(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 548 591**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)
A61K 35/50 (2015.01)
A61M 1/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2002** **E 10182433 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015** **EP 2316918**

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

(30) Prioridad:

14.02.2001 US 268560 P
05.12.2001 US 4942

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2015

(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 2 548 591 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

1. Introducción

Se describen en esta memoria métodos de exanguinación y perfusión de la placenta después de la expulsión desde el útero, p. ej., después del nacimiento. Se describen en esta memoria métodos de tratamiento y cultivo de una placenta aislada para la propagación de células madre de tipo embrionario que se originan a partir de la placenta y de fuentes exógenas. Se describe en esta memoria el uso de una placenta cultivada como un biorreactor para producir materiales biológicos o células de cultivo, tejidos y organoides. Se describe en esta memoria la recogida y propagación de células madre y, en particular, la recogida de células madre de tipo embrionario y otras células madre multipotentes a partir de placentas. La presente invención se refiere a células madre de tipo embrionario que se originan a partir de una placenta post-parto para uso en un método de tratamiento de la invención.

2. Antecedentes de la invención

Existe un interés considerable en la identificación, aislamiento y generación de células madre humanas. Las células madre humanas son células precursoras totipotentes o pluripotentes capaces de generar una variedad de linajes de células humanas maduras. Esta capacidad sirve como base para la diferenciación y especialización celulares necesarias para el desarrollo de órganos y tejidos.

El reciente éxito en el transplante de tales células madre ha proporcionado nuevas herramientas clínicas para reconstituir y/o complementar la médula ósea después de la mieloablación debida a enfermedad, exposición a agentes químicos tóxicos y/o radiación. Existe una evidencia adicional que demuestra que las células madre pueden ser empleadas para repoblar muchos, sino todos, los tejidos y restaurar la funcionalidad fisiológica y anatómica. La aplicación de células madre en la manipulación genética de tejidos, la liberación de terapia génica y la terapéutica celular también está avanzando rápidamente.

Se han caracterizado muchos tipos diferentes de células madre de mamífero. Por ejemplo, se conocen células madre embrionarias, células germinales embrionarias, células madre adultas u otras células madre comprometidas o células madre progenitoras. Ciertas células madre no solo han sido aisladas y caracterizadas sino que también han sido cultivadas en condiciones que permiten la diferenciación en un grado limitado. No obstante, sigue habiendo un problema básico, ya que obtener cantidades suficientes y poblaciones de células madre humanas que sean capaces de diferenciarse en todos los tipos de células es casi imposible. La producción de células madre es críticamente escasa. Éstas son importantes para el tratamiento de una amplia gama de trastornos, incluyendo tumores malignos, errores innatos del metabolismo, hemoglobinopatías, e inmunodeficiencias. Resultaría muy ventajoso tener una fuente de más células madre embrionarias.

La obtención de un número suficiente de células madre humanas ha sido problemática por varias razones. En primer lugar, el aislamiento de poblaciones normales de células madre en tejidos adultos ha sido técnicamente difícil y costosa debido, en parte, a la cantidad muy limitada encontrada en la sangre o los tejidos. En segundo lugar, la obtención de estas células a partir de embriones o de tejido fetal, incluyendo abortos, ha planteado problemas religiosos y éticos. La creencia ampliamente sostenida de que el embrión humano y el feto constituyen vida independiente ha dado lugar a restricciones gubernamentales en el uso de tales fuentes para todos los fines, incluyendo la investigación médica. Por lo tanto las fuentes alternativas que no requieren el uso de células obtenidas de tejido embrionario o fetal son esenciales para un progreso adicional en la utilización de células madre clínicamente. Existen, por consiguiente, pocas fuentes alternativas viables de células madre, concretamente células madre humanas, y por lo tanto el suministro es limitado. Además, la recogida de las células madre a partir de fuentes alternativas en cantidades adecuadas para fines terapéuticos y de investigación es generalmente laboriosa, implicando, p. ej., la recogida de células o tejidos de un sujeto donante o un paciente, el cultivo y/o la propagación de las células *in vitro,* la disección, etc.

Por ejemplo, Caplan et al. (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.486.359 titulada "Human mesenchymal stem cells," presentada el 23 de Enero, 1996), describe composiciones de células madre mesenquimales humanas (hMSC) derivadas de médula ósea que sirven como progenitoras de linajes de células mesenquimales. *Caplan et al,* describen que las hMSC se identifican por medio de marcadores específicos de la superficie celular que se identifican con anticuerpos monoclonales. Las composiciones de hMSC homogéneas se obtienen mediante selección positiva de células de médula o periosteales adherentes que están libres de marcadores asociados con células hematopoyéticas o células mesenquimales diferenciadas. Estas poblaciones de células mesenquimales aisladas presentan características epitópicas asociadas con las células madre mesenquimales, tienen la capacidad de regenerarse en cultivo sin diferenciarse, y tienen la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales específicos cuando son inducidas *in vitro* o colocadas *in vivo* en el sitio de un tejido dañado. La desventaja de tales métodos, no obstante, es que requieren la recogida de células de médula o periosteales de un donante, a partir de las cuales se pueden aislar con posterioridad las MSC.

Hu et al. (documento WO 00/73421 titulado "Methods of isolation, cryopreservation, and therapeutic use of human amniotic epithelial cells", publicado el 7 de Diciembre, 2000) describen células epiteliales amnióticas humanas

derivadas de placenta en el parto, que se aíslan, se cultivan, se crioconservan para su futuro uso, o se induce su diferenciación. De acuerdo con Hu *et al.,* se recoge una placenta inmediatamente después del parto y se separa la membrana amniótica del corion, p. ej., mediante disección. Las células epiteliales amnióticas se aíslan de la membrana amniótica de acuerdo con las técnicas de aislamiento de células convencionales. Las células descritas se pueden cultivar en diferentes medios, expandir en cultivo, crioconservar, o inducir su diferenciación. Hu *et al.* describen que las células epiteliales amnióticas son multipotenciales (y posiblemente pluripotenciales), y se pueden diferenciar en tejidos epiteliales tales como epitelio de la superficie de la córnea o epitelio vaginal. La desventaja de tales métodos, sin embargo, es que son trabajosos y el rendimiento de células madre es muy bajo. Por ejemplo, para obtener un número suficiente de células madre para fines terapéuticos o de investigación típicos, las células epiteliales amnióticas se deben aislar primero del amnion mediante técnicas de disección y separación de células, a continuación se deben cultivar y expandir *in vitro.*

La sangre de cordón umbilical (sangre de cordón) es una fuente alternativa conocida de células madre progenitoras hematopoyéticas. Las células madre de sangre de cordón se crioconservan de manera rutinaria para su uso en la reconstitución hematopoyética, un procedimiento terapéutico ampliamente utilizado en los transplantes de médula ósea y otros transplantes relacionados *(*véanse p. ej., Boyse et al., Documento U.S. 5.004.681, "Preservation of Fetal and Neonatal Hematopoietin Stem and Progenitor Cells of the Blood", Boyse et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.192.553, titulada "Isolation and preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood and methods of therapeutic use", presentada el 9 de Marzo, 1993). Las técnicas convencionales para la recogida de sangre del cordón se basan en el uso de una aguja o una cánula, que se utilizan con la ayuda de la gravedad para drenar la sangre del cordón (esto es, exanguinación) desde la placenta (Boyse et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.192.553, presentada el 9 de Marzo, 1993; Boyse et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.004.681, presentada el 2 de Abril, 1991; Anderson, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.372.581, titulada Method and apparatus for placental blood collection, presentada el 13 de Diciembre, 1994; Hessel et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.415.665, titulada Umbilical cord clamping, cutting, and blood collecting device and method, presentada el 16 de Mayo, 1995). La aguja o la cánula se colocan normalmente en la vena umbilical y la placenta se masajea suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón desde la placenta. Después de eso, sin embargo, se ha considerado que la placenta drenada no tiene un uso adicional y típicamente se ha descartado. Una limitación importante de la obtención de células madre a partir de sangre de cordón, por otra parte, ha sido el volumen frecuentemente inadecuado de sangre de cordón obtenida, que da como resultado un número insuficiente de células para reconstituir eficazmente la médula ósea después del transplante.

Naughton et al. (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.962.325 titulada "Three-dimensional stromal tissue cultures" presentada el 5 de Octubre, 1999) describen que las células fetales, incluyendo las células fetales de tipo fibroblasto y los progenitores de condrocitos, se pueden obtener a partir de cordón umbilical o tejido de placenta o sangre de cordón umbilical. Naughton et al. (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.962.325) describen que tales células estromales fetales se pueden utilizar para preparar un tejido estromal "genérico" o cartilaginoso. Naughton *et al.* también describen que se puede preparar un tejido estromal "específico" inoculando una matriz tridimensional con fibroblastos derivados de un individuo concreto que más tarde va a recibir las células y/o tejidos desarrollados en cultivo de acuerdo con los métodos descritos. La desventaja de semejante enfoque no obstante, es que es un trabajo intenso. De acuerdo con los métodos descritos por Naughton *et al.,* para recuperar células estromales fetales del cordón umbilical o la placenta se requiere la disección de estos tejidos, el desmenuzamiento del tejido en porciones y la disgregación. Además, para obtener cantidades adecuadas de las células estromales fetales de la sangre del cordón umbilical, así como del cordón umbilical y la placenta, se requiere una expansión adicional *ex vivo.*

Los métodos disponibles en la actualidad para la expansión *ex vivo* de poblaciones de células también representan un trabajo intenso. Por ejemplo, Emerson *et al.* (Emerson et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.326.198 titulada "Methods and compositions for the ex vivo replication of stem cells, for the optimization of hematopoietic progenitor cell cultures, and for increasing the metabolism, GM-CSF secretion and/or IL-6 secretion of human stromal cells", presentada el 4 de Diciembre, 2001) describe métodos, y condiciones de medios de cultivo para el cultivo *ex vivo* de células madre humanas en división y/o la optimización de células madre progenitoras hematopoyéticas humanas. De acuerdo con los métodos descritos, las células madre humanas o las células progenitoras derivadas de médula ósea se cultivan en un medio de cultivo líquido que es remplazado, preferiblemente perfundido, o bien de manera continua o bien periódicamente, a una tasa de 1 ml de medio por ml de cultivo durante un período de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas. Los productos metabólicos se retiran y se agotan los nutrientes reaprovisionados a la vez que se mantiene el cultivo en condiciones fisiológicamente aceptables.

Kraus *et al.* (Kraus et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.338.942, titulada "Selective expansion of target cell populations", presentada el 15 de Enero, 2002) describen que una población diana predeterminada de células se puede expandir selectivamente introduciendo una muestra de partida de células de sangre de cordón o sangre periférica en un medio de crecimiento, haciendo que las células de la población de células diana se dividan, y poniendo en contacto las células del medio de crecimiento con un elemento de selección que comprende moléculas de unión con afinidad específica (tales como anticuerpos monoclonales para CD34) para una población de células predeterminada (tales como células CD34), con el fin de seleccionar las células de una población diana predeterminada de otras células en el medio de crecimiento.

Rodgers et al. (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.335.195 titulada "Method for promoting hematopoietic and mesenchymal cell proliferation and differentiation", presentada el 1 de Enero, 2002) describen métodos para el cultivo *ex vivo* de células madre hematopoyéticas y mesenquimales y la inducción de la proliferación y diferenciación de células específicas del linaje mediante el crecimiento en presencia de angiotensinógeno, angiotensina I (AI), análogos de AI, fragmentos de AI y análogos de los mismos, angiotensina II (AII), análogos de AII, fragmentos de AII o análogos de los mismos o agonistas del receptor de tipo 2 de AII AT_2, ya sean solos o combinados con otros factores de crecimiento y citoquinas. Las células madre derivan de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. La desventaja de tales métodos, no obstante, es que tales métodos *ex vivo* para inducir la proliferación y diferenciación de células madre llevan tiempo, como se ha comentado anteriormente, y también producen bajos rendimientos de células madre.

Naughton et al., (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.022.743 titulada "Three-dimensional culture of pancreatic parenchymal cells cultured living stromal tissue prepared in vitro", presentada el 8 de Febrero, 2000) describen un sistema de cultivo de tejidos en el que las células madre o las células progenitoras (*p. ej.,* células estromales tales como aquellas derivadas de células de cordón umbilical, células placentarias, células madre mesenquinales o células fetales) se propagan sobre un soporte tridimensional en lugar de en forma de monocapa bidimensional, p. ej., un recipiente de cultivo tal como un matraz o una fuente.

Debido a las restricciones sobre la recogida y el uso de células madre, y al número inadecuado de células recogidas típicamente de sangre del cordón, la producción de células madre es críticamente escasa. Las células madre tienen el potencial de ser utilizadas en el tratamiento de una amplia gama de trastornos, incluyendo tumores malignos, errores de metabolismo innatos, hemoglobinopatías, e inmunodeficiencias. Existe una necesidad crítica de una fuente fácilmente accesible de un gran número de células madre para una variedad de fines terapéuticos y otros fines médicamente relacionados. La presente invención aborda esa y otras necesidades.

3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere a células madre placentarias aisladas en una cantidad terapéuticamente eficaz para uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, en donde dichas células madre placentarias son fibroblastoides y se adhieren al plástico en cultivo de tejidos, en donde dichas células madres placentarias se pueden obtener por perfusión de una placenta de mamífero con una solución de perfusión, en donde dicha placenta ha sido exanguinada y perfusionada para eliminar la sangre residual; y en donde dichas células madres placentarias: (a) no expresan antígenos del MHC Clase 2; (b) son CD34- y CD38-; (c) son OCT-4+ y ABC-p+; (d) son SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+; o (e) son CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, y ABC-p+ y en donde dicha enfermedad o trastorno es un trastorno convulsivo, isquemia, inflamación, parálisis cerebral, una enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia por SIDA, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad renal isquémica, glaucoma, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick , la enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hunter, el síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, la fibrosis quística, una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, el hipotiroidismo, anemia de células falciformes, el síndrome de Pearson, la enfermedad de Pompe, la fenilcetonuria (PKU), una porfiria, enfermedad del jarabe de arce, homocistinuria , enfermedad granulomatosa crónica, o tirosinemia.

Se describe en la presente memoria una placenta de mamífero, preferiblemente humana, que después de la expulsión desde el útero ha sido tratada y cultivada para producir células madre multipotentes (*p. ej.,* células progenitoras comprometidas), células madre de tipo embrionario y otros materiales biológicos. En particular, se describen en esta memoria métodos de perfusión y exanguinación de una placenta después del nacimiento. Se describen en esta memoria métodos de exanguinación y perfusión de una placenta en condiciones estériles durante un período de al menos dos a más de cuarenta y ocho horas después de la expulsión de la placenta desde el útero. En una realización, la placenta es perfundida con una solución que contiene factores para potenciar la exanguinación, tales como factores anticoagulantes. En otra realización, la placenta es perfundida con una solución que contiene factores para potenciar las condiciones estériles, tales como agentes antimicrobianos y antivirales. En una realización preferida, la placenta es perfundida con una solución que contiene factores de crecimiento. Tales soluciones que contienen factores de crecimiento y otros componentes de cultivo, pero sin anticoagulantes, son referidas como soluciones de cultivo.

En otra realización, la placenta es perfundida para eliminar la sangre, las células residuales, las proteínas y cualquier otro material residual. La placenta se puede procesar adicionalmente para eliminar desechos de material. La perfusión se continúa normalmente con un perfusato apropiado durante al menos dos o más de veinticuatro horas. En varias realizaciones adicionales, la placenta es perfundida durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 22 horas antes de la recogida de las células madre. El perfusato recogido de cualquiera de estos momentos puntuales también puede proporcionar una fuente de células madre de tipo embrionario. Se debe entender que la primera recogida de sangre de la placenta es referida como sangre de cordón que contiene predominantemente células progenitoras hematopoyéticas CD34+ y CD38+. En las primeras veinticuatro horas de perfusión post-parto, se pueden aislar células progenitoras hematopoyéticas CD34+ y CD38- de la placenta junto con células CD34+ y CD38-. Después de aproximadamente veinticuatro horas de perfusión, se pueden aislar células CD34- y CD38- de la placenta junto con las células anteriormente mencionadas.

