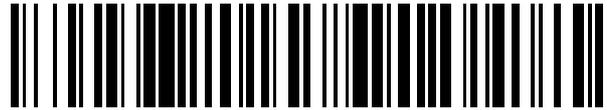


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 111**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/073** (2010.01)  
**C12N 5/074** (2010.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 35/50** (2015.01)  
**A61K 35/12** (2015.01)  
**A61K 35/64** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006 E 06848281 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1976977**

54 Título: **Poblaciones de células madre placentarias**

30 Prioridad:

**29.12.2005 US 754968 P**  
**22.09.2006 US 846641 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.10.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ABRAMSON, SASCHA DAWN;**  
**EDINGER, JAMES W.;**  
**FALECK, HERBERT;**  
**HARIRI, ROBERT J.;**  
**LABAZZO, KRISTEN S.;**  
**PERIERA, MARIAN;**  
**WANG, JIA-LUN y**  
**YE, QIAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 549 111 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**

Poblaciones de células madre placentarias

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/754.968, presentada el 29 de diciembre de 2005; y reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/846.641, presentada el 22 de septiembre de 2006.

**1. Campo de la invención**

La presente invención proporciona células madre placentarias aisladas, poblaciones de células madre placentarias, composiciones que comprenden las células madre y métodos de obtención de las células madre.

**2. Antecedentes de la invención**

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

Se han caracterizado muchos tipos diferentes de células madre de mamífero. Véase, por ejemplo, Caplan et al., patente de Estados Unidos N° 5.486.359 (células madre mesenquimatosas humanas); Boyse et al., patente de Estados Unidos N° 5.004.681 (células madre y progenitoras hematopoyéticas fetales y neonatales); Boyse et al., U.S. 5.192.553 (lo mismo); Beltrami et al., *Cell* 114(6): 763-765 (2003) (células madre cardíacas); Forbes et al., *J. Pathol.* 197(4): 510-518 (2002) (células madre hepáticas). Sangre del cordón umbilical, y células nucleadas totales obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical, se han usado en trasplantes para restaurar, parcial o completamente, la función hematopoyética en pacientes que han sido sometidos a terapia de ablación.

**3. Sumario de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a células madre placentarias adherentes aisladas, poblaciones de células madre placentarias, composiciones que comprenden las células madre, y métodos de obtención de las células madre.

Específicamente, la presente invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende aislar células madre placentarias de otras células placentarias, en el que las células madre placentarias se adhieren a un sustrato, y determinar que dichas células madre placentarias expresan CD200; en el que dichas células madre placentarias aisladas constituyen dicha población.

De acuerdo con una realización, el método comprende adicionalmente determinar que dichas células madre placentarias son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>.

De acuerdo con otra realización, el método comprende adicionalmente determinar que dichas células madre placentarias son CD90<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>.

De acuerdo con una realización adicional, al menos 70% de las células en dicha población de células son dichas células madre placentarias.

De acuerdo con una realización adicional, al menos 90%, o al menos 99% de las células en dicha población de células son dichas células madre placentarias.

De acuerdo con una realización adicional, al menos 90% de dichas células madre placentarias son de origen no materno.

De acuerdo con una realización adicional, dicha población de células se expande después de dicho aislamiento.

De acuerdo con una realización adicional, el método comprende adicionalmente transformar dichas células madre placentarias en dicha población de células con una secuencia de ADN que codifica una proteína promotora del crecimiento; y exponer a dichas células madre placentarias a condiciones que promueven la producción de dicha proteína promotora del crecimiento.

De acuerdo con una realización adicional, dichas células madre placentarias están determinadas para expresar un gen para dicha CD200 a un nivel notoriamente más elevado que una célula madre mesenquimatosa obtenida a partir de médula ósea que se ha sometido al mismo número de pases en cultivo que dichas células madre placentarias.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de preparación de un banco de células madre placentarias, que comprende:

(a) expandir células madre placentarias de cultivo primario procedentes de una placenta postparto humana que se adhieren a un sustrato para una primera pluralidad de duplicaciones de la población y crioconservar dichas células madre placentarias expandidas para formar un banco de células patrón;

(b) expandir una pluralidad de células madre placentarias procedentes del banco de células patrón para una segunda pluralidad de duplicaciones de la población y crioconservar dichas células madre placentarias expandidas para formar un banco de células de trabajo;

- 5 (c) expandir una pluralidad de células madre placentarias procedentes del banco de células de trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de la población;  
determinar que dichas células madre placentarias procedentes de la etapa (a), (b) y/o (c) expresan CD200; y crioconservar dichas células madre placentarias expandidas en dosis individuales,

en el que dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células madre placentarias.

- 10 En otro aspecto, la invención proporciona una población de células madre placentarias adherentes aisladas, en la que dichas células madre placentarias son CD200<sup>+</sup>.

De acuerdo con una realización, las células madre placentarias en la población de células de la invención son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>.

De acuerdo con una realización, las células madre placentarias en la población de células de la invención son adicionalmente CD90<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>.

- 15 De acuerdo con una realización adicional, las células madre placentarias se han sometido a un pase al menos 6 veces.

De acuerdo con una realización adicional, las células madre placentarias se han sometido a un pase al menos de 5 a 10 veces.

- 20 De acuerdo con una realización adicional, las células madre placentarias se han sometido a un pase no más de 5 a 10 veces.

De acuerdo con una realización adicional, al menos 90% de las células en la población de células de la invención son dichas células madre placentarias.

De acuerdo con una realización adicional, al menos 90%, o al menos 99% de dichas células madre placentarias en la población de células de la invención son de origen no materno.

- 25 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende la población de células de la invención, y un medio condicionado por dicha población, o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición está en una forma adecuada para administración intravenosa.

- 30 Dentro de los límites de la presente invención, referencia a células madre placentarias de la invención en la siguiente descripción implica que dichas células son CD200<sup>+</sup>. Las células pueden ser opcionalmente positivas o negativas para otros marcadores celulares.

- 35 Por lo tanto, la invención se refiere en primer lugar a células madre aisladas, y poblaciones de células que comprenden dichas células madre, en las que las células madre están presentes, y aislables a partir de tejido placentario (por ejemplo, amnios, corion, cotiledones placentarios, etc.). Las células madre placentarias muestran una o más características de una célula madre (por ejemplo, muestran marcadores asociados con células madre, se replican al menos 10-20 veces en cultivo en un estado indiferenciado, se diferencian en células adultas representativas de las tres capas germinales, etc.), y se pueden adherir a un sustrato para cultivo tisular (por ejemplo, plástico para cultivo tisular tal como la superficie de una placa para cultivo tisular o una placa de múltiples pocillos).

- 40 En una realización, la invención se refiere a una célula madre placentaria aislada que es CD200<sup>+</sup>. Dicha célula madre puede ser CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> o CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Dicha célula madre facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode a partir de una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

- 45 En otra realización, la invención proporciona una población de células placentarias aisladas que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre CD200<sup>+</sup>. En diversas realizaciones, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% o más de dichas células placentarias aisladas son células madre CD200<sup>+</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD34<sup>-</sup>, CD35<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otras realizaciones específicas, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, se ha sometido a un pase al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces. En otra realización específica, dicha población forma uno o más cuerpos de tipo embriode cuando se cultiva en condiciones que permiten la

formación de cuerpos de tipo embrioide.

La invención proporciona por ejemplo, una célula madre aislada que es CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, y CD200<sup>+</sup>. Dicha célula madre puede ser también HLA-G<sup>+</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Como alternativa, dicha célula madre puede ser CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup>. Específicamente, dicha célula madre puede ser CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto, dicha célula madre facilita el desarrollo de uno o más cuerpos de tipo embrioide a partir de una población de células placentarias aisladas que comprende la célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

La invención proporciona además una población de células placentarias aisladas que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. En diversos ejemplos, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células placentarias aisladas son células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. Además, dichas células madre pueden ser HLA-G<sup>+</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto más específico, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, se ha sometido a un pase al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces. En otra realización específica, dicha población forma uno o más cuerpos de tipo embrioide en cultivo en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

La invención también se refiere a una célula madre aislada que es CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto específico, la célula madre es CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto más específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Estas células madre facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide a partir de una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otro aspecto, la invención se refiere a una población de células aisladas que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>. En diversos ejemplos, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células placentarias aisladas son células madre CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto más específico, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, se ha sometido a un pase al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces. En otro aspecto específico, dicha población forma uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

En otro aspecto, la invención también proporciona una célula madre aislada que es CD200<sup>+</sup> y además CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> y que facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En un aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es OCT4<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dicha célula madre es OCT4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>.

La invención proporciona además una población de células placentarias aisladas que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, dichas células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, en la que dicha población forma uno o más cuerpos de tipo embrioide en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En diversos ejemplos, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células placentarias aisladas son células madre CD73<sup>+</sup>, CD 105<sup>+</sup>. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dichas células madre son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, se ha sometido a un pase al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces.

La invención proporciona además una célula madre aislada que es CD200<sup>+</sup> y además CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD200<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide a partir de una población de células placentarias aisladas que comprende células madre placentarias en cultivo en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.

La invención proporciona además una población de células placentarias aisladas que comprende, por ejemplo, que

está enriquecida en, dichas células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En diversos ejemplos, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células placentarias aisladas son células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD200<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dichas células madre son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, se ha sometido a un pase al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces. En otro aspecto específico, dicha población forma cuerpos de tipo embriode cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

La invención proporciona además una célula madre aislada que es CD200<sup>+</sup> y además OCT-4<sup>+</sup> y que facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En un aspecto específico, dicha célula madre es CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD200<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dicha célula madre es CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>.

En la presente memoria también se desvela una población de células aisladas que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, dichas células madre placentarias OCT-4<sup>+</sup>, en la que dicha población forma uno o más cuerpos de tipo embriode, cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En diversos ejemplos, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de dichas células placentarias aisladas son células madre placentarias OCT4<sup>+</sup>. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD73<sup>+</sup> y CD 105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD347<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha población ha sido expandida, por ejemplo, se ha sometido a un pase al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces.

La invención proporciona además una población aislada de las células madre placentarias descritas en la presente memoria que se produce de acuerdo con un método que comprende perfundir una placenta de mamífero a la que se le ha drenado la sangre del cordón umbilical y ha sido perfundida para eliminar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una solución de perfusión; y recoger dicha solución de perfusión, en el que dicha solución de perfusión después de la perfusión comprende una población de células placentarias que comprende células madre placentarias; y aislar una pluralidad de dichas células madre placentarias a partir de dicha población de células. En una realización específica, se hace pasar a la solución de perfusión a través de tanto la vena umbilical como de arterias umbilicales y es recogida después de que exuda de la placenta. En otra realización específica, se hace pasar a la solución de perfusión a través de la vena umbilical y se recoge a partir de las arterias umbilicales, o se le hace pasar a través de las arterias umbilicales y se recoge a partir de la vena umbilical.

La invención proporciona además una población aislada de las células madre placentarias descritas en la presente memoria que se produce de acuerdo con un método que comprende digerir tejido placentario con una enzima de ruptura de tejidos para obtener una población de células placentarias que comprende células madre placentarias, y aislar una pluralidad de células madre placentarias a partir del resto de dichas células placentarias. En realizaciones específicas, dicho tejido placentario es una placenta completa, una membrana amniótica, corion, una combinación de amnios y corion, o una combinación de cualquiera de las anteriores. En otra realización específica, la enzima de ruptura de tejidos es tripsina o colagenasa.

Las células madre aisladas anteriores pueden expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más elevado que una célula madre mesenquimatosa obtenida a partir de médula ósea, en los que dichos uno o más genes se seleccionan entre el grupo constituido por ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, ILIA, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A, y en los que dicha célula madre obtenida a partir de médula ósea se ha sometido a un número de pases en cultivo equivalente al número de pases que ha experimentado dicha célula madre placentaria. Secuencias correspondientes a estos genes se encuentran en matrices multigénicas ("arrays") GENECHIP® de Affymetrix. Estos genes también pueden encontrarse en los números de acceso del GenBank NM\_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM\_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM\_001845 (COL4A1), NM\_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM\_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM\_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM\_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (ILIA), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NK\_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM\_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 o BC065328 (SLC12A8), BC025697

(TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN, y BC005001 (ZC3H12A) a partir de diciembre de 2006.

Dichas células madre pueden expresar ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A a un nivel notoriamente más elevado que una célula madre mesenquimatosa obtenida a partir de médula ósea.

Cualquiera de las poblaciones de células madre aisladas anteriores puede expresar uno o más genes a un nivel notoriamente más elevado que una población de células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea, en la que dichos uno o más genes se seleccionan entre el grupo constituido por ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A, y en la que dicha población de células madre obtenidas a partir de médula ósea se ha sometido a un número de pases en cultivo equivalente al número de pases que ha experimentado dicha célula madre placentaria, y en la que dicha población de células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea tiene un número de células equivalente a dicha población de células madre aisladas. La población de células madre aisladas puede expresar ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A a un nivel notoriamente más elevado que dicha población de células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea aisladas.

La invención también se refiere a métodos de selección de una de las poblaciones de células mencionadas anteriormente, que comprende seleccionar células que expresan uno o más genes a un nivel notoriamente más elevado que una célula madre mesenquimatosa obtenida a partir de médula ósea, en los que uno o más genes se seleccionan entre el grupo constituido por ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A, y en los que dicha célula madre obtenida a partir de médula ósea se ha sometido a un número de pases en cultivo equivalente al número de pases que ha experimentado dicha célula madre placentaria. En un aspecto más específico, dicha selección comprende seleccionar células que expresan ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A a un nivel notoriamente más elevado que una célula madre mesenquimatosa obtenida a partir de médula ósea.

La invención también proporciona composiciones que comprenden una o más de las células madre de la invención, en las que la célula madre ha sido aislada a partir de la placenta. Por lo tanto, la invención proporciona además una composición que comprende una célula madre, en la que dicha célula madre es, por ejemplo, CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto más específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una célula madre, en la que dicha célula madre es CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre es HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>+</sup>.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una célula madre, en la que dicha célula madre es CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre es CD73<sup>+</sup> y GD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>.

En otro aspecto, la invención también proporciona una composición que comprende una célula madre que es CD200<sup>+</sup> y además CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>, en la que dicha célula madre facilita la formación de un cuerpo similar a embrioides en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre en condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a embrioides. En un aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es OCT-4<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>.

En otro aspecto más, la invención proporciona una composición que comprende una célula madre que es CD200<sup>+</sup> y

además CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es OCT-4<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>.

5 En otro aspecto, en la presente memoria se desvela una composición que comprende una célula madre que es OCT-4<sup>+</sup>, en la que dicha célula madre facilita la formación de un cuerpo similar a embriode en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre en condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a embriode. En un aspecto específico, dicha célula madre es CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>.

10 En ejemplos más específicos de las composiciones anteriores, dicha célula madre expresa uno o más genes a un nivel notoriamente más elevado que una célula madre mesenquimatosa obtenida a partir de médula ósea, en la que dichos uno o más genes se seleccionan entre el grupo constituido por ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A, y en la que dicha célula madre obtenida a partir de médula ósea se ha sometido a un número de pases en cultivo equivalente al número de pases que ha experimentado dicha célula madre placentaria.

15 En un aspecto más específico de las composiciones anteriores, dichas células madre expresan ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FIJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN y ZC3H12A a un nivel notoriamente más elevado que una población de células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea aisladas, en los que dicha población de células madre y dicha población de células mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea tienen números de células equivalentes.

20

25

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

30 En otra realización más específica, dicha matriz comprende una proteína de la membrana extracelular. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto sintético. En otra realización más específica, dicha matriz comprende un compuesto bioactivo. En otra realización más específica, dicho compuesto bioactivo es un factor de crecimiento, citoquina, anticuerpo, o molécula orgánica de menos de 5.000 daltons.

En otra realización, la invención proporciona además una composición que comprende un medio condicionado por cualquiera de las células madre anteriores, o cualquiera de las poblaciones de células madre anteriores. Cualquiera de dichas composiciones puede comprender una célula madre que no se obtiene a partir de una placenta tal como una célula madre mesenquimatosa, una célula madre obtenida a partir de médula ósea, una célula progenitora hematopoyética, una célula madre somática. En un aspecto aún más específico, dicha célula madre somática es una célula madre neural, una célula madre hepática, una célula madre pancreática, una célula madre endotelial, una célula madre cardíaca o una célula madre muscular.

35

40

La invención también proporciona métodos para producir poblaciones de células madre obtenidas a partir de placenta de mamífero que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD200; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En una realización, la invención proporciona un método de producción de una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD105 y CD200; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otra realización, la invención proporciona un método de producción de una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y OCT-4; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otra realización más, la invención proporciona un método de producción de una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200, CD73 y CD105, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode, cuando se cultivan con una población de células placentarias en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otra realización, la invención proporciona un método de producción de una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD200, CD73, CD105 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. La invención también proporciona un método de producción de una población de células, que comprende seleccionar células que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD200 y OCT-4, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode, cuando se cultivan con una población de células placentarias en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En una realización específica de cualquiera de los métodos anteriores, dicho sustrato comprende fibronectina. Los métodos pueden comprender además seleccionar células que expresan ABC-p. En otro aspecto, los métodos comprenden seleccionar células que muestran al menos una característica específica de una célula madre mesenquimatosa.

45

50

55

60

Dicha características específica de una célula madre mesenquimatosa es la expresión de CD29, la expresión de CD44, la expresión de CD90, o la expresión de una combinación de las anteriores. Como alternativa, dicha selección se consigue usando un anticuerpo, o citometría de flujo, o perlas magnéticas, o mediante clasificación de células activadas por fluorescencia. Dicha población de células también puede expandirse.

- 5 Puede producirse una línea de células madre mediante un método que comprende transformar una célula madre con una secuencia de ADN que codifica una proteína promotora del crecimiento; y exponer a dicha célula madre a condiciones que promueven la producción de dicha proteína promotora del crecimiento. Dicha proteína promotora del crecimiento puede ser v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande de SV40, antígeno T grande de polioma, adenovirus Ela o proteína E7 de papilomavirus humano. Dicha secuencia de ADN puede ser regulable. Más  
10 específicamente, dicha secuencia de ADN es regulable por tetraciclina. Dicha proteína promotora del crecimiento puede tener una actividad regulable. Específicamente, dicha proteína promotora del crecimiento puede ser un mutante sensible a temperatura.

La invención se refiere, además, a poblaciones de células madre crioconservadas. Por ejemplo, la invención  
15 proporciona una población de células madre CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, en la que dichas células madre han sido crioconservadas, y en la que dicha población está contenida dentro de un recipiente. La invención también proporciona una población de células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, en la que dichas células madre han sido crioconservadas, y en la que dicha población está contenida dentro de un recipiente. También se proporciona una población de células madre CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>, en la que dichas células madre han sido crioconservadas, y en la que dicha población está contenida dentro de un recipiente. También se proporciona una población de células madre  
20 CD200<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, en la que dichas células madre han sido crioconservadas, y en la que dicha población está contenida dentro de un recipiente, y en la que dichas células madre facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide, cuando se cultivan con una población de células placentarias en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. Se proporciona además una población de células madre CD200<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, en la que dichas células madre han sido crioconservadas, y en la que dicha población está  
25 contenida dentro de un recipiente. La invención también proporciona una población de células madre CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>, en la que dichas células madre han sido crioconservadas, en la que dicha población está contenida dentro de un recipiente, y en la que dichas células madre facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide, cuando se cultivan con una población de células placentarias en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. En una realización específica de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dicho  
30 recipiente es una bolsa. En diversas realizaciones específicas, dicha población comprende aproximadamente, al menos, o como máximo 1 x 10<sup>6</sup> de dichas células madre, 5 x 10<sup>6</sup> de dichas células madre, 1 x 10<sup>7</sup> de dichas células madre, 5 x 10<sup>7</sup> de dichas células madre, 1 x 10<sup>8</sup> de dichas células madre, 5 x 10<sup>8</sup> de dichas células madre, 1 x 10<sup>9</sup> de dichas células madre, 5 x 10<sup>9</sup> de dichas células madre, o 1 x 10<sup>10</sup> de dichas células madre. En otras realizaciones específicas de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células madre se han sometido a un  
35 pase aproximadamente, al menos, o no más de 5 veces, no más de 10 veces, no más de 15 veces o no más de 20 veces. En otra realización específica de cualquiera de las poblaciones crioconservadas anteriores, dichas células madre han sido expandidas dentro de dicho recipiente.

### 3.1 DEFINICIONES

40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "SH2" se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo en el marcador CD105. Por lo tanto, las células que se denominan como SH2<sup>+</sup> son CD105<sup>+</sup>.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "SH3" y "SH4" se refieren a anticuerpos que se unen a epítopos presentes en el marcador CD73. Por lo tanto, las células que se denominan como SH3<sup>+</sup> y/o SH4<sup>+</sup> son CD73<sup>+</sup>.

45 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre aislada" significa una célula madre que está sustancialmente separada de otras, células no madre del tejido, por ejemplo, placenta, del que procede la célula madre. Una célula madre está "aislada" si al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o al menos 99% de las células no madre con las que la célula madre está asociada de forma natural, o células madre que presentan un perfil de marcador diferente, se retiren de la célula madre, por ejemplo, durante la recogida y/o el cultivo de la célula madre.

50 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "población de células aisladas" significa una población de células que está sustancialmente separada de otras células del tejido, por ejemplo, placenta, del que procede la población de células. Una célula madre está "aislada" si al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o al menos 99% de las células con las que la población de células, o las células de que procede la población de células, están asociadas de forma natural, es decir, células madre que presentan un perfil de marcador diferente, se retiran de la  
55 célula madre, por ejemplo, durante la recogida y/o el cultivo de la célula madre.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre placentaria" se refiere a una célula madre o célula progenitora que obtiene a partir de una placenta de mamífero, independientemente de la morfología, los marcadores de la superficie celular, o el número de pases después de un cultivo primario. La expresión "célula madre placentaria" tal como se usa en la presente memoria, no se refiere, sin embargo, a un trofoblasto. Una célula

5 se considera una “célula madre” si la célula conserva al menos un atributo de una célula madre, por ejemplo, un perfil de marcador o de expresión génica asociado con uno o más tipos de células madre; la capacidad de replicarse al menos 10-40 veces en cultivo, la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales; la falta de características de células adultas (es decir, diferenciadas), o similares. Las expresiones “célula madre placentaria” y “célula madre obtenida a partir de la placenta” pueden usarse de forma intercambiable.

10 Tal como se usa en la presente memoria, una célula madre es “positiva” para un marcador particular cuando ese marcador es detectable por encima del fondo. Por ejemplo, una célula madre placentaria es positiva para, por ejemplo, CD73 porque CD73 es detectable en células madre placentarias en una cantidad notoriamente mayor que el fondo (en comparación con, por ejemplo, un control de isotipo). Una célula es también positiva para un marcador cuando ese marcador puede usarse para distinguir la célula de al menos otro tipo de célula, o puede usarse para seleccionar o aislar la célula cuando está presente o es expresada por la célula. En el contexto de, por ejemplo, la detección mediada por anticuerpo, “positivo/a”, como una indicación de que un marcador de la superficie celular particular está presente, significa que el marcador es detectable usando un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo marcado de forma fluorescente, específico para ese marcador; “positivo/a” también significa que una célula porta ese marcador en una cantidad que produce una señal, por ejemplo, en un citómetro, que está notoriamente por encima del fondo. Por ejemplo, una células es “CD200<sup>+</sup>” cuando la célula está marcada notoriamente con un anticuerpo específico para CD200, y la señal procedente del anticuerpo es notoriamente más elevada que un control (por ejemplo, fondo). A la inversa, “negativo/a” en el mismo contexto significa que el marcador de la superficie celular no es detectable usando un anticuerpo específico para ese marcador en comparación con el fondo. Por ejemplo, una célula es “CD34<sup>-</sup>” cuando la célula no está marcada notoriamente con un anticuerpo específico para CD34. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, los marcadores de grupo de diferenciación (“CD” por sus siglas en inglés) se detectan usando anticuerpos. Se determina que OCT-4 está presente, y una célula es “OCT-4<sup>+</sup>” si OCT-4 es detectable usando RT-PCR.

#### 4. Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: viabilidad de células madre placentarias procedentes de perfusión (A), amnios (B), corion (C), amnios-placa coriónica (D) o cordón umbilical (E). Los números en el eje X designan la placenta a partir de la cual se obtuvieron las células madre.

30 Figura 2: porcentaje de células HLA ABC/CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> procedentes de perfusión (A), amnios (B), corion (C), amnios-placa coriónica (D) o cordón umbilical (E) según lo determinado por FACSCalibur. Los números en el eje X designan la placenta a partir de la cual se obtuvieron las células madre.

Figura 3: porcentaje de células HLA ABC/CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> procedentes de perfusión (A), amnios (B), corion (C), amnios-placa coriónica (D) o cordón umbilical (E), según lo determinado por FACS Aria. Los números en el eje X designan placenta a partir de la cual se obtuvieron las células madre.

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

Figura 5: expresión de HLA-G, CD 10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD 105, CD 117, CD200 en células madre obtenidas a partir del amnios.

Figura 6: expresión de HLA-G, CD 10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD 105, CD 117, CD200 en células madre obtenidas a partir del corion.

40 Figura 7: expresión de HLA-G, CD 10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD 105, CD 117, CD200 en células madre obtenidas a partir de amnios-placa coriónica.

Figura 8: expresión de HLA-G, CD 10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD 105, CD 117, CD200 en células madre obtenidas a partir de cordón umbilical.

45 Figura 9: expresión promedio de la expresión de HLA-G, CD 10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD 105, CD 117, CD200 en células madre obtenidas a partir de perfusión (A), amnios (B), corion (C), amnios-placa coriónica (D) o cordón umbilical (E).

50 Figura 10: evoluciones temporales de cultivo para líneas celulares de amnios/corion (AC), cordón umbilical (UC), célula madre obtenida a partir de médula ósea (BM-MS) y fibroblasto dérmico humano (NHDF) usadas en este estudio. Todos los cultivos se hicieron crecer y se propagaron usando las mismas densidades de siembra y pase. Los círculos indican qué cultivos se usaron para aislamiento de ARN. Los cultivos tardíos se recogieron justo antes de la senescencia. Dos cultivos de UC se recogieron a las 38 duplicaciones (UC-38) para comparar el efecto de la tripsinización sobre la expresión génica. Todos los demás cultivos se lisaron directamente en sus matraces de cultivo antes del aislamiento de ARN.

55 Figura 11: Gráfico de líneas de los niveles de expresión relativa de 8215 genes en células de amnios/corion (AC), cordón umbilical (UC), célula madre obtenida a partir de médula ósea (BM-MS) y fibroblasto dérmico humano (DF).

El número asociado con cada designación de línea celular en el eje X indica el número de días que la línea celular se cultivó antes de la evaluación de los niveles de expresión génica. El gráfico se generó a partir de datos de expresión de ARN analizados mediante el software GeneSpring. Se usó AC-03 como condición seleccionada.

5 Figura 12: Subconjunto de toda la lista de genes que muestra genes sobreexpresados  $\geq 6$  veces en AC-03 para células de amnios/corion (AC), cordón umbilical (UC), célula madre obtenida a partir de médula ósea (BM-MS) y fibroblasto dérmico humano (DF). El número asociado con cada designación de línea celular en el eje X indica el número de días que se cultivó la línea celular antes de la evaluación de los niveles de expresión génica. El diagrama se generó a partir de datos de expresión de ARN analizados mediante el software GeneSpring. Se usó AC-03 como condición seleccionada.

10 Figura 13: Genes específicos de célula madre placentaria o específicos de célula madre del cordón umbilical descubiertos mediante filtración por nivel de cambio para células de amnios/corion (AC), cordón umbilical (UC), célula madre obtenida a partir de médula ósea (BM-MS) y fibroblasto dérmico humano (DF). El número asociado con cada designación de línea celular en el eje X indica el número de días que se cultivó la línea celular antes de la evaluación de los niveles de expresión génica. El diagrama se generó a partir de datos de expresión de ARN analizados mediante el software GeneSpring. Se usó AC-03 como condición seleccionada.

### 5. Descripción detallada de la invención

20 Específicamente, la presente invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende aislar células madre placentarias de otras células placentarias, en el que las células madre placentarias se adhieren a un sustrato, y determinar que dichas células madre placentarias expresan CD200; en el que dichas células madre placentarias aisladas constituyen dicha población de células.

De acuerdo con una realización, el método comprende adicionalmente determinar que dichas células madre placentarias son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>.

De acuerdo con otra realización, el método comprende adicionalmente determinar que dichas células madre placentarias son CD90<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>.

25 De acuerdo con una realización adicional, al menos 70% de las células en dicha población de células son dichas células madre placentarias.

De acuerdo con una realización adicional, al menos 90% o al menos 99% de las células en dicha población de células son dichas células madre placentarias.

30 De acuerdo con una realización adicional, al menos 90% de dichas células madre placentarias son de origen no materno.

De acuerdo con una realización adicional, dicha población de células se expande después de dicho aislamiento.

