sangre de cordón umbilical se basa en el uso de una aguja o cánula que se emplea con la ayuda de la gravedad para drenar la sangre de cordón umbilical de la placenta. Habitualmente, la aguja o la cánula se coloca en la vena umbilical y la placenta se masajea con suavidad para ayudar a drenar la sangre de cordón umbilical de la placenta. Después, la placenta drenada se considera sin uso y generalmente se desecha. Una importante limitación en la obtención de células troncales a partir de sangre de cordón umbilical ha sido el volumen, con frecuencia inadecuado, de sangre de cordón umbilical obtenido, que resulta en un número insuficiente de células para reconstituir la médula ósea después de un trasplante.

El suministro de células troncales se encuentra en unos niveles críticos. Estas son importantes para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos, que incluyen malignidades, errores congénitos del metabolismo, hemoglobinopatías e inmunodeficiencias. Sería muy ventajoso contar con una fuente de más células troncales embrionarias.

Por consiguiente, un objeto principal de la presente invención consiste en proporcionar un método para extraer y recuperar células troncales hematopoyéticas a partir de una placenta exsanguinada.

Un objeto de la presente descripción consiste también en proporcionar un método para aislar otras células troncales omnipotentes y/o similares a células embrionarias a partir de un extractante de una placenta drenada.

45 Otro objeto de la presente descripción consiste en proporcionar un método para recolectar células troncales a partir de la vena del cordón umbilical, la mejor fuente de células troncales progenitoras pluripotentes hemopoyéticas.

Otro objeto de la presente descripción consiste en proporcionar un método y un medio mediante el cual pueden obtenerse más células troncales similares a células embrionarias en concentraciones mayores a partir de una placenta drenada.

50 Otro objeto de la presente descripción consiste en proporcionar un método para utilizar la placenta aislada y perfusionada como biorreactor para proporcionar un buen entorno para la propagación de células endógenas, que incluyen, pero no se limitan a linfocitos y células troncales.

Otro objeto de la presente descripción consiste en proporcionar un método y un medio mediante el cual pueden obtenerse células troncales muchas horas después del nacimiento y la expulsión de la placenta del útero.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para aislar células troncales a partir de una placenta de mamífero aislada y exsanguinada, en el que dichas células troncales son células troncales CD34+ o células troncales similares a MSC adherentes a plástico para cultivo de tejidos fibroblastoides, comprendiendo dicho método perfusionar dicha placenta con una disolución de perfusión, haciendo pasar dicha disolución de perfusión hacia la arteria umbilical o la vena umbilical, o ambas, de dicha placenta, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para aislar una cantidad detectable de células troncales a partir de dicha placenta, habiendo sido dicha placenta drenada de sangre de cordón umbilical y sangre materna antes de dicha perfusión; y aislar dichas células troncales y la disolución de perfusión de dicha placenta, en el que, para dichas células troncales similares a MSC adherentes a plástico para cultivo de tejidos, el método comprende además aislar dichas células troncales mediante una técnica de adhesión diferencial, en el que dichas células troncales similares a MSC pueden obtenerse mediante una técnica de adhesión diferencial que comprende una tripsinización diferencial empleando tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2%.

Se ha desarrollado un método para extraer células troncales similares a células embrionarias a partir de una placenta drenada mediante una técnica de perfusión que utiliza la arteria umbilical o la vena umbilical, o ambas, en la recuperación de placenta humana después de la exsanguinación y la recolección de la sangre residual. La placenta después se procesa de tal manera que se establece un entorno de biorreactor natural *ex vivo* en el que las células troncales residentes dentro del parénquima y el espacio extravascular se reclutan y migran hacia la microcirculación vacía, en donde pueden ser lavadas hacia un recipiente de recolección mediante perfusión.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista en corte transversal de la canulación de la vena y la arteria de una placenta para perfusionar la placenta y después recolectar el perfusionado.

Las figuras 2a-e son dibujos esquemáticos que muestran la recolección, el pinzamiento, la perfusión, la recolección y la conservación de una placenta drenada y perfusionada.

La figura 3 es un esquema en corte transversal de una placenta perfusionada en un dispositivo para su uso como biorreactor.

La figura 4 es un esquema de la selección para clasificar las células extraídas de una placenta perfusionada.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para aislar células troncales a partir de una placenta de mamífero aislada y exsanguinada, en el que dichas células troncales son células troncales CD34+ o células troncales similares a MSC adherentes a plástico para cultivo de tejidos fibroblastoides, comprendiendo dicho método perfusionar dicha placenta con una disolución de perfusión, haciendo pasar dicha disolución de perfusión hacia la arteria umbilical o la vena umbilical, o ambas, de dicha placenta, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para aislar una cantidad detectable de células troncales a partir de dicha placenta, habiendo sido dicha placenta drenada de sangre de cordón umbilical y sangre materna antes de dicha perfusión; y aislar dichas células troncales y la disolución de perfusión de dicha placenta, en el que, para dichas células troncales similares a MSC adherentes a plástico para cultivo de tejidos, el método comprende además aislar dichas células troncales mediante una técnica de adhesión diferencial, en el que dichas células troncales similares a MSC pueden obtenerse mediante una técnica de adhesión diferencial que comprende una tripsinización diferencial empleando tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2%.

### 1. Método para drenar y extraer la placenta

#### Drenaje de la sangre de cordón umbilical y conservación de la placenta fresca

El método requiere el acceso a placentas humanas recién drenadas que se han sometido a un proceso de recuperación de sangre de cordón umbilical convencional mediante el drenaje de toda, o sustancialmente toda, la sangre de cordón umbilical de la placenta. Es importante que la placenta se conserve y se drene de modo apropiado para que pueda ser una fuente adecuada de células troncales embrionarias. En general, una placenta debe conservarse en una disolución anticoagulante a una temperatura de 5 °C (centígrados) a 25 °C durante no más de 48 horas antes de la recolección de la sangre de cordón umbilical. Las disoluciones anticoagulantes adecuadas son muy conocidas. Una disolución anticoagulante preferida comprende una disolución de heparina (al 1% en p/p en una disolución 1:1000). En general, la placenta drenada debe conservarse durante no más de 36 horas antes de recolectar las células troncales similares a células embrionarias.

#### Extracción de las células

El método de extracción de células troncales similares a células embrionarias preferido se basa en la perfusión de la placenta drenada con un fluido acuoso adecuado, tal como un anticoagulante disuelto en cualquier fluido isotónico acuoso adecuado, tal como una disolución de cloruro de sodio 0,9 N. El anticoagulante para el líquido de perfusión puede comprender heparina o warfarina sodio a una concentración que sea suficiente para evitar la formación de

coágulos de sangre de cordón umbilical residual. En general, pueden emplearse de 100 a 1000 unidades de heparina.