Se describe en esta memoria una placenta aislada que ha sido exanguinada y perfundida en condiciones estériles. En un aspecto preferido, se describe en esta memoria una placenta aislada que ha sido exanguinada y perfundida para eliminar todas las células residuales y que ha sido cultivada durante un período de tiempo de dos a veinticuatro horas después de la expulsión desde el útero. Se describe en esta memoria una placenta aislada que ha sido tratada y cultivada para dar como resultado un órgano viable capaz de producir células madre de tipo embrionario, células progenitoras y otros materiales biológicos.

Se describe en esta memoria un aparato de producción de células madre que comprende una placenta de mamífero post-parto que ha sido exanguinada y perfundida, un medio para la incubación o cultivo de la placenta; y un medio para la detección de células madre. En otro aspecto, el aparato comprende además un dispositivo de recogida y / o un medio para separar las células recogidas. En otro aspecto, el aparato comprende además un medio para el seguimiento y el ajuste de las condiciones de cultivo y la recolección de células.

En esta memoria también se describen métodos de incubación y cultivo de una placenta exanguinada aislada bajo condiciones apropiadas para permitir la producción de células madre de tipo embrionario que se originan a partir de la placenta para uso de acuerdo con la invención. De acuerdo con la presente invención, las células madre de tipo embrionario se obtienen de una placenta después de la expulsión desde el útero. La placenta es exanguinada y perfundida durante un período de al menos dos a veinticuatro horas para eliminar todas las células residuales. La placenta exanguinada se cultiva a continuación en las condiciones apropiadas para permitir la producción de células madre endógenas que se originan a partir de la placenta, incluyendo, pero no limitadas a células madre de tipo embrionario, y células madre pluripotentes o multipotentes. En una realización, la placenta exanguinada se cultiva en presencia de factores de crecimiento, tales como PDGF y EGF.

Se describen en esta memoria métodos de tratamiento y cultivo de una placenta aislada para su uso como biorreactor para la propagación de células madre endógenas que se originan a partir de la placenta. Se describen en esta memoria métodos de tratamiento y cultivo de una placenta aislada para su uso como biorreactor para la propagación de células exógenas y materiales biológicos, p. ej., anticuerpos, proteínas, oligonucleótidos, hormonas, virus, citoquinas y enzimas. Se describen en esta memoria la propagación y recogida de células madre de tipo embrionario y otras células madre pluripotentes y multipotentes de placentas para su uso de acuerdo con la invención. La placenta cultivada se puede utilizar repetidamente como biorreactor y se puede cultivar a lo largo de un período de días, meses e incluso años. La placenta cultivada se puede mantener eliminando periódicamente o continuamente una porción del medio de cultivo o fluido de perfusión que es introducido en el sistema y a partir del cual se pueden recuperar las células propagadas o los materiales biológicos producidos, y sustituido por medio de nueva aportación o líquido de perfusión.

En otro aspecto, se describe en esta memoria un método de utilización de la placenta aislada y perfundida como biorreactor en el cual propagar las células endógenas, incluyendo, pero no limitadas a, células madre de tipo embrionario, células progenitoras, células pluripotentes y células multipotentes. Las células endógenas propagadas en el biorreactor placentario se pueden recoger, y/o las moléculas bioactivas se pueden recuperar del perfusato, del medio de cultivo o de las propias células de la placenta.

En otro aspecto, se describe en esta memoria un método de utilización de placenta aislada y perfundida como biorreactor en el cual propagar células exógenas. De acuerdo con este aspecto, se describe en esta memoria una placenta aislada que contiene una célula no derivada de la placenta, en donde el injerto de dicha célula en la placenta puede estimular la placenta para producir células madre de tipo embrionario o en donde la célula injertada produce señales, tales como citoquinas y factores de crecimiento, que pueden estimular la producción de células madre en la placenta. De acuerdo con este aspecto, la placenta puede ser injertada con células de origen no placentario obtenidas del neonato asociado con la placenta. En otro aspecto, la placenta se puede injertar con células de origen no placentario obtenidas de los padres o hermanos del neonato asociado con la placenta. Las células exógenas propagadas en el biorreactor placentario se pueden recoger, y/o las moléculas bioactivas se pueden recuperar del medio de perfusión, del medio de cultivo o de las propias células de la placenta.

Se describen en esta memoria células madre de tipo embrionario que se originan a partir de una placenta para uso de acuerdo con la invención. Las células madre de tipo embrionario descritas en esta memoria se pueden caracterizar midiendo los cambios morfológicos y los marcadores de la superficie celular utilizando técnicas tales como la citometría de flujo y la inmunocitoquímica, y midiendo los cambios en la expresión génica utilizando técnicas tales como la PCR. En una realización, tales células madre de tipo embrionario se pueden caracterizar por la presencia de los siguientes marcadores de la superficie celular: CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, y ABC-p+. En una realización, tales células madre de tipo embrionario se pueden caracterizar por la presencia de marcadores de la superficie celular OCT-4+ y APC-p+. Las células madre de tipo embrionario que se originan a partir de la placenta tienen las características de las células madre embrionarias pero no derivan del embrión. En otras palabras, la invención incluye células OCT-4+ y ABC-p+ que son células madre indiferenciadas que son aisladas de placenta perfundida post-parto. Tales células son tan versátiles (p. ej., pluripotentes) como las células madre embrionarias humanas. Como se ha mencionado anteriormente, se pueden aislar numerosas células madre pluripotentes o multipotentes diferentes de la placenta perfundida en diferentes momentos puntuales *p. ej.,* células hematopoyéticas CD34+/CD38+, CD34+/CD38-, y CD34-/CD38-. De acuerdo con la invención, se utiliza la placenta humana post-nacimiento como fuente de células

madre de tipo embrionario.

En otra realización, se describe en esta memoria un método para aislar otras células madre de tipo embrionario y/o multipotentes o pluripotentes de un extractante o un perfusato de una placenta exanguinada.

Se describen en esta memoria composiciones farmacéuticas que comprenden las células madre de tipo embrionario descritas en esta memoria. En esta memoria se describe una población homogénea aislada de células madre placentarias humanas que tiene el potencial de diferenciarse en todos los tipos de célula para uso de acuerdo con la invención. Se describen en esta memoria composiciones farmacéuticas que tienen elevadas concentraciones (o poblaciones más grandes) de células madre hematopoyéticas homogéneas incluyendo pero no limitadas a células CD34+/CD38-; y células CD34-/CD38-, una o más de estas poblaciones de células se pueden utilizar con o en forma de una mezcla con células hematopoyéticas de sangre de cordón esto es, células hematopoyéticas CD34+/CD38+ para transplantes y otros usos.

Las células madre obtenidas mediante los métodos descritos en esta memoria tienen una multitud de usos en los transplantes para tratar o prevenir enfermedades. En una realización, se usan para renovar y repoblar tejidos y órganos, sustituyendo o remplazando de ese modo tejidos enfermos, órganos o porciones de los mismos.

3.1. Definiciones

Según se utiliza en esta memoria, el término "biorreactor" hace referencia a un sistema *ex vivo* para propagar células, producir o expresar materiales biológicos y desarrollar o cultivar células, tejidos, organoides, virus, proteínas, polinucleótidos y microorganismos.

Según se utiliza en esta memoria, el término "célula madre embrionaria" hace referencia a una célula que deriva de la masa interna de células de un blastocisto (*p. ej.,* un embrión humano de 4 a 5 días de edad) y que es pluripotente.

Según se utiliza en esta memoria, el término "célula madre de tipo embrionario" hace referencia a una célula que *no* deriva de la masa interna de células de un blastocisto. Según se utiliza en la presente invención, una "célula madre de tipo embrionario" también puede ser referida como una "célula madre placentaria". Una célula madre de tipo embrionario es preferiblemente pluripotente. No obstante, las células madre que se pueden obtener de la placenta incluyen células madre de tipo embrionario, células multipotentes, y células progenitoras comprometidas. De acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, las células madre de tipo embrionario derivadas de la placenta se pueden recoger de la placenta aislada una vez que ésta ha sido exanguinada y perfundida durante un período de tiempo suficiente para eliminar las células residuales.

Según se utiliza en esta memoria, el término "exanguinada" o "exanguinación", cuando se utiliza con respecto a la placenta, hace referencia a la eliminación y/o drenaje de sustancialmente toda la sangre de cordón de la placenta. De acuerdo con la presente invención, la exanguinación de la placenta se puede lograr, por ejemplo, pero no a modo de limitación, mediante drenaje, eflujo inducido por gravedad, masaje, compresión, bombeo, etc. En una realización, la exanguinación de la placenta se puede lograr adicionalmente mediante perfusión, enjuagado o lavado de la placenta con un fluido que puede contener o no agentes, tales como anticoagulantes, para ayudar a la exanguinación de la placenta.

Según se utiliza en esta memoria, el término "perfundir" o "perfusión" hace referencia al acto de verter o hacer pasar un fluido sobre o a través de un órgano o tejido, preferiblemente el paso de fluido a través de un órgano o tejido con suficiente fuerza o presión para eliminar cualquier célula residual, p. ej., células no ancladas del órgano o tejido. Según se utiliza en la presente invención, el término "perfusato", o "medio de perfusión", hace referencia al fluido recogido después de su paso a través de un órgano o tejido. En una realización, el perfusato contiene uno o más anticoagulantes.

Según se utiliza en esta memoria, el término "célula exógena" hace referencia a una célula "foránea", esto es, una célula heteróloga (esto es*,* una célula "no propia" derivada de una fuente distinta del donante de la placenta) o autóloga (esto es*,* una célula "propia" derivada del donante de la placenta) que deriva de un órgano o tejido distinto de la placenta.

Según se utiliza en esta memoria, el término "organoide" hace referencia a una agregación de uno o más tipos de células ensamblados en una apariencia superficial o en una estructura real como cualquier órgano o glándula de un organismo de mamífero, preferiblemente el organismo humano.

Según se utiliza en esta memoria, el término "célula multipotente" hace referencia a una célula que tiene la capacidad de crecer en cualquiera de los subgrupos de los aproximadamente 260 tipos de células del organismo de un mamífero. A diferencia de una célula pluripotente, una célula multipotente no tiene la capacidad de formar todos los tipos de células.

Según se utiliza en esta memoria, el término "célula pluripotente" hace referencia a una célula que tiene una versatilidad de diferenciación completa, *esto es,* la capacidad de desarrollarse a cualquiera de los aproximadamente 260 tipos de células del organismo de un mamífero. Una célula pluripotente puede ser auto-renovable, y puede

permanecer latente o quiescente en un tejido. A diferencia de una célula totipotente (p. ej., una célula huevo diploide, fertilizada), una célula madre embrionaria normalmente no puede formar un nuevo blastocisto.

Según se utiliza en esta memoria, el término "célula progenitora" hace referencia a una célula que está comprometida para diferenciarse en un tipo específico de célula o para formar un tipo específico de tejido.

Según se utiliza en esta memoria, el término "célula madre" hace referencia a una célula maestra que se puede reproducir indefinidamente para formar las células especializadas de tejidos y órganos. Una célula madre es una célula evolutivamente pluripotente o multipotente. Una célula madre se puede dividir para producir dos células madre hijas, o una célula madre hija y una célula progenitora ("transitoria"), que a continuación prolifera a células completamente formadas, maduras del tejido.

Según se utiliza en esta memoria, el término "célula totipotente" hace referencia a una célula que es capaz de formar un embrión completo (p. ej., un blastocisto).

4. Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una vista en corte transversal de la canulación de la vena y la arteria de una placenta para perfundir la placenta y a continuación recoger el perfusato.

Las Figuras 2a-e son esquemas que muestran la recogida, pinzamiento, perfusión, recogida y almacenamiento de una placenta exanguinada y perfundida.

La Figura 3 es un esquema transversal de una placenta perfundida en un dispositivo para su uso como biorreactor.

La Figura 4 es un esquema de selección para clasificar células, incluyendo células madre de tipo embrionario, recuperadas de una placenta perfundida.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a células madre placentarias aisladas en una cantidad terapéuticamente eficaz para uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, en donde dichas células madre placentarias son fibroblastoides y se adhieren al plástico de un cultivo de tejidos, en donde dichas células madre placentarias se pueden obtener por perfusión de una placenta de mamífero con una solución de perfusión, en donde dicha placenta ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual; en donde dichas células madre placentarias: (a) no expresan antígenos del MHC Clase 2; (b) son CD34- y CD38-; (c) son OCT-4+ y ABC-p+; (d) son SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+; o (e) son CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, y ABC-p+ y en donde dicha enfermedad o trastorno es un trastorno convulsivo, isquemia, inflamación, parálisis cerebral, una enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia por SIDA, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad renal isquémica, glaucoma, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick , la enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hunter, el síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, la fibrosis quística, una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, el hipotiroidismo, anemia de células falciformes, el síndrome de Pearson, la enfermedad de Pompe, la fenilcetonuria (PKU), una porfiria, enfermedad del jarabe de arce, homocistinuria , enfermedad granulomatosa crónica, o tirosinemia.

El solicitante ha descubierto inesperadamente que la placenta después del nacimiento contiene células quiescentes que pueden ser activadas si la placenta es procesada adecuadamente después del nacimiento. Por ejemplo, tras la expulsión desde el seno materno, la placenta es exanguinada tan rápidamente como sea posible para evitar o minimizar la apoptosis. Con posterioridad, tan pronto como sea posible después de la exanguinación la placenta es perfundida para eliminar la sangre, las células residuales, las proteínas, los factores y cualquier otro material presente en el órgano. Los desechos de materiales también se pueden eliminar de la placenta. La perfusión continúa normalmente con un perfusato apropiado durante al menos dos a más de veinticuatro horas. En varias realizaciones adicionales la placenta es perfundida durante al menos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, y 22 horas. En otras palabras, esta invención se basa al menos en parte en el descubrimiento de que las células de una placenta post-parto pueden ser activadas por exanguinación y perfusión durante una cantidad de tiempo suficiente. Por lo tanto, la placenta se puede utilizar fácilmente como una fuente rica y abundante de células madre de tipo embrionario, cuyas células se pueden utilizar para investigación, incluyendo el descubrimiento de fármacos, el tratamiento y la prevención de enfermedades, en particular cirugías o terapias de transplante, y la generación de células, tejidos y organoides comprometidos.

Adicionalmente, de manera sorprendente e inesperada, las células madre placentarias humanas producidas por la placenta exanguinada, perfundida y/o cultivada son células madre pluripotentes que pueden ser fácilmente diferenciadas a cualquier tipo de célula deseado.

Se describen en esta memoria métodos de tratamiento y cultivo de una placenta aislada para su uso como biorreactor para la producción y propagación de células madre de tipo embrionario que se originan a partir de la placenta o a partir de fuentes exógenas. También se describe en la presente invención el uso de una placenta

cultivada como un biorreactor para producir materiales biológicos, incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y virus. Se describen en la presente invención métodos de recogida y aislamiento de células madre y materiales biológicos a partir de la placenta cultivada.

Se describen en esta memoria métodos de perfusión y exanguinación de una placenta aislada una vez que ésta ha sido expulsada del útero, para eliminar todas las células residuales. Además se describe aquí el cultivo de la placenta aislada y exanguinada en las condiciones apropiadas para permitir la producción y propagación de células madre de tipo embrionario.

Se describe en esta memoria un método de extracción y recuperación de células madre de tipo embrionario, incluyendo, pero no limitadas a células madre pluripotentes o multipotentes, de una placenta humana exanguinada. Las células madre de tipo embrionario tienen características de células madre embrionarias pero no derivan del embrión. Tales células son tan versátiles (*p. ej.,* pluripotentes) como las células madre embrionarias humanas. De acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, la placenta humana se utiliza después del nacimiento como una fuente de células madre de tipo embrionario.

De acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, las células madre de tipo embrionario se extraen de una placenta drenada mediante una técnica de perfusión que utiliza cualquiera o ambas de la arteria umbilical y la vena umbilical. La placenta se drena preferiblemente por exanguinación y recogida de sangre residual (*p. ej.,* sangre de cordón umbilical residual). La placenta drenada se procesa a continuación de tal manera que se establece un entorno de biorreactor natural, ex vivo en el que se reclutan las células madre de tipo embrionario residentes del parénquima y el espacio extravascular. Las células madre de tipo embrionario migran a la microcirculación vacía, drenada en la que, de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, son recogidas, preferiblemente mediante lavado en un recipiente de recogida por perfusión.