35 De acuerdo con una realización adicional, el método comprende adicionalmente transformar dichas células madre placentarias en dicha población de células con una secuencia de ADN que codifica una proteína promotora del crecimiento; y exponer a dichas células madre placentarias a condiciones que promueven la producción de dicha proteína promotora del crecimiento.

De acuerdo con una realización adicional, se determina que dichas células madre placentarias expresan un gen para dicho CD200 a un nivel notoriamente más elevado que una célula madre mesenquimatosas obtenida a partir de médula ósea que se ha sometido al mismo número de pases en cultivo que dichas células madre placentarias.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un método de preparación de un banco de células madre placentarias, que comprende:

(a) expandir células madre placentarias de cultivo primario procedentes de una placenta postparto humana que se adhieren a un sustrato para una primera pluralidad de duplicaciones de la población y crioconservar dichas células madre placentarias expandidas para formar un banco de células patrón;

45 (b) expandir una pluralidad de células madre placentarias procedentes del banco de células patrón para una segunda pluralidad de duplicaciones de la población y crioconservar dichas células madre placentarias expandidas para formar un banco de células de trabajo;

(c) expandir una pluralidad de células madre placentarias procedentes del banco de células de trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de la población;

determinar que dichas células madre placentarias procedentes de la etapa (a), (b) y/o (c) expresan CD200; y

50 crioconservar dichas células madre placentarias expandidas en dosis individuales,

en el que dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células madre placentarias.

En otro aspecto, la invención proporciona una población de células madre placentarias adherentes aisladas, en la que dichas células madre placentarias son CD200<sup>+</sup>.

5 De acuerdo con una realización, las células madre placentarias en la población de células de la invención son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>.

De acuerdo con una realización, las células madre placentarias en la población de células de la invención son adicionalmente CD90<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>.

De acuerdo con una realización adicional, las células madre placentarias se han sometido a un pase al menos 6 veces.

10 De acuerdo con una realización adicional, las células madre placentarias se han sometido a un pase al menos de 5 a 10 veces.

De acuerdo con una realización adicional, las células madre placentarias se han sometido a un pase no más de 5 a 10 veces.

15 De acuerdo con una realización adicional, al menos 90% de las células en la población de células de la invención son dichas células madre placentarias.

De acuerdo con una realización adicional, al menos 90%, o al menos 99% de dichas células madre placentarias en la población de células de la invención son de origen no materno.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende la población de células de la invención, y un medio condicionado por dicha población o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización, la composición está en una forma adecuada para administración intravenosa.

### 5.1 CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS Y POBLACIONES DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

25 Las células madre placentarias son células madre, obtenibles de una placenta o parte de la misma, que se adhieren a un sustrato para cultivo tisular y tienen la capacidad de diferenciarse en tipos de células no placentarias. Las células madre placentarias pueden ser de origen fetal o materno (es decir, pueden tener el genotipo del feto o de la madre, respectivamente). Preferentemente, las células madre placentarias y las poblaciones de células madre placentarias de la invención son de origen fetal. Las poblaciones de células madre placentarias, o poblaciones de células que comprenden células madre placentarias, pueden comprender células madre placentarias que son exclusivamente de origen fetal o materno, o pueden comprender una población mixta de células madre placentarias de origen tanto fetal como materno. Las células madre placentarias, y poblaciones de células que comprenden las

30 células madre placentarias, pueden identificarse y seleccionarse mediante las características morfológicas, de marcador y de cultivo descritas a continuación.

#### 5.1.1 Características físicas y morfológicas

35 Las células madre placentarias de la presente invención, cuando se cultivan en cultivos primarios o en cultivo celular, se adhieren al sustrato para cultivo tisular, por ejemplo, la superficie de un recipiente para cultivo tisular (por ejemplo, plástico para cultivo tisular). Las células madre placentarias en cultivo asumen un aspecto estrellado generalmente fibroblastoide, con una serie de procesos citoplasmáticos que se extienden desde el cuerpo celular central. Las células madre placentarias son, sin embargo, morfológicamente diferenciables de fibroblastos cultivados en las mismas condiciones, dado que las células madre placentarias muestran un mayor número de dichos procesos que los fibroblastos. Morfológicamente, las células madre placentarias también son diferenciables de células madre hematopoyéticas, que generalmente asumen una morfología más redondeada o de adoquín en cultivo.

40

#### 5.1.2 Marcadores moleculares y genéticos de la superficie celular

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

50 Las células madre placentarias generalmente expresan los marcadores CD73, CD105, CD200, HLA-G y/o OCT-4, y no expresan CD34, CD38 o CD45. Las células madre placentarias también pueden expresar HLA-ABC (MHC-1) y HLA-DR. Estos marcadores pueden usarse para identificar células madre placentarias, y para distinguir células

madre placentarias de otros tipos de células madre. Dado que las células madre placentarias pueden expresar CD73 y CD105, pueden tener características similares a células madre mesenquimatosas. Sin embargo, dado que las células madre placentarias pueden expresar CD200 y HLA-G, un marcador específico fetal, pueden distinguirse de las células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea, que no expresan CD200 ni HLA-G. De la misma manera, la falta de expresión de CD34, CD38 y/o CD45 identifica las células madre placentarias como células madre no hematopoyéticas.

Por lo tanto, la invención proporciona una célula madre aislada que es CD200<sup>+</sup>. Específicamente, dicha célula madre es una célula madre placentaria. Dicha célula madre puede ser CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Como alternativa, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Dicha célula madre CD200<sup>+</sup> o HLA-G<sup>+</sup> facilita la formación de cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende las células madre, en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. Dicha célula madre placentaria es aislada de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria es aislada de células madre placentarias que no presentan estos marcadores.

La invención también se refiere a un método de selección de una célula madre placentaria entre una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una célula placentaria CD200<sup>+</sup> o HLA-G<sup>+</sup>, con lo que dicha célula es una célula madre placentaria. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es tanto CD200<sup>+</sup> como HLA-G<sup>+</sup>. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también facilita la formación de cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende las células madre, en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

En una realización, la invención proporciona una población aislada de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre CD200<sup>+</sup>. En una realización específica, dicha población es una población de células placentarias. En diversas realizaciones, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% o al menos aproximadamente 60% de dichas células son células madre CD200<sup>+</sup>. Preferentemente, al menos aproximadamente 70% de dichas células son células madre CD200<sup>+</sup>. Más preferentemente, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de dichas células son células madre CD200<sup>+</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Dicha población aislada produce uno o más cuerpos de tipo embriode cuando se cultivan en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. Dicha población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estos marcadores.

La invención también se refiere a un método de selección de una población de células madres placentarias entre una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en la que al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de dichas células son células madre CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Específicamente, dicha selección también comprende seleccionar una población de células madre placentarias que forma uno o más cuerpos de tipo embriode, cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

La invención proporciona, por ejemplo, una célula madre aislada que es CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. En una realización específica, dicha célula madre aislada es una célula madre placentaria aislada. Dicha célula madre puede ser HLA-G<sup>+</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Como alternativa, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto más específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. La célula madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> aislada facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende la célula madre, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. Dicha célula madre placentaria se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria se aísla de células madre placentarias que no presentan estos marcadores.

La invención también se refiere a un método de selección una célula madre placentaria entre una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una célula placentaria CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, y CD200<sup>+</sup>, con lo que dicha

- célula es una célula madre placentaria. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Además, dicha selección puede comprender adicionalmente seleccionar una célula madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup> que facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende la célula madre, cuando la población se cultiva en condiciones que facilitan la formación de cuerpos de tipo embrioide.
- La invención proporciona además una población aislada de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. En una realización específica, dichas células madre son células madre placentarias. En diversos ejemplos, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% o al menos aproximadamente 60% de dichas células son células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 70% de dichas células en dicha población de células son células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de dichas células en dicha población de células son células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. Además, dichas células madre pueden ser HLA-G<sup>+</sup>. Dichas células madre pueden ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Como alternativa, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto más específico, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Dicha población de células produce uno o más cuerpos de tipo embrioide cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. Además, dicha población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características.
- La invención también se refiere a un método de selección de una población de células madres placentarias entre una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en la que al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de dichas células son células madre CD73<sup>+</sup>, CD 105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. Dicha selección comprende seleccionar células madre que también pueden ser HLA-G<sup>+</sup>. Además, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Como alternativa, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Dicha selección adicionalmente comprende seleccionar una población de células placentarias que produce uno o más cuerpos de tipo embrioide, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.
- La invención también se refiere a una célula madre aislada que es CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto específico, la célula madre es CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En un aspecto específico, la célula madre es una célula madre placentaria. En otro aspecto específico, dicha célula madre es HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto más específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. La célula madre facilita la producción de uno o más cuerpos de tipo embrioide por una población de células placentarias que comprende la célula madre, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide. Dicha célula madre placentaria se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria se aísla de células madre placentarias que no presentan estos marcadores.
- La invención también se refiere a un método de selección de una célula madre placentaria entre una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una célula placentaria CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>, con lo que dicha célula es una célula madre placentaria. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Dicha selección comprende seleccionar una célula madre placentaria que también facilita la producción de uno o más cuerpos de tipo embrioide por una población de células placentarias que comprende la célula madre, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embrioide.
- La invención también proporciona una población aislada de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>. En diversos ejemplos, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% o al menos aproximadamente 60% de dichas células son células madre CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 70% de dichas células son dichas células madre CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de dichas células son dichas células madre CD200<sup>+</sup> OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto específico de las poblaciones aisladas, dichas células madre son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto

específico, dichas células madre son HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto más específico, dichas células madre son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. La población produce uno o más cuerpos de tipo embriode, cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. Dicha población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características.

La invención también se refiere a un método de selección de una población de células madres placentarias entre una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en la que al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de dichas células son células madre CD200<sup>+</sup>, OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también HLA-G<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar células madre que son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son también CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>.

La invención proporciona además una célula madre aislada que es CD200<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En una realización específica, la célula madre es una célula madre placentaria. Dicha célula madre puede ser CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Como alternativa, dicha célula madre puede ser CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es OCT-4<sup>+</sup>. Específicamente, dicha célula madre es CD200<sup>+</sup>. Dicha célula madre también puede ser CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. Dicha célula madre facilita la formación de cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre, cuando la población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. Dicha célula madre placentaria se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características.

La invención también se refiere a un método de selección de una célula madre placentaria entre una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una célula placentaria CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>, con lo que dicha célula es una célula madre placentaria. En un aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también OCT-4<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que es también CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. Dicha selección comprende seleccionar una célula placentaria que también facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode.

La invención también se refiere a una población aislada de células que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En una realización específica, dichas células madre son células madre placentarias. En diversos ejemplos, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% o al menos aproximadamente 60% de dichas células son células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 70% de dichas células son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En otro ejemplo, al menos aproximadamente 90%, 95% o 99% de dichas células son células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. Dichas células madre pueden ser CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Como alternativa, dichas células madre pueden ser CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son OCT-4<sup>+</sup>. Específicamente, dichas células madre son CD200<sup>+</sup>. Dichas células madre también pueden ser CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. Dicha población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características.

La invención también se refiere a un método de selección de una población de células madres placentarias entre una pluralidad de células placentarias, que comprende seleccionar una población de células placentarias en la que una mayoría de dichas células son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>. En un aspecto específico, dicha mayoría de células son también CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y/o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha mayoría de células son también CD200<sup>+</sup>. En otro aspecto específico, dicha mayoría de células son también CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, OCT-4<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>.

La invención se refiere, además, a una célula madre aislada que es CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> y que facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En un aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dicha célula madre es OCT4<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dicha célula madre es OCT4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Dicha célula madre placentaria se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria se aísla de

células madre placentarias que no presentan estas características.

La invención se refiere, además, a una población de células placentarias aisladas que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, en la que dicha población forma uno o más cuerpos de tipo embriode en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En diversos ejemplos, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de dichas células placentarias aisladas son células madre CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son OCT-4<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dichas células madre son OCT-4<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Dicha población ha sido expandida, por ejemplo, se ha sometido a un pase al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces. En otro aspecto específico, dicha población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características.

La invención se refiere, además, a una célula madre aislada que es OCT-4<sup>+</sup> y que facilita la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias aisladas que comprende dicha célula madre cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. Dicha célula madre puede ser CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. Dicha célula madre puede ser además CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. Específicamente, dicha célula madre es CD200<sup>+</sup>. Más específicamente, dicha célula madre es CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Dicha célula madre placentaria se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características.

La invención también se refiere a una población de células aisladas que comprende, por ejemplo, que está enriquecida en, células madre OCT-4<sup>+</sup>, en la que dicha población forma uno o más cuerpos de tipo embriode, cuando se cultiva en condiciones que permiten la formación de cuerpos de tipo embriode. En diversos ejemplos, al menos 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de dichas células placentarias aisladas son células madre OCT4<sup>+</sup>. En un aspecto específico de las poblaciones anteriores, dichas células madre son CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>. En otra realización específica, dichas células madre son CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> o CD45<sup>-</sup>. En otro aspecto específico, dichas células madre son CD200<sup>+</sup>. En un aspecto más específico, dichas células madre son CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup>. Dicha población ha sido expandida, por ejemplo, se ha sometido a un pase al menos una vez, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces. Dicha población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características.

La invención también proporciona una célula madre placentaria aislada que es CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. La invención proporciona además una población aislada de células madre placentarias, en la que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dichas células madre placentarias son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. En un aspecto específico de las realizaciones anteriores, dichas células madre son adicionalmente CD90<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otra realización específica, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características. En otra realización específica, dicha célula madre placentaria aislada es de origen no materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dichas células en dicha población aislada de células madre placentarias, son de origen no materno.

En la presente memoria se desvela una célula madre placentaria aislada que es HLA-A,B,C, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup>. La población aislada de células madre placentarias, en la que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dichas células madre placentarias son HLA-A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria aislada es de origen no materno. En otro aspecto específico, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dichas células en dicha población aislada de células madre placentarias, son de origen no materno. En otro aspecto, la invención se refiere a un método de obtención de una célula madre placentaria que es HLA-A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup> que comprende aislar dicha célula del perfundido placentario.

En la presente memoria se desvela también una célula madre placentaria aislada que es CD10<sup>+</sup> CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup>. En la presente memoria se desvela una población aislada de células madre placentarias, en la que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dichas células madre placentarias son CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria aislada es de origen no materno. En otro aspecto específico, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dichas células en dicha población aislada de células madre placentarias, son de origen no materno. En otro aspecto específico, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características. En otro aspecto, la invención proporciona un método de obtención de una célula madre placentaria que es CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> y CD133<sup>-</sup> que comprende aislar dicha célula del perfundido placentario.

En la presente memoria se desvela una célula madre placentaria aislada que es CD10<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD117<sup>-</sup>. En la presente memoria se desvela una población aislada de células madre placentarias, en la que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dichas células madre placentarias son CD10<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD117<sup>-</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria aislada es de origen no materno. En otro aspecto específico, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos 99% de dichas células en dicha población aislada de células madre placentarias, son de origen no materno. En otro aspecto específico, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características. En otro aspecto, la invención proporciona un método de obtención a célula madre placentaria que es CD10<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD117<sup>-</sup> que comprende aislar dicha célula del perfundido placentario.

En la presente memoria se desvela una célula madre placentaria aislada que es CD10<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD117<sup>-</sup>. En la presente memoria se desvela también una población aislada de células madre placentarias, en la que al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 99% de dichas células madre placentarias son CD10<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> y CD117<sup>-</sup>. En un aspecto específico, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otro aspecto específico, dicha célula madre placentaria aislada es de origen no materno. En otro aspecto específico, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos 99% de dichas células en dicha población aislada de células madre placentarias, son de origen no materno. En otro aspecto específico, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características. En otro aspecto, la invención proporciona un método de obtención de una célula madre placentaria que es CD10<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, y CD117<sup>-</sup> que comprende aislar dicha célula del perfundido placentario.

En una realización, la invención proporciona una célula madre placentaria aislada que es HLA A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, positiva para CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 y/o HLA-G, y/o negativa para CD117. La invención proporciona además una población aislada de células madre placentarias, en la que dichas células madre son HLA A,B,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>, y al menos aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o aproximadamente 99% de las células madre en la población son positivas para CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 y/o HLA-G, y/o negativas para CD 117. En una realización específica, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células placentarias que no son células madre. En otra realización específica, dicha célula madre placentaria aislada es de origen no materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99%, de dichas células en dicha población aislada de células madre placentarias, son de origen no materno. En otra realización específica, dicha célula madre o población de células madre placentarias se aísla de células madre placentarias que no presentan estas características. En otra realización, la invención proporciona un método de obtención a célula madre placentaria que es HLA AB,C<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup> y positiva para CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 y/o HLA-G, y/o negativa para CD117, que comprende aislar dicha célula del perfundido placentario.

En otra realización, la invención proporciona una célula madre placentaria que es CD200<sup>+</sup> y CD10<sup>+</sup>, según lo determinado por unión a anticuerpos, y CD117<sup>-</sup>, según lo determinado tanto por unión a anticuerpos como por RT-PCR. En otra realización, la invención proporciona una célula madre placentaria que es CD10<sup>+</sup>, CD29<sup>-</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, HLA de clase I y  $\beta$ -2-microglobulina<sup>-</sup>. En otra realización, la invención proporciona células madre placentarias, en las que la expresión de al menos un marcador es al menos dos veces mayor que para una célula madre mesenquimatosa (por ejemplo, una célula madre mesenquimatosa obtenida a partir de médula ósea). En otra realización específica, dicha célula madre placentaria aislada es de origen no materno. En otra realización específica, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos 99%, de dichas células en dicha población aislada de células madre placentarias, son de origen no materno.

En la presente memoria se desvela una población aislada de células madre placentarias, en la que una pluralidad de

dichas células madre placentarias son positivas para aldehído deshidrogenasa (ALDH), según lo evaluado mediante un ensayo de actividad aldehído deshidrogenasa. Dichos ensayos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bostian y Betts, *Biochem. J.*, 173, 787, (1978)). En un aspecto específico, dicho ensayo de ALDH usa ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregón) como marcador de actividad aldehído deshidrogenasa. En un aspecto específico, dicha pluralidad está entre aproximadamente 3% y aproximadamente 25% de células en dicha población de células. En otro aspecto, la invención proporciona una población de células madre de cordón umbilical, en la que una pluralidad de dichas células madre de cordón umbilical son positivas para aldehído deshidrogenasa, según lo evaluado mediante un ensayo de actividad aldehído deshidrogenasa que usa ALDEFLUOR® como un indicador de actividad aldehído deshidrogenasa. En un aspecto específico, dicha pluralidad está entre aproximadamente 3% y aproximadamente 25% de células en dicha población de células. En otro aspecto, dicha población de células madre placentarias o células madre de cordón umbilical muestra al menos tres veces, o al menos cinco veces, mayor actividad de ALDH que una población de células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea que tienen el mismo número de células y se cultivan en las mismas condiciones.

La invención proporciona cualquiera de las anteriores células madre placentarias, o poblaciones de células madre placentarias, en la que la célula madre o población de células madre placentarias se ha sometido a un pase al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 veces, o más, o se ha expandido para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones de la población, o más.

En una realización específica de cualquiera de las anteriores células placentarias o poblaciones de células, el cariotipo de las células, o al menos aproximadamente 95% o aproximadamente 99% de las células en dicha población, es normal. En otra realización específica de cualquiera de las anteriores células placentarias o poblaciones de células, las células, o células en la población de células, son de origen no materno.

Células madre placentarias aisladas, o poblaciones de células madre placentarias aisladas, que portan cualquiera de las anteriores combinaciones de marcadores, pueden combinarse en cualquier proporción. La invención también permite el aislamiento de, o el enriquecimiento en, dos o más cualesquiera de las anteriores poblaciones de células madre placentarias para formar una población de células madres placentarias. Por ejemplo, la invención proporciona una población aislada de células madre placentarias que comprende una primera población de células madre placentarias definida por una de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente y una segunda población de células madre placentarias definidas por otra de las combinaciones de marcadores descritas anteriormente, en la que dichas primera y segunda poblaciones se combinan en una proporción de aproximadamente 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, o aproximadamente 99:1. De forma similar, cualesquiera tres, cuatro, cinco o más de las células madre placentarias o poblaciones de células madre placentarias descritas anteriormente pueden combinarse.

La invención se refiere, además, a células madre placentarias que se obtienen por ruptura de tejido placentario, con o sin digestión enzimática, seguida por cultivo (véase la Sección 5.2.3) o perfusión (véase la Sección 5.2.4). Por ejemplo, en la presente memoria se desvela una población aislada de células madre placentarias que se produce de acuerdo con un método que comprende perfundir una placenta de mamífero a la que se le ha drenado la sangre del cordón umbilical y ha sido perfundida para eliminar la sangre residual; perfundir dicha placenta con una solución de perfusión; y recoger dicha solución de perfusión, en la que dicha solución de perfusión después de la perfusión comprende una población de células placentarias que comprende células madre placentarias; y aislar una pluralidad de dichas células madre placentarias de dicha población de células. En un aspecto específico, se hace pasar a la solución de perfusión a través de tanto la vena umbilical como de arterias umbilicales y es recogida después de que exuda de la placenta. Poblaciones de células madre placentarias producidas mediante este método típicamente comprenden una mezcla de células fetales y maternas. En otro aspecto específico, se hace pasar a la solución de perfusión a través de la vena umbilical y se recoge de las arterias umbilicales, o se hace pasar a través de las arterias umbilicales y se recoge de la vena umbilical. Poblaciones de células madre placentarias producidas mediante este método típicamente son de forma sustancial exclusivamente de origen fetal; es decir, por ejemplo, más de 90%, 95%, 99% o 99,5% de las células madre placentarias en la población son de origen fetal.

En diversos ejemplos, las células madre placentarias, contenidas dentro de una población de células obtenidas a partir de perfusión de una placenta, son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de dicha población de células placentarias. En otro aspecto específico, las células madre placentarias recogidas por perfusión comprenden células fetales y maternas. En otro aspecto específico, las células madre placentarias recogidas por perfusión son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% células fetales.

La invención se refiere, además, a una composición que comprende una población de células madre placentarias aisladas recogidas por perfusión, en la que dicha composición comprende al menos una parte de la solución de perfusión usada para recoger las células madre placentarias.

La invención se refiere, además, a una población aislada de las células madre placentarias descritas en la presente memoria que se produce de acuerdo con un método que comprende digerir tejido placentario con una enzima de ruptura de tejidos para obtener una población de células placentarias que comprende células madre placentarias, y aislar una pluralidad de células madre placentarias del resto de dichas células placentarias. Toda, o cualquier parte de, la placenta puede digerirse para obtener células madre placentarias. Por ejemplo, dicho tejido placentario es una

placenta completa, una membrana amniótica, corion, una combinación de amnios y corion, o una combinación de cualquiera de las anteriores. Específicamente, la enzima de ruptura de tejidos es tripsina o colagenasa. En diversos ejemplos, las células madre placentarias, contenidas dentro de una población de células obtenida a partir de la digestión de una placenta, son al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o al menos 99,5% de dicha población de células placentarias.

El perfilado génico confirma que las células madre placentarias aisladas, y poblaciones de células madre placentarias aisladas, son distinguibles de otras células, por ejemplo, células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre obtenidas a partir de médula ósea. Las células madre placentarias descritas en la presente memoria, pueden distinguirse de células madre mesenquimatosas tomando como base la expresión de uno o más genes, cuya expresión es específica de células madre placentarias o células madre de cordón umbilical en comparación con células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea. En particular, células madre placentarias pueden distinguirse de células madre mesenquimatosas tomando como base la expresión de uno o más genes, cuya expresión es significativamente mayor (es decir, al menos dos veces mayor) en células madre placentarias que en células madre mesenquimatosas, en las que los uno o más genes es(son) ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, o una combinación de cualquiera de los anteriores, en la que la expresión de estos genes es mayor en células madre placentarias o células madre de cordón umbilical que en células madre obtenidas a partir de médula ósea, cuando las células madre se cultivan en condiciones equivalentes. En una realización específica, el gen específico de células madre placentarias o gen específico de células madre del cordón umbilical es CD200.

El nivel de expresión de estos genes puede usarse para confirmar la identidad de una población de células placentarias, para identificar una población de células que comprende al menos una pluralidad de células madre placentarias, o similares. La población de células madre placentarias, cuya identidad está confirmada, puede ser clónica, por ejemplo, una población de células madre placentarias expandidas a partir de una única célula madre placentaria, o una población mixta de células madre, por ejemplo, una población de células que comprende únicamente células madre placentarias que se expanden a partir de múltiples células madre placentarias, o una población de células que comprende células madre placentarias y al menos otro tipo de células.

El nivel de expresión de estos genes puede usarse para seleccionar poblaciones de células madre placentarias. Por ejemplo, una población de células, por ejemplo, células expandidas de forma clónica, se selecciona si la expresión de uno o más de estos genes es significativamente mayor en una muestra de la población de células que es una población equivalente de células madre mesenquimatosas. Dicha selección puede ser de una población entre una pluralidad de poblaciones de células madre placentarias, entre una pluralidad de poblaciones de células, cuya identidad no se conoce, etc.

Células madre placentarias pueden seleccionarse tomando como base el nivel de expresión de uno o más de dichos genes en comparación con el nivel de expresión en dichos uno o más genes en una célula madre mesenquimatosas de control. En una realización, el nivel de expresión de CD200 en una muestra que comprende un número equivalente de células madre mesenquimatosas se usa como control. En otra realización, el control, para células madre placentarias sometidas a ensayo en ciertas condiciones, es un valor numérico que representa el nivel de expresión de CD200 en células madre mesenquimatosas en dichas condiciones.

Las células madre placentarias de la invención presentan las características anteriores (por ejemplo, combinaciones de marcadores de la superficie celular y/o perfiles de expresión génica) en cultivo primario, o durante la proliferación en medio que comprende DMEM-LG (Gibco) 60%, MCDM-201(Sigma) 40%, suero fetal de ternero (FCS) 2% (Hyclone Laboratories), 1x insulina-transferrina-selenio (ITS), 1x ácido linolénico-albúmina de suero bovino (LA-BSA), dexametasona  $10^{-9}$  M (Sigma), 2-fosfato de ácido ascórbico  $10^{-4}$  M (Sigma), factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml (R&D Systems), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems) y 100 U de penicilina/1000 U de estreptomina.

Las poblaciones de células madre placentarias aisladas descritas anteriormente, y poblaciones de células madre placentarias en general, pueden comprender aproximadamente, al menos, o no más de,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células madre placentarias.

### 5.1.3 Crecimiento en cultivo

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

Poblaciones de células placentarias aisladas que comprenden las células madre placentarias de la invención,

cuando se cultivan en condiciones apropiadas, forman cuerpos de tipo embrioide, es decir, agrupaciones tridimensionales de células crecen encima de la capa de células madre adherentes. Las células dentro de los cuerpos de tipo embrioide expresan marcadores asociados con células madre muy tempranas, por ejemplo, OCT-4, Nanog, SSEA3 y SSEA4. Las células dentro de los cuerpos de tipo embrioide típicamente no son adherentes al sustrato de cultivo, como lo son las células madre placentarias descritas en la presente memoria, pero permanecen fijadas a las células adherentes durante el cultivo. Las células de los cuerpos de tipo embrioide dependen de las células madre placentarias adherentes para la viabilidad, dado que los cuerpos de tipo embrioide no se forman en ausencia de las células madre adherentes. Las células madre placentarias adherentes facilitan de este modo el crecimiento de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprenden las células madre placentarias adherentes. Sin desear quedar limitados por la teoría, se cree que las células de los cuerpos de tipo embrioide crecen sobre las células madre placentarias adherentes en gran medida como las células madre embrionarias crecen sobre una capa alimentadora de células. Las células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea, no desarrollan cuerpos de tipo embrioide en cultivo.

## 5.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

### 5.2.1 Composición de recogida de células madre

La presente invención se refiere además a métodos de recogida y de aislamiento de células madre placentarias. Generalmente, las células madre se obtienen de una placenta de mamífero usando una solución fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una composición de recogida de células madre. Una composición de recogida de células madre se describe en detalle en la solicitud provisional de Estados Unidos relacionada N° 60/754.969, titulada "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs", presentada el 29 de diciembre de 2005.

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

La composición de recogida de células madre puede comprender uno o más componentes que tienden a conservar células madre placentarias, es decir, impedir que las células madre placentarias mueran, o retardar la muerte de las células madre placentarias, reducir el número de células madre placentarias en una población de células que mueren, o similares, desde el momento de la recogida hasta el momento del cultivo. Dichos componentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis (por ejemplo, un inhibidor de caspasa o inhibidor de JNK); un vasodilatador (por ejemplo, sulfato de magnesio, un fármaco hipotensor, péptido natriurético auricular (ANP), adrenocorticotropina, hormona liberadora de corticotropina, nitroprusiato de sodio, hidralazina, adenosina trifosfato, adenosina, indometacina o sulfato de magnesio, un inhibidor de fosfodiesterasa, etc.); un inhibidor de necrosis (por ejemplo, 2-(1H-Indol-3-il)-3-pentilamino-maleimida, ditiocarbamato de pirrolidina, o clonazepam); un inhibidor de TNF- $\alpha$ ; y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno (por ejemplo, bromuro de 30 perfluorooctilo, bromuro de perfluorodecilo, etc.).