5 El procedimiento de extracción se basa en la transferencia del líquido de perfusión a través de la arteria umbilical o la vena umbilical, o ambas, empleando un flujo por gravedad hacia la placenta, que se suspende de tal forma que la arteria umbilical y la vena umbilical están en el punto más elevado. Se prefiere conectar la arteria umbilical y la vena umbilical de modo simultáneo, tal como se muestra en la figura 1, a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un depósito del líquido de perfusión, que se transfiere hacia la vena y la arteria umbilical y se recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estaba unida al útero materno durante la gestación.

10 La técnica de recolección se basa en el uso de una cantidad suficiente del líquido de perfusión que resulte en la recolección de las células que quedan después del drenaje de la sangre de cordón umbilical. Se ha observado que cuando el líquido de perfusión se recoge primero, el líquido está coloreado por los eritrocitos residuales y tiende a aclararse a medida que el líquido de perfusión se hace pasar a través de la placenta. En general, de 30 a 100 ml de líquido de perfusión resultan adecuados para recoger las células similares a células embrionarias, pero puede utilizarse una cantidad mayor o menor dependiendo de los resultados observados.

## II. Método para utilizar la placenta drenada y perfusionada como biorreactor

### Perfusión de la placenta drenada

20 Tal como se analizó anteriormente, la placenta se recupera bajo condiciones asépticas después de la exsanguinación y el pinzamiento del cordón umbilical proximal (en los primeros 4-5 cm (centímetros) desde la inserción en el disco placentario) y la recuperación de la sangre placentaria, y se transporta en un dispositivo de transporte estéril y térmicamente aislado (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28 °C) hasta el laboratorio para su procesamiento, por ejemplo, colocando la placenta pinzada en una bolsa de plástico con un cierre de cremallera estéril que después se coloca en un recipiente de Styrofoam aislado o un recipiente de aislamiento al vacío, tal como se muestra en las figuras 2a-e.

### Uso de la placenta como biorreactor

25 La placenta se coloca en una cubeta estéril y se lava con 500 ml de disolución salina normal tamponada con fosfato. El fluido de lavado se desecha. La vena umbilical se canula con una cánula de plástico o teflón conectada a un tubo estéril que está conectado al distribuidor de perfusión, tal como se muestra en la figura 3. La cubeta después se cubre y la placenta se mantiene a temperatura ambiente (20-25 °C) durante un periodo que varía de 2 a 24 horas. La placenta después periódicamente se perfusiona, preferiblemente a 4, 8, 12 y 24 horas, con un volumen de perfusionado, preferiblemente 100 ml de perfusionado (disolución salina normal estéril complementada o no con heparina 1000 u/l y/o EDTA y/o CPDA (creatina fosfato dextrosa)). El fluido efluente que escapa de la placenta en la superficie opuesta se recoge y se procesa para aislar las células troncales de interés. Pueden realizarse alteraciones en las condiciones en las que la placenta se mantiene y en la naturaleza del perfusionado, para controlar el volumen y la composición del efluente.

35 Después las células troncales se aíslan a partir del efluente utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad, separación de células magnética u otro método aceptable, y se clasifican, por ejemplo, según el esquema mostrado en la figura 4.

40 En variaciones de este método, las células en la placenta pueden estimularse para que produzcan moléculas bioactivas, tales como inmunoglobulinas, u otras moléculas, o estimularse para que proliferen, por ejemplo, mediante la administración de eritropoyetina. Las células también pueden modificarse genéticamente antes de la recolección, cuando aún están en el biorreactor, o en el momento de la recolección, utilizando, por ejemplo, un vector vírico, tal como un vector adenovírico o retrovírico, o empleando medios mecánicos, tales como la captación química o mediada por liposomas del ADN.

45 El procedimiento es el siguiente:

1. Se exsanguina completamente la placenta y se retira cualquier contaminante celular no adherente y coagulado no adherente.

2. Se cultiva y se perfusiona la placenta con disolución de perfusionado (por ejemplo, disolución salina normal) con o sin un anticoagulante y/o con o sin un agente antimicrobiano.

50 3. Se recoge el perfusionado extravasado y el perfusionado circulado hacia un receptáculo estéril.

4. Se aíslan los tipos celulares del perfusionado recogido empleando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, pero sin limitarse a centrifugación en gradiente de densidad, separación de células magnética, separación de células por afinidad o técnicas de adhesión diferencial.

En una realización de la invención, la placenta se emplea como biorreactor para células endógenas, que incluyen,

pero no se limitan a linfocitos y diversos tipos de células troncales pluripotentes y/o totipotentes, incubando la placenta durante 48 horas con disolución de perfusionado.

5 La memoria descriptiva también indica que la placenta se procesa para eliminar todas las células endógenas y se permite que se introduzcan y se propaguen células extrañas en el entorno de la placenta perfusionada. También se indica que la placenta perfusionada se irradia con radiación electromagnética, UV, rayos X, gamma o beta para erradicar todas las células endógenas viables remanentes. Después se introducen las células extrañas de interés que se van a propagar en el biorreactor placentario irradiado.

10 La memoria descriptiva indica que las células exógenas son inducidas para que se propaguen mediante la introducción de nutrientes y factores del crecimiento en la disolución de perfusión. Se añade suero y otros factores del crecimiento a la disolución o medio de perfusión de propagación. Los factores del crecimiento habitualmente son proteínas e incluyen, pero no se limitan a citoquinas, linfoquinas, interferones, factores estimulantes de colonias (CSF), interferones, quimioquinas e interleuquinas. Otros factores del crecimiento incluyen factores del crecimiento hemopoyéticos humanos recombinantes, que incluyen ligandos, factores de células troncales, trombopoyetina (Tpo), interleuquinas y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Los factores del crecimiento introducidos en la disolución de perfusión pueden estimular la propagación de células troncales indiferenciadas o células hemopoyéticas diferenciadas, y estimulan la producción de moléculas bioactivas que incluyen, pero no se limitan a inmunoglobulinas, hormonas u otros factores del crecimiento, tal como se ha descrito previamente.

La presente invención se comprenderá más a fondo haciendo referencia al siguiente ejemplo.

**Ejemplo 1: Perfusión de la placenta drenada**

20 Se añaden 20 ml (mililitros) de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) al líquido de perfusión y se recoge una porción de 10 ml y se centrifuga durante 25 minutos a 3000 rpm (revoluciones por minuto). El efluente se divide en cuatro tubos y se coloca en un baño de hielo. Se añaden 2,5 ml de una disolución de suero de ternera fetal (FCS) al 1% en PBS, y los tubos se centrifugan (140 minutos x 10 g (aceleración debida a la gravedad)). El sedimento se resuspende en 5 ml de FCS al 1% y se reúnen dos tubos. Los mononucleocitos totales se calculan sumando los linfocitos totales y los monocitos totales y multiplicando el resultado por el volumen de suspensión celular total.