5.1. Métodos de aislamiento y cultivo de la placenta

5.1.1. Pretratamiento de la placenta

De acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, se recupera una placenta humana poco después de su expulsión después del nacimiento y, en ciertos aspectos, también se recupera la sangre del cordón de la placenta. En ciertos aspectos, la placenta se somete a un proceso convencional de recuperación de sangre del cordón. Semejante recuperación de sangre del cordón se puede obtener comercialmente, *p. ej.,* LifeBank Inc., Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry and Cryocell. La sangre del cordón se puede drenar poco después de la expulsión de la placenta.

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

Típicamente, la placenta se transporta desde la sala de partos o nacimientos a otra localización, p. ej., un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y/o el drenaje y la perfusión. La placenta se transporta preferiblemente en un dispositivo de transporte aislado térmicamente, estéril (que mantiene la temperatura de la placenta entre 20 a 28°C), por ejemplo, colocando la placenta, con el cordón umbilical proximal pinzado, en una bolsa de plástico con cierre de cremallera estéril, que a continuación se coloca en un contenedor aislado, como se muestra en las Figuras 2a-e. Preferiblemente, la placenta se lleva al laboratorio de veinticuatro a cuarenta y ocho horas después el parto.

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

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

Se pueden utilizar técnicas convencionales para la recogida de sangre del cordón. Típicamente se utiliza una aguja o una cánula, con la ayuda de la gravedad, para drenar la sangre del cordón (*esto es,* exanguinar) la placenta (Boyse et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.192.553, presentada el 9 de Marzo, 1993; Boyse et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.004.681, presentada el 2 de Abril, 1991; Anderson, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.372.581, titulada Method and apparatus for placental blood collection, presentada el 13 de Diciembre, 1994; Hessel

et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.415.665, titulada Umbilical cord clamping, cutting, and blood collecting device and method, presentada el 16 de Mayo, 1995). La aguja o la cánula se colocan normalmente en la vena umbilical y la placenta se masajea suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón desde la placenta.

En una realización preferida, la placenta se recupera de un paciente mediante consentimiento informado y también se realiza un historial médico completo del paciente antes, durante y después del embarazo y se asocia con la placenta. Estos registros médicos se pueden utilizar para coordinar el uso posterior de la placenta o las células madre recogidas de la misma. Por ejemplo, las células madre placentarias humanas se pueden utilizar con posterioridad fácilmente para una medicina personalizada para el bebé en cuestión, los padres, los hermanos u otros parientes. En efecto, las células madre placentarias humanas son más versátiles que la sangre del cordón. No obstante, se debe observar que la descripción incluye la adición de células madre placentarias humanas producidas por la placenta exanguinada, perfundida y/o cultivada a la sangre del cordón de la misma o distinta placenta y cordón umbilical. La sangre de cordón resultante tendrá una mayor concentración/población de células madre humanas y de ese modo es más útil para el transplante p. ej., para transplantes de médula ósea.

5.1.2. Exanguinación de la placenta y eliminación de células residuales

Ene sta memoria se describe un método de recuperación de células madre o progenitoras, incluyendo, pero no limitadas a células madre de tipo embrionario, a partir de una placenta que está exanguinada, *esto es,* completamente drenada de la sangre del cordón restante después del nacimiento y/o un procedimiento de recuperación de sangre del cordón convencional. De acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, la placenta es exanguinada y perfundida con un fluido de perfusión acuoso adecuado, tal como un fluido isotónico acuoso en el cual está disuelto un anticoagulante (p. ej., heparina, warfarina sódica). Tales fluidos isotónicos acuosos para perfusión son bien conocidos en la técnica, e incluyen, *p. ej.,* una solución acuosa de cloruro de sodio 0,9 N. El fluido de perfusión comprende preferiblemente el anticoagulante, tal como heparina o warfarina sódica, a una concentración que es suficiente para prevenir la formación de coágulos de cualquier sangre residual del cordón. En una realización específica, se emplea una concentración de 1 a 100 unidades de heparina, preferiblemente una concentración de 1 a 10 unidades de heparina por ml. En una realización, se pueden utilizar inhibidores de la apoptosis, tales como captadores de radicales libres, en particular captadores de radicales libres de oxígeno, durante e inmediatamente después de la exanguinación y a continuación estos agentes se pueden lavar de la placenta. De acuerdo con esta realización, la placenta aislada se puede almacenar en condiciones hipodérmicas con el fin de prevenir o inhibir la apoptosis.

De acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, la placenta es exanguinada mediante el paso del fluido de perfusión a través de la arteria umbilical o de la vena umbilical o de ambas, utilizando el flujo por gravedad en la placenta. La placenta se orienta preferiblemente (p. ej., se suspende) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical estén localizadas en el ítem más alto de la placenta. En una realización preferida, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente, como se muestra en la Figura 1, a una pipeta que está conectada a través de un conector flexible a un reservorio del fluido de perfusión. El fluido de perfusión se hace pasar a la vena y la arteria umbilicales y se recoge en un recipiente abierto adecuado desde la superficie de la placenta que estaba anclada al útero de la madre durante la gestación. El fluido de perfusión también se puede introducir a través de la abertura del cordón umbilical y dejar fluir o filtrar fuera de las aberturas de la pared de la placenta que está conectada con la pared uterina materna.

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

En una realización, se utiliza una cantidad suficiente de fluido de perfusión que dará como resultado la eliminación de toda la sangre residual del cordón y la posterior recogida o recuperación de las células placentarias, incluyendo, pero no limitadas a, células madre de tipo embrionario y células progenitoras, que permanecen en la placenta después de la eliminación de la sangre del cordón.

Se ha observado que cuando el fluido de perfusión se recoge primero de la placenta durante el proceso de exanguinación, el fluido se colorea con los glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón. El fluido de perfusión tiende a volverse más claro a medida que la perfusión continúa y los glóbulos rojos residuales del cordón se lavan de la placenta. Generalmente son adecuados de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión para exanguinar la placenta y para recuperar una población inicial de células de tipo embrionario de la placenta, pero se puede utilizar más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

5.1.3. Cultivo de placenta

Tras la exanguinación y un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se observa que las células madre de tipo embrionario migran a la microcirculación exanguinada y perfundida de la placenta donde, de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, son recogidas, preferiblemente mediante lavado en un recipiente de recogida por perfusión. La perfusión de la placenta aislada no sirve solamente para eliminar sangre residual del cordón, sino que también proporciona a la placenta nutrientes apropiados, incluyendo oxígeno. La placenta se puede cultivar y perfundir con una solución similar que se utilizó para eliminar los glóbulos rojos residuales del cordón,

preferiblemente, sin la adición de agentes anticoagulantes.

En ciertos aspectos descritos en esta memoria, la placenta exanguinada, drenada se cultiva como un biorreactor, esto es, un sistema *ex vivo* para propagar células o producir materiales biológicos. El número de células propagadas o el nivel de material biológico producido en el biorreactor placentario se mantiene en un estado continuo de crecimiento equilibrado eliminando periódicamente o continuamente una porción de medio de cultivo o de fluido de perfusión que es introducido en el biorreactor placentario, y a partir del cual se pueden recuperar las células propagadas o los materiales biológicos producidos. Se introduce medio o fluido de perfusión de nueva aportación a la misma velocidad o en la misma cantidad.

Se pueden controlar fácilmente el número y el tipo de células propagadas midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular utilizando técnicas de detección de células convencionales tales como citometría de flujo, clasificación celular, inmunocitoquímica (p. ej., tinción con anticuerpos específicos de tejidos o específicos de marcadores celulares), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), clasificación celular activada magnéticamente (MACS), mediante examen de la morfología de las células utilizando microscopía óptica o confocal, o midiendo los cambios en la expresión génica utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, tales como PCR y perfilado de la expresión génica.

En una realización, las células se pueden clasificar utilizando un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluyendo células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165). La excitación con láser de los radicales fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de las partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos específicos de marcadores de la superficie celular o los ligandos se marcan con marcas fluorescentes distintas. Las células se procesan por medio del clasificador celular, que permite la separación de las células basada en su capacidad para unirse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas por FACS se pueden depositar directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En otra realización, se pueden utilizar cuentas magnéticas para separar células. Las células se pueden clasificar utilizando una técnica de clasificación celular activada magnéticamente (MACS), un método para separar partículas basada en su capacidad para unirse a cuentas magnéticas (diámetro 0,5 a 100 µm). Se puede realizar una variedad de modificaciones útiles sobre las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de anticuerpos que reconocen específicamente una molécula de la superficie celular en fase sólida o un hapteno. A continuación se aplica un campo magnético, para manipular físicamente las cuentas seleccionadas. Las cuentas se mezclan después con las células para permitir la unión. A continuación las células se hacen pasar a través de un campo magnético para separar las células que tienen marcadores de la superficie celular. Estas células se pueden aislar a continuación y volver a mezclar con cuentas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de la superficie celular adicionales. Las células se hacen pasar de nuevo a través de un campo magnético, aislando las células que se unían a ambos anticuerpos. Tales células se pueden diluir en placas separadas, tales como placas de microtitulación para aislamiento clonal.

En aspectos preferidos, la placenta que se va a utilizar como biorreactor se exanguina y se lava en condiciones estériles de manera que se elimina cualquier contaminante celular coagulado adherente y no adherente. La placenta se cultiva a continuación o se cultiva en condiciones asépticas en un contenedor u otro recipiente adecuado, y se perfunde con una solución de perfusato (*p. ej.,* una solución salina normal tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin anticoagulante (*p. ej.,* heparina, warfarina sódica, cumarina, bishidroxicumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (*p. ej.,* β-mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomicina (p. ej., a 40 a 100 µg/ml), penicilina (p. ej., a 40 U/ml), anfotericina B (p. ej., a 0,5 µg/ml).

El perfusato efluente comprende tanto el perfusato que ha circulado, que ha fluido a través de la circulación placentaria, como el perfusato extravasado, que exuda desde o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos a los tejidos circundantes de la placenta. El perfusato efluente se recoge, y preferiblemente se recogen los perfusatos tanto que han circulado como extravasados, preferiblemente en un receptáculo estéril. Se pueden realizar alteraciones de las condiciones en las que se mantiene la placenta y la naturaleza del perfusato para modular el volumen y la composición del perfusato efluente.

Los tipos de células se aíslan a continuación del perfusato recogido empleando mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, tales como por ejemplo, pero no limitados a, centrifugación en gradiente de densidad, separación magnética de células, citometría de flujo, separación de células por afinidad o mecanismos de adherencia diferencial.

En un aspecto, se coloca una placenta en un cuenco estéril y se lava con 500 ml de solución salina tamponada con fosfato normal. Después se descarta el fluido de lavado. A continuación se canula la vena umbilical con una cánula, *p. ej.,* una cánula de TEFLON® o plástico, que se conecta a un aparato de conexión estéril, tal como tubo estéril. El aparato de conexión estéril se conecta a un colector de perfusión, como se muestra en la Figura 3. El contenedor que contiene la placenta se recupera a continuación y la placenta se mantiene a la temperatura ambiente (20 a

25°C) durante un período de tiempo deseado, preferiblemente de 2 a 24 horas, y preferiblemente, no más de 48 horas. La placenta se puede perfundir continuamente, con volúmenes iguales de perfusato introducido y perfusato efluente eliminado o recogido. Alternativamente, la placenta se puede perfundir periódicamente, *p. ej.,* cada 2 horas o cada 4, 8, 12, y 24 horas, con un volumen de perfusato, p. ej., 100 ml de perfusato (solución salina normal estéril con o sin un suplemento de 1000 u/l de heparina y/o EDTA y/o CPDA (creatina fosfato dextrosa)). En el caso de la perfusión periódica, preferiblemente se introducen y se eliminan volúmenes iguales de perfusato del entorno de cultivo de la placenta, de manera que un volumen estable de perfusato baña la placenta en todo momento.

El perfusato efluente que escapa de la placenta, *p. ej.,* en la superficie opuesta de la placenta, se recoge y se procesa para aislar las células madre de tipo embrionario, las células progenitoras u otras células de interés.

Se pueden utilizar diferentes medios como fluido de perfusión para cultivar o fomentar la placenta, tales como DMEM, F-12, M199, RPMI, de Fisher, de Iscore, de McCoy y combinaciones de los mismos, con un suplemento de suero bovino fetal (FBS), suero humano completo (WHS), o suero de cordón umbilical humano recogido en el momento de la liberación de la placenta. El mismo fluido de perfusión utilizado para exanguinar la placenta de sangre residual del cordón se puede utilizar para cultivar o fomentar la placenta, sin la adición de agentes anticoagulantes.

En ciertos aspectos, as células madre de tipo embrionario son inducidas a propagarse en el biorreactor de placenta mediante la introducción de nutrientes, hormonas, vitaminas, factores de crecimiento, o cualquier combinación de los mismos, en la solución de perfusión. Se pueden añadir suero y otros factores de crecimiento a la solución o al medio de perfusión de propagación. Los factores de crecimiento son normalmente proteínas e incluyen, pero no se limitan a: citoquinas, linfoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias (CSF), interferones, quimioquinas, e interleuquinas. Otros factores de crecimiento que se pueden utilizar incluyen factores de crecimiento hematopoyéticos humanos recombinantes incluyendo ligandos, factores de células madre, trombopoyetina (Tpo), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento derivado de placenta y factor de crecimiento epidérmico.

Los factores de crecimiento introducidos en la solución de perfusión pueden estimular la propagación de células madre de tipo embrionario no diferenciadas, células progenitoras comprometidas, o células diferenciadas (*p. ej.,* células hematopoyéticas diferenciadas). Los factores de crecimiento pueden estimular la producción de materiales biológicos y moléculas bioactivas incluyendo, pero no limitadas a, inmunoglobulinas, hormonas, enzimas o factores de crecimiento como se ha descrito previamente.

En un aspecto descrito en esta memoria, la placenta es utilizada como un biorreactor para propagar células endógenas (*esto es,* células que se originan a partir de la placenta), incluyendo, pero no limitadas a, diversas clases de células madre de tipo embrionario pluripotentes y/o totipotentes y linfocitos. Para utilizar la placenta como un biorreactor, ésta se puede cultivar durante períodos de tiempo variables en condiciones estériles por perfusión con solución de perfusato como se describe en esta memoria. En aspectos específicos, la placenta es cultivada durante al menos 12, 24, 36, o 48 horas, o durante 3 a 5 días, 6 a 10 días, o durante una a dos semanas. En un aspecto preferido, la placenta se cultiva durante 48 horas. La placenta cultivada debe ser "alimentada" periódicamente para eliminar el medio gastado, despoblarla de células liberadas, y añadir medio de nueva aportación. La placenta cultivada se debe almacenar en condiciones estériles para reducir la posibilidad de contaminación, y se debe mantener a una presurización intermitente y periódica para crear condiciones que mantengan un suministro adecuado de nutrientes a las células de la placenta. Se debe reconocer que la perfusión y el cultivo de la placenta se pueden automatizar e informatizar para su eficacia y para el incremento de capacidad.

En otro aspecto, la placenta se procesa para eliminar todas las células en proliferación endógenas, tales como las células madre de tipo embrionario, y para permitir que las células foráneas (*esto es,* exógenas) sean introducidas y propagadas en el entorno de la placenta perfundida. La presente descripción contempla una gran variedad de células madre o progenitoras que pueden ser cultivadas en el biorreactor placentario, incluyendo, pero no limitadas a, células madre de tipo embrionario, células madre mesenquimales, células estromales, células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos, y células madre o progenitoras para un tipo concreto de célula, tejido u órgano, incluyendo, pero no limitadas a, neuronas, mielina, músculo, sangre, médula ósea, piel, corazón, tejido conectivo, pulmón, riñón, hígado, y páncreas (*p. ej.,* células de islotes pancreáticos).

Las fuentes de células madre mesenquimales incluyen médula ósea, saco vitelino embrionario, placenta, cordón umbilical, piel fetal y adolescente, y sangre. Las células de médula ósea se pueden obtener de cresta ilíaca, fémures, tibias, espina dorsal, costilla u otros espacios medulares.

Los métodos para la destrucción, ablación o eliminación selectiva de células en proliferación o que se están dividiendo rápidamente de un tejido u órgano son bien conocidos en la técnica, *p. ej.,* métodos de tratamiento de cánceres o tumores. Por ejemplo, la placenta perfundida puede ser irradiada con radiación electromagnética, UV, rayos X, gamma o beta para erradicar todas las células endógenas viables restantes. Las células foráneas se pueden propagar e introducir en el biorreactor placentario irradiado, por ejemplo, mediante perfusión.