La composición de recogida de células madre puede comprender una o más enzimas que degradan el tejido, por ejemplo, una metaloproteasa, una serina proteasa, una proteasa neutra, una ribonucleasa, o una desoxirribonucleasa, o similares. Dichas enzimas incluyen, aunque sin limitarse a, colagenasas (por ejemplo, colagenasa I, II, III o IV, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, etc.); dispasa, termolisina, elastasa, tripsina, LIBERASA, hialuronidasa y similares.

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

La composición de recogida de células madre también puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: adenosina (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); D-glucosa (aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM); iones magnesio (aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM); una macromolécula de peso molecular mayor de 20.000 daltons, en un ejemplo, presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad endotelial y viabilidad celular (por ejemplo, un coloide de origen natural o sintético, un polisacárido tal como dextrano o un polietilenglicol presente de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 100 g/l, o aproximadamente 40 g/l a aproximadamente 60 g/l); un antioxidante (por ejemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, glutatión, vitamina C o vitamina E presentes de aproximadamente 25  $\mu$ M a 50 aproximadamente 100  $\mu$ M); un agente reductor (por ejemplo, N-acetilcisteína presente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM); un agente que previene la entrada de calcio en las células (por ejemplo, verapamilo

presente de aproximadamente 2  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 25  $\mu\text{M}$ ); nitroglicerina (por ejemplo, aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 0,2 g/l); un anticoagulante, en un ejemplo, presente en una cantidad suficiente para ayudar a prevenir la coagulación de sangre residual (por ejemplo, heparina o hirudina presentes a una concentración de aproximadamente 1000 unidades/l a aproximadamente 100.000 unidades/l); o un compuesto que contiene amilorida, etil isopropil amilorida, hexametilén amilorida, dimetil amilorida o isobutil amilorida presente de aproximadamente 1,0  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ ).

### 5.2.2 Recogida y manipulación de placenta

Generalmente, una placenta humana se recupera poco después de su expulsión después del nacimiento. En un aspecto preferido, la placenta se recupera de un paciente después de que se recoge un consentimiento informado y un historial médico completo del paciente y se asocia con la placenta. Preferentemente, el historial clínico continúa después del parto. Dicho historial clínico puede utilizarse para coordinar un uso posterior la placenta o las células madre recogidas de ésta. Por ejemplo, pueden usarse células madre placentarias humanas, a la luz del historial clínico, para medicina personalizada para el lactante asociado con la placenta de la cual se obtiene el corion o para los padres, hermanos u otros familiares del lactante.

Antes de la recuperación de células madre placentarias, la sangre del cordón umbilical y la sangre placentaria se retiran. En ciertos ejemplos, después del parto, se recupera la sangre del cordón en la placenta. La placenta puede someterse a un proceso convencional de recuperación de sangre del cordón. Típicamente se usa una aguja o cánula, con la ayuda de la gravedad, para extraer toda la sangre de la placenta (véase, por ejemplo, Anderson, patente de Estados Unidos N° 5.372.581; Hessel et al, patente de Estados Unidos N° 5.415.665). La aguja o cánula se coloca generalmente en la vena umbilical y la placenta puede masajearse suavemente para ayudar a drenar la sangre del cordón de la placenta. Dicha recuperación de la sangre del cordón puede realizarse comercialmente, por ejemplo, LifeBank EE. UU., Cedar Knolls, N. J., ViaCord, Cord Blood Registry y Cryocell. Preferentemente, la placenta se drena por gravedad sin manipulación adicional para minimizar la ruptura del tejido durante la recuperación de la sangre del cordón.

Típicamente, una placenta se transporta desde la sala de parto o alumbramiento a otra ubicación, por ejemplo, un laboratorio, para la recuperación de la sangre del cordón y la recogida de células madre mediante, por ejemplo, perfusión o disociación tisular. La placenta preferentemente se transporta en un dispositivo de transporte térmicamente aislado, estéril (manteniendo la temperatura de la placenta entre 20-28°C), por ejemplo, mediante la colocación de la placenta, con el cordón umbilical proximal sujeto con una pinza, en una bolsa de plástico con cierre estéril, que se coloca entonces en un recipiente aislado. En otro ejemplo, la placenta se transporta en un kit de recogida de sangre del cordón umbilical sustancialmente tal como se describe en la solicitud de Patente de Estado Unidos pendiente de tramitación N° 7.147.626. Preferentemente, la placenta se entrega al laboratorio de cuatro a veinticuatro horas después del parto. En ciertos ejemplos, el cordón umbilical próximo se pinza, preferentemente dentro de los 4-5 cm (centímetros) de la inserción en el disco placentario antes de la recuperación de la sangre del cordón umbilical. En otras realizaciones, el cordón umbilical proximal se pinza después de la recuperación de la sangre del cordón umbilical pero antes de un procesamiento adicional de la placenta.

La placenta, antes de la recogida de células madre, puede almacenarse en condiciones estériles y a temperatura ambiente o a una temperatura de 5 a 25°C (centígrados). La placenta puede almacenarse durante un período de cuatro veinticuatro horas, hasta cuarenta y ocho horas o mayor de cuarenta y ocho horas antes de la perfusión de la placenta para retirar cualquier sangre del cordón umbilical residual. En un ejemplo, la placenta se recoge de entre aproximadamente cero horas a aproximadamente dos horas después de la expulsión. La placenta se almacena preferentemente en una solución anticoagulante a una temperatura de 5 a 25°C (centígrados). Las soluciones anticoagulantes adecuadas se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede usarse una solución de heparina o warfarina sódica. En un aspecto preferido, la solución anticoagulante comprende una solución de heparina (por ejemplo, 1% p/p en solución 1:1000). La placenta exanguinada se almacena preferentemente durante no más de 36 horas antes de que se recojan las células madre placentarias.

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

### 5.2.3 Ruptura física y digestión enzimática de tejido placentario

En un aspecto, se recogen células madre de una placenta de mamífero mediante ruptura física de parte o todo el órgano. Por ejemplo, la placenta, o una parte de la misma, puede, por ejemplo, triturarse, cortarse, picarse, cortarse en cubos, trocearse, macerarse o similares. El tejido puede cultivarse a continuación para obtener una población de células madre. Típicamente, el tejido placentario se rompe usando, por ejemplo, una composición de recogida de células madre (véase la Sección 5.2.1 y a continuación).

La placenta puede diseccionarse en componentes antes de la ruptura física y/o la digestión enzimática y la recuperación de células madre. Pueden obtenerse células madre placentarias de toda o una parte de la membrana amniótica, el corion, el cordón umbilical, los cotiledones placentarios, o cualquier combinación de las mismas,

- incluyendo de una placenta completa. Preferentemente, las células madre placentarias se obtienen de tejido placentario que comprende amnios y corion. Típicamente, las células madre placentarias pueden obtenerse mediante ruptura de un pequeño bloque de tejido placentario, por ejemplo, un bloque de tejido placentario que tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o aproximadamente 1000 milímetros cúbicos de volumen. Puede usarse cualquier método de ruptura física, siempre que el método de ruptura deje una pluralidad, más preferentemente una mayoría, y más preferentemente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de las células en dicho órgano viables, según lo determinado mediante, por ejemplo, exclusión con azul de tripano.
- Las células madre pueden recogerse en general de una placenta, o parte de la misma, en cualquier momento en el plazo de aproximadamente los primeros tres días después de la expulsión, pero preferentemente entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 18 horas después de la expulsión.
- En un aspecto específico, el tejido roto se cultiva en medio de cultivo tisular adecuado para la proliferación de células madre placentarias (véase, por ejemplo, la Sección 5.3, a continuación, que describe el cultivo de células madre placentarias).
- En otro aspecto específico, se recogen células madre mediante ruptura física de tejido placentario, en la que la ruptura física incluye digestión enzimática, que puede conseguirse mediante el uso de una o más enzimas que digieren tejido. La placenta, o una parte de la misma, también puede romperse físicamente y digerirse con una o más enzimas, y el material resultante sumergirse a continuación en, o mezclarse con, una composición de recogida de células madre.
- Una composición de recogida de células madre preferida comprende una o más enzimas que rompen tejido. La digestión enzimática usa preferentemente una combinación de enzimas, por ejemplo, una combinación de una metaloproteasa de la matriz y una proteasa neutra, por ejemplo, una combinación de colagenasa y dispasa. En un aspecto, la digestión enzimática de tejido placentario usa una combinación de una metaloproteasa de la matriz, una proteasa neutra, y una enzima mucolítica para digestión de ácido hialurónico, tal como una combinación de colagenasa, dispasa e hialuronidasa o una combinación de LIBERASE (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) e hialuronidasa. Otras enzimas que pueden usarse para romper tejido de la placenta incluyen papaína, desoxirribonucleasas, serina proteasas, tales como tripsina, quimotripsina o elastasa. Las serina proteasas pueden inhibirse mediante alfa 2 microglobulina en suero y, por lo tanto, el medio usado para la digestión está habitualmente libre de suero. EDTA y desoxirribonucleasa se usan habitualmente en procedimientos de digestión enzimática para incrementar la eficiencia de la recuperación de células. El producto de digestión se diluye preferentemente para evitar atrapar células madre dentro del producto de digestión viscosa.
- Puede usarse cualquier combinación de enzimas de digestión tisular. Las concentraciones típicas para enzimas de digestión tisular incluyen, por ejemplo, 50-200 U/ml para colagenasa I y colagenasa IV, 1-10 U/ml para dispasa, y 10-100 U/ml para elastasa. Pueden usarse proteasas en combinación, es decir, dos o más proteasas en la misma reacción de digestión, o puede usarse secuencialmente para liberar células madre placentarias. Por ejemplo, en un aspecto, una placenta o parte de la misma, es digerida en primer lugar con una cantidad apropiada de colagenasa I de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mg/ml durante, por ejemplo, 30 minutos, seguida por digestión con tripsina, a una concentración de aproximadamente 0,25%, durante, por ejemplo, 10 minutos, a 37°C. Se usan preferentemente serina proteasas de forma consecutiva después del uso de otras enzimas.
- En otro aspecto, el tejido puede romperse además mediante la adición de un quelante, por ejemplo, ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) o ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) a la composición de recogida de células madre que comprende las células madre o a una solución en la cual el tejido se rompe y/o digiere antes del aislamiento de las células madre con la composición de recogida de células madre.
- En un ejemplo, una digestión puede desarrollarse de la siguiente manera. Aproximadamente un gramo de tejido placentario se obtiene y se pica. El tejido se digiere en 10 ml de una solución que comprende aproximadamente 1 mg/ml de colagenasa 1A y aproximadamente 0,25% de tripsina a 37°C en un agitador a aproximadamente 100 RPM. El producto de digestión se lava tres veces con medio de cultivo, y las células lavadas se siembran en 2 matraces T-75. Las células se aíslan a continuación mediante adherencia diferencial, y se caracterizan para, por ejemplo, viabilidad, marcadores de la superficie celular, diferenciación, y similares.
- Se apreciará que donde una placenta completa, o parte de una placenta que comprende células tanto fetales como maternas (por ejemplo, donde la parte de la placenta comprende el corion o cotiledones), las células madre placentarias recogidas comprenderán una mezcla de células madre placentarias obtenidas a partir de fuentes tanto fetales como maternas. Donde una parte de la placenta que no comprende ninguna, o comprende un número despreciable de, células maternas (por ejemplo, amnios), las células madre placentarias recogidas comprenderán casi exclusivamente células madre placentarias fetales.
- Pueden aislarse células madre de tejido roto mediante tripsinización diferencial (véase la Sección 5.2.5, a continuación) seguida por cultivo en uno o más nuevos recipientes de cultivo en medio de proliferación fresco, opcionalmente seguido por una segunda etapa de tripsinización diferencial.

#### 5.2.4 Perfusión de la placenta

También pueden obtenerse células madre placentarias por perfusión de la placenta de mamífero. Métodos de perfusión de la placenta de mamífero para obtener células madre se desvelan, por ejemplo, en Hariri, publicación de solicitud estadounidense N° 2002/0123141, y en la solicitud provisional de Estados Unidos relacionada N° 60/754.969, titulada "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs", presentada el 29 de diciembre de 2005.

Pueden recogerse células madre placentarias mediante perfusión, por ejemplo, a través de la vasculatura placentaria, usando, por ejemplo, una composición de recogida de células madre como solución de perfusión. En un aspecto, una placenta de mamífero se perfunde mediante el paso de solución de perfusión a través de cualquiera o ambos de la arteria umbilical y la vena umbilical. El flujo de solución de perfusión a través de la placenta puede conseguirse usando, por ejemplo, flujo por gravedad al interior de la placenta. Preferentemente, la solución de perfusión se hace pasar a través de la placenta usando una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica. La vena umbilical puede, por ejemplo, canularse con una cánula, por ejemplo, una cánula de TEFLON® o plástico, que está conectada a un aparato de conexión estéril, tales como un tubo estéril. El aparato de conexión estéril está conectado a un colector de perfusión.

En preparación para la perfusión, la placenta se orienta preferentemente (por ejemplo, se suspende) de tal manera que la arteria umbilical y la vena umbilical estén ubicadas en el punto más alto de la placenta. La placenta puede perfundirse mediante el paso de un fluido de perfusión a través de la vasculatura placentaria y el tejido circundante. La placenta también puede perfundirse mediante el paso de un fluido de perfusión al interior de la vena umbilical y recogida desde las arterias umbilicales, o el paso de un fluido de perfusión al interior de las arterias umbilicales y recogida desde la vena umbilical.

En un aspecto, por ejemplo, la arteria umbilical y la vena umbilical están conectadas simultáneamente, por ejemplo, a una pipeta que está conectada mediante un conector flexible a un depósito de la solución de perfusión. La solución de perfusión se hace pasar al interior de la vena y la arteria umbilical. La solución de perfusión exuda desde y/o pasa a través de las paredes de los vasos sanguíneos al interior de los tejidos circundantes de la placenta, y se recoge en un recipiente adecuado desde la superficie de la placenta que se fijó al útero de la madre durante la gestación. La solución de perfusión también puede introducirse a través de la abertura del cordón umbilical y se le puede permitir fluir o percolar fuera de las aberturas en la pared de la placenta que establecía una interfaz con la pared uterina materna. Las células placentarias que se recogieron mediante este método, que puede denominarse como un método "de recipiente", son típicamente una mezcla de células fetales y maternas.

En otro aspecto, se hace pasar a la solución de perfusión a través de las venas umbilicales y se recoge de la arteria umbilical, o se le hace pasar a través de la arteria umbilical y se recoge de las venas umbilicales. Las células placentarias recogidas mediante este método, que puede denominarse como un método "de circuito cerrado", son típicamente casi exclusivamente fetal.

Se apreciará que la perfusión usando el método de recipiente, es decir, mediante el cual el perfundido se recoge después de que ha exudado desde el lado materno de la placenta, da como resultado una mezcla de células fetales y maternas. Como resultado, las células recogidas mediante este método comprenden una población mixta de células madre placentarias de origen tanto fetal como materno. En contraste, la perfusión únicamente a través de la vasculatura placentaria en el método de circuito cerrado, con lo que se hace pasar al fluido de perfusión a través de uno o dos vasos placentarios y es recogido únicamente a través de del vaso o vasos restantes, da como resultado la recogida de una población de células madre placentarias casi exclusivamente de origen fetal.

El método de perfusión de circuito cerrado puede, en un aspecto, realizarse de la siguiente manera. Una placenta postparto se obtiene en el plazo de aproximadamente 48 horas después del nacimiento. El cordón umbilical se sujeta con pinzas y se corta por encima de la pinza. El cordón umbilical puede desecharse, o puede procesarse para recuperar, por ejemplo, células madre de cordón umbilical, y/o para procesar la membrana del cordón umbilical para la producción de un biomaterial. La membrana amniótica puede retenerse durante la perfusión, o puede separarse del corion, por ejemplo, usando disección sin filo con los dedos. Si la membrana amniótica se separa del corion antes de la perfusión, puede, por ejemplo, desecharse, o procesarse, por ejemplo, para obtener células madre mediante digestión enzimática, o para producir, por ejemplo, una membrana amniótica biomaterial, por ejemplo, el biomaterial descrito en la publicación de solicitud estadounidense N° 2004/0048796. Después de limpiar la placenta de todos los coágulos de sangre visibles y de sangre residual, por ejemplo, usando una gasa estéril, los vasos del cordón umbilical se exponen, por ejemplo, cortando parcialmente la membrana del cordón umbilical para dejar expuesta una sección transversal del cordón. Los vasos se identifican, y se abren, por ejemplo, haciendo avanzar una pinza de cocodrilo cerrada a través del extremo cortado de cada vaso. Después, el aparato, por ejemplo, un tubo de plástico conectado a un dispositivo de perfusión o una bomba peristáltica, se inserta en cada una de las arterias placentarias. La bomba puede ser cualquier bomba adecuada para ese fin, por ejemplo, una bomba peristáltica. El tubo de plástico, conectado a un depósito de recogida estéril, por ejemplo, una bolsa de sangre tal como una bolsa de recogida de 250 ml, se inserta a continuación en la vena placentaria. Como alternativa, el tubo conectado a la bomba se inserta en la vena placentaria, y tubos a un depósito o depósitos de recogida se insertan en una o ambas de las arterias placentarias. La placenta se perfunde a continuación con un volumen de solución de

perfusión, por ejemplo, aproximadamente 750 ml de solución de perfusión. Las células en el perfundido se recogen a continuación, por ejemplo, por centrifugado.

En un aspecto, el cordón umbilical proximal se sujeta con pinzas durante la perfusión, y más preferentemente, se sujeta con pinzas en 4-5 cm (centímetros) de la inserción del cordón en el disco placentario.

5 La primera recogida de fluido de perfusión procedente de una placenta de mamífero durante el proceso de extracción de toda la sangre está generalmente coloreada con glóbulos rojos residuales de la sangre del cordón umbilical y/o la sangre placentaria. El fluido de perfusión se vuelve más incoloro a medida que avanza la perfusión y las células de la sangre del cordón umbilical residuales son lavadas de la placenta. Generalmente de 30 a 100 ml (mililitros) de fluido de perfusión son adecuados para extraer toda la sangre inicialmente de la placenta, pero puede usarse más o menos fluido de perfusión dependiendo de los resultados observados.

10 El volumen de líquido de perfusión usado para recoger células madre placentarias puede variar dependiendo del número de células madre a recoger, el tamaño de la placenta, el número de recogidas a realizar a partir de una única placenta, etc. En diversos ejemplos, el volumen de líquido de perfusión puede ser de 50 ml a 5000 ml, 50 ml a 4000 ml, 50 ml a 3000 ml, 100 ml a 2000 ml, 250 ml a 2000 ml, 500 ml a 2000 ml, o 750 ml a 2000 ml. Típicamente, la placenta se perfunde con 700-800 ml de líquido de perfusión después de la extracción de toda la sangre.

15 La placenta puede perfundirse una pluralidad de veces en el transcurso de varias horas o varios días. Donde la placenta debe perfundirse una pluralidad de veces, puede mantenerse o cultivarse en condiciones asépticas en un recipiente u otro vaso adecuado, y perfundirse con la composición de recogida de células madre, o una solución de perfusión convencional (por ejemplo, una solución salina normal tal como solución salina tamponada con fosfato ("PBS")) con o sin un anticoagulante (por ejemplo, heparina, warfarina sódica, coumarina, bishidroxicoumarina), y/o con o sin un agente antimicrobiano (por ejemplo,  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1 mM); antibióticos tales como estreptomina (por ejemplo, a 40-100  $\mu$ g/ml), penicilina (por ejemplo, a 40 U/ml), amfotericina B (por ejemplo, a 0,5  $\mu$ g/ml). En una realización, una placenta aislada se mantiene o se cultiva durante un periodo de tiempo sin recoger el perfundido, de modo que la placenta se mantiene o cultiva durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas, o 2 o 3 o más días antes de la perfusión y la recogida de perfundido. La placenta perfundida puede mantenerse durante uno o más periodos de tiempo adicionales, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más horas, y perfundirse una segunda vez con, por ejemplo, 700-800 ml de fluido de perfusión. La placenta puede perfundirse 1, 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, una vez cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En un aspecto preferido, la perfusión de la placenta y la recogida de solución de perfusión, por ejemplo, composición de recogida de células madre, se repite hasta que el número de células nucleadas recuperadas caiga por debajo de 100 células/ml. Los perfundidos en diferentes puntos temporales pueden procesarse además individualmente para recuperar poblaciones dependientes del tiempo de células, por ejemplo, células madre. Perfundidos de diferentes puntos temporales también pueden combinarse. Preferentemente, se recogen células madre en un momento o momentos entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 18 horas después de la expulsión.

20 Sin desear quedar vinculados por ninguna teoría, después de la extracción de toda la sangre y un tiempo suficiente de perfusión de la placenta, se cree que las células madre placentarias migran en la microcirculación exanguinada y perfundida de la placenta donde, de acuerdo con los métodos de la invención, se recogen, preferentemente mediante lavado en un recipiente de recogida mediante perfusión. Perfundir la placenta aislada no solamente sirve para retirar sangre del cordón umbilical residual pero también proporcionan a la placenta los nutrientes apropiados, incluyendo oxígeno. La placenta puede cultivarse y perfundirse con una solución similar que se usó para retirar las células de sangre del cordón umbilical residual, preferentemente, sin la adición de agentes anticoagulantes.

25 La perfusión de acuerdo con los métodos de la invención da como resultado la recogida de significativamente más células madre placentarias que el número obtenible de una placenta de mamífero no perfundida con dicha solución, y no tratada de otro modo para obtener células madre (por ejemplo, mediante ruptura tisular, por ejemplo, digestión enzimática). En este contexto, "significativamente más" significa al menos 10% más. La perfusión de acuerdo con los métodos de la invención produce significativamente más células madre placentarias que, por ejemplo, el número de células madre placentarias obtenibles a partir de medio de cultivo en el que se ha cultivado una placenta, o parte de la misma.

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

### 5.2.5 Aislamiento, clasificación y caracterización de células madre placentarias

- Células madre de placenta de mamífero, ya fueran obtenidas mediante perfusión o digestión enzimática, pueden purificarse inicialmente de (es decir, aislarse de) otras células mediante centrifugado con gradiente de Ficoll. Dicho centrifugado puede seguir cualquier protocolo convencional para velocidad de centrifugado, etc. Por ejemplo, células recogidas de la placenta se recuperan del perfundido mediante centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo que separa las células de, por ejemplo, residuos contaminantes y plaquetas. En otra realización, el perfundido placentario se concentra a aproximadamente 200 ml, se dispone en capas suavemente sobre Ficoll, y se centrifuga a aproximadamente 1100 x g durante 20 minutos a 22°C, y la capa de células de interfaz de baja densidad se recoge para procesamiento adicional.
- Los sedimentos celulares pueden resuspenderse en composición de recogida de células madre fresca, o un medio adecuado para el mantenimiento de células madre, por ejemplo, medio libre de suero IMDM que contiene 2 U/ml de heparina y EDTA 2 mM (GibcoBRL, NY). La fracción de células mononucleares totales puede aislarse, por ejemplo, usando Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.
- Tal como se usa en la presente memoria "aislar" células madre placentarias significa retirar al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las células con las que las células madre están asociadas normalmente en la placenta de mamífero intacta. Una célula madre de otros órganos está "aislada" cuando está presente en una población de células que comprende menos de 50% de las células con las que la célula madre está asociada normalmente en el órgano intacto.
- Las células placentarias obtenidas mediante perfusión o digestión pueden, por ejemplo, aislarse adicional, o inicialmente mediante tripsinización diferencial usando, por ejemplo, una solución de tripsina 0,05% con EDTA 0,2% (Sigma, St. Louis MO). La tripsinización diferencial es posible porque las células madre placentarias típicamente se desprenden de superficies plásticas en el plazo de aproximadamente cinco minutos mientras que otras poblaciones adherentes típicamente requieren más de 20-30 minutos de incubación. Las células madre placentarias desprendidas pueden recogerse después de la tripsinización y la neutralización de la tripsina, usando, por ejemplo, solución neutralizante de tripsina (TNS, Cambrex). En un aspecto de células adherentes, alícuotas de, por ejemplo, aproximadamente 5-10 x 10<sup>6</sup> células se colocan en cada uno de varios matraces T-75, preferentemente matraces T75 revestidos de fibronectina. En dicho ejemplo, las células pueden cultivarse con medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas disponible en el mercado (MSCGM) (Cambrex), y colocarse en una incubadora para cultivo tisular (37°C, CO<sub>2</sub> 5%). Después de 10 a 15 días, las células no adherentes se retiran de los matraces mediante lavado con PBS. El PBS se sustituye a continuación por MSCGM. Los matraces son examinados preferentemente a diario en busca de la presencia de diversos tipos de células adherentes y en particular, para la identificación y la expansión de agrupamientos de células fibroblastoides.
- El número y el tipo de células recogidas de una placenta de mamífero puede monitorizarse, por ejemplo, midiendo cambios de morfología y marcadores de la superficie celular usando técnicas de detección de células convencionales tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcadores celulares) clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas por magnetismo (MACS), mediante examen de la morfología de células usando microscopía óptica o confocal, y/o midiendo cambios de la expresión génica usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como PCR y perfilado de la expresión génica. Estas técnicas pueden usarse, también, para identificar células que son positivas para uno o más marcadores particulares. Por ejemplo, usando anticuerpos para CD34, se puede determinar, usando las técnicas anteriores, si una célula comprende una cantidad detectable de CD34; si éste es el caso, la célula es CD34<sup>+</sup>. Del mismo modo, si una célula produce suficiente ARN de OCT-4 para ser detectable por RT-PCR, o significativamente más ARN de OCT-4 que una célula adulta, la célula es OCT-4<sup>+</sup>. Los anticuerpos para marcadores de la superficie celular (por ejemplo, marcadores CD tales como CD34) y la secuencia de genes específicos de células madre, tales como OCT-4, se conocen bien en la técnica.
- Células placentarias, particularmente células que han sido aisladas mediante separación con Ficoll, adherencia diferencial, o una combinación de ambas, pueden clasificarse usando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluyendo células, en base a las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150-165). La excitación por láser de fracciones fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En un ejemplo, anticuerpos o ligandos específicos de marcadores de la superficie celular están marcados con distintas marcas fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador celular, permitiendo la separación de células en base a su capacidad para unirse a los anticuerpos usados. Las partículas clasificadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.
- En un esquema de clasificación, células madre de placenta se clasifican tomando como base la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 y/o HLA-G. Esto puede conseguirse en relación con

procedimientos para seleccionar células madre tomando como base sus propiedades de adherencia en cultivo. Por ejemplo, una célula madre de selección de adherencia puede conseguirse antes o después de la clasificación tomando como base la expresión de marcadores. Por ejemplo, las células se clasifican en primer lugar tomando como base su expresión de CD34; las células CD34<sup>+</sup> son retenidas, y las células que son CD200<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>, se separan de todas las demás células CD34<sup>+</sup>. En otro aspecto, las células de la placenta se basan en su expresión de marcadores CD200 y/o HLA-G; por ejemplo, células que presentan cualquiera de estos marcadores se aíslan para un uso adicional. Células que expresan, por ejemplo, CD200 y/o HLA-G pueden, en una realización específica, clasificarse en base a su expresión de CD73 y/o CD105, o epítomos reconocidos por anticuerpos SH2, SH3 o SH4, o la falta de expresión de CD34, CD38 o CD45. Por ejemplo, en un aspecto, las células placentarias se clasifican mediante la expresión, o falta de la misma, de CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 y CD45, y células placentarias que son CD200<sup>+</sup>, HLA-G<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup> se aíslan de otras células placentarias para uso adicional.

Con respecto a la detección y clasificación de células madre placentarias mediadas por anticuerpos, puede usarse cualquier anticuerpo, específico para un marcador particular, en combinación con cualquier fluoróforo u otra marca adecuada para la detección y clasificación de células (por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia). Las combinaciones de anticuerpo/fluoróforo para marcadores específicos incluyen, aunque sin limitarse a, anticuerpos monoclonales conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra HLA-G (disponibles de Serotec, Raleigh, Carolina del Norte), CD10 (disponible de BD Immunocytometry Systems, San Jose, California), CD44 (disponible de BD Biosciences Pharmingen, San Jose, California), y CD105 (disponible de R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota); anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina (PE) contra CD44, CD200, CD 117, y CD13 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) contra CD33 y CD10 (BD Biosciences Pharmingen); estreptavidina conjugada a alofocianina (APC) y anticuerpos monoclonales contra CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 biotinilado (BD Biosciences Pharmingen). Otros anticuerpos que pueden usarse incluyen, aunque sin limitarse a, CD133-APC (Miltenyi), KDR-Biotina (CD309, Abcam), CitoqueratinaK-Fitc (Sigma o Dako), HLA ABC-Fitc (BD), HLA DRDQDP-PE (BD),  $\beta$ -2-microglobulina-PE (BD), CD80-PE (BD) y CD86-APC (BD).