**Ejemplo 2: Análisis de las células obtenidas mediante perfusión e incubación de la placenta**

	Leucocitos 1000/ml	% de linfoc.	% de MED	% de GRA	Volumen total	n.º de células
SCU (sangre de cordón umbilical)	10,5	43,2	8	48,8	60 ml	6,3 x 10 <sup>8</sup>
PP (perfusionado de la placenta, temperatura ambiente)	12,0	62,9	18,2	18,9	15 ml	1,8 x 10 <sup>8</sup>
PP <sub>2</sub> (perfusionado de la placenta, 37 °C)	11,7	56,0	19,2	24,8	30 ml	3,5 x 10 <sup>8</sup>

30 Las muestras de PP son después del Ficoll. El número de células total de PP después de Ficoll es de 5,3 x 10<sup>8</sup>, y el número de SU antes del procesamiento es de 6,3 x 10<sup>8</sup>. “% de linfoc.” es el porcentaje de linfocitos; “% de MED” es el porcentaje de leucocitos de rango medio; y “% de GRA” es el porcentaje de granulocitos.

El aislamiento de las células se logra empleando una separación de células magnética, tal como, por ejemplo, Auto Macs (Miltenyi). Preferiblemente, el aislamiento de las células CD34+ se realiza primero.

Materiales y métodos

35 Los donantes de placenta se reclutaron entre mujeres embarazadas que se inscribieron en programas de preparación de bancos de sangre de cordón umbilical privados y con la condición de su consentimiento informado que permite el uso de la placenta exsanguinada después de la recuperación de la sangre de cordón umbilical para fines de investigación. Estos donantes también permitieron el uso de los datos ciegos generados a partir del procesamiento normal de sus especímenes de sangre de cordón umbilical para la crioconservación. Esto permite la comparación entre la composición de la sangre de cordón umbilical recogida y el perfusionado efluente recuperado utilizando el método experimental descrito a continuación. Todos los datos de los donantes son confidenciales.

40 Después de la exanguinación del cordón umbilical y la placenta, la placenta se colocó en un recipiente estéril aislado a temperatura ambiente y se envió al laboratorio a las 4 horas del nacimiento. Las placentas se rechazaron si, tras su inspección, mostraban señales de daños físicos, tales como la fragmentación del órgano o la avulsión de vasos umbilicales. Las placentas se mantuvieron a temperatura ambiente (23 +/- 2 °C) o se refrigeraron (4 °C) en recipientes estériles durante 2 a 20 horas. Periódicamente, las placentas se sumergieron y se lavaron en disolución salina estéril a 25 +/- 3 °C para eliminar cualquier residuo o sangre de la superficie visible. El cordón umbilical se transecciona a aproximadamente 5 cm desde su inserción en la placenta, y los vasos umbilicales se canulan con

catéteres de teflón o polipropileno conectados a una vía de fluidos estéril que permite la perfusión bidireccional de la placenta y la recuperación del fluido efluente. El sistema empleado en la presente invención permite realizar todos los aspectos de acondicionamiento, perfusión y recolección del efluente bajo condiciones atmosféricas ambientales controladas, así como el control a tiempo real de los caudales y la presión intravascular, las temperaturas del núcleo y del perfusionado, y los volúmenes de efluente recuperados. Se evaluó una gama de protocolos de acondicionamiento a lo largo de un periodo de postparto de 24 horas, y se analizó la composición celular del fluido efluente mediante citometría de flujo, microscopía óptica y ensayos de unidades formadoras de colonias.

#### Acondicionamiento de la placenta

La placenta se mantuvo bajo condiciones variables para intentar simular y mantener un entorno fisiológicamente compatible para la proliferación y el reclutamiento de células residuales. La cánula se enjuagó con medio sin suero IMDM (GibcoBRL, NY) que contenía heparina 2 U/ml (EJkins-Sinn NJ). La perfusión de la placenta continuó a una velocidad de 50 ml por minuto hasta que se recogió aproximadamente 500 ml de perfusionado. Este volumen de perfusionado se denominó "fracción temprana". La perfusión continuada de la placenta a la misma velocidad produjo la recolección de una segunda fracción de aproximadamente 150 ml y se denominó "fracción tardía". Durante el desarrollo de procedimiento, la placenta se masajó suavemente para ayudar al proceso de perfusión y a la recuperación del material celular. El fluido efluente se recogió del circuito de perfusión mediante drenaje por gravedad y aspiración a través de la cánula arterial.

Las placentas se obtuvieron de las salas de parto junto con la sangre de cordón umbilical después de obtener el consentimiento escrito de los progenitores, y se procesaron a temperatura ambiente a las 12 a 24 horas después del parto. Antes del procesamiento, las membranas se retiraron y el sitio materno se lavó para eliminar la sangre residual. Los vasos umbilicales se canularon con catéteres fabricados a partir de agujas Butterfly de calibre 20 utilizadas para la recolección de muestras de sangre. Las placentas después se perfusionaron con medio Eagle modificado de Dulbecco (H.DMEM) heparinizado (2 U/ml) a una velocidad de 15 ml/minuto durante 10 minutos, y después los perfusionados se recogieron de los sitios maternos en una hora y se contaron las células nucleadas. Los procedimientos de perfusión y recolección se repitieron una o dos veces hasta que el número de células nucleadas recuperadas cayó por debajo de 100/microlitros. Los perfusionados se reunieron y se sometieron a una ligera centrifugación para eliminar las plaquetas, los residuos y las membranas de células desnucleadas. Después las células nucleadas se aislaron mediante una centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y, después de lavar, se resuspendieron en H.DMEM. Para el aislamiento de las células adherentes se colocaron partes alícuotas de 5-10 x 10<sup>6</sup> células en cada uno de varios matraces T-75 y se cultivaron con medio de crecimiento de células troncales mesenquimáticas (MSCGM) disponible en el mercado, obtenido en BioWhittaker, y se colocaron en un incubador de cultivo de tejidos (37 °C, CO<sub>2</sub> al 2%). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiraron lavando con PBS, que después se sustituyó por MSCGM. Los matraces se examinaron a diario para detectar la presencia de diversos tipos de células adherentes y, en particular, para la identificación y la expansión de agrupaciones de células fibroblastoides.

#### Recuperación y aislamiento de células

Las células se recuperaron de los perfusionados mediante una centrifugación a X 00 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este procedimiento actúa para separar las células de las plaquetas y los residuos contaminantes. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio sin suero IMDM que contenía heparina 2 U/ml y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares totales se aisló utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) según el procedimiento recomendado por el fabricante y se resuspendió la fracción de células mononucleares. Las células se contaron utilizando un hemocitómetro. Se evaluó la viabilidad mediante exclusión con azul de tripano. Se consiguió el aislamiento de las células mesenquimáticas mediante una "tripsinización diferencial", empleando una disolución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma). La tripsinización diferencial fue posible debido a que las células fibroblastoides se desprendieron de las superficies de plástico en aproximadamente cinco minutos, mientras que las otras poblaciones adherentes requieren una incubación de más de 20-30 minutos. Las células fibroblastoides desprendidas se recolectaron después de la tripsinización y la neutralización de la tripsina empleando una disolución neutralizante de tripsina (TNS, BioWhittaker). Las células se lavaron en H.DMEM y se resuspendieron en MSCGM. Se realizó una citometría de flujo utilizando un instrumento FACSCalibur Becton-Dickinson, y los anticuerpos monoclonales marcados con FITC y PE, seleccionados basándose en marcadores conocidos para MSC (células troncales mesenquimáticas) derivadas de médula ósea, se adquirieron en B.D. y Caltag Laboratories (San Francisco, CA), y los hibridomas productores de anticuerpos SH2, SH3 y Sh4 se obtuvieron en AM. Cul., y las reactividades de los MoAb en sus sobrenadantes cultivados se detectaron con anticuerpos anti-ratón de cabra F(ab)'2 marcados con FITC o PE. La diferenciación de los linajes se realizó utilizando un medio de cultivo de inducción y mantenimiento disponible en el mercado (BioWhittaker), empleado según las instrucciones del fabricante.