5.2. Recogida de células de la placenta

Como se ha descrito anteriormente, después de la exanguinación y perfusión de la placenta, las células madre de tipo embrionario migran a la microcirculación vacía, drenada donde, de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, son recogidas, preferiblemente recogiendo el perfusato efluente en un recipiente de recolección para uso de acuerdo con la invención.

En algunas realizaciones, las células cultivadas en la placenta se aíslan del perfusato efluente utilizando mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad, separación de células magnéticamente, citometría de flujo, u otros métodos de separación o clasificación celular bien conocidos en la técnica, y se clasifican, por ejemplo, de acuerdo con el esquema mostrado en la Figura 4.

En una realización específica, las células recogidas de la placenta se recuperan del perfusato efluente mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a la temperatura ambiente, que separa las células de los desechos contaminantes y las plaquetas. Los sedimentos celulares se resuspenden en medio IMDM libre de suero que contiene 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (Gibco BRL, NY). La fracción de células mononucleares totales se aisló utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante y la fracción de células mononucleares se resuspendió. Las células se contaron utilizando un hemocitómetro. Se evaluó la viabilidad mediante exclusión con azul tripán. El aislamiento de las células se logra mediante "tripsinización diferencial", utilizando una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial fue posible porque las células fibroblastoides se separaron de las superficies de plástico en aproximadamente cinco minutos mientras las otras poblaciones adherentes requirieron más de 20 a 30 minutos de incubación. Las células fibroblastoides separadas se recogieron después de la tripsinización y la neutralización con tripsina, utilizando Trypsin Neutralizing Solution (TNS, BioWhittaker). Las células se lavaron en H.DMEM y se resuspendieron en MSCGM.

En otra realización, la placenta aislada se perfunde durante un período de tiempo sin recoger el perfusato, de manera que la placenta puede ser perfundida durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 y 24 horas o incluso días antes de recoger el perfusato.

En una realización, las células cultivadas en el biorreactor de placenta se aíslan de la placenta diseccionando físicamente las células de la placenta.

En otro aspecto, las células cultivadas en el biorreactor de placenta se aíslan de la placenta disociando los tejidos de la placenta o una porción de los mismos, y recuperando las células cultivadas mediante métodos de separación o clasificación celular conocidos en la técnica tales como centrifugación en gradiente de densidad, separación de células magnéticamente, citometría de flujo, etc.

En una realización, la perfusión de la placenta y la recogida del perfusato efluente se repiten una o dos veces durante el cultivo de la placenta, hasta que el número de células nucleadas recuperadas cae por debajo de 100 células/ml. Los perfusatos se reúnen y se someten a centrifugación ligera para eliminar las plaquetas, los desechos y las membranas de las células des-nucleadas. Las células nucleadas se aíslan a continuación mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque y después de lavar, se resuspenden en H.DMEM. Para el aislamiento de las células adherentes, se colocan alícuotas de 5-10 x 10^6 células en cada uno de los numerosos matraces T-75 y se cultivan con Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) disponible en el mercado obtenido de BioWhittaker, y se colocan en una incubadora para el cultivo de tejidos (37°C, 5% de CO_2). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces lavando con PBS. La PBS se sustituye a continuación por MSCGM. Los matraces se examinan preferiblemente diariamente para determinar la presencia de los diversos tipos de células adherentes y en particular, para la identificación y expansión de agrupaciones de células fibroblastoides.

En otras realizaciones, las células recogidas de la placenta se crioconservan para su uso en un momento posterior. Los métodos para la crioconservación de células, tales como las células madres, son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la crioconservación utilizando los métodos de Boyse et al. (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.192.553, presentada el 9 de Marzo, 1993) o Hu et al. (Documento WO 00/73421, publicado el 7 de Diciembre, 2000).

5.3. Poblaciones de células obtenidas de o cultivadas en placenta

Las células madre de tipo embrionario para uso de acuerdo con la invención y obtenidas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir células pluripotentes, *esto es,* células que tienen una versatilidad de diferenciación completa, que se están auto-renovando, y pueden permanecer latentes o quiescentes en el tejido. Las células madre que se pueden obtener de la placenta incluyen células madre de tipo embrionario, células multipotentes, células progenitoras comprometidas, y células fibroblastoides.

La primera recogida de sangre de la placenta es referida como sangre de cordón que contiene predominantemente células progenitoras hematopoyéticas CD34+ y CD38+. En las primeras veinticuatro horas de perfusión post-parto, se pueden aislar elevadas concentraciones de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ y CD38- de la placenta, junto con elevadas concentraciones de células progenitoras hematopoyéticas CD34- y CD38+. Después de

aproximadamente veinticuatro horas de perfusión, se pueden asilar elevadas concentraciones de células CD34- y CD38- de la placenta junto con las células anteriormente mencionadas. La placenta aislada perfundida descrita en la presente memoria es una fuente de grandes cantidades de células madre enriquecidas en células madre CD34+ y CD38- y células madre CD34- y CD38+. La placenta aislada que ha sido perfundida durante veinticuatro horas o más proporciona una fuente de grandes cantidades de células madre enriquecidas en células madre CD34- y CD38-.

En una realización, las células madre de tipo embrionario obtenidas mediante los métodos descritos en la presente memoria son células madre pluripotentes, quiescentes, viables que existen en una placenta humana a término y que pueden ser recuperadas después de un nacimiento y una expulsión de la placenta satisfactorios, dando como resultado la recuperación de tantas como un millardo de células nucleadas, que proporciona 50 a 100 millones de células madre multipotentes y pluripotentes.

Las células madre placentarias humanas proporcionadas por la placenta son sorprendentemente de tipo embrionario, por ejemplo, se ha identificado la presencia de los siguientes marcadores de la superficie celular para estas células: SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p^+. En una realización, las células madre de tipo embrionario se caracterizan por la presencia de marcadores de la superficie celular OCT-4+ y ABC-p+. De este modo, la invención incluye células madre que no han sido aisladas u obtenidas de otro modo a partir de una fuente embrionaria pero que pueden ser identificadas por los siguientes marcadores: SSAE3-, SSAE4-, OCT-4+ y ABC-p+. En una realización, las células madre placentarias humanas no expresan antígenos del MHC de Clase 2.

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

En una realización, las células madre de tipo embrionario obtenidas mediante los métodos descritos en esta memoria se pueden identificar por la presencia de los siguientes marcadores de la superficie celular: OCT-4+ y ABC-p+. Adicionalmente, la invención incluye células madre embrionarias que tienen los siguientes marcadores: CD10+, CD38-, CD29+, CD34-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, y ABC-p+. Tales marcadores de la superficie celular se determinan de manera rutinaria de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, p. ej. mediante citometría de flujo, seguido de lavado y tinción con un anticuerpo anti-marcador de la superficie celular. Por ejemplo, para determinar la presencia de CD-34 o CD-38, las células se puede lavar en PBS y a continuación someter a doble tinción con anti-CD34-ficoeritrina y anti-CD38- isotiocianato de fluoresceína (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

En un aspecto, las células cultivadas en el biorreactor de placenta se identifican y se caracterizan por medio de un análisis de unidades formadoras de colonias, que es comúnmente conocido en la técnica, tal como el medio Mesen Cult™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)

Se puede inducir la diferenciación de las células madre de tipo embrionario para su uso de acuerdo con la invención obtenidas por los métodos descritos en esta memoria, a linajes específicos, incluyendo adipogénico, condrogénico, osteogénico, hematopoyético, miogénico, vasogénico, neurogénico, y hepatogénico. En ciertas realizaciones, se induce la diferenciación de las células madre de tipo embrionario obtenidas de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria para su uso en protocolos de transplante y tratamiento *ex vivo*. En ciertas realizaciones, se induce la diferenciación de las células madre de tipo embrionario obtenidas mediante los métodos descritos en esta memoria, a un tipo de célula concreto y se diseñan genéticamente para proporcionar un producto génico terapéutico. En una realización específica, las células madre de tipo embrionario obtenidas mediante los métodos descritos en esta memoria tambien se incuban con un compuesto *in vitro* que induce su diferenciación, seguido del transplante directo de las células diferenciadas a un sujeto. De este modo, la invención abarca los métodos de diferenciación de las células madre placentarias humanas utilizando medios de cultivo convencionales. Adicionalmente, la invención abarca células hematopoyéticas, células neuronales, fibroblastos, células "strand", células mesenquimales y células hepáticas.

Las células madre de tipo embrionario también se pueden cultivar adicionalmente después de su recogida de la placenta utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, cultivando sobre células nodriza, tales como fibroblastos irradiados, obtenidos de la misma placenta que las células madre de tipo embrionario o de otras fuentes humanas o no humanas, o en medio acondicionado obtenido de cultivos de tales células nodriza, con el fin de obtener cultivos a largo plazo, continuados de células madre de tipo embrionario. Las células madre de tipo embrionario también se pueden expandir, o bien dentro de la placenta antes de la recogida desde el biorreactor placentario o bien *in vitro* después de la recuperación desde la placenta. En ciertas realizaciones, las células madre de tipo embrionario que se van a expandir se exponen a, o se cultivan en presencia de, un agente que suprime la diferenciación celular. Tales agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos Delta-1 humano y Serrate-1 humano *(véase,* Sakano et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.337.387 titulada "Differentiation-suppressive polypeptide", presentada el 8 de Enero, 2002), factor inhibidor de leucemia (LIF) y factor de células madre. Los métodos de expansión de las poblaciones de células también son conocidos en la técnica *(véanse, p. ej.,* Emerson et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.326.198 titulada "Methods and compositions for the ex vivo replication of stem cells, for the optimization of hematopoietic progenitor cell cultures, and for increasing the metabolism, GM-CSF secretion and/or IL-6 secretion of human stromal cells", presentada el 4 de

Diciembre, 2001; Kraus et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.338.942, titulada "Selective expansion of target cell populations", presentada el 5 de Enero, 2002).

Las células madre de tipo embrionario se pueden evaluar para determinar su viabilidad, potencial de proliferación, y longevidad utilizando mecanismos convencionales conocidos en la técnica, tales como el análisis de exclusión con azul Tripán, el análisis de absorción de diacetato de fluoresceína, el análisis de absorción de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y el análisis de absorción de timidina, el análisis de proliferación de células MTT (para evaluar la proliferación). La longevidad se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo determinando el número máximo de duplicaciones de la población en un cultivo extendido.

En ciertas realizaciones, la diferenciación de las células madre o las células progenitoras que se cultivan en la placenta exanguinada, perfundida y/o cultivada se modula utilizando un agente o composiciones farmacéuticas que comprende una dosis y/o dosis eficaces tras la administración única o múltiple, para ejercer un efecto suficiente para inhibir, modular y/o regular la diferenciación de una célula recogida de la placenta.

Los agentes que pueden inducir la diferenciación de células madre o progenitoras son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, Ca^{2+}, EGF, aFGF, bFGF, PDGF, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), TGF-β, citoquinas (p. ej., IL-1α, IL-1β, IFN-γ, TFN), ácido retinoico, transferrina, hormonas *(p. ej.,* andrógenos, estrógenos, insulina, prolactina, triyodotironina, hidrocortisona, dexametasona), butirato de sodio, TPA, DMSO, NMF, DMF, elementos de la matriz (p. ej., colágeno, laminina, sulfato de heparán, Matrigel™), o combinaciones de los mismos.

Los agentes que suprimen la diferenciación celular también son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos Delta-1 humano y Serrate-1 humano *(véase,* Sakano et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.337.387 titulada "Differentiation-suppressive polypeptide", presentada el 8 de Enero, 2002), factor inhibidor de leucemia (LIF), y factor de células madre.

El agente utilizado para modular la diferenciación se puede introducir en el biorreactor placentario para inducir la diferenciación de las células que se están cultivando en la placenta. Alternativamente, el agente se puede utilizar para modular la diferenciación *in vitro* después de que las células hayan sido recogidas o eliminadas de la placenta.

La determinación de que una célula madre se ha diferenciado en un tipo concreto de célula se puede completar mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular utilizando mecanismos tales como citometría de flujo o la inmunocitoquímica (p. ej., tiñendo las células con anticuerpos específicos de tejidos o específicos de marcadores celulares), examinando la morfología de las células utilizando microscopía óptica o confocal, o midiendo los cambios en la expresión génica utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, tales como PCR y perfilado de la expresión génica.

En otra realización, las células cultivadas en la placenta son estimuladas para producir moléculas bioactivas, tales como inmunoglobulinas, hormonas, enzimas.

En otra realización, as células cultivadas en la placenta son estimuladas para que proliferen, por ejemplo, mediante la administración de eritropoyetina, citoquinas, linfoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias (CSF), interferones, quimioquinas, interleuquinas, factores de crecimiento hematopoyéticos humanos recombinantes incluyendo ligandos, factor de células madres, trombopoyetina (Tpo), interleuquinas, y factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento.

En otra realización, las células cultivadas en la placenta se manipulan genéticamente antes o después de la recogida desde la placenta, utilizando por ejemplo, un vector viral tal como un vector adenoviral o retroviral, o utilizando métodos mecánicos tales como la absorción del ADN mediada por liposomas o agente químicos.

Se puede introducir un vector que contiene un transgén en una célula de interés mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., transfección, transformación, transducción, electroporación, infección, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, liposomas, LIPOFECTIN™, fusión de liposomas, lípidos catiónicos sintéticos, uso de una pistola génica o un transportador de vectores de ADN, de manera que el transgén sea transmitido a las células hijas, *p. ej.,* las células madre de tipo embrionario o las células progenitoras hijas producidas por la división de una célula madre de tipo embrionario. Para las diferentes técnicas de transformación o transfección de células de mamífero, véanse Keown et al., 1990, Methods Enzymol. 185: 527-37; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

Preferiblemente, el transgén es introducido utilizando cualquier mecanismo, con tal que no sea destructivo para la membrana nuclear de la célula u otras estructuras celulares o genéticas existentes. En ciertas realizaciones, el transgén se inserta en el material genético nucleico mediante microinyección. La microinyección de células y estructuras celulares es comúnmente conocida y practicada en la técnica.

Para la transfección estable de las células de mamífero cultivadas, tales como las células cultivadas en la placenta, solamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. La eficacia de la integración depende del vector y de la técnica de transfección utilizada. Con el fin de identificar y seleccionar los integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (p. ej., para la resistencia a

antibióticos) en la célula madre de tipo embrionario anfitriona junto con la secuencia génica de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido se pueden identificar mediante selección con fármacos (p. ej., las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras las otras morirán). Tales métodos son particularmente útiles en métodos que implican recombinación homóloga en células de mamífero *(p. ej.,* en células madre de tipo embrionario) antes de la introducción o el transplante de las células recombinantes en un sujeto o paciente.

Se pueden utilizar numerosos sistemas de selección para seleccionar células de tipo embrionario anfitrionas transformadas. En particular, el vector puede contener ciertos marcadores detectables o seleccionables. Otros métodos de selección incluyen, pero no se limitan a, la selección de otro marcador, por ejemplo: se pueden emplear el gen de la timidina quinasa (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223), de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026), y de la adenina fosforribosiltransferasa *(*Lowy et al., 1980, Cell 22: 817) del virus del herpes simplex en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Asimismo, se puede utilizar la resistencia antimetabolitos como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol, 150: 1); e higro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147).

El transgén se puede integrar en el genoma de la célula de interés, preferiblemente mediante integración al azar. En otras realizaciones el transgén se puede integrar mediante un método dirigido, *p. ej.,* mediante recombinación homóloga dirigida *(esto es,* introducción "knock-in" o inactivación "knock-out" de un gen de interés en el genoma de la célula de interés), Chappel, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.272.071; y Publicación PCT Núm. WO 91/06667, publicada el 16 de Mayo, 1991; Patente de los Estados Unidos 5.464.764; Capeechi et al., presentada el 7 de Noviembre, 1995; Patente de los Estados Unidos 5.627.059, Capecchi et al. presentada el 6 de Mayo, 1997; Patente de los Estados Unidos 5.487.992, Capecchi et al., presentada el 30 de Enero, 1996).