Otras combinaciones de anticuerpo/marca que pueden usarse incluyen, aunque sin limitarse a, CD45-PerCP (peridina clorofila proteína); CD44-PE; CD19-PE; CD10-F (fluoresceína); HLA-G-F and 7-amino-actinomicina-D (7-AAD); HLA-ABC-F; y similares.

Las células madre placentarias pueden ser ensayadas para CD117 o CD133 usando, por ejemplo, estreptavidina conjugada a ficoeritrina-Cy5 (PE Cy5) y anticuerpos monoclonales conjugados a biotina contra CD117 o CD 133; sin embargo, usando este sistema, puede parecer que las células son positivas para CD117 o CD133, respectivamente, debido a un fondo relativamente elevado.

Las células madre placentarias pueden marcarse con un anticuerpo para un único marcador y detectarse y/clasificarse. Las células madre placentarias también pueden marcarse simultáneamente con múltiples anticuerpos para diferentes marcadores.

En otro ejemplo, pueden usarse perlas magnéticas para separar células. Las células pueden clasificarse usando una técnica de clasificación de células activadas por magnetismo (MACS), un método para separar partículas en base a su capacidad para unirse a perlas magnéticas (0,5-100  $\mu$ m de diámetro). Pueden realizarse diversas modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluyendo adición covalente de un anticuerpo que reconoce específicamente una molécula o hapteno de la superficie celular particular. Las perlas se mezclan a continuación con las células para permitir la unión. A continuación se hace pasar a las células a través de un campo magnético para separar células que tienen el marcador de la superficie celular específico. En un ejemplo, estas células pueden aislarse a continuación y remezclarse con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo contra marcadores de la superficie celular adicionales. Se hace pasar de nuevo a las células a través de un campo magnético, que aísla células que se unieron a ambos anticuerpos. Dichas células pueden diluirse a continuación en placas separadas, tales como placas de microvaloración para aislamiento clónico.

Las células madre placentarias también pueden caracterizarse y/o clasificarse en base a la morfología celular y características de crecimiento. Por ejemplo, células madre placentarias pueden caracterizarse como teniendo, y/o seleccionarse tomando como base, por ejemplo, un aspecto fibroblastoide en cultivo. Las células madre placentarias también pueden caracterizarse como teniendo, y/o seleccionarse, tomando como base su capacidad para formar cuerpos de tipo embriode. Por ejemplo, las células placentarias que son de forma fibroblastoide, expresan CD73 y CD105, y producen uno o más cuerpos de tipo embriode en cultivo se aíslan de otras células placentarias. En otro ejemplo, células placentarias OCT-4<sup>+</sup> que producen uno o más cuerpos de tipo embriode en cultivo se aíslan de otras células placentarias.

En otro aspecto, las células madre placentarias pueden identificarse y caracterizarse mediante un ensayo de unidades formadoras de colonias. Los ensayos de unidades formadoras de colonias se conocen habitualmente en la técnica, tales como medio MESEN CULT™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Columbia Británica).

Puede ensayarse la viabilidad, el potencial de proliferación y la longevidad de las células madre placentarias usando

técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como ensayo de exclusión con azul de tripano, ensayo de captación de diacetato de fluoresceína, ensayo de captación de yoduro de propidio (para evaluar la viabilidad); y ensayo de captación de timidina, ensayo de proliferación celular MTT (para evaluar la proliferación). La longevidad puede determinarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como determinando el número máximo de duplicaciones de la población en un cultivo extendido.

Las células madre placentarias también pueden separarse de otras células placentarias usando otras técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación en base a la capacidad de aglutinación diferencial de células en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación-descongelación; filtración; centrifugado convencional y zonal; elutriación centrífuga (centrifugado a contracorriente); separación unitaria por gravedad; distribución a contracorriente; electroforesis; y similares.

### 5.3 CULTIVO DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

#### 5.3.1 Medios de cultivo

Pueden usarse células madre placentarias aisladas, o una población de células madre placentarias, o células o tejido placentario a partir del cual crecen células madre placentarias, para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células son generalmente transferidas a recipientes para cultivo tisular estériles sin revestir o revestidos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, nativo o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, ornitina, vitronectina, y proteína de la membrana extracelular (por ejemplo, MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.)).

Las células madre placentarias pueden cultivarse en cualquier medio, en cualesquiera condiciones, reconocidas en la técnica como aceptables para el cultivo de células madre. Preferentemente, el medio de cultivo comprende suero. Las células madre placentarias pueden cultivarse en, por ejemplo, DMEM-LG (Medio esencial modificado por Dulbecco, baja glucosa)/MCDB 201 (medio basal de fibroblasto de pollo) que contiene ITS (insulina-transferrina-selenio), LA+BSA (ácido linoleico-albúmina de suero de bovino), dextrosa, L-ácido ascórbico, PDGF, EGF, IGF-1 y penicilina/estreptomicina; DMEM-HG (alta glucosa) que comprende 10% de suero fetal bovino (FBS); DMEM-HG que comprende 15% de FBS; IMDM 20 (medio Dulbecco con modificación de Iscove) que comprende 10% de FBS, 10% de suero equino e hidrocortisona; M199 que comprende 10% de FBS, EGF y heparina;  $\alpha$ -MEM (medio esencial mínimo) que comprende 10% de FBS, GLUTAMAX™ y gentamicina; DMEM que comprende 10% de FBS, GLUTAMAX™ y gentamicina, etc. Un medio preferido es DMEM-LG/MCDB-201 que comprende 2% de FBS, ITS, LA+BSA, dextrosa, L-ácido ascórbico, PDGF, EGF y penicilina/estreptomicina.

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

El medio de cultivo puede estar suplementado con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero (por ejemplo, suero fetal bovino (FBS), preferentemente aproximadamente 2-15% (p/p); suero equino (de caballo) (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferentemente aproximadamente 0,001% (p/p); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y eritropoyetina (EPO); 35 aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antimicóticos y/o antibióticos para controlar la contaminación microbiana, tal como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea en solitario o en combinación.

Las células madre placentarias pueden cultivarse en condiciones de cultivo tisular convencionales, por ejemplo, en placas de cultivo tisular o placas de múltiples pocillos. Las células madre placentarias también pueden cultivarse usando un método de gota colgante. En este método, células madre placentarias se suspenden a aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por ml en aproximadamente 5 ml de medio y una o más gotas del medio se colocan en el interior de la tapa de un recipiente para cultivo tisular, por ejemplo, una placa de Petri de 100 ml. Las gotas pueden ser, por ejemplo, gotas individuales o gotas múltiples de, por ejemplo, una pipeta multicanal. La tapa se invierte cuidadosamente y se coloca sobre el fondo de la placa, que contiene un volumen de líquido, por ejemplo, PBS estéril suficiente para mantener el contenido de humedad en la atmósfera de la placa, y las células se cultivan.

En un aspecto, las células madre placentarias se cultivan en presencia de un compuesto que actúa para mantener un fenotipo indiferenciado en la célula madre placentaria. Específicamente, el compuesto es una 3,4-dihidropiridimol[4,5-d]pirimidina sustituida. Más específicamente, el compuesto es un compuesto que tiene la siguiente estructura química:



El compuesto puede ponerse en contacto con una célula madre placentaria, o población de células madre placentarias, a una concentración de, por ejemplo, entre aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ .

### 5.3.2 Expansión y proliferación de células madre placentarias

- 5 Una vez que se obtiene una célula madre placentaria aislada, o población aislada de células madre (por ejemplo, una célula madre o población de células madre separada de al menos 50% de las células placentarias con las que la célula madre o población de células madre está normalmente asociada *in vivo*), la célula madre o población de células madre puede proliferarse y expandirse *in vitro*. Por ejemplo, una población de células madre placentarias puede cultivarse en recipientes para el cultivo tisular, por ejemplo, placas, matraces, placas de múltiples pocillos, o similares, durante un tiempo suficiente para que las células madre proliferen a 70-90% confluencia, es decir, hasta que las células madre y su progenie ocupen 70-90% del área superficial de cultivo del recipiente para cultivo tisular.

15 Las células madre placentarias pueden sembrarse en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento de células. Por ejemplo, las células pueden sembrarse desde una densidad baja (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup>) a una densidad alta (por ejemplo, aproximadamente 50.000 o más células/cm<sup>2</sup>). Preferentemente, las células se cultivan desde aproximadamente 0 a aproximadamente 5 por ciento en volumen de CO<sub>2</sub> en el aire. En algunos ejemplos preferidos, las células se cultivan de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 por ciento de O<sub>2</sub> en el aire, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento de O<sub>2</sub> en el aire. Las células se cultivan preferentemente a de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferentemente 37°C. Las células preferentemente se cultivan en una incubadora.

20 El medio de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las células madre placentarias preferentemente se cultivan con estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína o similares).

25 Una vez que se obtiene una confluencia de 70%-90%, se puede someter a un pase a las células. Por ejemplo, las células pueden tratarse enzimáticamente, por ejemplo, tripsinizarse usando técnicas bien conocidas en la técnica, para separarlas de la superficie de cultivo tisular. Después de retirar las células mediante pipeteo y de contar las células, aproximadamente 20.000-100.000 células, preferentemente 50.000 células, se hacen pasar a un nuevo recipiente para cultivo que contiene un medio de cultivo fresco. Típicamente, el nuevo medio es el mismo tipo de medio del cual las células se retiraron. En la presente memoria se desvelan poblaciones de células madre placentarias que se han sometido a un pase al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 o más veces.

### 30 5.3.3 Poblaciones de células madre placentarias

35 La invención proporciona poblaciones de células madre placentarias. La población de células madre placentarias puede aislarse directamente de una o más placentas; es decir, la población de células madre placentarias puede ser una población de células placentarias que comprende células madre placentarias obtenidas de, o contenidas en, perfundido, u obtenidas de, o contenidas en, tejido placentario roto, por ejemplo, producto de digestión de tejido placentario (es decir, la colección de células obtenidas mediante digestión enzimática de una placenta o parte de la misma). Las células madre placentarias aisladas de la invención también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células madre placentarias. Las poblaciones de células placentarias que comprenden células madre placentarias también pueden cultivarse y expandirse para producir poblaciones de células madre placentarias.

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

45 La invención se refiere a métodos de producción de una población de células madre placentarias aislada seleccionando, por ejemplo, células madre placentarias, ya procedan de digestión enzimática o perfusión, que expresan marcadores particulares y/o características de cultivo o morfológicas particulares. En una realización, por ejemplo, la invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD200; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otra realización, la invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende identificar células placentarias que expresan CD200, y aislar dichas células de

50

5 otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el método de producción de una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD105, y CD200; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende identificar células placentarias que expresan CD73, CD105 y CD200, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el método de producción de una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato y (b) expresan CD200 y OCT-4; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende identificar células placentarias que expresan CD200 y OCT-4, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el método de producción de una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan CD73 y CD105, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a embrioide; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende identificar células placentarias que expresan CD73 y CD105, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a embrioide, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el método de producción de una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, y (b) expresan CD73, CD105 y HLA-G; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende identificar células placentarias que expresan CD73, CD105 y HLA-G, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, el método de producción de una población de células comprende seleccionar células placentarias que (a) se adhieren a un sustrato, (b) expresan OCT-4, y (c) facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a embrioide; y aislar dichas células de otras células para formar una población de células. En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una población de células que comprende identificar células placentarias que expresan OCT-4, y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embrioide en una población de células placentarias que comprende dicha célula madre, cuando dicha población se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a embrioide, y aislar dichas células de otras células para formar una población de células.

35 Dichas poblaciones de células pueden usarse para tratar cualquiera de las enfermedades o afecciones enumeradas a continuación en la presente memoria. Dichas poblaciones de células también pueden usarse para evaluar poblaciones de células madre placentarias, por ejemplo, como parte de un método de control de calidad.

40 En cualquiera de los aspectos anteriores, el método puede comprender adicionalmente seleccionar células placentarias que expresan ABC-p (una proteína transportadora ABC específica de la placenta; véase, por ejemplo, Allikmets et al., *Cancer Res.* 58(23): 5337-9 (1998)). El método también puede comprender seleccionar células que muestran al menos una característica específica de, por ejemplo, una célula madre mesenquimatosas, por ejemplo, expresión de CD29, expresión de CD44, expresión de CD90, o expresión de una combinación de los anteriores.

En los aspectos anteriores, el sustrato puede ser cualquier superficie en el que pueda conseguirse el cultivo y/o la selección de células, por ejemplo, células madre placentarias. Típicamente, el sustrato es plástico, por ejemplo, plástico de una placa de cultivo tisular o una placa de múltiples pocillos. El plástico para cultivo tisular puede estar revestido con una biomolécula, por ejemplo, laminina o fibronectina.

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

55 La población de células madre placentarias aislada puede comprender células placentarias que no son células madre, o células que no son células placentarias.

60 Las poblaciones de células madre placentarias aisladas pueden combinarse con una o más poblaciones de células no madre o células no placentarias. Por ejemplo, una población aislada de células madre placentarias puede combinarse con sangre (por ejemplo, sangre placentaria o sangre del cordón umbilical), células madre obtenidas a partir de la sangre (por ejemplo, células madre obtenidas a partir de sangre placentaria o sangre del cordón umbilical), células madre de cordón umbilical, poblaciones de células nucleadas obtenidas a partir de la sangre, células mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea, poblaciones de células madre obtenidas a partir del

hueso, médula ósea en bruto, células madre adultas (somáticas), poblaciones de células madre contenidas dentro del tejido, células madre cultivadas, poblaciones de células completamente diferenciadas (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, células amnióticas, osteoblastos, células musculares, células cardíacas, etc.) y similares. En un ejemplo específico, la invención proporciona una población de células madre que comprende células madre placentarias y células madre de cordón umbilical. Las células en una población de células madre placentarias aislada pueden combinarse con una pluralidad de células de otro tipo en proporciones de aproximadamente 100.000.000:1, 50.000.000:1, 20.000.000:1, 10.000.000:1, 5.000.000:1, 2.000.000:1, 1.000.000:1, 500.000:1, 200.000:1, 100.000:1, 50.000:1, 20.000:1, 10.000:1, 5.000:1, 2.000:1, 1.000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:5.000; 1:10.000; 1:20.000; 1:50.000; 1:100.000; 1:500.000; 1:1.000.000; 1:2.000.000; 1:5.000.000; 1:10.000.000; 1:20.000.000; 1:50.000.000; o aproximadamente 1:100.000.000, comparando números de células nucleadas totales en cada población. Las células en una población de células madre placentarias aislada pueden combinarse con una pluralidad de células de una pluralidad de tipos celulares también.

En una, una población aislada de células madre placentarias se combina con una pluralidad de células madre hematopoyéticas. Dichas células madre hematopoyéticas pueden estar, por ejemplo, contenidas dentro de sangre placentaria, del cordón umbilical o sangre periférica sin procesar; en células nucleadas totales de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en una población aislada de células CD34<sup>+</sup> de sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica; en médula ósea sin procesar; en células nucleadas totales de médula ósea; en una población aislada de células CD34<sup>+</sup> de médula ósea, o similares.

#### 5.4 PRODUCCIÓN DE UN BANCO DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

Células madre de placentas postparto pueden cultivarse en una serie de diferentes manera para producir un conjunto de lotes, por ejemplo, un conjunto de dosis administrables de forma individual, de células madre placentarias. Dichos lotes pueden, por ejemplo, obtenerse de células madre de perfundido placentario o de tejido placentario digerido por enzimas. Conjuntos de lotes de células madre placentarias, obtenidos de una pluralidad de placentas, pueden disponerse en un banco de células madre placentarias para, por ejemplo, almacenamiento a largo plazo. Generalmente, células madre adherentes se obtienen de un cultivo inicial de material placentario para formar un cultivo de siembra, que se expande en condiciones controladas para formar poblaciones de células a partir de números aproximadamente equivalentes de duplicaciones. Los lotes se obtienen preferentemente del tejido de una única placenta, pero pueden obtenerse del tejido de una pluralidad de placentas.

En un aspecto, los lotes de células madre se obtienen de la siguiente manera. El tejido placentario se rompe en primer lugar, por ejemplo, picando, se digiere con una enzima adecuada, por ejemplo, colagenasa (véase la Sección 5.2.3, anterior). El tejido placentario preferentemente comprende, por ejemplo, todo el amnios, todo el corion, o ambos, de una única placenta, pero puede comprender solamente una parte de cualquiera del amnios o el corion. El tejido digerido se cultiva, por ejemplo, durante aproximadamente 1-3 semanas, preferentemente aproximadamente 2 semanas. Después de la retirada de células no adherentes, las colonias de alta densidad que se forman se recogen, por ejemplo, mediante tripsinización. Estas células se recogen y se resuspenden en un volumen conveniente de medio de cultivo, y se definen como células de pase 0.

Las células de pase 0 se usan a continuación para sembrar cultivos de expansión. Los cultivos de expansión pueden ser cualquier disposición de aparatos de cultivo celular independientes, por ejemplo, una factoría celular de NUNC™. Las células en el cultivo de pase 0 pueden subdividirse en cualquier grado para sembrar cultivos de expansión con, por ejemplo,  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^4$  o  $10 \times 10^4$  células madre. Preferentemente, se usan de aproximadamente  $2 \times 10^4$  a aproximadamente  $3 \times 10^4$  células de pase 0 para sembrar cada cultivo de expansión. El número de cultivos de expansión puede depender del número de células de pase 0, y puede ser mayor o menor en número dependiendo de la placenta o placentas particulares de las que se obtienen las células madre.

Los cultivos de expansión se cultivan hasta que la densidad de las células en el cultivo alcanza cierto valor, por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Las células pueden recogerse y criopreservarse en este momento o someterse a un pase para formar nuevos cultivos de expansión tal como se ha descrito anteriormente. Las células pueden someterse a un pase, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 1, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces antes de su uso. Preferentemente se mantiene un registro del número acumulativo de duplicaciones de poblaciones durante el cultivo o los cultivos de expansión. Las células de un cultivo de pase 0 pueden expandirse para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 o 40 duplicaciones o hasta 60 duplicaciones. Sin embargo, preferentemente, el número de duplicaciones de la población, antes de dividir la población de células en dosis individuales, es de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30, preferentemente aproximadamente 20 duplicaciones. Las células pueden cultivarse continuamente a lo largo del proceso de expansión o pueden congelarse en uno o más puntos durante la expansión.

Las células a utilizar para dosis individuales pueden congelarse, por ejemplo, criopreservarse para uso posterior. Las dosis individuales pueden comprender, por ejemplo, de aproximadamente 1 millón a aproximadamente 100 millones de células por ml, y pueden comprender entre aproximadamente  $10^6$  y aproximadamente  $10^9$  células en

total.

En una realización específica, del método, células de pase 0 se cultivan para un primer número de duplicaciones, por ejemplo, aproximadamente 4 duplicaciones, a continuación se congelan en un primer banco de células. Las células del primer banco de células se congelan y se usan para sembrar un segundo banco de células, cuyas células se expanden para un segundo número de duplicaciones, por ejemplo, aproximadamente otras ocho duplicaciones. Las células en esta fase se recogen y congelan y se usan para sembrar nuevos cultivos de expansión que se dejan desarrollar para un tercer número de duplicaciones, por ejemplo, aproximadamente ocho duplicaciones adicionales, llevando el número acumulativo de duplicaciones celulares a aproximadamente 20. Las células en los puntos intermedios de los pases pueden congelarse en unidades de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 10 millones de células por ml, preferentemente aproximadamente 1 millón de células por ml, para su uso en un cultivo de expansión posterior. Las células a aproximadamente 20 duplicaciones pueden congelarse en dosis individuales de entre aproximadamente 1 millón y aproximadamente 100 millones de células por ml para la administración o el uso para preparar una composición que contiene células madres.

En una realización, por lo tanto, la invención proporciona un método de preparación de un banco de células madre placentarias, que comprende: expandir células madre placentarias de cultivo primario procedentes de una placenta postparto humana para una primera pluralidad de duplicaciones de la población; crioconservar dichas células madre placentarias para formar un banco de células patrón; expandir una pluralidad de células madre placentarias procedentes del banco de células patrón para una segunda pluralidad de duplicaciones de la población; crioconservar dichas células madre placentarias para formar un banco de células de trabajo; expandir una pluralidad de células madre placentarias procedentes del banco de células de trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de la población; y crioconservar dichas células madre placentarias en dosis individuales, en las que dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células madre placentarias. En una realización específica, el número total de duplicaciones de la población es de aproximadamente 20. En otra realización específica, dicha primera pluralidad de duplicaciones de la población es de aproximadamente cuatro duplicaciones de la población; dicha segunda pluralidad de duplicaciones de la población es de aproximadamente ocho duplicaciones de la población; y dicha tercera pluralidad de duplicaciones de la población es de aproximadamente ocho duplicaciones de la población. En otra realización específica, dichas células madre placentarias de cultivo primario comprenden células madre placentarias de perfundido placentario. En otra realización específica, dichas células madre placentarias de cultivo primario comprenden células madre placentarias procedentes de tejido placentario digerido. En otra realización específica, dichas células madre placentarias de cultivo primario comprenden células madre placentarias procedentes de perfundido placentario y procedentes de tejido placentario digerido. En otra realización específica, todas de dichas células madre placentarias en dicho cultivo primario de células madres placentarias son de la misma placenta. En otra realización específica, el método comprende además la etapa de seleccionar células madre placentarias CD200<sup>+</sup> entre dicha pluralidad de dichas células madre placentarias procedentes de dicho banco de células de trabajo para formar dosis individual. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10<sup>4</sup> a aproximadamente 10<sup>5</sup> células madre placentarias. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10<sup>5</sup> a aproximadamente 10<sup>6</sup> células madre placentarias. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10<sup>6</sup> a aproximadamente 10<sup>7</sup> células madre placentarias. En otra realización específica, dichas dosis individuales comprenden de aproximadamente 10<sup>7</sup> a aproximadamente 10<sup>8</sup> células madre placentarias.

En un aspecto preferido, el donante del cual se obtiene la placenta (por ejemplo, la madre) se ensaya para detectar al menos un patógeno. Si los ensayos de la madre resultan positivos para un patógeno ensayado, el lote completo de la placenta se descarta. Dicho ensayo puede realizarse en cualquier momento durante la producción de lotes de células madre placentarias, incluyendo antes o después de establecer las células de pase 0 o durante el cultivo de expansión. Los patógenos para los cuales la presencia se ensaya pueden incluir, sin limitación, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, virus de inmunodeficiencia humana (tipos I y II), citomegalovirus, herpesvirus y similares.

## 5.5 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

### 5.5.1 Inducción de la diferenciación en células neuronales o neurogénicas

La diferenciación neuronal de células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, colocando células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en neuronas. En un método ejemplar, un medio neurogénico comprende DMEM/FBS 20% y betamercaptoetanol 1 mM; dicho medio puede sustituirse después del cultivo durante aproximadamente 24 horas con medio constituido por DMEM y betamercaptoetanol 1-10 mM. En otra realización, las células se ponen en contacto con DMEM/DMSO 2% /200 μM de hidroxianisol butilado. En un ejemplo específico, el medio de diferenciación comprende DMEMIF-12 libre de suero, hidroxianisol butilado, cloruro de potasio, insulina, forskolina, ácido valproico e hidrocortisona. En otro ejemplo, la diferenciación neuronal se consigue sembrando células madre placentarias en placas revestidas de laminina en medio Neurobasal-A (Invitrogen, Carlsbad CA) que contiene suplemento B27 y L-glutamina, opcionalmente suplementado con bFGF y/o EGF. Las células madre placentarias también pueden ser inducidas a diferenciación neural mediante cocultivo con células neurales, o cultivo en medio condicionado con neuronas.

La diferenciación neuronal puede evaluarse, por ejemplo, mediante detección de morfología similar a las neuronas (por ejemplo, células bipolares que comprenden procesos extendidos) detección de la expresión de por ejemplo, receptor del factor de crecimiento nervioso y genes de cadena pesada del neurofilamento mediante RT-PCR; o detección de actividad eléctrica, por ejemplo, mediante fijación de voltaje "patch-clamp". Se considera que una célula madre placentaria se ha diferenciado en una célula neuronal cuando la célula cuando la célula presenta una o más de estas características.

#### 5.5.2 Inducción de la diferenciación en células adipogénicas

La diferenciación adipogénica de células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, situando a células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en adipocitos. Un medio adipogénico preferido comprende MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con suero de sangre del cordón umbilical 15%. En una realización, células madre placentarias son alimentadas con medio de inducción de la adipogénesis (Cambrex) y se cultivan durante 3 días (a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%), seguidos por 1-3 días de cultivo en medio de mantenimiento de la adipogénesis (Cambrex). Después de 3 ciclos completos de inducción/mantenimiento, las células se cultivan durante 7 días adicionales en medio de mantenimiento de la adipogénesis, sustituyendo el medio cada 2-3 días.

En otro ejemplo, células madre placentarias se cultivan en medio que comprende dexametasona 1 µM, indometacina 0,2 mM, 0,01 mg/ml de insulina, IBMX 0,5 mM, DMEM-alta glucosa, FBS y antibióticos. Células madre placentarias también pueden ser inducidas hacia la adipogénesis mediante cultivo en medio que comprende uno o más glucocorticoides (por ejemplo, dexametasona, indometasona, hidrocortisona, cortisona), insulina, un compuesto que eleva los niveles intracelulares de AMPc (por ejemplo, dibutilil-AMPc; 8-CPT-AMPc (8-(4)clorofeniltio)-adenosina, monofosfato 3',5' cíclico); 8-bromo-AMPc; dioctanoil-AMPc; forskolina) y/o un compuesto que inhibe la degradación de AMPc (por ejemplo, un inhibidor de fosfodiesterasa tal como isobutilmetilxantina (IBMX), metil isobutilxantina, teofilina, cafeína, indometacina).

Un sello distintivo de la adipogénesis es el desarrollo de múltiples vesículas lipídicas intracitoplasmáticas que pueden observarse fácilmente usando la tinción lipófila aceite rojo O. La expresión de genes de lipasa y/o proteínas de unión a ácidos grasos se confirma mediante RT/PCR en células madre placentarias que han comenzado a diferenciarse en adipocitos. Se considera que una célula madre placentaria se ha diferenciado en una célula adipocítica cuando la célula presenta una o más de estas características.

#### 5.5.3 Inducción de la diferenciación en células condrocíticas

La diferenciación condrogénica de células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, colocando a células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en condrocitos. Un medio condrogénico preferido comprende MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con suero de sangre del cordón umbilical 15%. En un ejemplo, células madre placentarias se dividen en alícuotas en un tubo de polipropileno estéril, se centrifugan (por ejemplo, a 150 x g durante 5 minutos), y se lavan dos veces en medio de condrogénesis incompleto (Cambrex). Las células se resuspenden en medio de condrogénesis completo (Cambrex) que contenía 0,01 µg/ml de TGF-beta-3 a una concentración de aproximadamente 1-20 x 10<sup>5</sup> células/ml. En otros ejemplos, células madre placentarias se ponen en contacto con factores de crecimiento exógenos, por ejemplo, GDF-5 o factor de crecimiento transformante beta3 (TGF-beta3), con o sin ascorbato. El medio condrogénico puede suplementarse con aminoácidos que incluyen prolina y glutamina, piruvato sódico, dexametasona, ácido ascórbico, e insulina/transferrina/selenio. El medio condrogénico puede suplementarse con hidróxido sódico y/o colágeno. Las células madre placentarias pueden cultivarse a alta o baja densidad. Las células se cultivan preferentemente en ausencia de suero.

La condrogénesis puede evaluarse mediante, por ejemplo, observación de la producción de sustancia fundamental eosinófila, tinción con safranina-O para la expresión de glucosaminoglucano; tinción con hematoxilina/eosina, evaluación de la morfología celular, y/o confirmación por RT/PCR de la expresión de genes de colágeno 2 y colágeno 9. La condrogénesis también puede observarse cultivando las células madre en un sedimento, formado, por ejemplo, centrifugando suavemente células madre en suspensión (por ejemplo, a aproximadamente 800 g durante aproximadamente 5 minutos). Después de 1-28 días, el sedimento de células madre comienza a formar una matriz resistente y demuestra una integridad estructural no descubierta en líneas celulares no inducidas, o no condrogénicas, cuyos sedimentos tienden a desmoronarse cuando son estimulados. La condrogénesis también puede demostrarse, por ejemplo, en dichos sedimentos de células, tiñendo con un colorante que tiñe el colágeno, por ejemplo, rojo sirio, y/o un colorante que tiñe glucosaminoglucanos (GAG), tales como, por ejemplo, azul alcian. Se considera que una célula madre placentaria se ha diferenciado en una célula condrocítica cuando la célula presenta una o más de estas características.