#### Aislamiento de células troncales placentarias

El examen microscópico de las células adherentes en los matraces de cultivo puso de manifiesto tipos de células morfológicamente diferentes: células con forma de huso, células redondas con grandes núcleos y numerosas vacuolas pequeñas perinucleares, y células con forma de estrella con varias proyecciones, a través de una de las

5 cuales las células se unen al matraz. Aunque no se intentó caracterizar estas células adherentes, se observaron células similares en el cultivo de médula ósea, sangre de cordón umbilical y periférica y, por tanto, se consideró que eran células cuya naturaleza no se correspondía con células troncales. Las células fibroblastoides, que aparecen las últimas en forma de agrupaciones, son candidatas para ser MSC y fueron aisladas mediante tripsinización diferencial y se subcultivaron en matraces secundarios. Una microscopía de fase de las células redondas, después de la tripsinización, demostró que estaban muy granuladas y eran indistinguibles de las MSC derivadas de médula ósea producidas en el laboratorio o adquiridas en BioWhittaker. Cuando se subcultivan, las células derivadas de la placenta, en contraste con su fase temprana, se adhirieron en horas, adoptaron una característica forma fibroblastoide, y formaron un patrón de crecimiento idéntico al de las MSC derivadas de médula ósea de referencia.

10 Además, durante el subcultivo y la realimentación, las células mononucleares unidas de forma laxa fueron eliminadas mediante un lavado y los cultivos siguieron siendo homogéneos y sin contaminantes visibles de células no fibroblastoides.

#### Citometría de flujo

15 La expresión de CD-34, CD-38 y otros marcadores de la superficie asociados a células troncales sobre las células mononucleares purificadas de la fracción temprana y tardía se evaluó mediante citometría de flujo. Brevemente, las células se lavaron en PBS y después se sometieron a una tinción doble con ficoeritrina anti-CD34 e isotiocianato de fluoresceína anti-CD38 (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para aislar células troncales a partir de una placenta de mamífero aislada y exsanguinada, en el que dichas células troncales son células troncales CD34+ o células troncales similares a MSC adherentes a plástico para cultivo de tejidos fibroblastoides, comprendiendo dicho método:
- 5 perfusionar dicha placenta con una disolución de perfusión, haciendo pasar dicha disolución de perfusión hacia la arteria umbilical o la vena umbilical, o ambas, de dicha placenta, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para aislar una cantidad detectable de células troncales a partir de dicha placenta, habiendo sido dicha placenta drenada de sangre de cordón umbilical y sangre materna antes de dicha perfusión; y aislar dichas células troncales y la disolución de perfusión de dicha placenta;
- 10 en el que, para dichas células troncales similares a MSC adherentes a plástico para cultivo de tejidos, el método comprende además aislar dichas células troncales mediante técnicas de adhesión diferencial;
- en el que dichas células troncales similares a MSC pueden obtenerse mediante una técnica de adhesión diferencial que comprende una tripsinización diferencial empleando tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2%.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicha placenta se perfusiona periódicamente a las 4, 8, 12 y 24 horas.
- 15 3.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la placenta se mantiene a temperatura ambiente durante 2 a 24 horas después de la canulación y después se perfusiona periódicamente.
- 4.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha perfusión se realiza utilizando un primer volumen de entre aproximadamente 30 ml y aproximadamente 150 ml de dicha disolución de perfusión.
- 20 5.- El método de la reivindicación 4, que comprende además continuar dicha perfusión utilizando un segundo volumen de aproximadamente 30 ml a aproximadamente 150 ml de dicha disolución de perfusión, aislándose dicho segundo volumen por separado de dicho primer volumen.
- 6.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha perfusión se realiza una pluralidad de veces.
- 7.- El método de la reivindicación 6, en el que, para cada una de dichas veces, dicha perfusión se realiza utilizando un volumen de aproximadamente 30 ml a aproximadamente 150 ml de dicha disolución de perfusión.
- 25 8.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además separar dichas células troncales placentarias de dicha disolución de perfusión.
- 9.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha separación se realiza mediante centrifugación.
- 30 10.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichas células troncales placentarias se aíslan a lo largo de un periodo de hasta 48 horas.
- 11.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha disolución de perfusión comprende un anticoagulante.
- 35 12.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha disolución de perfusión comprende heparina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o creatina fosfato dextrosa (CPDA).
- 13.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha disolución de perfusión comprende eritropoyetina.
- 14.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha placenta de mamífero aislada es una placenta de postparto que queda después de un nacimiento con éxito.