Los métodos para generar células que tienen modificaciones génicas dirigidas a través de la recombinación homóloga son conocidos en la técnica. El constructo comprenderá al menos una porción de un gen de interés con una modificación genética deseada, e incluirá regiones de homología con el locus diana, esto es, la copia endógena del gen elegido como diana en el genoma del anfitrión. Los constructos de ADN para la integración al azar, en contraste con los utilizados para la recombinación homóloga, no necesitan incluir regiones de homología para mediar la recombinación. Se pueden incluir marcadores en el constructo de redireccionamiento o el constructo al azar para realizar la selección positiva y negativa para la inserción del transgén.

Para crear una célula recombinante homóloga, p. ej., una célula madre de tipo embrionario, una célula placentaria endógena o una célula exógena cultivada en placenta recombinantes homólogas, se prepara un vector de recombinación homólogo en el que un gen de interés está flanqueado en sus extremos 5' y 3' por secuencias génicas que son endógenas con respecto al genoma de la célula elegida como diana, para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre el gen de interés portado por el vector y el gen endógeno en el genoma de la célula elegida como diana. Las secuencias de ácido nucleico limítrofes adicionales tienen una longitud suficiente para una recombinación homóloga satisfactoria con el gen endógeno en el genoma de la célula elegida como diana. Típicamente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN limítrofe (en los extremos tanto 5' como 3'). Los métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos a partir de células madre recombinantes son comúnmente conocidos en la técnica *(véanse, p. ej.,* Thomas y Capecchi, 1987, Cell 51: 503; Bradley, 1991, Curr. Opin. Bio/Technol. 2: 823-29; y Publicaciones PCT Núms. WO 90/11354, WO 91/01140, y WO 93/04169.

En una realización, el genoma de una célula exógena cultivada en la placenta de acuerdo con los métodos descritos en la presente invención es una diana de redireccionamiento génico a través de recombinación homóloga o a través de integración al azar.

En una realización específica, se utilizan los métodos de Bonadio et al. (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.942.496, titulada Methods and compositions for multiple gene transfer into bone cells, presentada el 24 de Agosto, 1999; y el documento PCT WO95/22611, titulado Methods and compositions for stimulating bone cells, publicado el 24 de Agosto, 1995) para introducir ácidos nucleicos en una célula de interés, tal como una célula madre, una célula progenitora o una célula exógena cultivada en la placenta, p. ej., células óseas progenitoras.

5.4 usos de la placenta cultivada como biorreactor

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

En un aspecto, se describe en la presente invención un método de utilización de placenta perfundida aislada como

un biorreactor para la propagación de células exógenas. De acuerdo con este aspecto, se describe en la presente invención una placenta aislada que contiene una célula no derivada de la placenta, en donde el injerto de dicha célula en la placenta puede estimular la placenta para que produzca células madre de tipo embrionario, o en donde la célula injertada produce señales, tales como citoquinas y factores de crecimiento, que pueden estimular la placenta para producir células madre. La placenta puede ser injertada con células de origen no placentario obtenidas de los padres, hermanos u otros parientes de sangre del bebé asociado con la placenta. En otro aspecto, la placenta aislada se puede injertar con células de origen no placentario obtenidas de un individuo que no es el bebé, ni está emparentado con el bebé. Del mismo modo, las células, tejidos, organoides y órganos, que se propagan y se cultivan en la placenta pueden ser transplantados al bebé asociado con la placenta, los padres, los hermanos u otros parientes de dicho bebé o a un individuo no emparentado con el bebé.

En un aspecto descrito aquí, la placenta puede estar poblada con cualquier tipo concreto de célula y utilizar como biorreactor para el cultivo *ex vivo* de las células, tejidos u órganos. Tales cultivos de células, tejidos u órganos se pueden cosechar y utilizar en protocolos de transplante y tratamiento ex vivo. En este aspecto, la placenta se procesa para eliminar todas las células endógenas y para permitir la introducción y propagación de células foráneas (esto es, exógenas) en el entorno de la placenta perfundida. Los métodos para la eliminación de las células endógenas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la placenta perfundida es irradiada con radiación electromagnética, UV, rayos X, gamma o beta para erradicar todas las células endógenas viables restantes. En un aspecto, se puede utilizar la exposición sub-letal a radiaciones, p. ej., 500 a 1500 CGγ para conservar la placenta pero erradicar las células no deseadas. En cuanto a la radiación ionizante letal vs. no letal internacional (véase el Capítulo 5 "Biophysical and Biological Effects of Ionizing Radiation" del Departamente de Defensa de los Estados Unidos). Las células foráneas de interés que se van a propagar en el biorreactor placentario irradiado se introducen a continuación, por ejemplo, mediante perfusión vascular o inyección intraparenquimal directa.

En otro aspecto, se puede utilizar el biorreactor para producir y propagar células, tejidos, u órganos quiméricos novedosos para uso de acuerdo con la invención. Tales quimeras se pueden crear utilizando células placentarias y uno o más tipos de células adicionales como materiales de partida en un biorreactor. La interacción, o "cross-talk" entre los diferentes tipos de células puede inducir patrones de expresión distintos de cualquiera de los tipos de células de partida. En una realización, por ejemplo, se genera una quimera autóloga propagando células placentarias autólogas del paciente en un biorreactor con otro tipo de célula derivado del mismo paciente. En otra realización, por ejemplo, se puede generar una quimera heteróloga mediante la adición de células de un paciente, esto es, células de la sangre, a un biorreactor que tiene células placentarias heterólogas. En otra realización más, las células placentarias pueden derivar de un paciente, y un segundo tipo de célula de un segundo paciente. A continuación se recuperan células quiméricas que tienen unas características fenotípicas y/o genéticas diferentes de cualquiera de las células de partida. En una realización específica, las células heterólogas son del mismo haplotipo, y las células quiméricas se reintroducen en el paciente.

En otros aspectos, se puede utilizar el biorreactor para potenciar el crecimiento de un tipo concreto de célula, ya sea nativa o de origen sintético, o para la producción de un producto específico de un tipo de célula. Por ejemplo, en un aspecto, se puede utilizar el biorreactor placentario para estimular las células de los islotes pancreáticos para que produzcan insulina. El biorreactor es particularmente ventajoso para la producción de proteínas terapéuticas de mamífero, cuya eficacia terapéutica puede depender de una modificación post-traduccional apropiada. De este modo, el biorreactor es útil para la producción de proteínas, factores de crecimiento, citoquinas terapéuticos, y otras moléculas terapéuticas naturales o recombinantes, tales como, pero no limitadas a, eritropoyetina, interleuquinas, e interferones.

En otro aspecto, el biorreactor se puede utilizar para propagar células manipuladas genéticamente para proporcionar un producto génico terapéutico, y se puede emplear para la producción a gran escala del producto recombinante. En un aspecto, por ejemplo, el reactor se puede utilizar para potenciar la producción de anticuerpos. La placenta se puede poblar con células productoras de anticuerpos, tales como hibridomas, que producen anticuerpos monoclonales específicos, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno concreto. Los hibridomas se pueden obtener por cualquier técnica, incluyendo, pero no limitada a, la técnica del hibridoma de Kohler y Milstein (1975, Nature 256, 495-497; y Patente de los Estados Unidos Núm. 4.376.110), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4, 72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030), y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et a/., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Los hibridomas productores de mAb se pueden cultivar en el biorreactor para producir títulos elevados de mAb.

Alternativamente, cuando un antígeno es desconocido, se puede utilizar el biorreactor para generar anticuerpos específicos para un tipo concreto de célula, que se puede utilizar a continuación para identificar el antígeno desconocido. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos contra un antígeno específico de tumores desconocido en un paciente con cáncer cultivando un espécimen de sangre completa de un paciente con cáncer, expandiendo las células en un biorreactor, y a continuación escrutar en busca de anticuerpos que reaccionan específicamente con las células tumorales del paciente.

En otro aspecto, se puede utilizar el biorreactor para producir virus en cultivo y para escrutar en busca de agentes antivirales en el cultivo. Este método tiene un interés particular para aquellos virus, tales como parvovirus y virus de

la inmunodeficiencia humana, que son difíciles de propagar en condiciones de cultivo celular.

El biorreactor también se puede utilizar como soporte para escrutar en busca de moléculas terapéuticas que modulan la actividad de un tipo concreto de célula, tal como la actividad o expresión de un producto génico de interés o la activación de una ruta de transducción de señales. En este aspecto, se puede cultivar un tipo celular de interés y expandirlo en el biorreactor. La célula puede ser una célula de origen natural, o una célula manipulada para expresar un producto génico recombinante. El biorreactor se pone en contacto a continuación con moléculas terapéuticas candidato, tales como moléculas pequeñas, no péptidos, anticuerpos, etc., o genotecas de tales moléculas terapéuticas candidato. Las células se analizan después para determinar los cambios en la actividad deseada en presencia o ausencia de la molécula terapéutica candidato. Por ejemplo, semejante actividad deseada podría ser un incremento o una disminución en la tasa de crecimiento, y un cambio en la expresión génica, o un cambio en la unión o absorción de la molécula terapéutica candidato.

Es probable que algunos tipos de métodos sean particularmente convenientes y/o útiles para el escrutinio de agentes de ensayo. Estos incluyen, pero no se limitan a, métodos que miden la unión de un compuesto, métodos que miden un cambio en la capacidad de las células para interaccionar con un anticuerpo o ligando, y métodos que miden la actividad o la expresión de una proteína "informadora", que es, una enzima u otra proteína detectable o seleccionable, que ha sido colocada bajo el control de una región de control de interés. De este modo, en un aspecto preferido, se pueden escrutar compuestos de origen natural y/o sintéticos (p. ej., bibliotecas de moléculas o péptidos pequeños), para determinar la actividad terapéutica. Los análisis de escrutinio se pueden utilizar para identificar compuestos y composiciones que incluyen péptidos y moléculas no proteicas, orgánicas que modulan una actividad específica de un tipo de célula. Los compuestos recombinantes, sintéticos, o exógenos de otro modo pueden tener capacidad de unión y, por lo tanto, pueden ser candidatos a agentes farmacéuticos. Alternativamente, las proteínas y los compuestos incluyen componentes celulares endógenos que interaccionan con los genes y proteínas identificados in vivo. Tales componentes endógenos pueden proporcionar nuevas dianas para intervenciones farmacéuticas y terapéuticas.

En otro aspecto, la placenta se utiliza como un biorreactor para propagar células endógenas (esto es, células que se originan a partir de la placenta), incluyendo, pero no limitadas a, varias clases de células madre de tipo embrionario pluripotentes y/o totipotentes y linfocitos para uso de acuerdo con la invención. En una realización, la placenta se incuba durante períodos variables de tiempo con solución de perfusato como se describe en la presente invención. Tales células endógenas de origen placentario se pueden transformar para que expresen recombinantemente un gen de interés, para que expresen mutaciones, y/o se pueden manipular para suprimir un locus genético, utilizando la tecnología de la inactivación génica ("knock out"). Por ejemplo, se puede suprimir un gen diana endógeno inactivando "knocking out" el gen diana o su promotor utilizando la recombinación homóloga dirigida (p. ej., véanse Smithies, et al., 1985, Nature 317, 230-234; Thomas & Capecchi, 1987, Cell 51, 503-512; Thompson, et al., 1989, Cell 5, 313-321). Por ejemplo, se puede utilizar un gen diana no funcional, mutante (o una secuencia de ADN no relacionada en absoluto) flanqueada por ADN homólogo al gen diana endógeno (o las regiones codificantes o las regiones reguladoras del gen diana), con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar células que expresan el gen diana in vivo. La inserción del constructo de ADN, a través de la recombinación homóloga dirigida, da como resultado la inactivación del gen diana. Tales enfoques se pueden utilizar para eliminar, remplazar, o alterar la expresión génica de interés en células, tejidos, y/u órganos. Se puede utilizar este enfoque para alterar el fenotipo de una célula, tejido, u órgano, que puede ser introducido en un sujeto humano.

En ciertas realizaciones, se puede inducir la diferenciación de una célula de la placenta a un tipo de célula concreto, ya sea *ex* vivo o in *vivo.* Por ejemplo, se pueden inyectar células madre de tipo embrionario pluripotentes en un órgano dañado, para la neogénesis del órgano y la reparación de la lesión in vivo. Semejante lesión se puede deber a afecciones y trastornos que incluyen, pero no se limitan a, infarto de miocardio, trastorno convulsivo, esclerosis múltiple, apoplejía, hipotensión, parada cardíaca, isquemia, inflamación, pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad, daño por radiación, parálisis cerebral, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia por SIDA, pérdida de invención, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad con isquemia renal, trauma cerebral o de la médula espinal, bypass corazón-pulmón, glaucoma, isquemia retiniana, o trauma en la retina.

Las células madre de tipo embrionario aisladas de la placenta se pueden utilizar, en aspectos específicos, en la terapia de sustitución de enzimas autólogas o heterólogas para tratar enfermedades o afecciones específicas, incluyendo, pero no limitadas a, enfermedades de almacenamiento lisosomal, tales como los síndromes de Tay-Sachs, Niemann-Pick, Fabry, Gaucher, Hunter, y Hurler. También se describen en esta memoria usos de células madre de tipo embrionario descritas en esta memoria para tratar otras gangliosidosis, mucopolisacaridosis, y glicogenosis.

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

También se describen en esta memoria usos de células madre de tipo embrioario descritas en esta memoria para tratar mucopolisacaridodenosis.

En otros aspectos, se pueden utilizar las células en terapias o protocolos de regeneración o sustitución de tejidos autólogos o heterólogos, incluyendo, pero no limitados a, tratamiento de defectos epiteliales de la córnea, reparación de cartílago, dermabrasión facial, membranas mucosales, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas *(*p. ej., retina, neuronas auditivas de la membrana basilar, neuronas olfativas en el epitelio olfativo), reparación de quemaduras y heridas para lesiones traumáticas de la piel, o para la reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos.

El gran número de células madre de tipo embrionario y/o progenitor obtenido utilizando los métodos descritos en la presente memoria, reducirían, en ciertos aspectos, la necesidad de grandes donaciones de médula ósea. Se deben infundir aproximadamente de 1 x 10^8 a 2 x 10^8 células mononucleares de médula ósea por kilogramo de peso del paciente para el injerto en un transplante de médula ósea (*esto es,* aproximadamente 70 ml de médula para un donante de 70 kg). La obtención de 70 ml requiere una donación intensiva y una pérdida significativa de sangre en el proceso de donación. En un aspecto específico, las células de una pequeña donación de médula ósea (p. ej., 7 a 10 ml) se podrían expandir mediante propagación en un biorreactor placentario antes de la infusión en un receptor.

Además, normalmente circula en la corriente sanguínea un pequeño número de células madre y células progenitoras. En otro aspecto, tales células madre exógenas o células progenitoras exógenas se recogen mediante féresis, un procedimiento en el cual se recoge sangre, se eliminan selectivamente uno o más componentes, y el resto de la sangre se vuelve a infundir en el donante. Las células exógenas recuperadas mediante féresis se expanden mediante propagación en un biorreactor placentario, eliminando de ese modo completamente la necesidad de donación de médula ósea.

En otro aspecto, la expansión de células exógenas en un biorreactor placentario se utiliza como un tratamiento suplementario además de la quimioterapia. La mayor parte de los agentes de quimioterapia utilizados para elegir como diana y destruir las células cancerosas actúan eliminando todas las células en proliferación, esto es, las células que están pasando por una división celular. Puesto que la médula ósea es uno de los tejidos que proliferan más activamente en el organismo, las células madre hematopoyéricas son frecuentemente dañadas o destruidas por los agentes quimioterapéuticos y por consiguiente, la producción de células de la sangre disminuye o se detiene. La quimioterapia debe dejar de aplicarse a intervalos para permitir que el sistema hematopoyético del paciente refuerce el suministro de células de la sangre antes de reanudar la quimioterapia. Puede llevar un mes o más que las primeras células madre quiescentes proliferen y aumente el recuento de glóbulos blancos hasta niveles aceptables de manera que se pueda reanudar la quimioterapia (cuando de nuevo, las células madre de la médula ósea son destruidas).

Mientras las células de la sangre se regeneran entre los tratamientos de quimioterapia, el cáncer, sin embargo, tiene tiempo para crecer y posiblemente hacerse más resistente a los fármacos de la quimioterapia debido a la selección natural. Por lo tanto, cuanto más tiempo se administra la quimioterapia y más corta es la duración entre tratamientos, mayores serán las probabilidades de destruir con éxito el cáncer. Para acortar el tiempo entre tratamientos con quimioterapia, se podrían introducir en el paciente células madre de tipo embrionario o células progenitoras recogidas de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria. Semejante tratamiento reduciría el tiempo en el que el paciente mostraría un bajo recuento de células de la sangre, y por lo tanto permitiría una reanudación más temprana del tratamiento de quimioterapia.