#### 5.5.4 Inducción de la diferenciación en células osteocíticas

La diferencia osteogénica de células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, situando a células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en osteocitos. Un medio osteocítico preferido comprende MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con suero de sangre del cordón umbilical 15%,

seguido por Medio de inducción osteogénica (Cambrex) que contiene dexametasona 0,1  $\mu$ M, ácido ascórbico-2-fosfato 0,05 mM, beta glicerofosfato 10 mM. En otro ejemplo, células madre placentarias se cultivan en medio (por ejemplo, DMEM-baja glucosa) que contiene de aproximadamente  $10^{-7}$  a aproximadamente dexametasona  $10^{-9}$  M, sal de ascorbato fosfato aproximadamente 10-50  $\mu$ M (por ejemplo, ascorbato-2-fosfato) y  $\beta$ -glicerofosfato de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 10 mM. El medio osteogénico también puede incluir suero, uno o más agentes antibióticos/antimicóticos, factor de crecimiento transformante-beta (por ejemplo, TGF- $\beta$ 1) y/o proteína morfogénica ósea (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, o una combinación de las mismas).

La diferenciación puede ensayarse usando una tinción específica de calcio, por ejemplo, tinción de von Kossa, y detección por RT/PCR de, por ejemplo, fosfatasa alcalina, osteocalcina, sialoproteína ósea y/o expresión del gen de osteopontina. Se considera que una célula madre placentaria se ha diferenciado en una célula osteocítica cuando la célula presenta una o más de estas características.

#### 5.5.5 Inducción de la diferenciación en células pancreáticas

La diferenciación de células madre placentarias en células pancreáticas productoras de insulina puede conseguirse, por ejemplo, colocando a células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en células pancreáticas.

Un medio pancreático ejemplar comprende DMEM/CBS 20%, suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1, 2 ng/ml. Este medio se combina con medios condicionados procedentes de cultivos de células neuronales positivas para nestina a 50/50 v/v. Puede usarse Suero de sustitución Knockout en lugar de CBS. Las células se cultivan durante 14-28 días, realimentando cada 3-4 días.

La diferenciación puede confirmarse ensayando para, por ejemplo, producción de proteína de insulina, o expresión de genes de insulina mediante RT/PCR. Se considera que una célula madre placentaria se ha diferenciado en una célula pancreática cuando la célula presenta una o más de estas características.

#### 5.5.6 Inducción de la diferenciación en células cardíacas

La diferenciación miogénica (cardiogénica) de células madre placentarias puede conseguirse, por ejemplo, situando a células madre placentarias en condiciones de cultivo celular que inducen la diferenciación en cardiomiocitos. Un medio cardiomiocítico preferido comprende DMEM/CBS 20% suplementado con ácido retinoico, 1  $\mu$ M; factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1, 2 ng/ml; y factor de crecimiento epidérmico, 100 ng/ml. Puede usarse suero de sustitución Knockout (Invitrogen, Carlsbad, California) en lugar de CBS. Como alternativa, se cultivan células madre placentarias en DMEM/CBS 20% suplementado con 50 ng/ml de Cardiotropina-1 durante 24 horas. En otro ejemplo, pueden cultivarse células madre placentarias 10-14 días en medio libre de proteínas durante 5-7 días, a continuación estimularse con extracto de miocardio humano, por ejemplo, producido homogeneizando miocardio humano en tampón HEPES 1% suplementado con suero de sangre del cordón umbilical 1%.

La diferenciación puede confirmarse mediante demostración de expresión de genes de actina cardíaca, por ejemplo, mediante RT/PCR, o mediante latido visible de la célula. Se considera que una célula madre placentaria se ha diferenciado en una célula cardíaca cuando la célula presenta una o más de estas características.

### 5.6 CONSERVACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

Células madre placentarias pueden conservarse, es decir, colocarse en condiciones que permiten almacenamiento a largo plazo, o condiciones que inhiben la muerte celular mediante, por ejemplo, apoptosis o necrosis.

Las células madre placentarias pueden conservarse usando, por ejemplo, una composición que comprende un inhibidor de apoptosis, inhibidor de necrosis y/o un perfluorocarbono portador de oxígeno, tal como se describe en la solicitud provisional de Estados Unidos relacionada N° 60/754.969, titulada "Improved Medium for Collecting Células madre placentarias and Preserving Organs", presentada el 25 de diciembre de 2005. En una realización, la invención proporciona un método de conservación de una población de células madre que comprende poner en contacto a dicha población de células madre con una composición de recogida de células madre que comprende un inhibidor de apoptosis y un perfluorocarbono portador de oxígeno, en la que dicho inhibidor de apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células madre, en comparación con una población de células madre no puesta en contacto con el inhibidor de apoptosis. En un aspecto específico, dicho inhibidor de apoptosis es un inhibidor de caspasa. En otro aspecto específico, dicho inhibidor de apoptosis es un inhibidor de JNK. En un aspecto más específico, dicho inhibidor de JNK no modula la diferenciación o proliferación de dichas células madre. En otro aspecto, dicha composición de recogida de células madre comprende dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en fases separadas. En otro aspecto, dicha composición de recogida de células madre comprende dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono portador de oxígeno en una emulsión. En otro aspecto, la composición de recogida de células madre adicionalmente comprende un emulsionante, por ejemplo, lecitina. En otro aspecto, dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 25°C en el momento de

contactar con las células madre. En otro aspecto más específico, dicho inhibidor de apoptosis y dicho perfluorocarbono están entre aproximadamente 2°C y 10°C, o entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 5°C, en el momento de contactar con las células madre. En otro aspecto más específico, dicho contacto se realiza durante el transporte de dicha población de células madre. En otro aspecto más específico, dicho contacto se realiza durante la congelación y descongelación de dicha población de células madre.

En la presente memoria se desvela además un método de conservación de una población de células madre placentarias que comprende poner en contacto dicha población de células madre con un inhibidor de apoptosis y un compuesto que conserva los órganos, en el que dicho inhibidor de apoptosis está presente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o prevenir la apoptosis en la población de células madre, en comparación con una población de células madre no puesta en contacto con el inhibidor de apoptosis. En un aspecto específico, el compuesto que conserva los órganos es solución UW (descrita en la patente de Estados Unidos N° 4.798.824; también conocida como ViaSpan; véase también Southard et al., *Transplantation* 49(2): 251-257 (1990)) o una solución descrita en Stern et al., patente de Estados Unidos N° 5.552.267. En otro aspecto, dicho compuesto que conserva los órganos es hidroxietilalmidón, ácido lactobiónico, rafinosa, o una combinación de los mismos. En otro aspecto, la composición de recogida de células madre adicionalmente comprende un perfluorocarbono portador de oxígeno, en dos fases o en forma de una emulsión.

En otro aspecto del método, células madre placentarias se ponen en contacto con una composición de recogida de células madre que comprende un inhibidor de apoptosis y perfluorocarbono portador de oxígeno, compuesto que conserva los órganos, o combinación de los mismos, durante la perfusión. En otro aspecto, dichas células madre son contactadas durante un proceso de ruptura de tejidos, por ejemplo, digestión enzimática. En otro aspecto, las células madre placentarias son puestas en contacto con dicho compuesto de recogida de células madre después de la recogida por perfusión, o después de la recogida mediante ruptura de tejidos, por ejemplo, digestión enzimática.

Típicamente, durante la recogida, enriquecimiento y aislamiento de células placentarias, es preferible minimizar o eliminar la tensión celular debido a hipoxia y la tensión mecánica. En otro aspecto del método, por lo tanto, una célula madre, o población de células madre, es expuesta a una condición hipóxica durante la recogida, enriquecimiento o aislamiento durante menos de seis horas durante dicha conservación, en la que una condición hipóxica es una concentración de oxígeno que es menor que la concentración normal de oxígeno en la sangre. En un aspecto más específico, dicha población de células madre es expuesta a dicha condición hipóxica durante menos de dos horas durante dicha conservación. En otro aspecto más específico, dicha población de células madre es expuesta a dicha condición hipóxica durante menos de una hora, o menos de treinta minutos, o no es expuesta a una condición hipóxica, durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento. En otro aspecto específico, dicha población de células madre no es expuesta a tensión cortante durante la recogida, el enriquecimiento o el aislamiento.

Las células madre placentarias de la invención pueden crioconservarse, por ejemplo, en un medio de crioconservación en recipientes pequeños, por ejemplo, ampollas. El medio de crioconservación adecuado incluye, aunque sin limitarse a, un medio de cultivo que incluye, por ejemplo, un medio de crecimiento o medio de congelación de células, por ejemplo un medio de congelación de células disponible en el mercado, por ejemplo, C2695, C2639 o C6039 (Sigma). El medio de crioconservación preferentemente comprende DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 10% (v/v). El medio de crioconservación puede comprender agentes adicionales, por ejemplo, metilcelulosa y/o glicerol. Las células madre placentarias preferentemente se enfrían a aproximadamente 1°C/min durante la crioconservación. Una temperatura de crioconservación preferida es de aproximadamente -80°C a aproximadamente -180°C, preferentemente de aproximadamente -125°C a aproximadamente -140°C. Las células crioconservadas pueden transferirse a nitrógeno líquido antes de descongelarlas para su uso. Por ejemplo, una vez que las ampollas han alcanzado aproximadamente -90°C, se transfieren a un área de almacenamiento en nitrógeno líquido. Las células crioconservadas preferentemente se descongelan a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 37°C.

## 5.7 USOS DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

### 5.7.1 Poblaciones de células madre placentarias

Las poblaciones de células madre placentarias pueden usarse para tratar cualquier enfermedad, trastorno o afección que responda al tratamiento mediante administración de una población de células madre. Tal como se usa en la presente memoria, "tratar" abarca la cura, el remedio, la mejoría, la disminución de la gravedad, o la reducción de la evolución temporal de, una enfermedad, trastorno o afección, o cualquier parámetro o síntoma de la misma.

Las células madre placentarias, y las poblaciones de células madre placentarias, pueden inducirse a diferenciarse en un tipo de célula particular, *ex vivo* o *in vivo*, en preparación para la administración a un individuo que necesita células madre, o células diferenciadas a partir de células madre. Por ejemplo, pueden inyectarse células madre placentarias en un órgano dañado, y para neogénesis de órganos y reparación de lesiones *in vivo*. Dicha lesión puede deberse a dichas afecciones y trastornos incluyendo, aunque sin limitarse a, infarto de miocardio, trastornos convulsivos, esclerosis múltiple, apoplejía, hipotensión, paro cardíaco, isquemia, inflamación, tiroiditis, pérdida de la

función cognitiva asociada a la edad, daño por radiación, parálisis cerebral, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Leigh, demencia por SIDA, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, distrofia muscular, enfermedad renal isquémica traumatismo cerebral o de la médula espinal, bypass cardiopulmonar, glaucoma, isquemia retiniana, o traumatismo de la retina.

- 5 Las células madre placentarias pueden usarse para tratar afecciones autoinmunitarias tales como diabetes juvenil, lupus, distrofia muscular, artritis reumatoide, y similares.

Pueden usarse poblaciones de células madre placentarias aisladas en terapia de sustitución enzimática autóloga o heteróloga para tratar enfermedades o afecciones específicas, incluyendo, aunque sin limitarse a enfermedades de almacenamiento lisosomal, tales como enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher (por ejemplo, deficiencia de glucocerebrosidasa), síndromes de Hunter y Hurler, síndrome de Maroteaux-Lamy, fucosidosis (deficiencia de fucosidasa), enfermedad de Batten (CLN3), así como otras gangliosidosis, mucopolisacaridosis y glucogenosis.

10

Las poblaciones de células madre placentarias aisladas, en solitario o en combinación con poblaciones de células madre o progenitoras, pueden usarse en solitario, o como portadores de transgenes autólogos o heterólogos en terapia génica, para corregir errores innatos del metabolismo, fibrosis quística, adrenoleucodistrofia (por ejemplo, deficiencia de co-A ligasa), leucodistrofia metacromática (deficiencia de arilsulfatasa A) (por ejemplo, formas infantil tardía o juvenil sintomática o presintomática), leucodistrofia de células globosas (enfermedad de Krabbe; deficiencia de galactocerebrosidasa), deficiencia de la lipasa ácida (enfermedad de Wolman), enfermedad de almacenamiento de glucógeno, hipotiroidismo, anemia (por ejemplo, anemia aplásica, anemia de células falciformes, etc.), síndrome de Pearson, enfermedad de Pompe, fenilcetonuria (PKU), porfiria, enfermedad del jarabe de arce, homocistinuria, mucopolisacaridosis, enfermedad crónica granulomatosa y tirosinemia y enfermedad de Tay-Sachs o para tratar cáncer (por ejemplo, un neoplasia hematológica), tumores u otras afecciones patológicas. Las células madre placentarias pueden usarse para tratar displasia esquelética. En un aspecto, las células madre placentarias transformadas para expresar el activador de plasminógeno tisular (tPA) pueden administrarse a un individuo para tratar un trombo.

15

20

25

Pueden usarse poblaciones de células madre placentarias aisladas en terapias o protocolos de regeneración sustitución tisular autólogas o heterólogas, incluyendo, aunque sin limitarse a, tratamiento de defectos epiteliales de la córnea, tratamiento de la osteogénesis imperfecta, reparación del cartilago, dermoabrasión facial, membranas mucosas, membranas timpánicas, revestimientos intestinales, estructuras neurológicas (por ejemplo, retina, neuronas auditivas en membrana basilar, neuronas olfativas en 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.

30

Una población aislada de células madre placentarias se usa en reconstrucción hematopoyética en un individuo que ha sufrido una pérdida parcial o total de células madre hematopoyéticas, por ejemplo, individuos expuestos a dosis letales o subletales de radiación (ya sea industrial, médica o militar); individuos que se han sometido a mieloablación como parte de, por ejemplo, terapia para cáncer, y similares, en el tratamiento de, por ejemplo, una neoplasia hematológica. Pueden usarse células madre placentarias en reconstitución hematopoyética en individuos que tienen anemia (por ejemplo, anemia aplásica, anemia de células falciformes, etc.). Preferentemente, las células madre placentarias son administradas a aquellos individuos con una población de células madre hematopoyéticas. Pueden usarse poblaciones aisladas de células madre obtenidas a partir de la placenta en lugar de, o para suplementar, médula ósea o poblaciones de células madre obtenidas a partir de médula ósea. Típicamente, aproximadamente de  $1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^8$  células mononucleares de médula ósea por kilogramo de peso del paciente se infunden para injerto en un trasplante de médula ósea (es decir, aproximadamente 70 ml de médula para un donante de 70 kg). Para obtener 70 ml se requiere una donación intensiva y una pérdida significativa de sangre del donante en el proceso de donación. Una población aislada de células madre placentarias para reconstitución hematopoyética puede comprender, aproximadamente, al menos, o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células madre placentarias.

35

40

45

Por lo tanto, pueden usarse células madre placentarias para tratar a pacientes que tienen un cáncer de la sangre, tal como un linfoma, leucemia (como leucemia mieloide crónica o aguda, leucemia linfocítica aguda, enfermedad de Hodgkin, etc.), mielodisplasia, síndrome mielodisplásico, y similares. En otro aspecto, la enfermedad, trastorno o afección es enfermedad granulomatosa crónica.

50

Puesto que la reconstitución hematopoyética puede usarse en el tratamiento de anemias, en la presente memoria se desvela además el tratamiento de un individuo con una combinación de células madre desvelada en la presente memoria, en la que el individuo tiene una anemia o trastorno de la hemoglobina de la sangre. La anemia o trastorno puede ser natural (por ejemplo, causado por la genética o una enfermedad), o puede ser inducida de forma artificial (por ejemplo, mediante envenenamiento accidental o deliberado, quimioterapia, y similares). En otro aspecto, la enfermedad o trastorno es un síndrome de insuficiencia de la médula (por ejemplo, anemia aplásica, síndrome de Kostmann, anemia de Diamond Blackfan, trombocitopenia amegacariocítica, y similares), un trastorno de médula ósea o una enfermedad o trastorno hematopoyético.

55

También pueden usarse células madre placentarias para tratar enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave,

incluyendo, aunque sin limitarse a, una enfermedad de inmunodeficiencia combinada (por ejemplo, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome grave de DiGeorge, y similares).

5 Las células madre placentarias desveladas en la presente memoria, en solitario o en combinación con otras poblaciones de células madre o células progenitoras, pueden usarse en la fabricación de un tejido u órgano *in vivo*. Los métodos desvelados en la presente memoria abarcan el uso de células obtenidas de la placenta, por ejemplo, células madre o células progenitoras, para sembrar una matriz y para cultivarlas en las condiciones apropiadas para permitir a las células diferenciarse y poblar la matriz. Los tejidos y órganos obtenidos mediante los métodos desvelados en la presente memoria pueden usarse para diversos fines, incluyendo fines de investigación y terapéuticos.

10 Pueden usarse células madre placentarias y poblaciones de células madre placentarias para trasplantes autólogos y alogénicos, incluyendo trasplantes hematopoyéticos de tipo HLA coincidente y no coincidente. En un aspecto del uso de células madre placentarias como trasplantes hematopoyéticos alogénicos, el huésped es tratado para reducir la reacción inmunológica de las células del donante, o para crear inmunotolerancia (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.800.539 y 5.806.529). En otro aspecto, el huésped no es tratado para reducir el rechazo  
15 inmunológico o para crear inmunotolerancia.

Células madre placentarias, en solitario o en combinación con una o más poblaciones de células madre diferentes, pueden usarse en protocolos de trasplante terapéutico, por ejemplo, para aumentar o sustituir células madre o progenitoras del hígado, páncreas, riñón, pulmón, sistema nervioso, aparato muscular, hueso, médula ósea, timo, bazo, tejido mucosal, gónadas, o cabello. Adicionalmente, pueden usarse células madre placentarias en lugar de  
20 clases específicas de células progenitoras (por ejemplo, condrocitos, hepatocitos, células hematopoyéticas, células el parénquima pancreático, neuroblastos, células progenitoras musculares, etc.) en protocolos terapéuticos o de investigación en los que se usarían típicamente células progenitoras.

Pueden usarse células madre placentarias, particularmente células madre placentarias CD200<sup>+</sup>, como complemento a la terapia de sustitución capilar. Por ejemplo, células madre placentarias, por ejemplo, células madre placentarias C200<sup>+</sup>, se inyectan por vía subcutánea o por vía intradérmica en un lugar en el que se desea el crecimiento o  
25 recrecimiento del cabello. El número de células madre inyectadas puede estar, por ejemplo, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 10.000 por inyección, en un volumen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 µl, aunque también pueden usarse más o menos células en mayor o menor volumen. La administración de células madre placentarias para facilitar el recrecimiento del cabello puede comprender una única inyección o múltiples inyecciones en, por ejemplo, un patrón regular o aleatorio en una zona en la que se desea el recrecimiento del  
30 cabello. Pueden usarse terapias de recrecimiento del cabello conocidas junto con las células madre placentarias, por ejemplo, minoxidil tópico. La caída del cabello que puede tratarse usando células madre placentarias puede ser de origen natural (por ejemplo, calvicie de patrón masculino) o inducida (por ejemplo, resultante de exposición a productos químicos tóxicos).

35 Pueden usarse células madre placentarias y poblaciones de células madre placentarias para el aumento, la reparación o la sustitución de cartílago, tendones, o ligamentos. Por ejemplo, en ciertos aspectos, prótesis (por ejemplo, prótesis de cadera) pueden revestirse con construcciones de tejido de cartílago de sustitución que se hicieron crecer a partir de células madre placentarias. En otros aspectos, pueden reconstruirse articulaciones (por ejemplo, la rodilla) con construcciones de tejido de cartílago que se hicieron crecer a partir de células madre  
40 placentarias. Las construcciones de tejido de cartílago también pueden emplearse en cirugía reconstructiva mayor para diferentes tipos de articulaciones (véase, por ejemplo, Resnick & Niwayama, eds., 1988, *Diagnosis of Bone and Joint Disorders*, 2d ed., W. B. Saunders Co.).

45 Las células madre placentarias pueden usarse para reparar el daño a tejidos y órganos que resulta de, por ejemplo, traumatismo, trastornos metabólicos, o enfermedad. El traumatismo puede ser, por ejemplo, traumatismo por cirugía, por ejemplo, cirugía cosmética. En dicho ejemplo, a un paciente se le pueden administrar células madre placentarias, en solitario o combinadas con otras poblaciones de células madre o progenitoras, para regenerar o restaurar tejidos u órganos que han sido dañados como consecuencia de una enfermedad.

### 5.7.2 Composiciones que comprenden células madre placentarias

50 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden células madre placentarias, o biomoléculas de las mismas. Las células madre placentarias de la presente invención pueden combinarse con cualquier compuesto, composición o dispositivo fisiológicamente aceptable o médicamente aceptable, para uso en, por ejemplo, investigación o terapéutica.

#### 5.7.2.1 Células madre placentarias crioconservadas

55 Las poblaciones de células madre placentarias de la invención pueden conservarse, por ejemplo, crioconservarse para uso posterior. Los métodos para la crioconservación de células, tales como células madre, se conocen bien en la técnica. Pueden prepararse poblaciones de células madre placentarias en una forma que sea fácilmente administrable a un individuo. Por ejemplo, la invención se refiere a una población de células madres placentarias que está contenida dentro de un recipiente que es adecuado para uso médico. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo,

una bolsa, matraz, frasco de plástico estéril u otro recipiente a partir del cual la población de células madre placentarias puede dispensarse fácilmente. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de sangre u otra bolsa de plástico médicamente aceptable adecuada para la administración intravenosa de un líquido a un receptor. El recipiente es preferentemente uno que permite la crioconservación de la población de células madre combinada.

- 5 La población de células madre placentarias crioconservada puede comprender células madre placentarias obtenidas a partir de un único donante, o de múltiples donantes. La población de células madre placentarias pueden tener compatibilidad HLA completa con un receptor pretendido, o incompatibilidad HLA parcial o total.

Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una composición que comprende una población de células madres placentarias en un recipiente. En una realización específica, la población de células madre está crioconservada. En otra realización específica, el recipiente es una bolsa, matraz o frasco. En una realización más específica, dicha bolsa es una bolsa de plástico estéril. En una realización más específica, dicha bolsa es adecuada para, permite o facilita la administración intravenosa de dicha población de células madre placentarias. La bolsa puede comprender múltiples luces o compartimentos que están interconectados para permitir la mezcla de las células madre placentarias y una o más soluciones más, por ejemplo, un fármaco, antes de, o durante, la administración. En otra realización específica, la composición comprende uno o más compuestos que facilitan la crioconservación de la población de células madre combinada. En otra realización específica, dicha población de células madre placentarias está contenida dentro de una solución acuosa fisiológicamente aceptable. En una realización más específica, dicha solución acuosa fisiológicamente aceptable es una solución de NaCl 0,9%. En otra realización específica, dicha población de células madre placentarias comprende células placentarias que tienen compatibilidad HLA a un receptor de dicha población de células madre. En otra realización específica, dicha población de células madre combinadas comprende células placentarias que tienen incompatibilidad HLA al menos parcial con un receptor de dicha población de células madre. En otro aspecto específico, dichas células madre placentarias proceden de una pluralidad de donantes.

#### 5.7.2.2 Composiciones farmacéuticas

25 Poblaciones de células madre placentarias, o poblaciones de células que comprenden células madre placentarias, pueden formularse en composiciones farmacéuticas para uso *in vivo*. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden una población de células madre placentarias, o una población de células que comprende células madre placentarias, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable aceptada para administración *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender cualquiera de las poblaciones de células madre placentarias, o tipos de células madre placentarias, descritas en otra parte en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender células madre placentarias fetales, maternas, o tanto fetales como maternas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además células madre placentarias obtenidas de un único individuo o placenta, o de una pluralidad de individuos o placentas.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender cualquier número de células madre placentarias. Por ejemplo, una única dosis unitaria de células madre placentarias puede comprender, en diversas realizaciones, aproximadamente, al menos, o no más de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  o más células madre placentarias.

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

45 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender uno o más compuestos que, por ejemplo, facilitan el injerto (por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de células T, un inmunosupresor, o similares); estabilizantes tales como albúmina, dextrano 40, gelatina, hidroxietilalmidón, y similares.

Cuando se formula como una solución inyectable, en una realización, la composición farmacéutica de la invención comprende aproximadamente 1,25% de HSA y aproximadamente 2,5% de dextrano. Pueden usarse otras formulaciones inyectables, adecuadas para la administración de productos celulares.

50 En una realización, la composición de la invención comprende células madre placentarias que son sustancialmente, o completamente, de origen no materno. Por ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende una población de células madre placentarias que son CD200<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>; CD200<sup>+</sup> y OCT-4<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y HLA-G<sup>+</sup>; CD73<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dicha población de células madre placentarias, cuando dicha población de células placentarias se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a embriode; u OCT-4<sup>+</sup> y facilitan la formación de uno o más cuerpos de tipo embriode en una población de células placentarias que comprende dicha población de células madre placentarias, cuando dicha población de células placentarias se cultiva en condiciones que permiten la formación de un cuerpo similar a embriode; o una combinación de las anteriores, en la que al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de dichas células madre

placentarias son de origen no materno. En una realización específica, la composición adicionalmente comprende una célula madre que no se obtiene de una placenta.

#### 5.7.2.3 Medios condicionados por células madre placentarias

5 Las células madre placentarias de la invención pueden usarse para producir medio condicionado, es decir, medio que comprende una o más biomoléculas secretadas o excretadas por las células madre. En diversas realizaciones, el medio condicionado comprende medio en el que células madre placentarias han crecido durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días. En otras realizaciones, el medio condicionado comprende medio en el que células madre placentarias han crecido hasta al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de confluencia, o hasta 100% confluencia. Dicho medio condicionado puede usarse para soportar el cultivo de una población independiente de células madre placentarias, o de células madre de otro tipo. En otra realización, el medio condicionado comprende medio en el que células madre placentarias se han diferenciado en un tipo de célula adulta. En otra realización, el medio condicionado de la invención comprende medio en el que se han cultivado células madre placentarias y células madre no placentarias.

#### 5.7.2.4 Matrices que comprenden células madre placentarias

15 La invención se refiere, además, a matrices, hidrogeles, matrices de soporte, y similares que comprenden una célula madre placentaria, o una población de células madre placentarias.

Células madre placentarias de la invención pueden sembrarse sobre una matriz natural, por ejemplo, un biomaterial placentario tal como una membrana amniótica material. Dicha membrana amniótica material puede ser, por ejemplo, membrana amniótica diseccionada directamente de una placenta de mamífero; membrana amniótica fijada o tratada térmicamente, membrana amniótica sustancialmente seca (es decir, <20% H<sub>2</sub>O), membrana coriónica, membrana coriónica sustancialmente seca, membrana amniótica y coriónica sustancialmente seca, y similares. Biomateriales placentarios preferidos en los que pueden sembrarse células madre placentarias se describen en Hariri, publicación de solicitud estadounidense N° 2004/0048796.

25 Las células madre placentarias de la invención pueden suspenderse en una solución de hidrogel adecuada para, por ejemplo, inyección. Hidrogeles adecuados para dichas composiciones incluyen péptidos de autoensamblaje, tales como RAD16. En una realización, una solución de hidrogel que comprende las células se dejar endurecer, por ejemplo, en un molde, para formar una matriz que tiene células dispersadas en su interior para implantación. Las células madre placentarias en dicha matriz también pueden cultivarse de modo que las células se expandan mediante mitosis antes de la implantación. El hidrogel es, por ejemplo, un polímero orgánico (natural o sintético) que se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura reticular abierta tridimensional que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. Materiales de formación de hidrogeles incluyen polisacáridos tales como alginato y sales del mismo, péptidos, polifosfazinas y poliácridatos, que se reticulan iónicamente, o polímeros de bloque tales como copolímeros de óxido de polietileno-propilenglicol, que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. En algunas realizaciones, el hidrogel o matriz es biodegradable.

35 En algunas realizaciones de la invención, la formulación comprende un gel polimerizable *in situ* (véase., por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2002/0022676; Anseth et al., J. Control Release, 78(1-3): 199-209 (2002); Wang et al., Biomaterials, 24(22): 3969-80 (2003).

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

50 Las células madre placentarias de la invención o cocultivos de las mismas pueden sembrarse sobre un marco o matriz de soporte tridimensional o implantarse *in vivo*. Dicho marco puede implantarse en combinación con cualquiera de uno o más factores de crecimiento, células, fármacos u otros componentes que estimulan la formación de tejido o potencian o mejoran de otro modo la puesta en práctica de la invención.

55 Los ejemplos de matrices de soporte que pueden usarse en la presente invención incluyen mallas no tejidas, espumas porosas o péptidos de autoensamblaje. Las mallas no tejidas pueden formarse usando fibras que comprenden un copolímero absorbible sintético de ácidos glicólicos y lácticos (por ejemplo, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). Espumas, compuestas por, por ejemplo, copolímero de poli(ε-caprolactona)/ácido poli(glicólico) (PCL/PGA), formadas por procesos tales como liofilización (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.355.699), también pueden usarse como matrices de soporte.