40

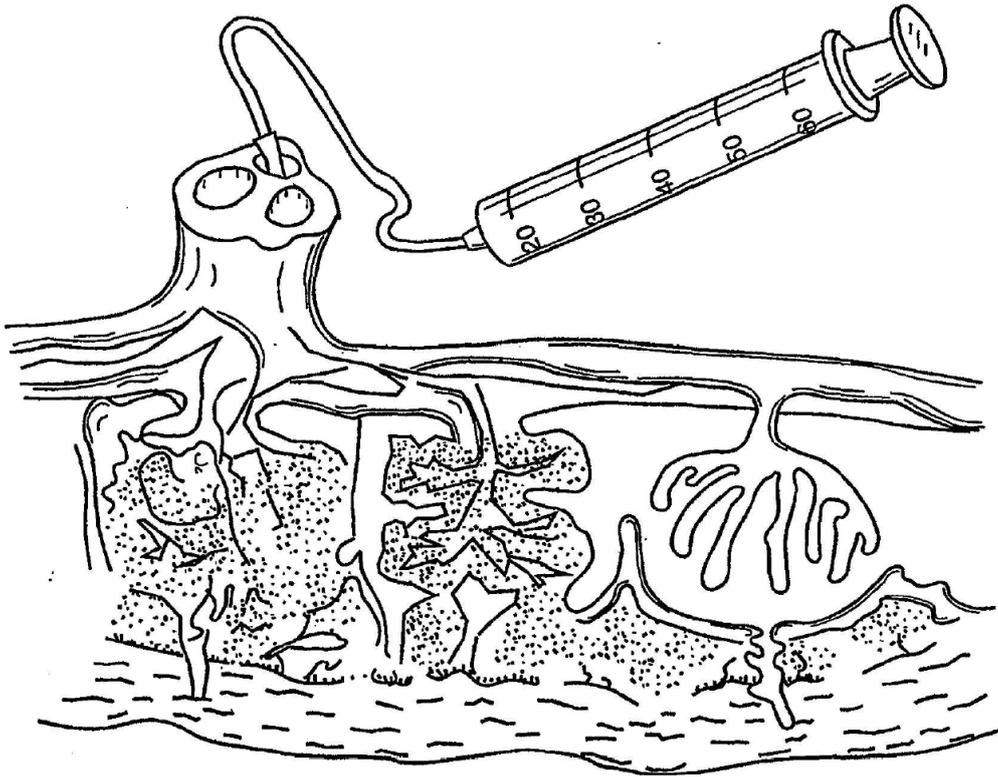
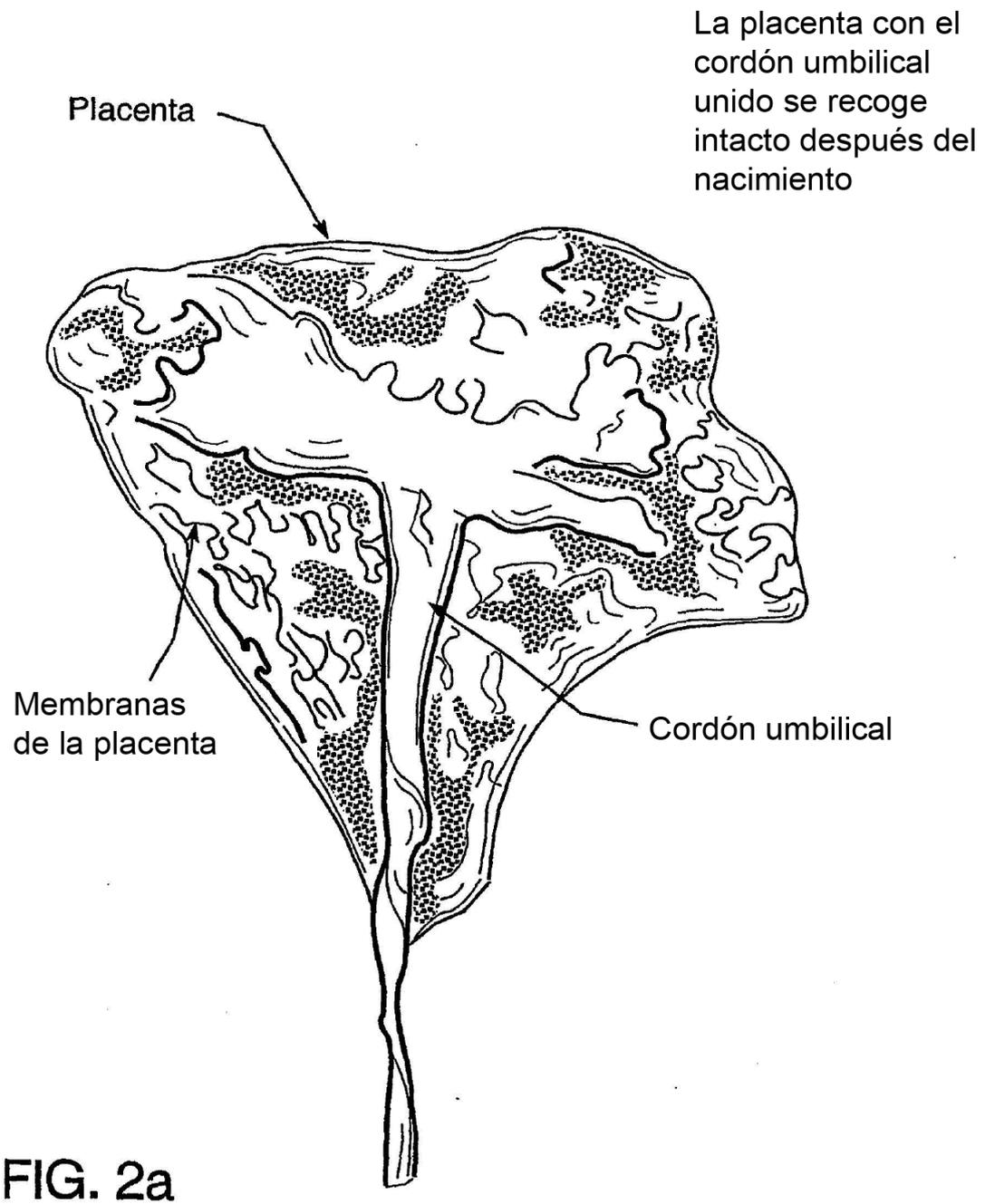