Las células madre de tipo embrionario, las células progenitoras, las células foráneas, o las células manipuladas obtenidas de una placenta de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar en la fabricación de un tejido u órgano *in vivo.* Los métodos de la invención incluyen el uso de células obtenidas de la placenta, p. ej., células madre de tipo embrionario, células progenitoras, o células madre o células progenitoras foráneas, para sembrar una matriz y para ser cultivadas en las condiciones apropiadas para permitir que las células se diferencien y pueblen la matriz. Los tejidos y órganos obtenidos mediante los métodos de la invención se pueden utilizar para una variedad de fines, incluyendo fines de investigación y terapéuticos.

5.5 Usos de células madre de tipo embrionario

Las células madre de tipo embrionario descritas en esta memoria se pueden utilizar para una amplia variedad de protocolos terapéuticos en los que un tejido u órgano del organismo se aumenta, se repara o se sustituye por el injerto, transplante o infusión de una población de células deseada, tal como una población de células madre o de células progenitoras. Las células madre de tipo embrionario descritas en esta memoria se pueden utilizar para sustituir o aumentar tejidos existentes, para introducir tejidos nuevos o alterados, o para reunir tejidos o estructuras biológicos. Las células madre de tipo embrionario descritas en esta memoria también pueden ser sustituidas por células madre embrionarias en protocolos terapéuticos en los que típicamente se utilizarían las células madre embrionarias.

En un aspecto preferido descrito en est memoria, las células madre de tipo embrionario y otras células madre de la placenta se pueden utilizar como transplantes hematopoyéticos autólogos y alogénicos, incluyendo de tipo HLA

compatibles e incompatibles. De acuerdo con el uso de células madre de tipo embrionario como transplantes hematopoyéticos alogénicos, puede ser necesario tratar al anfitrión para reducir el rechazo inmunológico de las células del donante, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.800.539, presentada el 1 de Septiembre, 1998; y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.806.529, presentada el 15 de Septiembre, 1998.

Por ejemplo, las células madre de tipo embrionario de la invención se pueden utilizar en protocolos de transplante terapéutico, p. ej., para aumentar o sustituir células madre o progenitoras del hígado, páncreas, riñón, pulmón, sistema nervioso, sistema muscular, hueso, médula ósea, timo, bazo, tejido mucosal, gónadas, o pelo.

Las células madre de tipo embrionario se puede utilizar en lugar de clases específicas de células progenitoras (p. ej., condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células parenquimales pancreáticas, neuroblastos, células progenitoras musculares, etc.) en protocolos terapéuticos o de investigación en los cuales se utilizarían típicamente células progenitoras.

Las células madre de tipo embrionario descritas en esta memoria se pueden utilizar para aumentar, reparar o sustituir cartílago, tendón, o ligamentos. Por ejemplo, en ciertos aspectos, las prótesis (p. ej., prótesis de cadera) se recubren con constructos de tejido de cartílago de sustitución desarrollados a partir de células madre de tipo embrionario descritas aquí. En otros aspectos, las articulaciones (p. ej., rodilla) pueden ser reconstuidas con constructos de tejido de cartílago desarrollados a partir de células madre de tipo embrionario. Los constructos de tejido de cartílago también se pueden emplear en la cirugía reconstructiva mayor para diferentes tipos de articulaciones (para los protocolos, véanse, p. ej., Resnick, D., y Niwayama, G., eds., 1988, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2ª ed., W. B. Saunders Co.).

Las células madre de tipo embrionario descritas aquí se pueden utilizar para reparar el daño de tejidos y órganos resultante de enfermedades. En tal aspecto, se pueden administrar a un paciente células madre de tipo embrionario para regenerar o restaurar tejidos u órganos que han sido dañados como consecuencia de una enfermedad, p. ej., potenciar el sistema inmunitario después de quimioterapia o radiación, reparar tejido del corazón después de un infarto de miocardio.

Las células madre de tipo embrionario descritas aquí se pueden utilizar para aumentar o sustituir células de médula ósea en el transplante de médula ósea. Los transplantes de médula ósea autólogos y alogénicos humanos se utilizan actualmente como terapias para enfermedades tales como leucemia, linfoma y otros trastornos que amenazan la vida. La desventaja de estos procedimientos, no obstante, es que se debe retirar una gran cantidad de médula ósea del donante para garantizar que haya suficientes células para el injerto.

Las células madre de tipo embrionario recogidas de acuerdo con los métodos descritos aquí pueden proporcionar células madre y células progenitoras que reducirían la necesidad de una gran donación de médula ósea. También sería, de acuerdo con los métodos descritos en la presente invención, para obtener una pequeña donación de médula ósea y a continuación expandir el número de células madre y células progenitoras cultivándolas y expandiéndolas en la placenta antes de la infusión o el transplante al receptor.

Las células madre de tipo embrionario aisladas de la placenta se pueden utilizar, en aspectos específicos, en la terapia de sustitución enzimática autóloga o heteróloga para tratar enfermedades o afecciones específicas, incluyendo, pero no limitadas a enfermedades de almacenamiento lisosomal, tales como los síndromes de Tay-Sachs, Niemann-Pick, Fabry, Gaucher, Hunter y Hurler, y en otros aspectos también gangliosidosis, mucopolisacaridosis, y glicogenosis.

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

En otros aspectos, las células se pueden utilizar en las terapias o protocolos de regeneración o sustitución de tejidos autólogos o heterólogos, incluyendo, pero no limitados a tratamiento de defectos epiteliales de la córnea, reparación de cartílago, dermabrasión facial, membranas mucosales, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (p. ej., retina, neuronas auditivas en la membrana basilar, neuronas olfativas en el epitelio olfativo), reparación de quemaduras o heridas para lesiones traumáticas de la piel, transplante de cuero cabelludo (pelo), o para la reconstrucción de otros órganos o tejidos dañados o enfermos.

El gran número de células madre de tipo embrionario y/o progenitoras obtenido utilizando los métodos descritos en esta memoria reducirían, en ciertos aspectos, la necesidad de grandes donaciones de médula ósea. Aproximadamente se deben infundir de 1×10^8 a 2×10^8 células mononucleares de médula ósea por kilogramo de peso del paciente para el injerto en un transplante de médula ósea (esto es, aproximadamente 70 ml de médula para un donante de 70 kg). Obtener 70 ml requiere una donación intensiva y una pérdida significativa de sangre en el proceso de donación. En un aspecto específico, las células de una pequeña donación de médula ósea (p. ej., 7 a 10 ml) se expandirían mediante propagación en un biorreactor placentario antes de la infusión en el receptor.

En otro aspecto, las células madre de tipo embrionario se pueden utilizar en un tratamiento complementario además de la quimioterapia. La mayor parte de los agentes de quimioterapia utilizados para elegir como diana y destruir las células cancerosas actúan eliminando todas las células en proliferación, esto es, las células que están pasando por una división celular. Puesto que la médula ósea es uno de los tejidos que proliferan más activamente en el organismo, las células madre hematopoyéricas son frecuentemente dañadas o destruidas por los agentes quimioterapéuticos y por consiguiente, la producción de células de la sangre disminuye o se detiene. La quimioterapia debe dejar de aplicarse a intervalos para permitir que el sistema hematopoyético del paciente refuerce el suministro de células de la sangre antes de reanudar la quimioterapia. Puede llevar un mes o más que las primeras células madre quiescentes proliferen y aumente el recuento de glóbulos blancos hasta niveles aceptables de manera que se pueda reanudar la quimioterapia (cuando de nuevo, las células madre de la médula ósea son destruidas).

Mientras las células de la sangre se regeneran entre los tratamientos de quimioterapia, el cáncer, sin embargo, tiene tiempo para crecer y posiblemente hacerse más resistente a los fármacos de la quimioterapia debido a la selección natural. Por lo tanto, cuanto más tiempo se administra la quimioterapia y más corta es la duración entre tratamientos, mayores serán las probabilidades de destruir con éxito el cáncer. Para acortar el tiempo entre tratamientos con quimioterapia, se podrían introducir en el paciente células madre de tipo embrionario o células progenitoras recogidas de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria. Semejante tratamiento reduciría el tiempo en el que el paciente mostraría un bajo recuento de células de la sangre, y por lo tanto permitiría una reanudación más temprana del tratamiento de quimioterapia.

En una realización, las células madre placentarias humanas se pueden utilizar para tratar o prevenir enfermedades genéticas tales como la enfermedad granulomatosa crónica.

5.6 Composiciones farmacéuticas

Se describen en esta memoria composiciones farmacéuticas que comprenden una dosis y/o dosis eficaces en una administración individual o múltiple, antes o después del transplante de células madre progenitoras humanas acondicionadas o no acondicionadas, que ejercen un efecto suficiente para inhibir, modular y/o regular la diferenciación de células madre progenitoras pluripotentes y multipotentes humanas de origen placentario en células de linajes mesodermales y/o hematopoyéticos.

De acuerdo con esta realización, las células madre de tipo embrionario para su uso en un método de tratamiento de la invención se pueden formular en forma de un inyectable (p. ej., documento PCT WO 96/39101). En una realización alternativa, las células y tejidos para su uso en un método de tratamiento de la presente invención se pueden formular utilizando hidrogeles polimerizables o de entrecruzamiento como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.709.854; 5.516.532; 5.654.381.

6. Ejemplos

6.1. Ejemplo 1: Análisis de tipos de células recuperadas de perfusato de placenta drenada

Este ejemplo describe el análisis de los tipos de células recuperadas del perfusato efluente de una placenta cultivada de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria.

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

La siguiente tabla describe los tipos de células obtenidas mediante perfusión de una placenta cultivada de acuerdo con los métodos descritos más arriba.

	GB 1000/ml	% Lin	%MID	%GRA	Volumen Total	Núm. de Células
CB (Sangre de Cordón)	10,5	43,2	8	48,8	60 ml	$6,3 \times 10^8$
PP (Perfusato de placenta, temperatura ambiente)	12,0	62,9	18,2	18,9	15 ml	$1,8 \times 10^8$
PP_2 (Perfusato de placenta, 37° C)	11,7	56,0	19,2	24,8	30 ml	$3,5 \times 10^8$
Las muestras de PP fueron después de Ficoll. El número de células totales de PP después de Ficoll fue de $5,3 \times 10^8$ y el número de CB antes del procesamiento es de $6,3 \times 10^8$. % Lin indica el porcentaje de linfocitos; % MID indica el porcentaje de glóbulos blancos de gama media; y % GRA indica el porcentaje de granulocitos.						

6.2. Ejemplo 2: análisis de células obtenidas mediante perfusión e incubación de placenta

El siguiente ejemplo describe un análisis de células obtenidas por perfusión e incubación de placenta de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria.

6.2.1. Materiales y métodos

Los donantes de placenta se reclutaron entre madres embarazadas que se enrolaron en programas privados de bancos de sangre de cordón umbilical y proporcionaron el consentimiento informado que permitía el uso de la placenta exanguinada después de la recuperación de la sangre del cordón para fines de investigación. Los datos de los donantes pueden ser confidenciales. 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 permitió la comparación entre la composición de la sangre de cordón recogida y el perfusato efluente recuperado utilizando el método experimental descrito más abajo.

Después de la exanguinación de la sangre de cordón procedente del cordón umbilical y de que la placenta se almacenara a la temperatura ambiente y se transportara al laboratorio en un plazo de cuatro a veinticuatro horas, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, la placenta se colocó en un recipiente aislado, estéril a la temperatura ambiente y se llevó al laboratorio a las 4 horas del nacimiento. Las placentas se descartaron si, durante la inspección, tenían evidencia de daño físico tal como fragmentación del órgano o avulsión de los vasos umbilicales. Las placentas se mantuvieron a la temperatura ambiente (23±2ºC) o se refrigeraron (4°C) en contenedores estériles durante 2 a 20 horas. Periódicamente, las placentas se sumergieron y se lavaron en solución salina estéril a 25±3°C para eliminar cualquier sangre superficial o desecho visible.

El cordón umbilical se seccionó a aproximadamente 5 cm de su inserción en la placenta y los vasos umbilicales se canularon con catéteres de TEFLON® o polipropileno conectados a un lecho de fluido estéril que permita la perfusión bi-direccional de la placenta y la recuperación del fluido efluente. Los métodos descritos anteriormente permitieron llevar a cabo todos los aspectos del acondicionamiento placentario, la perfusión y la recogida de efluente en condiciones atmosféricas ambiente controladas así como el control en tiempo real de la presión intravascular y las velocidades de flujo, las temperaturas del núcleo y del perfusato y los volúmenes de efluente recuperado. Se evaluó una gama de protocolos de acondicionamiento a lo largo de un período post-parto de 24-horas, y se analizó la composición celular del fluido efluente mediante citometría de flujo, microscopía óptica y análisis de unidades formadoras de colonias.

6.2.2. Acondicionamiento de la placenta

Las placentas de los donantes se procesaron a la temperatura ambiente en el plazo de 12 a 24 horas después del parto. Antes del procesamiento, se retiraron las membranas y se lavó el emplazamiento materno de sangre residual. Los vasos sanguíneos se canularon con catéteres elaborados con agujas Butterfly de calibre 20 utilizados para la recogida de muestras de sangre.

Las placentas de los donantes se mantuvieron en condiciones variables tales como mantenimiento a 5 a 37° con 5% de CO_2, pH 7,2 a 7,5, preferiblemente pH 7,45, en un intento de simular y mantener un entorno fisiológicamente compatible para la proliferación y el reclutamiento de células madre de tipo embrionario residuales. La cánula se enjuagó con medio IMDM libre de suero (GibcoBRL, NY) que contenía 2 U/ml de heparina (Elkins-Sinn, NJ). La perfusión de la placenta continuó a una velocidad de 50 ml por minuto hasta que se recogieron aproximadamente 150 ml de perfusato. Este volumen de perfusato se marcó como "fracción temprana". La perfusión continuada de la

placenta a la misma velocidad dio como resultado la recogida de una segunda fracción de aproximadamente 150 ml y se marcó como "fracción tardía". Durante el transcurso del procedimiento, la placenta se masajeó suavemente para ayudar al proceso de perfusión y contribuir a la recuperación de material celular. El fluido efluente se recogió del circuito de perfusión mediante drenaje por gravedad y por aspiración a través de la cánula arterial.

Las placentas se perfundieron a continuación con Medio de Eagle modificado de Dulbecco heparinizado (2 U/ml) (H.DMEM) a una velocidad de 15 ml/minuto durante 10 minutos y los perfusatos se recogieron del emplazamiento materno en una hora y se contaron las células nucleadas. Los procedimientos de perfusión y recogida se repitieron una o dos veces hasta que el número de células nucleadas recuperadas cayó por debajo de 100/ml. Los perfusatos se reunieron y se sometieron a centrifugación ligera para eliminar las plaquetas, los desechos y las membranas de las células des-nucleadas. Las células nucleadas se aislaron a continuación mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y después de lavar, se resuspendieron en H.DMEM. Para el aislamiento de las células adherentes, se colocaron alícuotas de 5-10 x 10^6 células en cada uno de los numerosos matraces T-75 y se cultivaron con Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) disponible en el mercado obtenido de Bio Whittaker, y se colocaron en una incubadora para el cultivo de tejidos (37°C, 5% de CO_2). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se eliminaron lavando con PBS, que a continuación se sustituyó por MSCGM. Los matraces se examinaron diariamente para determinar la presencia de diversos tipos de células adherentes y en particular, para la identificación y expansión de agrupaciones de células fibroblastoides.

6.2.3. Recuperación y aislamiento de células

Las células se recuperaron de los perfusatos mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a la temperatura ambiente. Este procedimiento sirvió para separar las células de los desechos contaminantes y las plaquetas. Los sedimentos celulares se resuspendieron en medio IMDM libre de suero que contenía 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares totales se aisló utilizando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante y la fracción de células mononucleares se resuspendió. Las células se contaron utilizando un hemocitómetro. La viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul tripán. El aislamiento de las células mesenquimales se logró mediante "tripsinización diferencial", utilizando una solución de tripsina al 0,05% con EDTA al 0,2% (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial fue posible porque las células fibroblastoides se separaron de las superficies de plástico en aproximadamente cinco minutos mientras las otras poblaciones adherentes requirieron más de 20 a 30 minutos de incubación. Las células fibroblastoides separadas se recogieron después de la tripsinización y la neutralización con tripsina, utilizando Trypsin Neutralizing Solution (TNS, Bio Whittaker). Las células se lavaron en H.DMEM y se resuspendieron en MSCGM.