Células madre placentarias de la invención también pueden sembrarse en, o ponerse en contacto con, un material

de cerámica fisiológicamente aceptable incluyendo, aunque sin limitarse a, mono-, di-, tri-, alfa-tri-, beta-tri- y tetra-fosfato de calcio, hidroxiapatita, fluoroapatitas, sulfatos de calcio, fluoruros de calcio, óxidos de calcio, carbonatos de calcio, fosfatos de calcio de magnesio, vidrios biológicamente activos tales como BIOGLASS® y mezclas de los mismos. Los materiales cerámicos biocompatibles porosos disponibles actualmente en el mercado incluyen SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canadá), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Francia), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Suiza) y productos de injertos óseos de colágeno mineralizado tales como HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) y VITOSS®, RHAKOSS™ y CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.). El marco puede ser una mezcla, combinación o compuesto de materiales naturales y/o sintéticos.

En otra realización, células madre placentarias pueden sembrarse en, o ponerse en contacto con, un fieltro, que puede, por ejemplo, estar compuesto por un hilo multifilamento hecho de material bioabsorbible tal como copolímeros o combinaciones de PGA, PLA, PCL, o ácido hialurónico.

Las células madre placentarias de la invención pueden, en otra realización, sembrarse en matrices de soporte de espuma que pueden ser estructuras compuestas. Dichas matrices de soporte de espuma pueden moldearse en una forma útil, tal como la de una parte de una estructura específica en el cuerpo que debe repararse, reemplazarse o aumentarse. En algunos aspectos, el marco se trata, por ejemplo, con ácido acético 0,1 M mediante incubación en polilisina, PBS y/o colágeno, antes de la inoculación de las células de la invención para mejorar la unión celular. Las superficies externas de una matriz pueden modificarse para mejorar la fijación o el crecimiento de células y la diferenciación de tejido, tal como mediante revestimiento con plasma de la matriz, o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glucoproteínas, glucosaminoglucanos (por ejemplo, sulfato de heparina, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatán, sulfato de queratina, etc.), una matriz celular y/u otros materiales tales como, aunque sin limitarse a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas vegetales y similares.

En algunas realizaciones, la matriz de soporte comprende, o se trata con, materiales que le hacen no trombogénica. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y sostener el crecimiento endotelial, la migración y la deposición de matriz extracelular. Los ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, aunque no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de Tipo IV, materiales sintéticos tales como EPTFE y siliconas de poliuretano urea segmentadas, tales como PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., 15 Berkeley, Calif). La matriz de soporte también puede comprender agentes antitrombóticos tales como heparina; las matrices de soporte también pueden tratarse para alterar la carga de la superficie (por ejemplo, revistiendo con plasma) antes de sembrar con células madre placentarias.

### 5.7.3 Líneas de células madre placentarias inmortalizadas

Las células placentarias de mamífero pueden inmortalizarse condicionalmente mediante transfección con cualquier vector adecuado que contenga un gen promotor del crecimiento, es decir, un gen que codifica una proteína que, en las condiciones apropiadas, promueve el crecimiento de la célula transfectada, de modo que la producción y/o actividad de la proteína promotora del crecimiento sea regulable mediante un factor externo. En una realización preferida el gen promotor del crecimiento es un oncogén tal como, aunque sin limitarse a, v-myc, N-myc, c-myc, p53, antígeno T grande de SV40, antígeno T grande de polioma, adenovirus Ela o proteína E7 de papilomavirus humano.

La regulación externa de la proteína promotora del crecimiento puede lograrse situando al gen promotor del crecimiento bajo el control de un promotor externamente regulable, por ejemplo, un promotor cuya actividad puede controlarse mediante, por ejemplo, modificación de la temperatura de las células transfectadas o la composición del medio en contacto con las células. Puede emplearse un sistema de expresión génica controlada por tetraciclina (tet) (véase Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 89: 5547-5551, 1992; Hoshimaru et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 93: 1518-1523, 1996). En ausencia de tet, un transactivador controlado por tet (tTA) dentro de este vector activa fuertemente la transcripción de  $ph_{CMV^{-1}}$ , un promotor mínimo del citomegalovirus humano fusionado con secuencias operadoras de tet. La tTA es una proteína de fusión del represor (tetR) del operón de resistencia a tet procedente del transposón-10 de *Escherichia coli* y el dominio ácido de VP16 del virus del herpes simplex. Concentraciones no tóxicas bajas de tet (por ejemplo, 0,01-1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) suprimen casi completamente la transactivación mediante tTA.

El vector contiene, además, un gen que codifica un marcador seleccionable, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a los fármacos. El gen de resistencia a la neomicina bacteriana ( $neo^R$ ) es un marcador tal que puede emplearse como se describe en la presente memoria. Las células que portan  $neo^R$  pueden seleccionarse por medios conocidos por los expertos en la materia, tal como la adición de, por ejemplo, 100-200  $\mu\text{g/ml}$  de G418 al medio de cultivo.

La transfección puede conseguirse mediante cualquiera de diversos medios conocidos por los expertos en la materia que incluyen, aunque sin limitarse a, la infección retroviral. En general, un cultivo celular puede transfectarse mediante incubación con una mezcla de medio condicionado recogida de la línea celular del productor para el vector y DMEM/F12 que contiene suplementos de N2. Por ejemplo, un cultivo celular placentario preparado como se ha descrito anteriormente puede infectarse después de, por ejemplo, cinco días *in vitro* mediante incubación durante aproximadamente 20 horas en un volumen de medio condicionado y dos volúmenes de DMEM/F12 que contiene

suplementos de N2. Las células transfectadas que portan un marcador seleccionable pueden seleccionarse a continuación tal como se ha descrito anteriormente.

5 Después de la transfección, los cultivos se hacen pasar sobre una superficie que permite la proliferación, por ejemplo, permite que al menos aproximadamente 30% de las células se dupliquen en un período de 24 horas. Preferentemente, el sustrato es un sustrato de poliornitina/laminina, que consta de plástico de cultivo tisular revestido con poliornitina (10 µg/ml) y/o laminina (10 µg/ml), un sustrato de polilisina/laminina o una superficie tratada con fibronectina. Los cultivos se alimentan entonces cada 3-4 días con un medio de cultivo, que puede suplementarse o no con uno o más factores que mejoran la proliferación. Pueden añadirse al medio de cultivo factores que mejoran la proliferación cuando los cultivos son menos de 50% confluentes.

10 Las líneas de células madre placentarias inmortalizadas condicionalmente pueden hacerse pasar usando técnicas convencionales, tales como mediante tripsinización, cuando son 80-95% confluentes. Hasta aproximadamente el vigésimo pase, en algunos ejemplos, es beneficioso mantener la selección (mediante, por ejemplo, la adición de G418 para células que contienen un gen de resistencia a la neomicina). Las células también pueden congelarse en nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo.

15 Las líneas celulares clónicas pueden aislarse de una línea de células madre placentarias inmortalizadas condicionalmente tal como se ha descrito anteriormente. En general, dichas líneas celulares clónicas pueden aislarse usando técnicas estándar, tal como mediante dilución límite o usando anillos de clonación y expandirse. Las líneas celulares clónicas pueden alimentarse en general y someterse a pase tal como se ha descrito anteriormente.

20 Líneas de células madre placentarias humanas inmortalizadas condicionalmente, que pueden ser clónicas, pero no necesariamente lo son, pueden inducirse en general a diferenciarse mediante supresión de la producción y/o actividad de la proteína promotora de crecimiento en condiciones que facilitan la diferenciación. Por ejemplo, si el gen que codifica la proteína promotora del crecimiento está bajo el control de un promotor externamente regulable, las condiciones, por ejemplo, temperatura o composición del medio, pueden modificarse para suprimir la transcripción del gen promotor del crecimiento. Para el sistema de expresión génica controlada por tetraciclina que se ha descrito anteriormente, la diferenciación puede lograrse mediante adición de la tetraciclina para suprimir la transcripción del gen promotor de crecimiento. En general, 1 µg/ml de tetraciclina durante 4-5 días es suficiente para iniciar la diferenciación. Para promover una mayor diferenciación, pueden incluirse agentes adicionales en el medio de cultivo.

#### 5.7.4 Ensayos

30 Las células madre placentarias pueden usarse en ensayos para determinar la influencia de las condiciones de cultivo, los factores ambientales, moléculas (por ejemplo, biomoléculas, pequeñas moléculas inorgánicas, etc.) y similares sobre la proliferación, expansión y/o diferenciación de células madre, en comparación con las células madre placentarias no expuestas a dichas condiciones.

35 En un aspecto preferido, las células madre placentarias se ensayan para cambios en la proliferación, expansión o diferenciación en el momento del contacto con una molécula. En la presente memoria se desvela un método de identificación un compuesto que modula la proliferación de una pluralidad de células madre placentarias, que comprende poner en contacto dicha pluralidad de células madre con dicho compuesto en condiciones que permiten la proliferación, en la que si dicho compuesto causa un cambio detectable en la proliferación de dicha pluralidad de células madre en comparación con una pluralidad de células madre no puestas en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la proliferación de células madre placentarias. En un aspecto específico, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la proliferación. En otro aspecto específico, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la proliferación.

45 En la presente memoria se desvela además un método de identificación un compuesto que modula la expansión de una pluralidad de células madre placentarias, que comprende poner en contacto dicha pluralidad de células madre con dicho compuesto en condiciones que permiten expansión, en el que si dicho compuesto causa un cambio detectable en la expansión de dicha pluralidad de células madre en comparación con una pluralidad de células madre no puestas en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la expansión de células madre placentarias. En un aspecto específico, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la expansión. En otro aspecto específico, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la expansión.

55 En la presente memoria se desvela también un método de identificación un compuesto que modula la diferenciación de una célula madre placentaria, que comprende poner en contacto dichas células madre con dicho compuesto en condiciones que permiten la diferenciación, en el que si dicho compuesto causa un cambio detectable en la diferenciación de dichas células madre en comparación con una célula madre no puesta en contacto con dicho compuesto, dicho compuesto se identifica como un compuesto que modula la proliferación de células madre placentarias. En un aspecto específico, dicho compuesto se identifica como un inhibidor de la diferenciación. En otro aspecto específico, dicho compuesto se identifica como un potenciador de la diferenciación.

## 6. Ejemplos

### 6.1 EJEMPLO 1: CULTIVO DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

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

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

#### *Células madre placentarias aisladas mediante perfusión*

Los cultivos de células madre placentarias a partir de perfundido placentario se establecen de la siguiente manera. Células procedentes de un gradiente de Ficoll se siembran en matraces T75 revestidos de FN, preparados como anteriormente, a  $50\text{-}100 \times 10^6$  células/matraz en 15 ml de medio de cultivo. Típicamente, se siembran de 5 a 10 matraces. Los matraces se incuban a 37°C durante 12-18 h para permitir la fijación de las células adherentes. Se añaden 10 ml de PBS caliente a cada matraz para retirar las células en suspensión, y se mezcla suavemente. A continuación se retiran 15 ml del medio y se sustituyen por 15 ml de medio de cultivo fresco. Todo el medio se cambia 3-4 días después del comienzo del cultivo. Los posteriores cambios del medio de cultivo se realizan, durante los cuales se retira 50% o 7,5 ml del medio.

Comenzando en aproximadamente el día 12, el cultivo se verifica en un microscopio para examinar el crecimiento de las colonias de células adherentes. Cuando los cultivos celulares se vuelven aproximadamente 80% confluentes, típicamente entre el día 13 y el día 18 después del comienzo del cultivo, las células adherentes se recogen mediante digestión con tripsina. Las células recogidas de estos cultivos primarios se designan de pase 0 (cero).

#### *Células madre placentarias aisladas mediante ruptura física y digestión enzimática*

Los cultivos de células madre placentarias se establecen a partir de tejido placentario digerido de la siguiente manera. La placenta perfundida se coloca sobre una hoja de papel estéril con el lado materno arriba. Aproximadamente 0,5 cm de la capa superficial en el lado materno de la placenta se raspa con una cuchilla, y la cuchilla se usa para retirar un bloque de tejido placentario que mide aproximadamente 1 x 2 x 1 cm. Este tejido placentario se pica a continuación en trozos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Estos trozos se recogen en un tubo Falcon de 50 ml y se digieren con colagenasa IA (2 mg/ml, Sigma) durante 30 minutos, seguida por tripsina-EDTA (0,25%, GIBCO BRL) durante 10 minutos, a 37°C en un baño de agua. La solución resultante se centrifuga a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y la solución de digestión se retira. El sedimento se resuspende a aproximadamente 10 volúmenes con PBS (por ejemplo, un sedimento de 5 ml se resuspende con 45 ml de PBS), y los tubos se centrifugan a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de tejido/células se resuspende en 130 ml de medio de cultivo, y las células se siembran a 13 ml por matraz T-75 revestido con fibronectina. Las células se incuban a 37°C con una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> 5%. Las células madre placentarias opcionalmente se crioconservan en esta fase.

#### *Subcultivo y expansión de células madre placentarias*

Las células crioconservadas se descongelan rápidamente en un baño de agua a 37°C. Las células madre placentarias se retiran inmediatamente del criovial con 10 ml de medio caliente y se transfieren a un tubo estéril de 15 ml. Las células se centrifugan a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspenden suavemente en 10 ml de medio de cultivo caliente mediante pipeteo, y los recuentos de células viables se determinan mediante exclusión con azul de tripano. Las células se siembran a continuación a aproximadamente 6000-7000 células por cm<sup>2</sup> en matraces revestidos con FN, preparados como anteriormente (aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por matraz T-75). Las células se incuban a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% y 90% de humedad. Cuando las células alcanzaban 75-85% de confluencia, todo el medio agotado se retira de forma aséptica de los matraces y se desecha. Se añaden 3 ml de solución tripsina/EDTA 0,25% (p/v) para cubrir la capa de células, y las células se incuban a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% y 90% de humedad durante 5 minutos. El matraz se golpea una o dos veces para acelerar el desprendimiento de células. Una vez que >95% de las células están redondeadas y desprendidas, se añaden 7 ml de medio de cultivo caliente a cada matraz T-75, y la solución se dispersa mediante pipeteo sobre la superficie de la capa de células varias veces.

Después de contar las células y determinar la viabilidad como anteriormente, las células se centrifugan a 1000 RPM

durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se someten a un pase resuspendiendo suavemente el sedimento de células de un matraz T-75 con medio de cultivo, y sembrando uniformemente las células sobre dos matraces T-75 revestidos con FN.

5 Usando los métodos anteriores, se identifican poblaciones ejemplares de células madre placentarias adherentes que expresan los marcadores CD105, CD33, CD73, CD29, CD44, CD10, y CD90. Estas poblaciones de células típicamente no expresan CD34, CD45, CD117 o CD133. Algunos, aunque no todos los cultivos de estas células madre placentarias expresaban HLA-ABC y/o HLA-DR.

**6.2 EJEMPLO 2:**

**AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS A PARTIR DE ESTRUCTURAS PLACENTARIAS**

10 **6.2.1 Materiales y métodos**

**6.2.1.1 Aislamiento de poblaciones de células placentarias que comprenden células madre placentarias**

Se obtuvieron poblaciones de células placentarias distintas de las placentas de embarazos a término normales. Todas las donantes dieron su consentimiento por escrito para el uso de sus placentas para fines de investigación. Se obtuvieron células madre placentarias de las siguientes fuentes: (1) perfundido placentario (de la perfusión de la vasculatura placentaria); y digestiones enzimáticas de (2) amnios, (3) corion, (4) amnios-placa coriónica, y (5) el cordón umbilical. Los diversos tejidos placentarios se limpiaron en PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y se colocaron en placas de Petri estériles diferentes. Los diversos tejidos se picaron usando un escalpelo quirúrgico estéril y se colocaron en tubos cónicos Falcon de 50 ml. Los tejidos picados se digirieron con 1X Colagenasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 20 minutos en un baño con agua a 37°C, se centrifugaron, y a 15 una continuación se digirieron con Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco-Invitrogen Corp) durante 10 minutos en un baño con agua a 37°C. Los diversos tejidos se centrifugaron después de la digestión y se aclararon una vez con PBS estéril (Gibco-Invitrogen Corp). Las células reconstituidas se filtraron a continuación dos veces, una vez con colorantes 20 celulares de 100 µm y una vez con filtros de separación de 30 µm, para retirar cualquier matriz extracelular residual o resto celular.

25 **6.2.1.2 Evaluación de la viabilidad celular y recuentos celulares**

El método de exclusión con azul de tripano manual se empleó después de la digestión para calcular recuentos celulares y evaluar la viabilidad celular. Las células se mezclaron con colorante azul de tripano (Sigma-Aldrich) a una proporción de 1:1, y las células se leyeron en un hemacitómetro.

**6.2.1.3 Caracterización de marcadores de la superficie celular**

30 Células que eran HLA ABC<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup> se seleccionaron para caracterización. Células que tienen este fenotipo se identificaron, cuantificaron y se caracterizaron mediante dos citómetros de flujo de Becton-Dickinson, FACSCalibur y FACS Aria (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EE. UU.). Las diversas células placentarias se tiñeron, a una proporción de aproximadamente 10 µl de anticuerpo por 1 millón de células, durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Se usaron los siguientes anticuerpos anti-ser humano: anticuerpos monoclonales 35 conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra HLA-G (Serotec, Raleigh, NC), CD10 (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA), CD44 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) y CD105 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN); anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina (PE) contra CD44, CD200, CD117 y CD13 (BD Biosciences Pharmingen); estreptavidina conjugada a ficoeritrina-Cy5 y anticuerpos monoclonales (PE Cy5) contra CD117 (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpos monoclonales conjugados a 40 ficoeritrina-Cy7 (PE Cy7) contra CD33 y CD10 (BD Biosciences); estreptavidina conjugada a alofococianina (APC) y anticuerpos monoclonales contra CD38 (BD Biosciences Pharmingen); y CD90 biotinilado (BD Biosciences Pharmingen). Después de la incubación, las células se aclararon una vez para retirar anticuerpos no unidos y se fijaron durante una noche con paraformaldehído 4% (USB, Cleveland, OH) a 4°C. Al día siguiente, las células se aclararon dos veces, se filtraron a través de un filtro de separación de 30 µm, y se hicieron pasar por el citómetro o 45 citómetros de flujo.

Las muestras que se tiñeron con anticuerpos IgG anti-ratón (BD Biosciences Pharmingen) se usaron como controles negativos y se usaron para ajustar los tubos fotomultiplicadores (PMTs). Las muestras que se tiñeron únicamente con anticuerpos anti-ser humano se usaron como controles positivos y se usaron para ajustar solapamientos/compensaciones espectrales.

50 **6.2.1.4 Clasificación y cultivo celular**

Un conjunto de células placentarias (de perfundido, amnios o corion), antes de cualquier cultivo, se tiñó con 7-Amino-Actinomicina D (7AAD; BD Biosciences Pharmingen) y anticuerpos monoclonales específicos para el fenotipo de interés. Las células se tiñeron a una proporción de 10 µl de anticuerpo por 1 millón de células, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Estas células se clasificaron a continuación 55 positivamente para células vivas que expresan el fenotipo de interés en BD FACS Aria y se sembraron en cultivo.

Las poblaciones de células placentarias clasificadas (población de interés) y “todas” (no clasificadas) se sembraron en placas para comparaciones. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos revestida con fibronectina (Sigma-Aldrich) a las densidades celulares enumeradas en la tabla 1 (células/cm<sup>2</sup>). La densidad celular, y si el tipo de células estaba sembrado por duplicado o triplicado, se determinó y se rigió por el número de células que expresan el fenotipo de interés.

Tabla 1: Densidades de siembra de células

| <b>Cultivo en placa de 96 pocillos</b> |                        |                        |                        |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Densidad de células sembradas</b>   |                        |                        |                        |
| Condiciones                            | Clasificadas           | Todas                  | Todas densidad máxima  |
| Fuente de células                      | Perfundido             |                        |                        |
| Conjunto N°1:                          | 40,6 K/cm <sup>2</sup> | 40,6 K/cm <sup>2</sup> | 93,8 K/cm <sup>2</sup> |
| Conjunto N°2:                          | 40,6 K/cm <sup>2</sup> | 40,6 K/cm <sup>2</sup> | 93,8 K/cm <sup>2</sup> |
| Conjunto N°3:                          | 40,6 K/cm <sup>2</sup> | 40,6 K/cm <sup>2</sup> | 93,8 K/cm <sup>2</sup> |
| Fuente de células                      | Amnios                 |                        |                        |
| Conjunto N°1:                          | 6,3 K/cm <sup>2</sup>  | 6,3 K/cm <sup>2</sup>  | 62,5 K/cm <sup>2</sup> |
| Conjunto N°2:                          | 6,3 K/cm <sup>2</sup>  | 6,3 K/cm <sup>2</sup>  | 62,5 K/cm <sup>2</sup> |
| Fuente de células                      | Corion                 |                        |                        |
| Conjunto N°1:                          | 6,3 K/cm <sup>2</sup>  | 6,3 K/cm <sup>2</sup>  | 62,5 K/cm <sup>2</sup> |
| Conjunto N°2:                          | 6,3 K/cm <sup>2</sup>  | 6,3 K/cm <sup>2</sup>  | 62,5 K/cm <sup>2</sup> |

Medio completo (60% DMEM-LG (Gibco) y MCDB-201 40% (Sigma); suero fetal de ternero 2% (Hyclone Labs.); 1x insulina-transferrina-selenio (ITS); 1x ácido linoleico-albúmina de suero bovino (LA-BSA); dexametasona 10<sup>-9</sup> M (Sigma); 2-fosfato de ácido ascórbico 10<sup>-4</sup> M (Sigma); factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (R&D Systems); y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems)) se añadió a cada pocillo de la placa de 96 pocillos y la placa se colocó en una incubadora con CO<sub>2</sub> 5%/37°C. El día 7, se añadieron 100 µl de medio completo a cada uno de los pocillos. La placa de 96 pocillos se monitorizó durante aproximadamente dos semanas y una evaluación final del cultivo se completó el día 12. Esto es muy temprano en el cultivo de células madre placentarias, y representa células de pase 0.

**6.2.1.5 Análisis de los datos**

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

**6.2.2 Resultados**

**6.2.2.1 Viabilidad celular**

La viabilidad después de la digestión se evaluó usando el método manual de exclusión con azul de tripano (figura 1). La viabilidad de células promedio obtenidas a partir de la mayoría del tejido digerido (procedente de amnios, corion o amnios-placa coriónica) era aproximadamente 70%. El amnios presentaba una viabilidad promedio de 74,35%±10,31% (n=6, ETM=4,21), el corion presentaba una viabilidad promedio de 78,18%± 12,65% (n=4, ETM=6,32), el amnios-placa coriónica presentaba una viabilidad promedio de 69,05% ±10,80% (n=4, ETM=5,40), y el cordón umbilical presentaba una viabilidad promedio de 63,30% ±20,13% (n=4, ETM=10,06). Células procedentes de perfusión, que no experimentaban digestión, conservaban la viabilidad promedio más elevada, 89,98±6,39% (n=5, ETM=2,86).

**6.2.2.2 Cuantificación de células**

Las poblaciones de células placentarias y células del cordón umbilical se analizaron para determinar los números de células HLA AHC/CD45/CD34/CD133<sup>+</sup>. A partir del análisis de los datos de BD FACSCalibur, se observó que el amnios, el perfundido, y el corion contenían el mayor número total de estas células, 30,72 ± 21,80 células (n=4, ETM=10,90), 26,92 ± 22,56 células (n=3, ETM=13,02), y 18,39 ± 6,44 células (n=2, ETM=4,55) respectivamente (no se muestran los datos). El amnios-placa coriónica y el cordón umbilical contenían el mínimo número total de células que expresan el fenotipo de interés, 4,72 ± 4,16 células (n=3, ETM=2,40) y 3,94 ± 2,58 células (n=3, ETM=1,49) respectivamente (no se muestran los datos).

Análogamente cuando se analizó el porcentaje de células totales que expresan el fenotipo de interés, se observó que el amnios y el perfundido placentario contenían los mayores porcentajes de células que expresan este fenotipo (0,0319% ± 0,0202% (n=4, ETM=0,0101) y 0,0269% ± 0,0226% (n=3, ETM=0,0130) respectivamente (figura 2). Aunque el cordón umbilical contenía una pequeña cantidad de células que expresan el fenotipo de interés (figura 2), contenía el tercer porcentaje más alto de células que expresan el fenotipo de interés, 0,020±0,0226% (n=3, ETM=0,0131) (figura 2). El corion y el amnios-placa coriónica contenían los porcentajes más bajos de células que expresan el fenotipo de interés, 0,0184±0,0064% (n=2, ETM=0,0046) y 0,0177±0,0173% (n=3, ETM=0,010) respectivamente (figura 2).

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

Los datos de BD FACS revelaron que el perfundido y el amnios producían los mayores porcentajes de células HLA ABC/CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, 0,1523 ± 0,0227% (n=15, ETM=0,0059) y 0,0929 ± 0,0419% (n=20, ETM=0,0094) respectivamente (figura 3). El amnios-placa coriónica contenía el tercer porcentaje más alto de células que expresan el fenotipo de interés, 0,0632±0,0333% (n=9, ETM=0,0111) (figura 3). El corion y el cordón umbilical contenían los porcentajes más bajos de células que expresan el fenotipo de interés, 0,0623±0,0249% (n=15, ETM=0,0064) y 0,0457±0,0055% (n=9, ETM=0,0018) respectivamente (figura 3).

Después de que las células HLA ABC/CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> se identificaron y se cuantificaron de cada fuente de células, sus células se analizaron adicionalmente y se caracterizaron para su expresión de marcadores de la superficie celular HLA-G, CD10, CD 13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD 105, CD117, CD200, y CD105.

#### 6.2.2.3 Células obtenidas a partir de perfundido placentario

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

#### 6.2.2.4 Células obtenidas a partir del amnios

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

#### 6.2.2.5 Células obtenidas a partir del corion

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

#### 6.2.2.6 Células obtenidas a partir del amnios-placa coriónica

Las células de amnios-placa coriónica eran positivas sistemáticamente para HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44,

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

**6.2.2.7 Células obtenidas a partir del cordón umbilical**

Las células obtenidas a partir del cordón umbilical eran positivas sistemáticamente para HLA-G, CD33, CD90, CD38, CD105, y CD13, mientras que la expresión de CD117, CD10, CD44, y CD200 variaba (figura 8). La expresión promedio de cada marcador para células obtenidas a partir del cordón umbilical era la siguiente: 62,50% ± 53,03% (n=2, ETM=37,50) de las células expresaban HLA-G; 25,67% ± 11,28% (n=5, ETM=5,04) de las células expresaban CD33; 44,45% ± 62,85% (n=2, ETM=44,45) de las células expresaban CD117; 8,33% ± 11,79% (n=2, ETM=8,33) de las células expresaban CD10; 21,43% ± 30,30% (n=2, ETM=21,43) de las células expresaban CD44; 0,0% (n=1) de las células expresaban CD200; 81,25% (n=1) de las células expresaban CD90; 64,29% (n=1) de las células expresaban CD38; 6,25% (n=1) de las células expresaban CD105; y 50,0% (n=1) de las células expresaban CD 13.

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

**6.2.2.8 Informe de clasificación BD FACS Aria**

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

Tabla 2:

| Informe de clasificación BD FACS Aria |                            |  |             |
|---------------------------------------|----------------------------|--|-------------|
| Fuente de células                     | Acontecimientos procesados | Acontecimientos clasificados (Fenotipo de interés) | % del total |
| Perfundido                            | 135540110                  | 51215  | 0,037786    |
| Amnios                                | 7385933                    | 4019   | 0,054414    |
| Corion                                | 108498122                  | 4016   | 0,003701    |

Se cultivaron las tres poblaciones distintas de células clasificadas positivamente ("clasificadas") y sus células no clasificadas correspondientes y los resultados del cultivo se evaluaron el día 12 (tabla 3). Las células obtenidas a partir de perfundido clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 40.600/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes. Dos de los tres conjuntos de células obtenidas a partir de perfundido no clasificadas, cada una cultivada a una densidad celular de 40.600/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado principalmente células pequeñas, redondas no adherentes con varias células adherentes localizadas alrededor de la periferia del pocillo. Las células obtenidas del perfundido no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 93.800/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado principalmente células pequeñas, redondas no adherentes con varias células adherentes localizadas alrededor de la periferia de los pocillos.

Células obtenidas del amnios, clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes. Células obtenidas del amnios, no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes. Células obtenidas del amnios, no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 62.500/cm<sup>2</sup> dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes.

Células obtenidas de corion, clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes. Células obtenidas de corion no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 6.300/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes. Células obtenidas de corion, no clasificadas, cultivadas a una densidad celular de 62.500/cm<sup>2</sup>, dieron como resultado pequeñas células redondas no adherentes.