FIG. 1



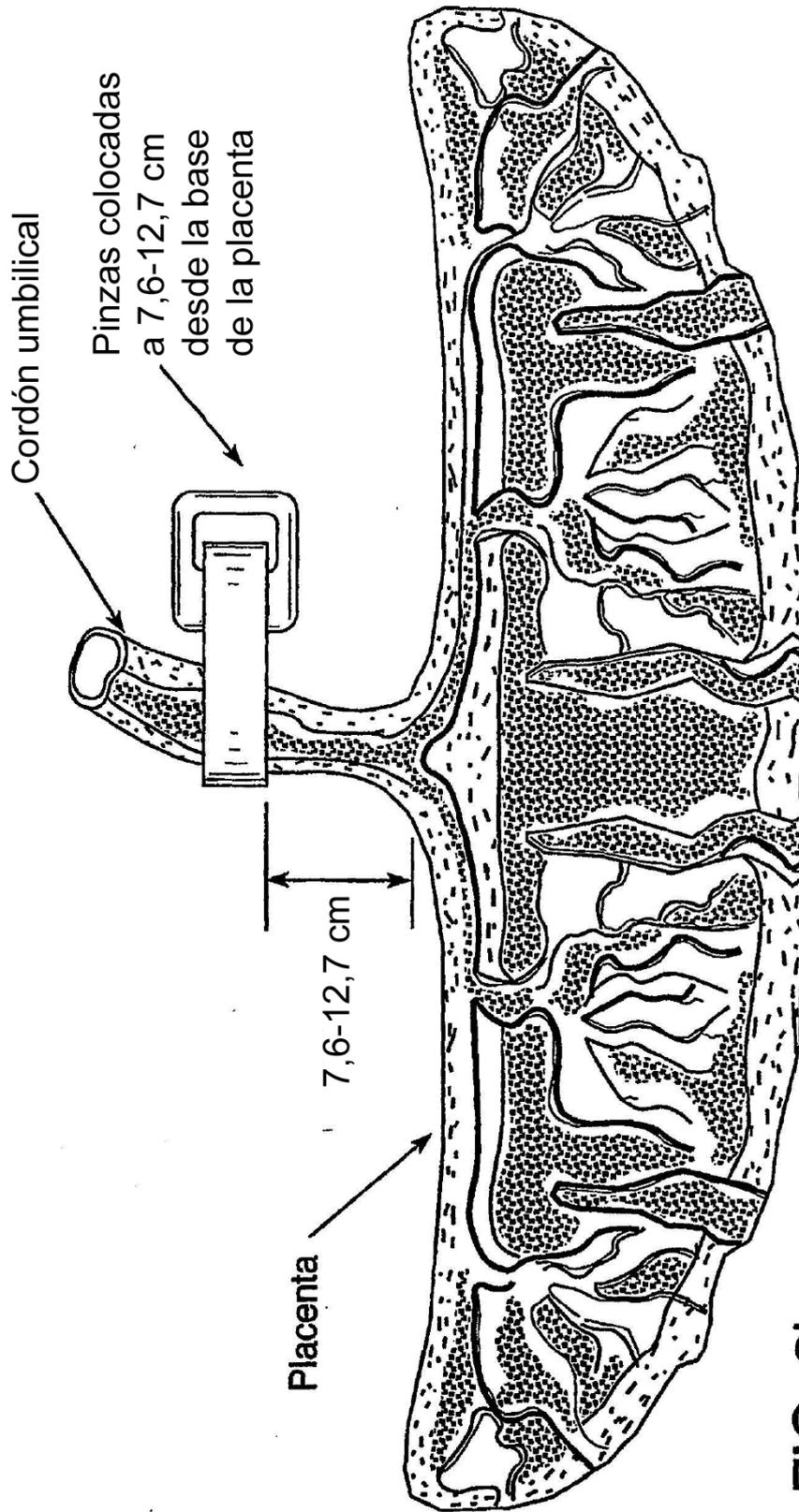


FIG. 2b

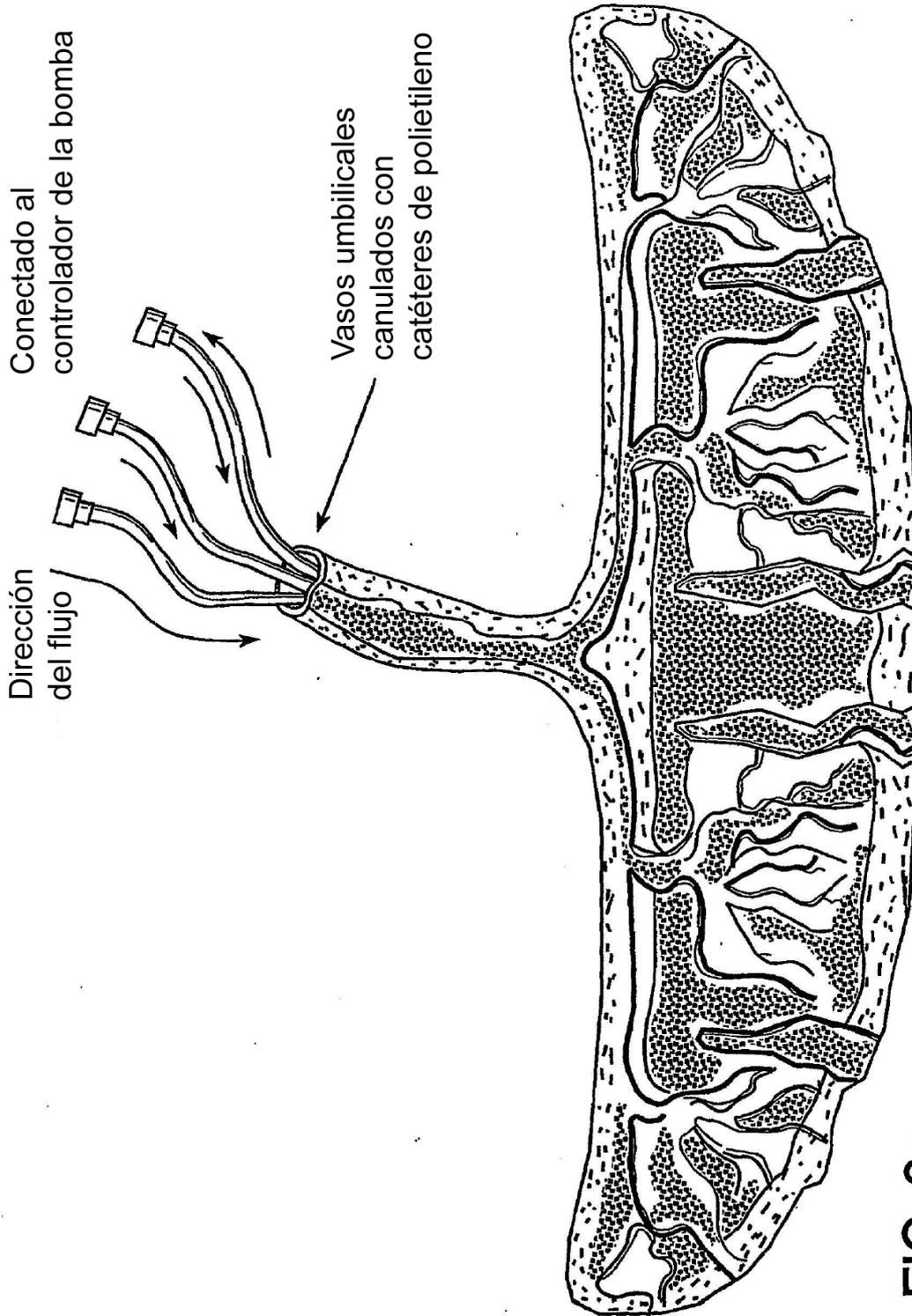