La citometría de flujo se llevó a cabo utilizando un aparato Becton-Dickinson FACSCalibur y los anticuerpos monoclonales (mAb) marcados con FITC y PE, seleccionados basándose en marcadores conocidos para MSC (células madre mesenquimales) derivadas de médula, se adquirieron de los laboratorios B.D. y Caltag (South San Francisco, CA.), y se obtuvieron los hibridomas productores de anticuerpos SH2, SH3 y SH4 y se detectaron la reactividades de los mAbs en sus sobrenadantes cultivados por medio de anticuerpos anti-ratón de cabra F(ab)'2 marcados con FITC o PE. La diferenciación del linaje se llevó a cabo utilizando medios de cultivo de inducción y mantenimiento (BioWhittaker) disponibles en el mercado utilizados de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

6.2.4. Aislamiento de células madre de tipo embrionario placentarias

El examen microscópico de las células adherentes en los matraces de cultivo reveló tipos de células morfológicamente diferentes. Se observaron células con forma de huso, células redondas con grandes núcleos y numerosas vacuolas pequeñas perinucleares, y células con forma de estrella con numerosas proyecciones (a través de una de las cuales las células con forma de estrella se anclaban al matraz) que se adherían a los matraces de cultivo. Aunque no se realizaron intentos para caracterizar adicionalmente estas células adherentes, se observaron células similares en el cultivo de médula ósea, sangre de cordón y periférica, y por lo tanto se consideró que no eran de tipo célula madre en la naturaleza. Las células fibroblastoides, que aparecían al final como agrupaciones, eran candidatas a ser MSC (células madre mesenquimales) y se aislaron mediante tripsinización diferencial y se subcultivaron en matraces secundarios. La microscopía de fase de las células redondeadas, tras la tripsinización, reveló que las células estaban muy granuladas; eran indistinguibles de las MSC derivadas de la médula ósea producidas en el laboratorio o adquiridas de BioWhittaker. Cuando se subcultivaron, las células madre de tipo embrionario derivadas de placenta, al contrario que en su fase más temprana, adheridas en horas, adoptaron una forma fibroblastoide característica, y formaron un patrón de crecimiento idéntico al de las MSC derivadas de médula ósea. Durante el subcultivo y la realimentación, por otra parte, las células mononucleares unidas laxamente se lavaron y los cultivos permanecieron homogéneos y desprovistos de cualquier contaminante de célula no fibroblastoide visible.

6.2.5. Resultados

La expresión de CD-34, CD-38, y otros marcadores de la superficie asociados a células madre sobre células mononucleares purificadas en la fracción temprana y tardía se evaluó mediante citometría de flujo. Las células

clasificadas, recuperadas se lavaron en PBS y a continuación se sometieron a doble tinción con anti-CD34-ficoeritrina y anti-CD38-isotiocianato de fluoresceína (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

El aislamiento celular se logró utilizando la separación de células magnéticamente, tal como por ejemplo, Auto Macs (Miltenyi). Preferiblemente, se realiza primero el aislamiento de las células CD34+.

6.3 Ejemplo 3: medio de perfusión

El siguiente ejemplo proporciona una fórmula de la solución de perfusato preferida para el cultivo de placentas aisladas

Agente químico	Fuente	Concentración de la solución de partida	Concentración Final	500 ml
DMEM-LG	GibcoBRL11885-084			300 ml
MCDB201	Sigma M-6770	Disuelto en H2O	pH a 7,2. filtro	200 ml
FCS	Hyclone	100%	2%	10 ml
ITS	Sigma I-3146 o GibcoBRL41400-045	100x	1x	5 ml
Pen y Estrep	GibcoBRL15140-122	100x	1x	5 ml
LA+BSA	Sigma+GibcoBRL BSA	100 x (1 µg/ml de LA	10 ng/ml de LA	5 ml
Dexametasona	Sigma D-2915	0,25 mM en H2O	0,05 µM	100 µl
Ácido L-ascórbico	Sigma A-8960	1000 x (100 mM)	1 x (0,1 mM)	500 µl
PDGF (50 µg)	R&D 220BD	10 µg/ml en HCl 4 mM + BSA al 0,1%	10 ng/ml	500 µl
EGF (200 µg)	Sigma E-9644	10 µg/ml en HAc 10 mM + BSA al 0,1%	10 ng/ml	500 µl

La composición anterior es un perfusato que se puede utilizar a una variedad de temperaturas para perfundir la placenta. Se debe observar que se pueden utilizar en el perfusato o el medio de cultivo componentes adicionales tales como antibióticos, anticoagulantes y otros factores de crecimiento.

Aspectos ilustrativos

1. Una placenta de mamífero aislada que se ha exanguinado y perfundido en condiciones estériles.

2. La placenta de mamífero aislada del ítem 1 en el que la solución utilizada para perfundir la placenta contiene una solución anticoagulante.

3. La placenta de mamífero aislada del ítem 1 en el que la solución utilizada para perfundir la placenta contiene una solución antimicrobiana.

4. La placenta de mamífero aislada del ítem 1 en el que la solución utilizada para perfundir la placenta contiene factores de crecimiento.

5. La placenta de mamífero aislada del ítem 1, en el que la placenta es humana.

6. La placenta de mamífero aislada del ítem 1 que se ha almacenado desde aproximadamente 2 a 24 horas después de la expulsión de la placenta del útero.

7. Una placenta de mamífero aislada que se ha exanguinado y perfundido y se ha incubado en condiciones que permiten la producción de células madre de tipo embrionario y otras como células madre multipotentes a partir de dicha placenta.

8. La placenta de mamífero aislada del ítem 7 que ha sido incubada durante un periodo de aproximadamente 2 a 24 horas.

9. La placenta de mamífero aislada del ítem 7 que ha sido perfundida o incubada durante un período de aproximadamente 24 horas a más de 48 horas.

10. Una placenta de mamífero perfundida, aislada, que comprende células madre de tipo embrionario viables.

11. La placenta aislads del ítem 10 en el que las células madre son OCT-4- y ABC-p +.

12. La placenta de mamífero aislada del ítem 1 que se ha perfundido durante al menos dos horas.

13. La placenta de mamífero aislada del ítem 12 que se ha perfundido durante al menos once horas.

14. La placenta de mamífero del ítem 10 en el que la placenta se recupera después del nacimiento.

15. La placenta de mamífero aislada del ítem 13 que se ha perfundido durante al menos veinticuatro horas.

16. La placenta de mamífero aislada del ítem 10 en el que la placenta es perfundida con una solución que contiene factores de crecimiento.

17. La placenta de mamífero aislada del ítem 7 que ha sido perfundida con una solución que contiene factores de crecimiento.

18. La placenta de mamífero aislada del ítem 7, que es humana.

19. Un método de cultivo de una placenta de mamífero que comprende la obtención de una placenta después de la expulsión desde el útero, la exanguinación de la placenta, y la perfusión de la placenta en condiciones estériles.

20. El método del ítem 19 en el que la placenta es perfundida con una solución que contiene una solución anticoagulante.

21. El método del ítem 19 en el que la placenta es perfundida con una solución que contiene un agente antimicrobiano.

22. El método del ítem 19, en donde la placenta es humana.

23. El método del ítem 19, en donde la placenta se ha almacenado durante dos a veinticuatro horas después de la expulsión desde el útero.

24. El método del ítem 19 en el que dicha expulsión es en el momento del nacimiento.

25. El método del ítem 23 en el que la placenta se almacena a temperatura ambiente.

26. El método del ítem 23, en donde la placenta se almacena bajo refrigeración o congelación.

27. Un método para cultivar una placenta de mamífero aislada que se ha exanguinado y perfundido que comprende cultivar la placenta en condiciones que permiten la producción de células madre de tipo embrionario desde dicha placenta.

28. El método del ítem 27, en el que el cultivo de la placenta comprende perfundir la placenta.

29. El método del ítem 27 o 28 en el que la placenta se ha incubado durante un periodo de aproximadamente veinticuatro a cuarenta y ocho horas.

30. El método del ítem 27 en el que la placenta se ha perfundido durante al menos dos horas.

31. El método del ítem 30 en el que la placenta se ha perfundido durante al menos once horas.

32. El método del ítem 31 en el que la placenta se ha perfundido durante al menos veinticuatro horas.

33. El método del ítem 32, en el que la placenta ha sido perfundido durante más de cuarenta y ocho horas.

34. El método del ítem 28 en el que la placenta se ha perfundido con una solución que contiene factores de crecimiento.

35. El método del ítem 27 en el que la placenta es humana.

36. Un célula madre placentaria humana aislada, que es OTC-4+ y ABC-p+.

37. La célula madre del ítem 35 en donde la célula es una célula humana.

38. Una célula madre placentaria de mamífero aislada que tiene, al menos, las siguientes características: CD10+, CD29+, CD34, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4 + y ABC-p +.

39. La célula madre placentaria del ítem 35 en el que dicha célula es SSEA3- y SSEA4-

40. Una célula madre placentaria humana que ha sido aislada a partir de una placenta humana post-parto después de que dicha placenta se ha exanguinado y perfundido durante al menos 11 horas.

41. Un aparato de producción de células madre, que comprende:

(a) una placenta de mamífero post-parto que ha sido exanguinada y perfundida;

(b) un medio para la incubación o cultivo de la placenta; y

(c) un medio para detectar células madre.

42. El aparato de ítem 39 que comprende además un dispositivo de captura para recoger células madre.

43. El aparato de ítem 39 que comprende además un medio para el seguimiento y el ajuste de las condiciones de cultivo.

44. El aparato de ítem 41 en el que el monitoreo y ajuste está informatizado.

45. El aparato de ítem 39 que comprende además un dispositivo de separación celular.

46. Un método de tratamiento de la enfermedad en un ser humano, que comprende administrar una célula madre placentaria humana del ítem 35, 37 o 38.

47. Un método de trasplante de células madre, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una célula madre placentaria humana del ítem 35, 37 o 38.

48. Una composición farmacéutica que comprende una célula madre placentaria humana del ítem 35, 37 o 38.

49. La composición farmacéutica de ítem 46, que comprende además sangre de cordón umbilical o placenta.

50. Una célula comprometida que se ha diferenciado de una célula madre placentaria humana del ítem 35, 37 o 38.

51. Una población homogénea, aislada, de células madre placentarias humanas, que pueden diferenciarse en todos los tipos celulares.

52. Una población homogénea de células madre placentarias humanas viables que exhiben al menos los siguientes marcadores de superficie celular: OCT-4+ y ABC-p+.

53. Una población homogénea, aislada, de células madre placentarias humanas, que es multipotente.

54. Una placenta aislada que contiene una célula que no es de origen fetal ni materno.

55. Las células madre del ítem 49 o 51 en el que las células madre se originan a partir de una placenta.

56. Una composición adecuada para el trasplante de médula ósea que comprende una población de células madre hematopoyéticas enriquecidas en células que son CD34+ que son CD38- y.

57. La composición del ítem 53, que comprende además la sangre del cordón tiene células que son CD34+ y CD38+.

58. Una composición adecuada para el trasplante de médula ósea que comprende una población de células madre hematopoyéticas enriquecidas en células que son CD34- y CD38-

59. La composición del ítem 54, que comprende además sangre del cordón que tiene células que son CD34+ y CD38+.

REIVINDICACIONES

1. Células madre placentarias aisladas en una cantidad terapéuticamente eficaz para uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, en donde dichas células madre placentarias son fibroblastoides y se adhieren a plástico de un cultivo de tejidos, en donde dichas células madre placentarias se pueden obtener por perfusión de una placenta humana con una solución de perfusión, en donde dicha placenta ha sido exanguinada y perfundida para eliminar la sangre residual; y en donde dichas células madre placentarias:

(a) no expresan antígenos del MHC Clase 2;

(b) son CD34- y CD38-;

(c) son OCT-4+ y ABC-p+;

(c) son SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ y ABC-p+; o

(e) son CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, y ABC-p+, y

en donde dicha enfermedad o trastorno es un trastorno convulsivo, isquemia, inflamación, parálisis cerebral, una enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia por SIDA, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad renal isquémica, glaucoma, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick , la enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hunter, el síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, la fibrosis quística, una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, el hipotiroidismo, anemia de células falciformes, el síndrome de Pearson, la enfermedad de Pompe, la fenilcetonuria (PKU), una porfiria, enfermedad del jarabe de arce, homocistinuria , enfermedad granulomatosa crónica, o tirosinemia.

2. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células madre placentarias son alogénicas para dicho individuo.

3. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células madre placentarias son autólogas para dicho individuo.

4. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células madre placentarias tienen el potencial para diferenciarse en células de un fenotipo neurgénico.

5. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha solución de perfusión es solución salina normal.

6. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas células están presentes en una composición farmacéutica.

7. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha composición farmacéutica se formula como una composición inyectable.

8. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha composición farmacéutica comprende un hidrogel polimerizable o reticulado.

9. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichas células madre placentarias han sido producidas por ingeniería genética.

10. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 9, donde dichas células madre placentarias han sido modificadas genéticamente con un vector viral.

11. Las células madre placentarias aisladas para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 9, donde dichas células madre placentarias han sido modificadas genéticamen te con un transgen integrado en el genoma de las células.