Después de ejecutar los experimentos relacionados anteriormente, y el cultivo adicional de las células madre placentarias, se determinó que el marcaje de los anticuerpos para CD117 y CD133, en el que un anticuerpo conjugado a estreptavidina se marcó con ficoeritrina (PE) conjugada a biotina, producía un fondo suficientemente significativo para registrar a una lectura positiva. Este fondo había dado como resultado inicialmente que las células

madre placentarias fueran consideradas positivas para ambos marcadores. Cuando se usó una marca diferente, APC o PerCP, el fondo se redujo, y se determinó correctamente que las células madre placentarias eran negativas tanto para CD117 como para CD133.

5 **6.3 EJEMPLO 3: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS Y CÉLULAS MADRE DE CORDÓN UMBILICAL**

Este ejemplo demuestra un perfil de marcadores de la superficie celular ejemplar de células madre placentarias.

10 Células madre placentarias o células madre de cordón umbilical, obtenidas mediante digestión enzimática, en medio de cultivo se lavaron una vez añadiendo 2 ml de FBS 2%-PBS y centrifugando a 400 g durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó, y el sedimento se resuspendió en 100-200 µl FBS 2%-PBS. Se prepararon 4 tubos con BD™ CompBeads (Nº de Cat 552843) añadiendo 100 µl de FBS 2%-PBS a cada tubo, añadiendo 1 gota completa (aproximadamente 60 µl) del control negativo BD™ CompBeads y 1 gota de las perlas anti-ratón BD™ CompBeads a cada tubo, y agitando en vértice. A los 4 tubos de BD™ CompBeads, se les añadieron los siguientes anticuerpos:

| Nº de tubo | Anticuerpo  | Nº de Cat | Clon       | Volumen µl |
|------------|-------------|-----------|------------|------------|
| 1          | CD105 FITC  | FAB10971F | 166707     | 10         |
| 2          | CD200PE     | 552475    | MRC-OX-104 | 20         |
| 3          | CD10 PE-Cy7 | 341102    | HI10a      | 5          |
| 4          | CD34 APC    | 340667    | 8G12       | 5          |

Se prepararon tubos de control de la siguiente manera:

| Nº de tubo | Anticuerpo                | Nº de Cat             | Clon    | Volumen µl |
|------------|---------------------------|-----------------------|---------|------------|
| 1          | Sin teñir                 | -                     | -       | -          |
| 2          | IgG FITC/IgG PE// IgG APC | 555787,555786, 550931 | G18-145 | 10 ea      |

15

Los siguientes anticuerpos se añadieron a los tubos de muestra:

| Anticuerpo  | Nº de Cat | Clon       | Volumen µl |
|-------------|-----------|------------|------------|
| CD105 FITC  | FAB10971F | 166707     | 10         |
| CD200 PE    | 552475    | MRC-OX-104 | 20         |
| CD10 PE-Cy7 | 341102    | HI10a      | 5          |
| CD34 APC    | 340667    | 8G12       | 5          |

20 Los tubos de control y de muestra se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, los tubos se lavaron añadiendo 2 ml de FBS 2%-PBS y centrifugando a 400 g durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó, y el sedimento se resuspendió en 100-200 µl de FBS 2%-PBS y se adquirió en un citómetro de flujo. Todos los demás anticuerpos se usaron siguiendo este procedimiento.

25 Células madre placentarias coincidentes de la membrana amniótica y células madre de cordón umbilical se analizaron usando anticuerpos marcados por fluorescencia y citometría de flujo para identificar marcadores de la superficie celular que estaban presentes o ausentes. Los marcadores analizados incluían CD105 (marcador específico endotelial relacionado con la proliferación); CD200 (marcador asociado con la función reguladora); CD34 (expresado en células endoteliales y en células madre hematopoyéticas); CD10 (marcador de células madre/células precursoras); citoqueratina K (marcador epitelial); CD44 (migración celular, retorno linfocítico selectivo, hematopoyesis); CD45 (marcador de linaje); CD133 (marcador para células progenitoras hematopoyéticas); CD117 (factor de células madre (c-Kit)); CD90 (expresado en células madre hematopoyéticas primitivas en médula ósea normal, sangre del cordón umbilical y células hepáticas fetales); HLA ABC (pan MHC I, presentación de antígenos, inmunogenicidad); β-2-microglobulina (se asocia con MHC I, presentación de antígenos, inmunogenicidad); HLA DR,DQ,DP (pan MHC II, presentación de antígenos, inmunogenicidad); y CD80/86 (moléculas coestimuladoras para presentación de antígenos).

30

Los resultados de citometría de flujo mostraban que para las células madre placentarias que fueron ensayadas, 93,83% de las células eran CD105<sup>+</sup>, 90,76% de las células eran CD200<sup>+</sup>, y 86,93% de las células eran tanto CD105<sup>+</sup> como CD200<sup>+</sup>. 99,97% de las células eran CD10<sup>+</sup>, 99,15% de las células eran CD34<sup>+</sup>, y 99,13% de las células eran tanto CD10<sup>+</sup> como CD34<sup>+</sup>. 98,71% de las células eran positivas para citoqueratina, 99,95% de las células eran CD44<sup>+</sup>, y 98,71% de las células eran positivas tanto para citoqueratina como para CD44. 99,51% de las células eran CD45<sup>-</sup>, 99,78% de las células eran negativa para CD133, y 99,39% de las células eran negativas tanto para CD45 como para CD133. 99,31% de las células eran positivas para CD90, 99,7% eran negativas para CD117, y 99,01% eran positivas para CD90 y negativas para CD 117. 95,7% de las células eran negativas tanto para CD80 como para CD86.

Los resultados de citometría de flujo para células madre de cordón umbilical mostraban que 95,95% de las células eran CD200<sup>+</sup>, 94,71% eran CD105<sup>+</sup>, y 92,69% eran CD105<sup>+</sup> y CD200<sup>+</sup>. 99,93% de las células eran CD10<sup>+</sup>, 99,99% de las células eran CD34<sup>+</sup>, y 99,6% de las células eran tanto CD10<sup>+</sup> como CD34<sup>+</sup>. 99,45% de las células eran positivas para citoqueratina, 99,78% de las células eran CD44<sup>+</sup>, y 99,3% de las células eran positivas tanto para citoqueratina como para CD44. 99,33% de las células eran CD45<sup>-</sup>, 99,74% eran CD133<sup>-</sup>, y 99,15% de las células eran tanto CD45<sup>-</sup> como CD133<sup>-</sup>. 99,84% de las células eran CD117<sup>-</sup>, 98,78% de las células eran CD90<sup>+</sup>, y 98,64% de las células eran tanto CD90<sup>+</sup> como CD117<sup>-</sup>.

Un fenotipo (CD200<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>) parece ser sistemático durante numerosos de dichos análisis. Este fenotipo es adicionalmente positivo para CD90, CD44, HLA ABC (débil), β-2-microglobulina (débil), y citoqueratina K, y negativo para HLA DR,DQ,DP, CD117, CD133 y CD45.

#### 6.4 EJEMPLO 4: DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ALDEHÍDO DESHIDROGENASA EN CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

El nivel de actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH), un potencial marcador de la capacidad de injerto de células madre, se determinó usando un kit de ensayo ALDEFLUOR® de Stem Cell Technologies, Inc. Típicamente, las células madre indiferenciadas más primitivas demuestran menos actividad ALDH que las células madre más diferenciadas.

El ensayo usa ALDEFLUOR®, un sustrato de ALDH fluorescente (Aldagen, Inc., Durham, Carolina del Norte). Se siguió el protocolo del fabricante. El reactivo ALDEFLUOR® seco se proporciona en una forma inactiva estable. El ALDEFLUOR® se activó disolviendo el compuesto seco en dimetilsulfóxido (DMSO) y añadiendo HCl 2 N, y se añadió inmediatamente a las células. También se estableció un tubo de control combinando las células con ALDEFLUOR® más DEAB, un inhibidor específico de ALDH.

Las células analizadas incluían cuatro líneas de células madre del cordón umbilical y tres líneas de células madre placentarias de amnios-placa coriónica, una línea de células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea (BM-MSC), una línea de células madre obtenidas a partir de tejido adiposo (ADSC), una línea celular de trofoblastos vellosos humanos (HVT), y células madre CD34<sup>+</sup> purificadas de sangre del cordón umbilical.

El ensayo se desarrolla de la siguiente manera. La concentración de la muestra se ajustó a 1X10<sup>6</sup> células /ml con tampón de ensayo proporcionado con el kit de ensayo ALDEFLUOR®. 1 ml de suspensión celular ajustada en tubo experimental y de control para cada una de las líneas celulares ensayadas, y 5 µl de DEAB se añadieron adicionalmente al tubo de control marcado como control.

El sustrato ALDEFLUOR® se activó añadiendo 25 µl de DMSO al reactivo ALDEFLUOR® seco, y se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se añadieron 25 µl de HCl 2N y se mezclaron bien. Esta mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadieron 360 µl de tampón de ensayo ALDEFLUOR® al vial y se mezclaron. La mezcla resultante se almacenó a 2-8°C durante el uso.

Se añadieron 5 µl del reactivo ALDEFLUOR® activado por 1 mililitro de muestra a los tubos experimentales, y 0,5 ml de esta mezcla se transfirieron inmediatamente a los tubos de control. Los tubos experimentales y de control para cada línea celular se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 400 x g, y el sobrenadante se desechó. Las células en el sedimento resultante se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de ensayo y se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos se analizaron usando el software FLOWJO™ (Tree Star, Ashland, Oregón). Se crearon diagramas gráficos de SSC frente a FSC y SSC frente a FL1 en el espacio de trabajo de FLOWJO™. Se abrieron archivos de datos de control y experimentales para cada muestra, y se determinaron las acotamientos apropiadas en base a muestras de control. Las células positivas se calcularon como un porcentaje positivo para ALDEFLUOR® del número total de acontecimientos contados.

Líneas de células madre placentarias demostraron actividad ALDH de aproximadamente 3% a aproximadamente 25% (3,53%, 8,76% y 25,26%). Líneas de células madre del cordón umbilical demostraron actividad ALDH de aproximadamente 16% a aproximadamente 20% (16,59%, 17,01%, 18,44% y 19,83%). En contraste, BM-MSC y HVT eran negativas y 1,5% respectivamente para ALDH, pero las MSC obtenidas a partir de tejido adiposo están cerca al 30% ALDH<sup>+</sup>. Las células CD34<sup>+</sup> de control positivo purificadas de sangre del cordón umbilical eran, tal como se esperaba, altamente positivas (75%) para ALDH.

**6.5 EJEMPLO 5: RECOGIDA DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS MEDIANTE PERFUSIÓN EN CIRCUITO CERRADO**

Este ejemplo demuestra un método de recogida de células madre placentarias mediante perfusión.

- 5 Se obtiene una placenta postparto en el plazo de 24 horas después del nacimiento. El cordón umbilical pinza con una pinza para cordón umbilical aproximadamente 3 a 4 pulgadas (7,62 a 10,16) alrededor del disco placentario, y el cordón se corta encima de la pinza. El cordón umbilical se desecha o se procesa para recuperar, por ejemplo, células madre de cordón umbilical, y/o para procesar la membrana del cordón umbilical para la producción de un biomaterial. El exceso de membrana amniótica y de corion se corta de la placenta, dejando aproximadamente ¼ de pulgada (0,64 cm) alrededor del borde de la placenta. El material recortado se desecha.
- 10 Empezando desde el borde de la membrana placentaria, la membrana amniótica se separa del corion usando disección sin filo con los dedos. Cuando la membrana amniótica está completamente separada del corion, la membrana amniótica se corta alrededor de la base del cordón umbilical con tijeras, y se desprende del disco placentario. La membrana amniótica puede desecharse, o procesarse, por ejemplo, para obtener células madre mediante digestión enzimática, o para producir, por ejemplo, un biomaterial de la membrana amniótica.
- 15 El lado fetal del material placentario restante se limpia de todos los coágulos de sangre visibles y la sangre residual usando gasa estéril, y a continuación se esteriliza limpiando con un hisopo con yodo y a continuación con un hisopo con alcohol. El cordón umbilical se pinza a continuación de forma transversal con un hemostato estéril por debajo de la pinza para el cordón umbilical, y se hace girar al hemostato, tirando del cordón sobre la pinza para crear un pliegue. Después, el cordón se corta parcialmente por debajo del hemostato para dejar expuesta una sección transversal del cordón sujeta por la pinza. Como alternativa, el cordón se pinza con un hemostato estéril. El cordón se coloca después sobre una gasa estéril y se sujeta con el hemostato para proporcionar tensión. El cordón se corta después en línea recta transversal, directamente por debajo del hemostato, y el borde del cordón cerca del vaso se pinza de nuevo.
- 20 Los vasos expuestos tal como se ha descrito anteriormente, habitualmente una vena y dos arterias, se identifican y se abren de la siguiente manera. Una pinza de cocodrilo se hace avanzar a través del extremo cortado de cada vaso, teniendo cuidado de no perforar con la pinza la pared del vaso. La inserción se detiene cuando la punta de la pinza está ligeramente por encima de la base del cordón umbilical. A continuación, la pinza se abre ligeramente, y se retira lentamente del vaso para dilatarlo.
- 25 Un tubo de plástico, conectado a un dispositivo de perfusión o bomba peristáltica, se inserta en cada una de las arterias placentarias. Un tubo de plástico, conectado a una bolsa de recogida de 250 ml, se inserta en la vena placentaria. El tubo se fija en su sitio con cinta adhesiva.
- 30 Un pequeño volumen de solución de NaCl 0,9% de calidad para inyección estéril para comprobar las fugas. Si no hay fugas presentes, la velocidad de la bomba se incrementa, y aproximadamente 750 ml de la solución de NaCl 0,9% de calidad para inyección se bombean a través de la vasculatura placentaria. La perfusión puede asistirse masajeando suavemente el disco placentario desde los bordes externos hasta el cordón. Cuando la bolsa de recogida está llena, la bolsa se retira del acoplador que conecta el tubo a la bolsa, y una nueva bolsa se conecta al tubo.
- 35 Cuando la recogida está terminada, las bolsas de recogida se pesan y se equilibran para centrifugado. Después del centrifugado, cada bolsa se coloca dentro de un extractor de plasma sin romper los sedimentos de células. El sobrenadante dentro de las bolsas se elimina y se desecha a continuación. La bolsa se masajea suavemente a continuación para resuspender las células en el sobrenadante restante. Usando una jeringa estéril de 1 ml, se extraen aproximadamente 300-500 µl de células de la bolsa de recogida, mediante un acoplador al sitio de muestreo, y se transfieren a un tubo de centrifuga de 1,5 ml. El peso y el volumen del perfundido restante se determinan, y se añade 1/3 del volumen de heta-almidón al perfundido y se mezcla minuciosamente. El número de células por ml se determina. Se retiran los glóbulos rojos del perfundido usando un extractor de plasma.
- 40 Las células placentarias se cultivan a continuación inmediatamente para aislar células madre placentarias, o se crioconservan para uso posterior.

**6.6 EJEMPLO 6: DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS**

**6.6.1 Inducción de la diferenciación en neuronas**

- 50 La diferencia neuronal de células madre placentarias también puede conseguirse de la siguiente manera:
1. Células madre placentarias se cultivan durante 24 h en medio de preinducción que consta de DMEM/FBS 20% y beta-mercaptoetanol 1 mM.
  2. El medio de preinducción se retira y las células se lavan con PBS.
  3. Medio de inducción neuronal que consta de DMEM y betameraptoetanol 1-10 mM se añade a las células. Como

alternativa, pueden usarse medios de inducción que constan de DMEM/DMSO 2% / hidroxianisol butilado 200 µM.

4. En ciertos ejemplos, pueden producirse cambios morfológicos y moleculares ya a los 60 minutos después de la exposición a medios libres de suero y betamercaptoetanol. Puede usarse RT/PCR para evaluar la expresión de, por ejemplo, genes del receptor del factor de crecimiento nervioso y cadena pesada del neurofilamento.

5 **6.6.2 Inducción de la diferenciación en adipocitos**

Varios cultivos de células madre placentarias obtenidas a partir de digestión enzimática del amnios, a 50-70% de confluencia, se indujeron en medio que comprendía (1) DMEM/MCDB-201 con FCS 2%, hidrocortisona 0,5%, isobutilmetilxantina 0,5 mM (IBMX), indometacina 60 µM; o (2) DMEM/MCDB-201 con FCS 2% y ácido linoleico 0,5%. Se examinaron las células en busca de cambios morfológicos; después de 3-7 días, aparecían gotitas de aceite. La diferenciación también se evaluó mediante PCR cuantitativa en tiempo real para examinar la expresión de genes específicos asociados con la adipogénesis, es decir, PPAR-γ2, aP-2, lipoproteína lipasa, y osteopontina. Dos cultivos de células madre placentarias mostraban un incremento de 6,5 veces y 24,3 veces en la expresión de genes específicos de adipocitos, respectivamente. Otros cuatro cultivos mostraban un incremento moderado (1,5-2,0 veces) en la expresión de PPAR-γ2 después de la inducción de la adipogénesis.

15 En otro experimento, células madre placentarias obtenidas de perfundido se cultivaron en DMEM/MCDB-201 (medio basal de fibroblasto de pollo) con FCS 2%. Las células se tripsinizaron y centrifugaron. Las células se resuspendieron en medio de adipo-inducción (AIM) 1 o 2. AIM1 comprendía medio basal MesenCult para células madre mesenquimatosas humanas (StemCell Technologies) suplementadas con suplementos adipogénicos de células madre mesenquimatosas (StemCell Technologies). AIM2 comprendía DMEM/MCDB-201 con FCS 2% y LA-BSA (1%). Aproximadamente  $1,25 \times 10^5$  células madre placentarias se cultivaron en 5 ml de AIM1 o AIM2 en matraces T-25. Las células se cultivaron en incubadoras durante 7-21 días. Las células desarrollaron vacuolas con gotas de aceite en el citoplasma, según lo confirmado mediante tinción con rojo aceite, lo que sugería la diferenciación de las células madre en adipocitos.

La diferenciación adipogénica de células madre placentarias también puede conseguirse de la siguiente manera:

25 1. Células madre placentarias se cultivan en MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con suero de sangre del cordón umbilical 15%.

2. Se usan tres ciclos de inducción/mantenimiento. Cada ciclo consta de alimentar las células madre placentarias con medio de inducción de la adipogénesis (Cambrex) y cultivar las células durante 3 días (a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%), seguido por 1-3 días de cultivo en medio de mantenimiento de la adipogénesis (Cambrex). Un medio de inducción alternativo que puede usarse contiene dexametasona 1 µM, indometacina 0,2 mM, 0,01 mg/ml de insulina, IBMX 0,5 mM, DMEM-alta glucosa, FBS, y antibióticos.

3. Después de 3 ciclos completos de inducción/mantenimiento, las células se cultivan durante 7 días adicionales en medio de mantenimiento de la adipogénesis, sustituyendo el medio cada 2-3 días.

35 4. Un sello distintivo de la adipogénesis es el desarrollo de múltiples vesículas lipídicas intracitoplasmáticas que pueden observarse fácilmente usando el colorante lipófilo aceite rojo O. La expresión de genes de lipasa y/o proteína de unión a ácidos grasos se confirma mediante RT/PCR en células madre placentarias que han comenzado a diferenciarse en adipocitos.

**6.6.3 Inducción de la diferenciación en osteocitos**

40 Se preparó medio osteogénico a partir de 185 ml de medio basal de diferenciación de Cambrex - Osteogenic y SingleQuots (uno cada de dexametasona, 1-glutamina, ascorbato, pen/estrep, MCGS, y β-glicerofosfato). Células madre placentarias procedentes de perfundido se cultivaron, a aproximadamente  $3 \times 10^3$  células por cm<sup>2</sup> de área superficial para cultivo tisular en 0,2-0,3 ml de MSCGM por cm<sup>2</sup> de área para cultivo tisular. Típicamente, todas las células se adherían a la superficie para cultivo durante 4-24 horas en MSCGM a 37°C en CO<sub>2</sub> 5%. La diferenciación osteogénica se indujo sustituyendo el medio por medio de diferenciación osteogénica. La morfología celular comenzó a cambiar desde el típico aspecto en forma de huso de las células madre placentarias adherentes, a un aspecto cuboidal, acompañado por mineralización. Algunas células se delaminaron de la superficie para cultivo tisular durante la diferenciación.

La diferenciación osteogénica también puede conseguirse de la siguiente manera:

50 1. Cultivos adherentes de células madre placentarias se cultivan en MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con suero de sangre del cordón umbilical 15%.

2. Los cultivos se cultivan durante 24 horas en matraces para cultivo tisular.

3. La diferenciación osteogénica se induce sustituyendo MSCGM por medio de inducción osteogénica (Cambrex) que contenía dexametasona 0,1 µM, ácido ascórbico-2-fosfato 0,05 mM, beta glicerofosfato 10 mM.

4. Las células se alimentan cada 3-4 días durante 2-3 semanas con medio de inducción osteogénica.
5. La diferenciación se evalúa usando un colorante específico de calcio y RT/PCR para la expresión de genes de fosfatasa alcalina y osteopontina.

#### 6.6.4 Inducción de la diferenciación en células pancreáticas

5 La diferenciación pancreática se consigue de la siguiente manera:

1. Células madre placentarias se cultivan en DMEM/CBS 20%, suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1,2 ng/ml. puede usarse suero de sustitución Knockout en lugar de CBS.

10 2. Medio condicionado procedente de cultivos de células neuronales positivas para nestina se añade a los medios a una concentración 50/50.

3. Las células se cultivan durante 14-28 días, realimentando cada 3-4 días.

4. La diferenciación se caracteriza ensayando para proteína insulina o la expresión de genes de insulina mediante RT/PCR.

#### 6.6.5 Inducción de la diferenciación en células cardíacas

15 La diferenciación miogénica (cardiogénica) se consigue de la siguiente manera:

1. Células madre placentarias se cultivan en DMEM/CBS 20%, suplementado con ácido retinoico, 1  $\mu$ M; factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/ml; y factor de crecimiento transformante beta-1, 2 ng/ml; y factor de crecimiento epidérmico, 100 ng/ml. Puede usarse suero de sustitución Knockout (Invitrogen, Carlsbad, California) en lugar de CBS.

20 2. Como alternativa, células madre placentarias se cultivan en DMEM/CBS 20% suplementado con 50 ng/ml Cardiotropina-1 durante 24 horas.

3. Como alternativa, células madre placentarias se mantienen en medios libres de proteínas durante 5-7 días, a continuación se estimulan con extracto de miocardio humano (análisis de dosis con aumento gradual). Se produce extracto de miocardio homogenizando 1 gm de miocardio humano en tampón HEPES 1% suplementado con suero de sangre del cordón umbilical 1%. La suspensión se incuba durante 60 minutos, a continuación se centrifuga y el sobrenadante se recoge.

25 4. Las células se cultivan durante 10-14 días, realimentando cada 3-4 días.

5. La diferenciación se confirma mediante demostración de la expresión de genes de actina cardíaca mediante RT/PCR.

#### 30 6.6.6 Inducción de la diferenciación en condrocitos

##### 6.6.6.1 Método general

La diferenciación condrogénica de células madre placentarias se consigue generalmente de la siguiente manera:

1. Células madre placentarias se mantienen en MSCGM (Cambrex) o DMEM suplementado con suero de sangre del cordón umbilical 15%.

35 2. Células madre placentarias se dividen en alícuotas en un tubo de polipropileno estéril. Las células se centrifugan (150 x g durante 5 minutos), y se lavan dos veces en medio de condrogénesis incompleto (Cambrex).

3. Después del último lavado, las células se resuspenden en medio de condrogénesis completo (Cambrex) que contiene 0,01  $\mu$ g/ml de TGF-beta-3 a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml.

40 4. 0,5 ml de células se dividen en alícuotas en un tubo para cultivo de polipropileno de 15 ml. Las células se sedimentan a 150 x g durante 5 minutos. El sedimento se deja intacto en el medio.

5. Tubos tapados sin apretar se incuban a 37°C, CO<sup>2</sup> 5% durante 24 horas.

6. Los sedimentos de células se alimentan cada 2-3 días con medio de condrogénesis completo recién preparado.

7. Los sedimentos se mantienen suspendidos en medio mediante agitación diaria usando un vórtice a baja velocidad.

45 8. Los sedimentos de células condrogénicas se recogen después de 14-28 días en cultivo.

9. La condrogénesis se caracteriza mediante por ejemplo, observación de la producción de sustancia fundamental eosinófila, evaluando la morfología celular, y/o confirmación por RT/PCR de la expresión de genes de colágeno 2 y/o colágeno 9 y/o la producción de mucopolisacáridos ácidos de la matriz de cartílago, según lo confirmado mediante tinción citoquímica con azul Alcian.

5 **6.6.6.2** Diferenciación de células madre placentarias y de cordón umbilical en células condrogénicas

El ejemplo demuestra la diferenciación de células madre placentarias en células condrogénicas y el desarrollo de tejido similar a cartílago a partir de dichas células.

10 El cartílago es un tejido avascular, alinfático que carece de inervación. El cartílago tiene una baja densidad de condrocitos (<5%), sin embargo estas células son sorprendentemente eficientes en el mantenimiento de la matriz extracelular a su alrededor. En el cuerpo existen tres tipos principales de cartílago: (1) cartílago articular, que facilita la lubricación articular en articulaciones; (2) fibrocartílago, que proporciona absorción de choques en, por ejemplo, el menisco y el disco intervertebral; y (3) cartílago elástico, que proporciona estructura anatómica en, por ejemplo, nariz y orejas. Los tres tipos de cartílago son de estructura bioquímica similar.

15 El dolor articular es una causa principal de incapacidad y produce una necesidad insatisfecha de alivio en el área de la ortopedia. La artrosis primaria (que puede causar degeneración articular), y el traumatismo son dos causas comunes de dolor. Aproximadamente 9% de la población estadounidense tiene artrosis de cadera o rodilla, y más de 2 millones de cirugías de rodilla se realizan al año. Desafortunadamente, los tratamientos actuales están más orientados hacia el tratamiento de síntomas en lugar de la reparación del cartílago. La reparación natural se produce cuando células similares a fibroblastos invaden el área y lo llenan con tejido fibroso que no es tan resiliente o elástico como el tejido normal, causando de este modo más daño. Las opciones de tratamiento históricamente incluían injertos de tejido, perforación subcondral, o sustitución total de la articulación. Tratamientos más recientes incluyen, sin embargo, CARTICEL®, una inyección de condrocitos autólogos; SYNVISC® y ORTHOVISC®, que son inyecciones de ácido hialurónico para alivio temporal del dolor; y CHONDROGEN™, una inyección de células madre mesenquimatosas adultas para reparación de menisco. En general, la tendencia parece estar yendo más hacia terapias celulares y/o productos tisulares genomanipulados que implican condrocitos o células madre.

*Materiales y métodos.*

30 Dos líneas de células madre placentarias, designadas AC61665, P3 (pase 3) y AC63919, P5, y dos líneas de células madre del cordón umbilical, designadas UC67249, P2 y UC67477, P3 se usaron en los estudios perfilados a continuación. Se usaron células madre mesenquimatosas humanas (MSC) como controles positivos, y una línea celular de osteosarcoma, MC3T3, y fibroblastos dérmicos humanos (HDF) se usaron como controles negativos.

35 Células madre placentarias y de cordón umbilical se aislaron y se purificaron de placenta humana a término mediante digestión enzimática. Las células MSC humanas y células HDF se adquirieron de Cambrex, y las células MC3T3 se adquirieron de la colección americana de cultivos tipo "American Type Culture Collection". Todas las líneas celulares usadas se centrifugaron en sedimentos en tubos de centrifuga de polipropileno a 800 RPM durante 5 minutos y se cultivaron tanto en medios de inducción condrogénica (Cambrex) y medios MSC basales no inductores (Cambrex). Los sedimentos se recogieron y se analizaron histológicamente a 7, 14, 21 y 28 días mediante tinción para glucosaminoglucanos (GAG) con azul Alcian, y/o para colágenos con rojos sirio. El tipo de colágeno se evaluó además con inmunotinción. El análisis de ARN para genes específicos de cartílago se realizó a los 7 y 14 días.

40 *Resultados*

Experimento 1: Se diseñaron estudios de condrogénesis para alcanzar tres objetivos principales: (1) demostrar que las células madre placentarias y de cordón umbilical pueden diferenciarse y formar tejido cartilaginoso; (2) demostrar que las células madre placentarias y de cordón umbilical pueden diferenciarse funcionalmente en condrocitos; y (3) validar los resultados obtenidos con las células madre evaluando líneas celulares de control.