FIG. 2c

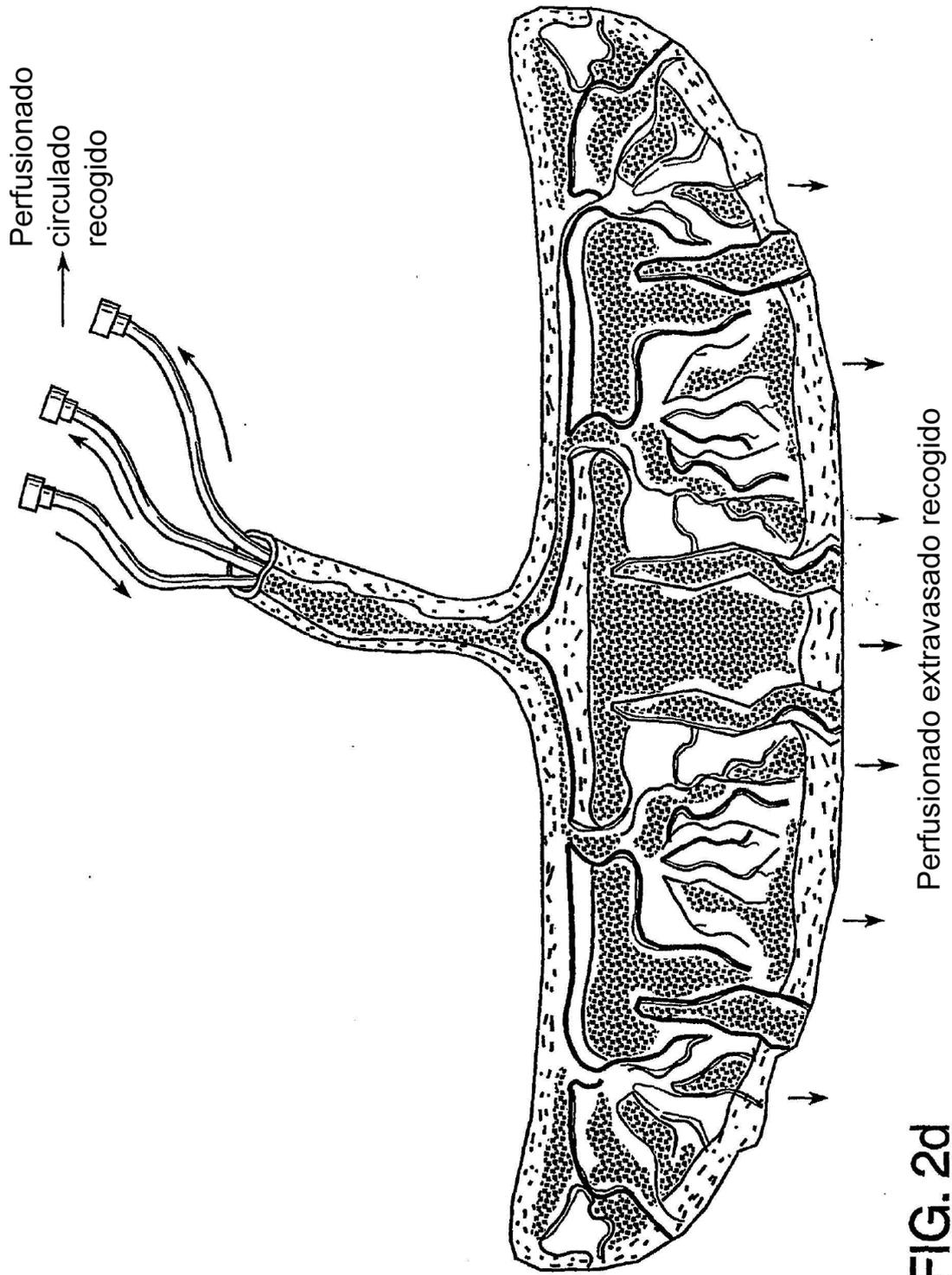
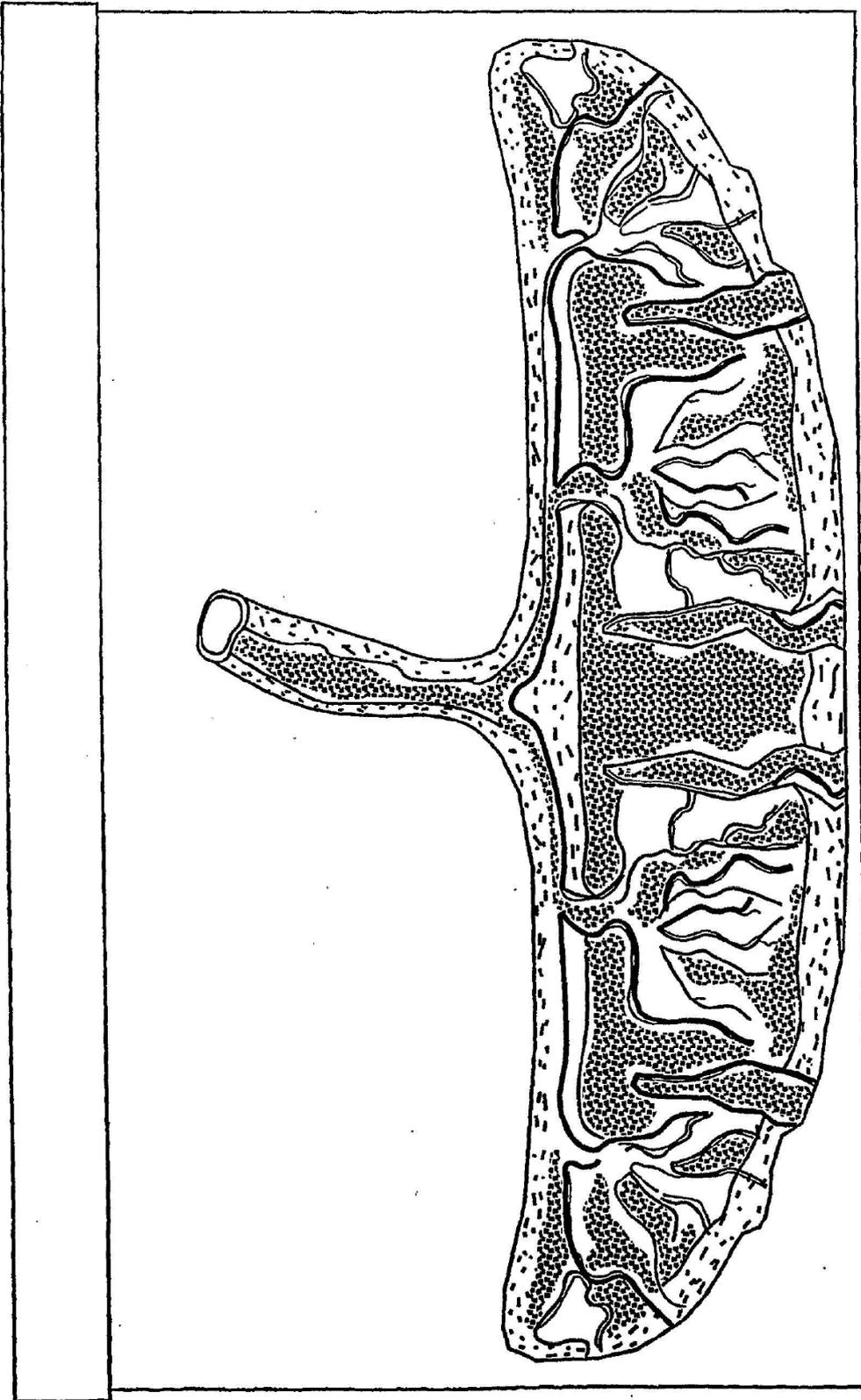