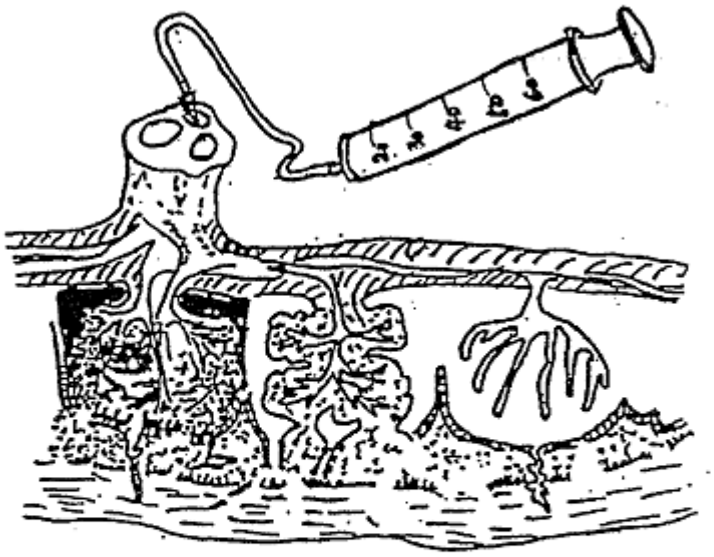


FIGURA 1

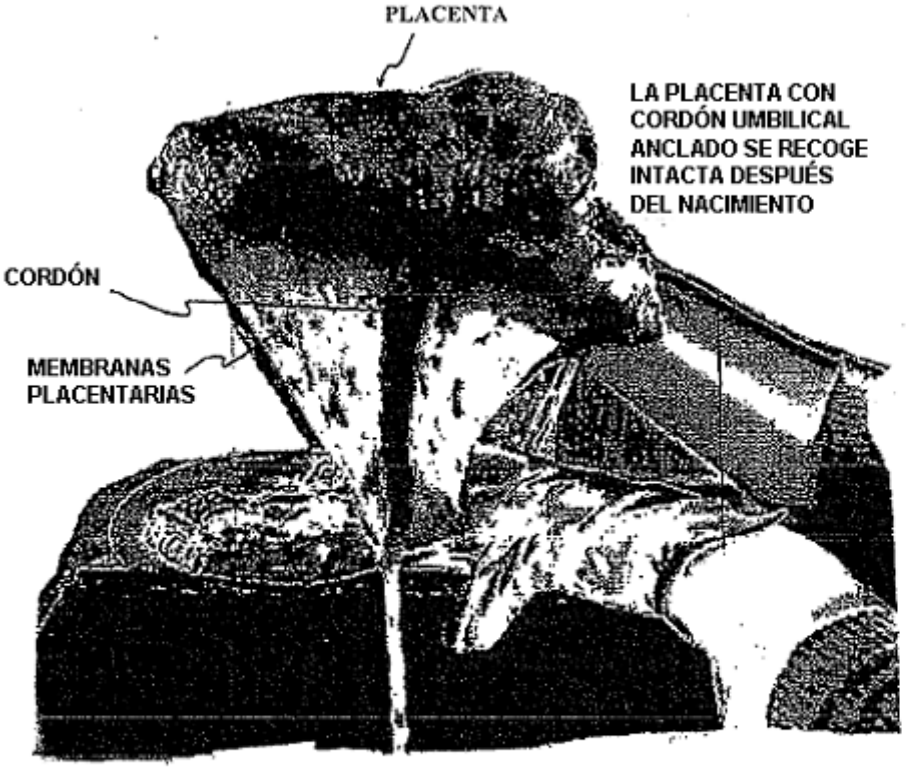

PLACENTA
LA PLACENTA CON CORDÓN UMBILICAL ANCLADO SE RECOGE INTACTA DESPUÉS DEL NACIMIENTO
CORDÓN
MEMBRANAS PLACENTARIAS

FIGURA 2a

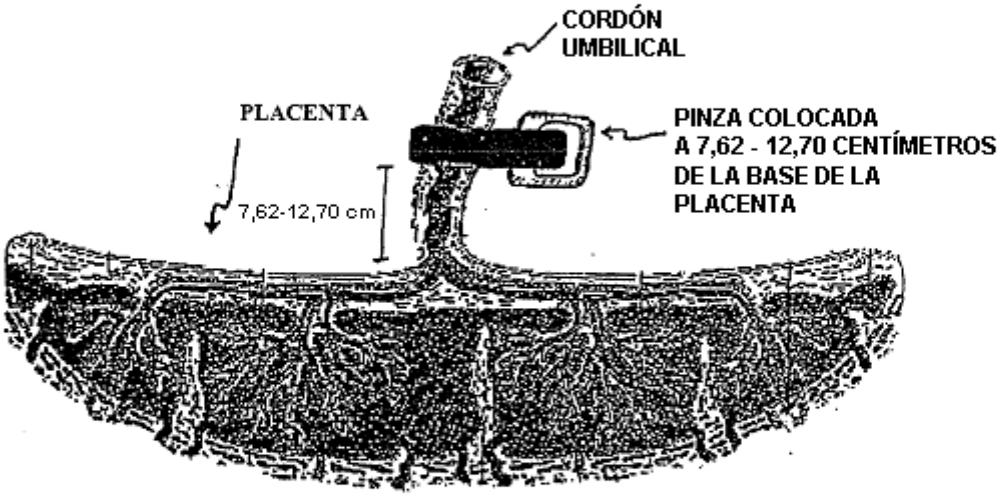

CORDÓN
UMBILICAL
PLACENTA
PINZA COLOCADA
A 7,62 - 12,70 CENTÍMETROS
DE LA BASE DE LA
PLACENTA
7,62-12,70 cm

FIGURA 2b

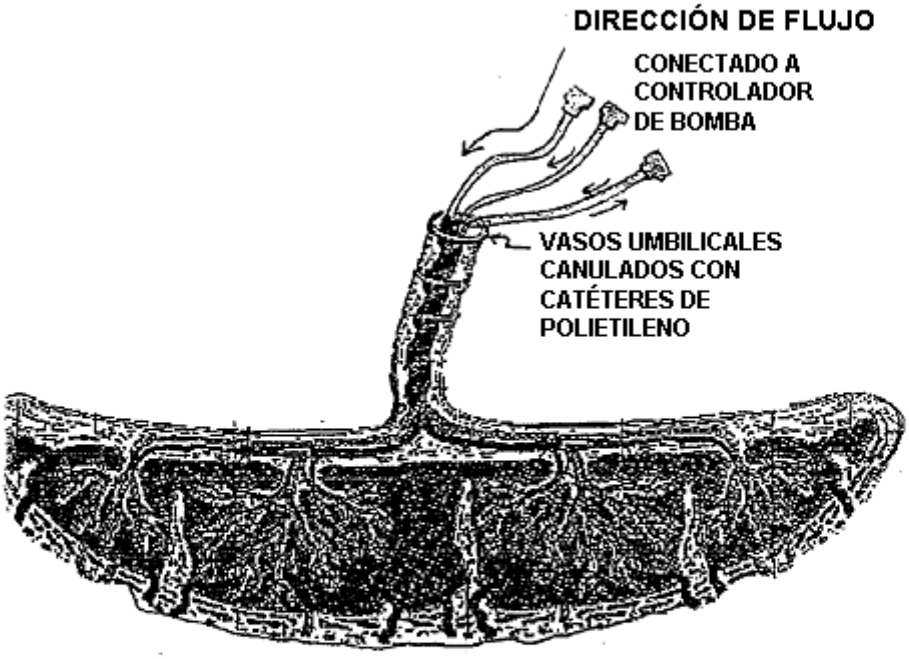

DIRECCIÓN DE FLUJO
CONECTADO A
CONTROLADOR
DE BOMBA
VASOS UMBILICALES
CANULADOS CON
CATÉTERES DE
POLIETILENO

FIGURA 2c

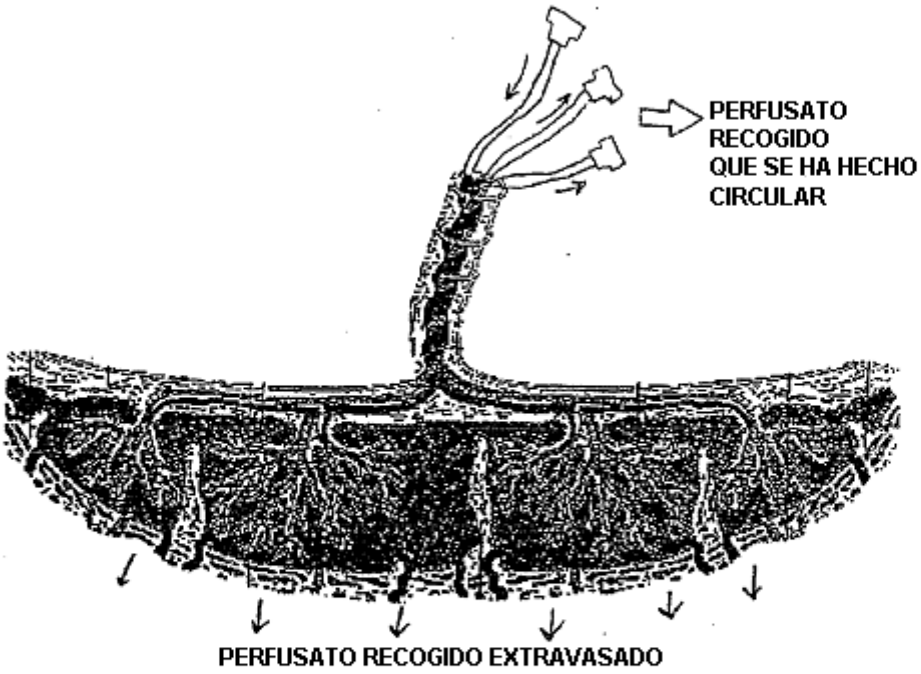
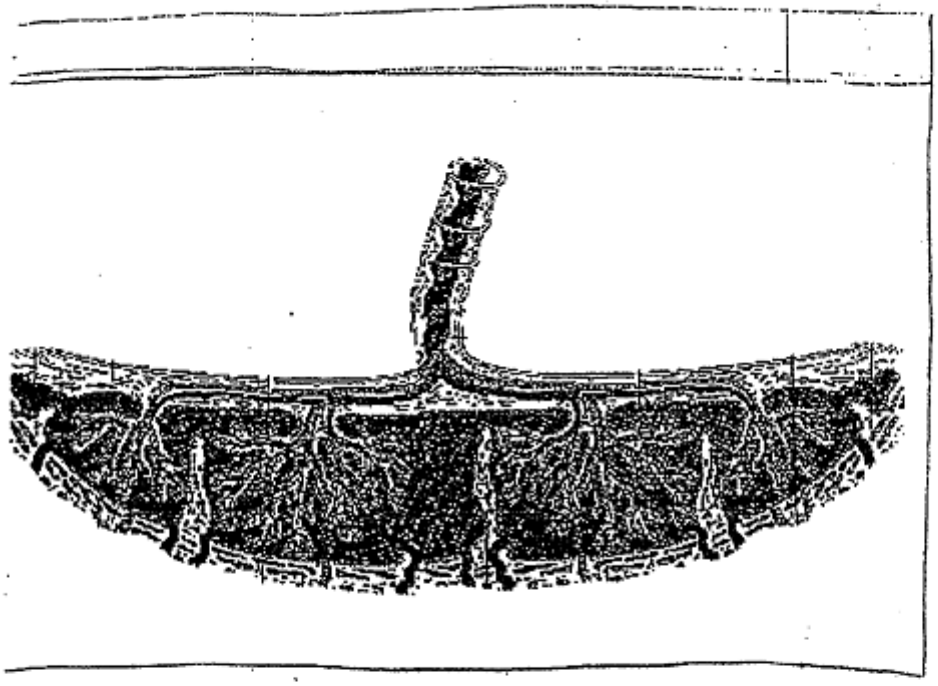

PERFUSATO
RECOGIDO
QUE SE HA HECHO
CIRCULAR
PERFUSATO RECOGIDO EXTRAVASADO

FIGURA 2d



PLACENTA PERFUNDIDA, DRENADA
ALMACENADA EN RECIPIENTE HERMÉTICO

FIGURA 2e

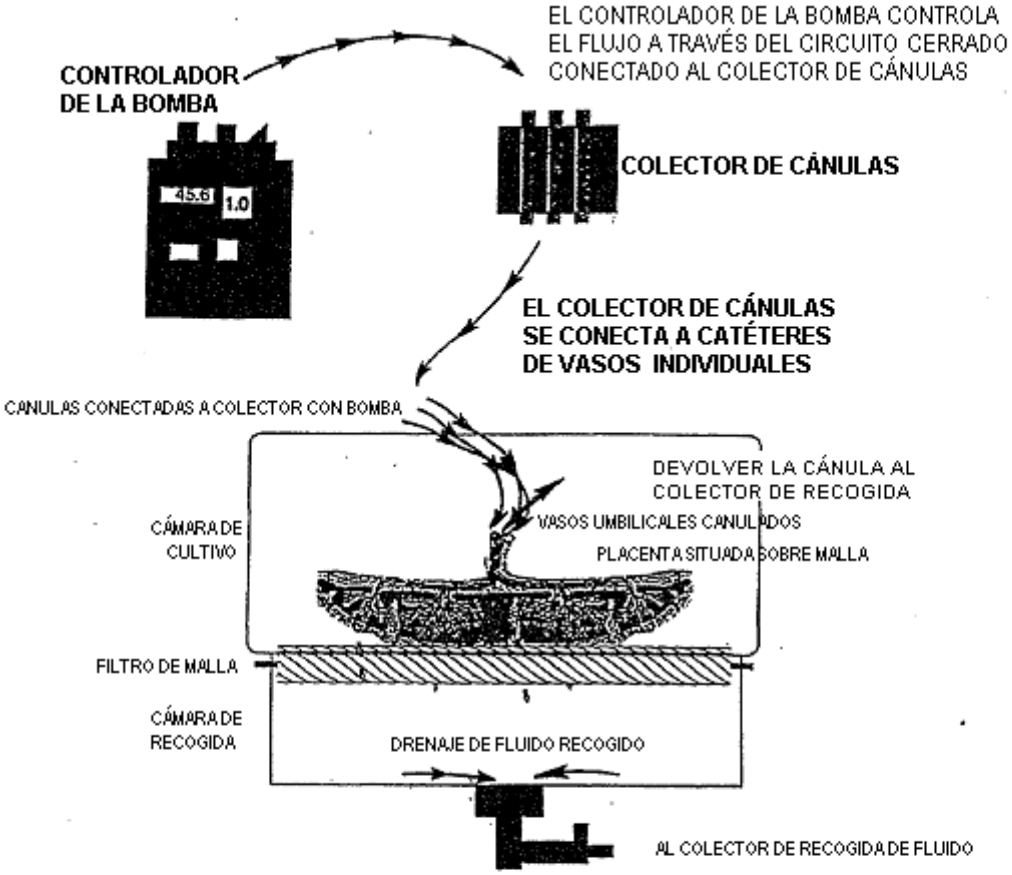

EL CONTROLADOR DE LA BOMBA CONTROLA
EL FLUJO A TRAVÉS DEL CIRCUITO CERRADO
CONECTADO AL COLECTOR DE CÁNULAS
CONTROLADOR
DE LA BOMBA
45.6
1.0
COLECTOR DE CÁNULAS
EL COLECTOR DE CÁNULAS
SE CONECTA A CATÉTERES
DE VASOS INDIVIDUALES
CANULAS CONECTADAS A COLECTOR CON BOMBA
DEVOLVER LA CÁNULA AL
COLECTOR DE RECOGIDA
CÁMARA DE
CULTIVO
VASOS UMBILICALES CANULADOS
PLACENTA SITUADA SOBRE MALLA
FILTRO DE MALLA
CÁMARA DE
RECOGIDA
DRENAJE DE FLUIDO RECOGIDO
AL COLECTOR DE RECOGIDA DE FLUIDO

FIGURA 3

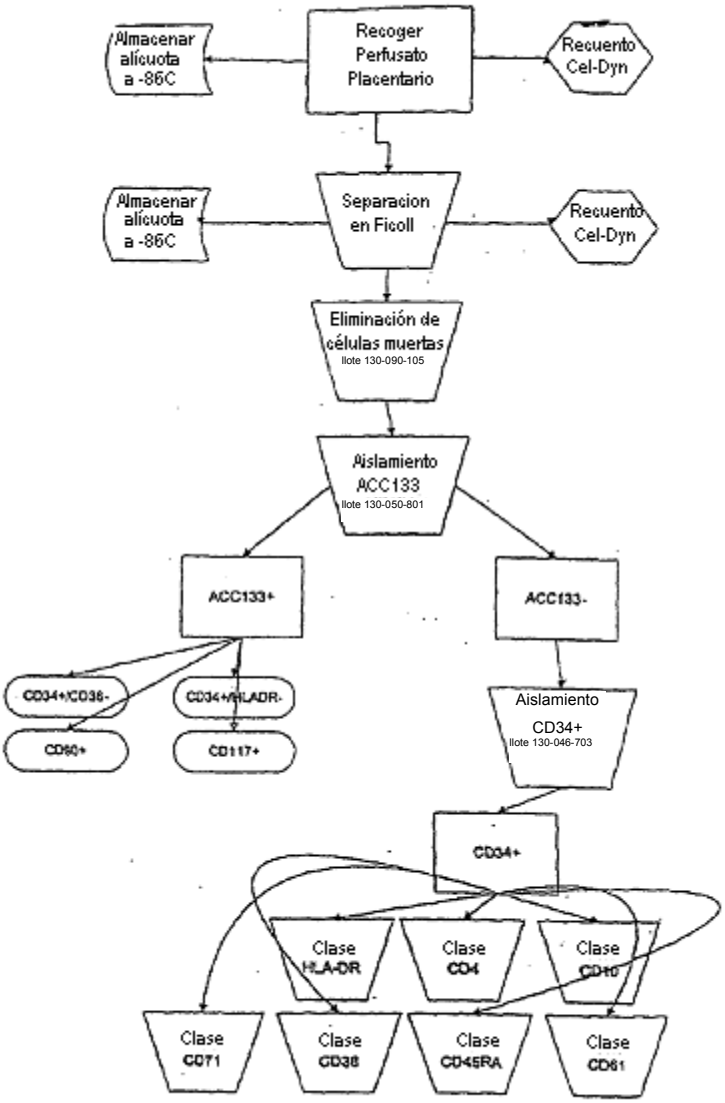

Recoger Perfusato Placentario
Almacenar alícuota a -86C
Recuento Cel-Dyn
Separacion en Ficoll
Almacenar alícuota a -86C
Recuento Cel-Dyn
Eliminación de células muertas
lote 130-090-105
Aislamiento ACC133
lote 130-050-801
ACC133+
ACC133-
CD34+/CD38-
CD34+/HLADR-
CD90+
CD117+
Aislamiento CD34+
lote 130-046-703
CD34+
Clase HLA-DR
Clase CD4
Clase CD10
Clase CD71
Clase CD38
Clase CD45RA
Clase CD61

FIGURA 4