FIG. 2d



Placenta drenada y perfusionada conservada  
en un recipiente hermético al aire

**FIG. 2e**

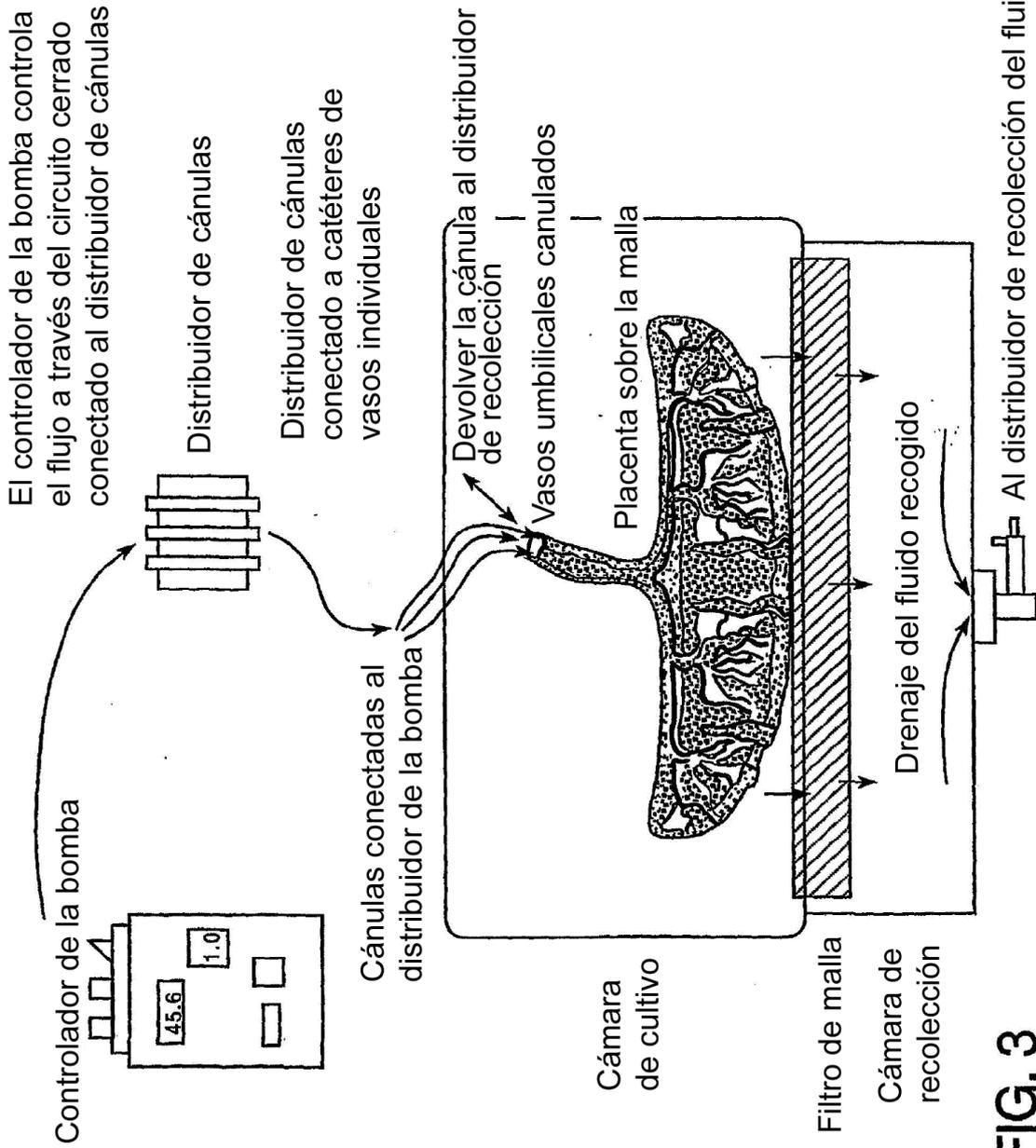


FIG. 3

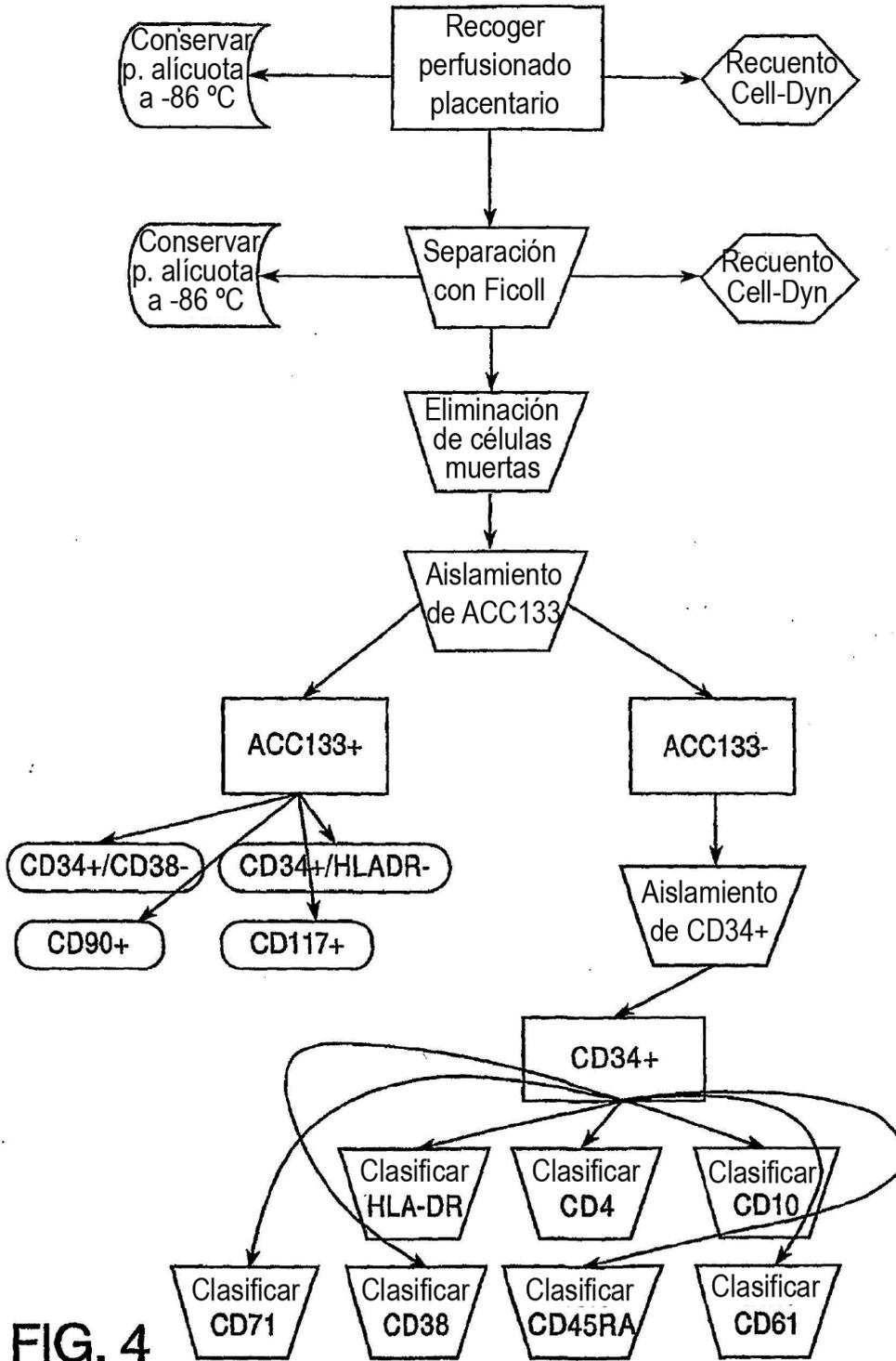


FIG. 4