45 Para el objetivo 1, en un estudio preliminar, una célula madre placentaria se cultivó en medio de inducción condrogénica en forma de sedimentos celulares, con o sin proteína morfogénica ósea (BMP) a una concentración final de 500 ng/ml. Los sedimentos se evaluaron en busca de evidencias de inducción condrogénica cada semana durante 4 semanas. Los resultados indicaban que los sedimentos aumentan de tamaño a lo largo del tiempo. Sin embargo, no se observaron diferencias visuales entre las muestras BMP<sup>+</sup> y BMP<sup>-</sup>. Los sedimentos también se analizaron histológicamente para GAG, un indicador de tejido cartilaginoso, mediante tinción con azul Alcian. Las células BMP<sup>+</sup> generalmente parecían metabólicamente más activas con vacuolas pálidas mientras que las células BMP<sup>-</sup> eran más pequeñas con núcleos teñidos densos y menos citoplasma (refleja baja actividad metabólica). A los 7 días, las células BMP<sup>+</sup> se habían teñido fuertemente de azul, mientras que las BMP<sup>-</sup> se habían teñido sólo ligeramente. A los 28 días de inducción, las células tanto BMP<sup>+</sup> como BMP<sup>-</sup> estaban teñidas de forma aproximadamente equivalente con azul Alcian. En general, la densidad celular disminuía con el tiempo, y la matriz sobrepasó al sedimento. En contraste, la línea celular negativa MC3T3 no demostró presencia alguna de GAG cuando se teñió con azul Alcian.

5 Experimento 2: en base a los resultados del experimento 1, se diseñó un estudio más detallado para evaluar el potencial de diferenciación condrogénica de dos líneas de células madre placentarias y dos de células madre del cordón umbilical. Además de la histología con azul Alcian, las células también se tiñeron con rojo sirio, que es específico para colágeno de tipo II. Se prepararon múltiples sedimentos para cada línea celular, con y sin medios de inducción.

10 Las líneas celulares cultivadas y sedimentadas se evaluaron en primer lugar mediante observación macroscópica en busca de generación macroscópica de cartilago. En general, se observó que las líneas de células madre forman sedimentos ya el día 1. Estos sedimentos crecían a lo largo del tiempo y formaban una matriz resistente, que parece blanca, brillante y similar al cartilago, y se volvieron mecánicamente resistentes. Mediante inspección visual, los sedimentos de células madre placentarias o células madre de cordón umbilical eran mucho más grandes que los controles de MSC. Los sedimentos de control en medios no de inducción comenzaron a desmoronarse el día 11, y eran mucho más pequeños a los 28 días que los sedimentos desarrollados por células cultivadas en medio de inducción condrogénica. Visualmente, no existían diferencias entre sedimentos formados por células madre placentarias o de cordón umbilical. Sin embargo, la línea de células madre UC67249, que se inició en medios libres de dexametasona, formaba sedimentos más grandes. Las células MC3T3 de control negativo no formaba sedimentos; sin embargo, los HDF formaban sedimentos.

20 Sedimentos representativos de todos los grupos de ensayo se sometieron a continuación a análisis histológicos para GAG y colágeno. Generalmente, los sedimentos formados por las células madre en condiciones inductoras eran mucho más grandes y permanecían intactos mejor que los sedimentos formados en condiciones no inductoras. Los sedimentos formados en condiciones inductoras mostraban producción de GAG e incrementaban el contenido de colágeno a lo largo del tiempo, y ya a los siete días, mientras que los sedimentos formados en condiciones no inductoras mostraban poca o ninguna producción de colágeno, tal como se evidenciaba mediante una débil tinción con azul Alcian. En general, las células madre placentarias y las células madre de cordón umbilical parecían, mediante inspección visual, producir sedimentos más resistentes, más grandes, y parecían estar produciendo más colágeno a lo largo del tiempo, que las MSC humanas. Además, en el transcurso del estudio, el colágeno parecía engrosarse, y el tipo de colágeno parecía cambiar, según se evidencia mediante cambios en los colores de la fibra bajo luz polarizada (los colores se correlacionan con el grosor de la fibra lo que puede ser indicativo del tipo de colágeno). Las células madre placentarias no inducidas producían mucho menos colágeno de tipo II, si producen alguno, en comparación con las células madre inducidas. Durante el periodo de 28 días, la densidad celular disminuía a medida que la producción de la matriz se incrementaba, una característica del tejido cartilaginoso.

30 Estos estudios confirman que las células madre placentarias y de cordón umbilical pueden diferenciarse a lo largo de una ruta condrogénica, y pueden inducirse fácilmente a formar tejido cartilaginoso. Las observaciones iniciales indican que dichas células madre son preferibles a MSC para la formación de tejido cartilaginoso.

#### 6.7 EJEMPLO 7: CULTIVO POR GOTA COLGANTE DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

35 Células madre adherentes placentarias en cultivo se tripsinizan a 37°C durante aproximadamente 5 minutos, y se sueltan de la placa de cultivo golpeando. Se añade FBS 10% al cultivo para detener la tripsinización. Las células se diluyen a aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por ml en aproximadamente 5 ml de medio. Gotas (una única gota o gotas procedentes de una micropipeta multicanal se colocan en el interior de la tapa de una placa de Petri de 100 ml. La tapa se invierte cuidadosamente y se coloca encima de la parte inferior de la placa, que contiene aproximadamente 25 ml de PBS estéril para mantener el contenido de humedad en la atmósfera de la placa. Las células se cultivan durante 6-7 días.

#### 6.8 EJEMPLO 8: DIGESTIÓN DE TEJIDO PLACENTARIO PARA OBTENER CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

Este ejemplo demuestra un aislamiento aumentado de células madre placentarias, mediante digestión enzimática.

45 Aproximadamente 10 gramos de tejido placentario (amnios y corion) se obtienen, se maceran, y se digieren usando volúmenes iguales de colagenasa A (1 mg/ml) (Sigma) y Tripsina-EDTA (0,25%) (Gibco-BRL) en un volumen total de aproximadamente 30 ml durante aproximadamente 30 minutos a 37°C. Las células liberadas por la digestión se lavan 3 veces con medio de cultivo, se distribuyen en cuatro matraces T-225 y se cultivan tal como se ha descrito en el ejemplo 1. El rendimiento de células madre placentaria está entre aproximadamente  $4 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$  células por 10 g de material de partida. Las células, caracterizadas en el pase 3, son de forma predominante CD10<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup>.

#### 6.9 EJEMPLO 9: PRODUCCIÓN DE PRODUCTO DE CÉLULAS MADRE CRIOCONSERVADAS Y BANCO DE CÉLULAS MADRE

Este ejemplo demuestra el aislamiento de células madre placentaria y la producción de un producto a base de células madre congeladas.

55 *Resumen:* tejido placentario se disecciona y se digiere, seguido por cultivos primario y de expansión para conseguir un producto celular expandido que produce muchas dosis de células. Las células se almacenan en un banco de células de dos niveles y se distribuyen como un producto celular congelado. Todas las dosis de células obtenidas a

partir de la placenta de una única donante se definen como un lote, y un lote de placenta se procesa cada vez usando técnica estéril en una sala dedicada y una campa de flujo laminar de clase 100. El producto celular se define como siendo CD105<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, y CD34<sup>+</sup>, teniendo un cariotipo normal y ningún o sustancialmente ningún contenido celular materno.

5 **6.9.1** Obtención de células madre

*Disección y digestión tisular:* se obtiene una placenta menos de 24 horas después de la expulsión. Se obtiene tejido placentario del amnios, una combinación de amnios y corion, o corion. El tejido se pica en pequeños trozos, de aproximadamente 1 mm de tamaño. El tejido picado se digiere en 1mg/ml de Colagenasa 1A durante 1 hora a 37°C seguida por Tripsina-EDTA durante 30 minutos a 37°C. Después de tres lavados en FBS 5% en PBS, el tejido se resuspende en medio de cultivo.

10  
15 *Cultivo primario:* el propósito del cultivo primario es establecer células a partir de tejido placentario digerido. El tejido digerido se suspende en medio de cultivo y se coloca en matraces T de Corning, que se incuban en una cámara humidificada mantenida a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%. La mitad del medio se repone después de 5 días de cultivo. Colonias de alta densidad de células se forman a las 2 semanas de cultivo. Las colonias se recogen con Tripsina-EDTA, que a continuación se inactiva con FBS al 2% en PBS. Las células se centrifugan y se resuspenden en medio de cultivo para sembrar cultivos de expansión. Estas células se definen como células de pase 0 que se han duplicado 0 veces.

20 *Cultivo de expansión:* las células recogidas del cultivo primario, recogidas de cultivo de expansión, o descongeladas a partir del banco de células se usan para sembrar cultivos de expansión. Factorías celulares (NUNC™) son tratadas con CO<sub>2</sub> 5% en aire a 50 ml/min/bandeja durante 10 minutos a través de un filtro estéril y se calientan en una incubadora humidificada mantenida a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%. Las semillas de células se cuentan en un hemacitómetro con azul de tripano, y el número, la viabilidad y el número de pase de las células, y el número acumulativo de duplicaciones se registran. Las células se suspenden en medio de cultivo a aproximadamente 2,3 X 10<sup>4</sup> células/ml y 110 ml/bandeja se siembran en las factorías celulares. Después de 3-4 días y de nuevo a los 5-6 días de cultivo, medio de cultivo se retira y se sustituye por medio fresco, seguido por otro tratamiento con CO<sub>2</sub> 5% en aire. Cuando las células alcanzan aproximadamente 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>, las células se recogen con Tripsina-EDTA, seguida por inactivación con FBS 2% en PBS. Las células se centrifugan a continuación y se resuspenden en medio de cultivo.

25  
30 *Crioconservación:* las células a congelar se recogen del cultivo con Tripsina-EDTA, se inactivan con FBS 2% en PBS, y se cuentan en un hemacitómetro. Después del centrifugado, las células se resuspenden con DMSO 10% en FBS a una concentración de aproximadamente 1 millón de células/ml para células que se usarán para ensamblaje de un banco de células, y 10 millones de células/ml para dosis de células congeladas individuales. La solución de células se transfiere a un recipiente de congelación, que se coloca en un baño con alcohol isopropílico en un congelador a -80°C. Al día siguiente, las células se transfieren a nitrógeno líquido.

**6.9.2** Diseño de un banco de células madre

35 Un "lote" se define como todas las dosis de células obtenidas a partir de la placenta de una única donante. Las células mantenían un crecimiento, cariotipo y fenotipo de marcadores de la superficie celular normales durante más de 8 pases y 30 duplicaciones durante cultivo de expansión. Dada esta limitación, las dosis comprenden células de 5 pases y aproximadamente 20 duplicaciones. Para generar un suministro de células equivalentes, un único lote se expande en cultivo y se almacena en un banco de células de dos niveles y las dosis se congelan. En particular, células recogidas del cultivo primario, que se definen como células de pase 0 que han experimentado 0 duplicaciones, se usan para iniciar un cultivo de expansión. Después del primer pase, se producen aproximadamente 4 duplicaciones, y las células se congelan en un banco de células patrón (MCB). Se usan viales procedentes del MCB para sembrar cultivos de expansión adicionales. Después de dos pases adicionales de células descongeladas procedentes del MCB, las células se congelan en un banco de células de trabajo (WCB), aproximadamente 12 duplicaciones acumulativas. Viales del WCB se usan para sembrar un cultivo de expansión durante otros 2 pases, dando como resultado células de pase 5 a aproximadamente 20 duplicaciones que se congelan en dosis individuales.

**6.9.3** Descongelación de células para cultivo

50 Recipientes congelados de células se colocan en una bolsa de plástico sellada y se sumergen en un baño con agua a 37°C. Los recipientes se agitan suavemente hasta que todo el contenido se funde excepto un pequeño trozo de hielo. Los recipientes se retiran de la bolsa de plástico sellada y un volumen 10X de medio de cultivo se añade lentamente a las células con mezclado suave. Una muestra se cuenta en el hemacitómetro y se siembra en cultivos de expansión.

**6.9.4** Descongelación de células para inyección

55 Recipientes congelados de células se transfieren al punto de administración en un transportador con nitrógeno seco. Antes de la administración, los recipientes se colocan en una bolsa de plástico sellada y se sumergen en un baño con agua a 37°C. Los recipientes se agitan suavemente hasta que todo el contenido se funde excepto un pequeño

trozo de hielo. Los recipientes se retiran de la bolsa de plástico sellada y se añade un volumen igual de HSA 2,5%/Dextrano 5%. Las células se inyectan sin lavado adicional alguno.

**6.9.5 Pruebas y especificaciones**

5 Una muestra de sangre materna acompaña a la placenta de todas las donantes. La muestra es cribada para anticuerpo del núcleo de Hepatitis B y antígeno de superficie, anticuerpo del virus de Hepatitis C y ácido nucleico y anticuerpo de VIH I y II y ácido nucleico. El procesamiento placentario y de cultivo primario comienza antes de la recepción de los resultados de las pruebas, pero continúa sólo para placentas asociadas con muestras de sangre materna que resultan negativas para todos los virus. Un lote se rechaza si la donante da positivo para cualquier patógeno. Además, las pruebas descritas en la tabla 3 se realizan en el MCB, el WCB y una muestra del material de  
10 dosis celular procedente de un vial del WCB. Un lote se libera sólo cuando se cumplen todas las especificaciones.

Tabla 3: Pruebas y especificaciones celulares

| Prueba            | Métodos  | Resultado requerido   |
|-------------------|--|---|
| Esterilidad       | BD BACTEC PEDS PLUS/F y BACTEC Myco/F Lytic              | Negativo  |
| Endotoxina        | Coágulo de gel LAL                                       | ≤ 5 EU/ml*  |
| Viabilidad        | Azul de Tripano  | >70% viable   |
| Micoplasma        | Cultivo directo, ADN-fluoróculo (FDA PTC 1993)           | Negativo  |
| Identidad         | Citometría de flujo (véase a continuación)               | CD105 <sup>+</sup> , CD200 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+</sup> , CD34 <sup>-</sup> |
| Pureza de células | Microsatélite  | No se detectó ninguna célula contaminante                                       |
| Cariotipo         | Bandeo G y recuento de cromosomas en células en metafase | Normal  |

\* Para el producto diseñado que es 40 ml de células congeladas/dosis y un máximo de 5 EU/ml, el producto celular está por debajo del límite superior de 5 EU/kg/dosis para receptores de peso corporal superior a 40 kg.

**6.9.6 Análisis del fenotipo de marcadores celulares**

15 Las células se colocan en paraformaldehído 1% (PFA) en PBS durante 20 minutos y se almacenan en un frigorífico hasta que se tiñen (hasta una semana). Las células se lavan con FBS 2%, azida sódica 0,05% en PBS (tampón de tinción) y a continuación se resuspenden en tampón de tinción. Las células se tiñen con los siguientes conjugados de anticuerpo: CD105-FITC, CD200-PE, CD34-PECy7, CD10-APC. Las células también se tiñen con controles de isotipo. Después de 30 minutos de incubación, las células se lavan y se resuspenden con tampón de tinción, seguido  
20 por análisis en un citómetro de flujo. Las células que tienen una fluorescencia incrementada en comparación con controles de isotipo se cuentan como positivas para un marcador.

**6.10 EJEMPLO 10: IDENTIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS**

Los patrones de expresión génica de células madre placentarias de amnios-corion (AC) y cordón umbilical (UC) se compararon con patrones de expresión génica de células madre mesenquimatosas multipotentes obtenidas a partir  
25 de médula ósea (BM) y fibroblastos dérmicos (DF), de las cuales se considera que las últimas están diferenciadas de forma terminal. Las células se cultivaron para un único pase, un número intermedio de pases, y gran número de pases (incluyendo hasta la senescencia). Los resultados indican que el número de duplicaciones de la población tiene un impacto fundamental sobre la expresión génica. Se identificó un conjunto de genes que están regulados positivamente en AC y UC, y regulados negativamente o ausentes en BM y DF, y que se expresan independientes  
30 del número de pases. Este conjunto de genes específicos de células madre placentarias o células madre del cordón umbilical codifica una serie de proteínas del citoesqueleto y de adhesión célula a célula con células epiteliales y una proteína de la superficie similar a inmunoglobulina, CD200, implicada en la tolerancia inmunitaria materno-fetal. Células madre placentarias y células madre de cordón umbilical se denominarán colectivamente en lo sucesivo en este ejemplo como células madre AC/UC.

**6.10.1 Métodos y materiales**

**6.10.1.1 Células y cultivo celular**

BM (Nº de Cat PT-2501) y DF (Nº de Cat CC-2511) se adquirieron de Cambrex. AC y UC se originaban de matraces para cultivo tisular de pase 0. AC y UC en los matraces se obtuvieron mediante digestión a partir de la placenta de  
40 un donante designada 2063919. Matraces de cultivo T-75 se sembraron a 6000 células/cm<sup>2</sup> y las células se sometieron a un pase cuando se volvieron confluentes. Las duplicaciones de la población se estimaron a partir de recuentos de células con azul de tripano. Los cultivos se ensayaron para expresión génica después de 3, 11-14, y 24-38 duplicaciones de la población.

### 6.10.1.2 ARN, micromatrices multigénicas, y análisis

Las células se lisaron directamente en sus matraces de cultivo tisular, con la excepción de un cultivo que se tripsinizó antes de la lisis. El ARN total se aisló con el kit RNeasy de QIAGEN. La integridad y las concentraciones del ARN se determinaron con un bioanalizador Agilent 2100. Diez microgramos de ARN total de cada cultivo se hibridaron en una plataforma GENECHIP® de Affymetrix. El ARN total se convirtió en ARNc marcados y se hibridó con matrices multigénicas (“arrays”) Human Genome U133A 2.0 de oligonucleóticos de acuerdo con los métodos del fabricante. Archivos de imágenes se procesaron con el software MAS 5.0 de Affymetrix, y se normalizaron y se analizaron con el software GeneSpring 7.3 de Agilent.

### 6.10.2 Resultados

#### 10 6.10.2.1 Selección de puntos de temporales de cultivo de BM MSC, células madre AC/UC, y DF para análisis de micromatrices multigénicas

Para establecer un patrón de expresión génica único para células madre AC/UC, dos líneas de células madre, AC(6) y UC(6), se cultivaron en paralelo con BM-MSD y DF. Para maximizar la identificación de un perfil de expresión génica atribuible al origen celular y minimizar las influencias exógenas, todas las células se cultivaron en el mismo medio, se sembraron y se sub-cultivaron usando los mismos criterios. Las células se recogieron después de 3 duplicaciones de la población, 11-14 duplicaciones, o 35 duplicaciones o senescencia, lo que ocurra en primer lugar. Los genes cuya expresión en células madre AC/UC permanece sin cambios por el tiempo en cultivo y están regulados positivamente con respecto a BM y DF son candidatos a genes específicos de células madre AC/UC.

La figura 10 muestra perfiles de crecimiento para las cuatro líneas celulares en el estudio; los círculos indican qué cultivos fueron recogidos para aislamiento de ARN. En total se recogieron doce muestras. BM, AC(6), y UC(6) se recogieron después de tres duplicaciones de la población; se consideró que estas muestras estaban en cultivo durante un “corto” periodo de tiempo. Una muestra de DF a corto plazo no se recogió. Cultivos de duración intermedia, 11 a 14 duplicaciones, se recogieron para todos los tipos de células. Los cultivos a largo plazo se recogieron de todas las líneas celulares a aproximadamente 35 duplicaciones de la población o justo antes de la senescencia, lo que ocurra antes. La senescencia se producía antes de 15 duplicaciones para BM y a 25 duplicaciones para DF. Las células BM y DF adquiridas se expandieron muchas veces antes del análisis de genes, y no pueden considerarse de fase temprana. Sin embargo, de forma operativa, BM cultivadas durante tres duplicaciones (BM-03) se consideran un cultivo a corto plazo. Del mismo modo, BM-11 se denomina de forma operativa como un cultivo de duración intermedia, pero dado que la senescencia se producía a 14 duplicaciones, BM-11 es de la forma más probable un cultivo biológicamente a largo plazo.

#### 30 6.10.2.2 El agrupamiento jerárquico muestra relación entre BM, células madre AC/UC y DF

El análisis de micromatrices multigénicas identifica patrones de expresión génica, y el agrupamiento jerárquico (HC) intenta descubrir similitudes en el contexto de dos dimensiones - genes en la primera dimensión y diferentes condiciones (diferentes muestras de ARN) en la segunda. Los chips génicos “GeneChips” usados en este experimento contenían más de 22.000 conjuntos de sonda (denominado como la “lista de todos los genes”), pero muchos de estos conjuntos interrogan a genes que no son expresados en ninguna condición. Para reducir la lista de todos los genes, los genes que no se expresaban o se expresaban a niveles bajos (valores no procesados por debajo de 250) en todas las muestras se eliminaron para producir una lista de 8.215 genes.

#### 40 6.10.2.3 Análisis de la expresión génica usando la vista gráfica lineal

Patrones de expresión génica de los 8215 genes se visualizaron usando la vista gráfica lineal en GeneSpring (figura 11). El eje x muestra las doce condiciones experimentales y el eje y muestra los valores de expresión del conjunto de sondas normalizadas en una escala logarítmica. El eje y cubre un intervalo de 10.000 veces, y genes que no se expresan o se expresan a niveles muy bajos son ajustados a un valor de 0,01. Por defecto el valor normalizado se ajusta a 1. Cada línea representa un único gen (en realidad un conjunto de sondas, algunos genes tienen múltiples conjuntos de sondas) y discurre a través de las doce condiciones como un único color. Los colores representan niveles de expresión relativa, según lo descrito para los mapas térmicos, pero el patrón de coloración se determina seleccionando una condición. AC-03 es la condición seleccionada en la figura 11. Los genes regulados positivamente con respecto al valor normalizado se visualizan mediante el software como rojos, y los que están regulados negativamente, se visualizan como azules. Los picos que apuntan hacia arriba y hacia abajo obvios en AC-03 a UC-11 indican que muchos genes se expresan de forma diferente a través de estas condiciones. La impactante similitud en los patrones de color entre AC-03 y UC-03 muestra que muchos de los mismos genes están regulados positiva o negativamente en estas dos muestras. Los segmentos de línea horizontal indican que el nivel de expresión de un gen permanece sin cambios a través de una serie de condiciones. Esto es lo más notable comparando UC-36, UC-38, y UC-38-T. No existen picos obvios, pero existe una tendencia sutil en que una serie de líneas rojas entre UC-36 y UC-38-T están por debajo del valor normalizado de 1. Esto indica que estos genes, que están regulados positivamente en AC-03 y UC-03, están regulados negativamente en los cultivos tardíos. El hecho de que los patrones de expresión entre UC-38 y UC-38-T sean tan similares indica que tripsinizar células justo antes del aislamiento del ARN tiene poco efecto sobre la expresión génica.

Además del método HC computacionalmente intensivo, mediante inspección visual las dos muestras de BM son más similares entre sí que a las otras condiciones. Lo mismo es cierto para los dos cultivos de DF. Y a pesar del gran número de genes expresados de forma diferencial presentes en las muestras de BM y DF, el aspecto general sugiere que dos BM y los dos DF son más similares entre sí que a células madre AC/UC. Esto se confirma mediante los resultados de HC descritos anteriormente.

Cuando el proceso anterior se aplica usando AC-11 como condición seleccionada, está claro que AC-11 y UC-11 comparten muchos de los mismos genes expresados de forma diferencial, pero el número total de genes en común entre estas dos condiciones parece menor que el número de genes expresados de forma diferencial compartidos por AC-03 y UC-03. La figura 12 muestra: genes sobreexpresados de forma diferencial, pero seis o más veces con respecto al valor inicial, en AC-03. La mayoría de los genes regulados positivamente en AC-03 están también regulados positivamente en UC-03, y son más divergentes en BM y DF.

**6.10.2.4 Métodos de filtración usados para identificar genes específicos de células madre AC/UC**

Los genes que permanecen constantes a través de todas las muestras de AC/UC, y están regulados negativamente en BM and DF, se consideran específicos de células madre de AC/UC. Se combinaron dos métodos de filtración para crear una lista de 58 genes específicos de células madre AC/UC (Tabla 4).

Tabla 4: 58 genes específicos de células madre placentarias o células madre del cordón umbilical

| Símbolo | Gen   | Proceso biológico, descripción, y comentario adicional  |
|---------|---|---|
| ACTG2   | actina, gamma 2, músculo liso, entérico   | desarrollo muscular, citoesqueleto, expresado en arteria del cordón umbilical y epitelios de próstata               |
| ADARB1  | adenosina desaminasa, específico de ARN, B1 (RED 1 de rata homólogo)                            | procesamiento de ARN, desarrollo del sistema nervioso central   |
| AMIGO2  | gen 2 inducido por anfoterina   | adhesión de células homófilas y heterófilas, molécula de adhesión con dominio 2 similar a 1g                        |
| ARTS-1  | regulador de aminopeptidasa de liberación del receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 1 | proteólisis, procesamiento de antígenos, angiogénesis, expresado en placenta  |
| B4GALT6 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosiltransferasa, polipéptido 6                                | metabolismo de carbohidratos, integrado en la membrana, puede funcionar en reconocimiento y/o adhesión intercelular |
| BCHE    | butirilcolinesterasa  | actividad colinesterasa, actividad serina esterasa, actividad hidrolasa   |
| C11orf9 | Marco abierto de lectura 9 del cromosoma 11   | proteína hipotética, factor de transcripción similar a p53, expresado en epitelio pigmentario retiniano             |
| CD200   | Antígeno CD200  | similar a inmunoglobulina, proteína superficial, inhibe macrófagos  |
| COL4A1  | colágeno, tipo IV, alfa I   | ECM, membrana basal, colágeno afibrilar, contiene dominio arresten  |
| COL4A2  | colágeno, tipo IV, alfa 2   | ECM, biogénesis, membrana basal, coexpresado con COL 4A1, reg. neg. en epitelios displásicos                        |
| CPA4    | carboxipeptidasa A4   | proteolítico, acetilación de histona, huella materna, alta expresión en líneas celulares de cáncer de próstata      |
| DMD     | distrofina (distrofia muscular, tipos Duchenne y Becker)  | contracción muscular, control de la forma de células y el tamaño de células, desarrollo muscular                    |
| DSC3    | desmocolina 3   | adhesión célula-célula homófila, localizado en desmosomas   |
| DSG2    | desmogleína 2   | adhesión célula-célula homófila, localizado en desmosomas   |

| Símbolo  | Gen  | Proceso biológico, descripción, y comentario adicional  |
|----------|--|---|
| ELOVL2   | similar a elongación de ácidos grasos de cadena muy larga (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, levadura) 2 | biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de lípidos  |
| F2RL1    | similar al receptor del factor de coagulación II (trombina) 1                                | Ruta de señalización de proteínas del receptor acoplado a proteína G, altamente expresado en epitelios de colon y elementos neuronales    |
| FLJ10781 | proteína hipotética FLJ10781   | ---   |
| GATA6    | proteína 6 de unión a GATA 6   | factor de transcripción, desarrollo muscular  |
| GPR126   | receptor 126 acoplado a proteína G   | transducción de señales, ruta de señalización de neuropéptidos  |
| GPRC5B   | receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro B                                | Ruta de señalización de proteínas del receptor acoplado a proteína G,   |
| ICAM1    | molécula 1 de adhesión intercelular (CD54), receptor de rinovirus humano                     | adhesión célula-célula, adhesión de células, actividad de receptor transmembrana, expresado en epitelio de la conjuntiva                  |
| IER3     | respuesta temprana inmediata 3   | anti-apoptosis, embriogénesis y morfogénesis, crecimiento y/o mantenimiento celular   |
| IGFBP7   | proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a insulina                              | regulación negativa de la proliferación celular, sobreexpresado en células epiteliales senescentes  |
| IL1A     | Interleuquina 1, alfa  | respuesta inmunitaria, transducción de señales, actividad de citoquinas, proliferación celular, diferenciación, apoptosis                 |
| IL1B     | interleuquina 1, beta  | respuesta inmunitaria, transducción de señales, actividad de citoquinas, proliferación celular, diferenciación, apoptosis                 |
| 1L6      | interleuquina 6 (interferón, beta 2)   | transducción de señales vinculada a receptor de la superficie celular, respuesta inmunitaria  |
| KRT18    | queratina 18   | morfogénesis, filamento intermedio, expresado en tejidos de placenta, fetal y epitelial   |
| KRT8     | queratina 8  | organización y biogénesis del citoesqueleto, fosforilación, filamento intermedio, coexpresado con KRT18                                   |
| LIPG     | lipasa, endotelial   | Metabolismo de lípidos, actividad lipoproteína lipasa, transportador de lípidos, actividad fosfolipasa, implicado en la biología vascular |
| LRAP     | arginina aminopeptidasa obtenida de leucocitos   | procesamiento de antígenos, antígeno endógeno mediante MHC clase I; actividad aminopeptidasa N-terminal                                   |
| MATN2    | matrilina 2  | ampliamente expresado en líneas celulares de origen fibroblástico o epitelial, ECM de cartílago no articular                              |
| MEST     | homólogo transcrito específico de mesodermo (ratón)  | Gen con huella paternal, desarrollo de tejidos mesodérmicos, expresado en tejidos fetales y fibroblastos                                  |
| NFE2L3   | similar al factor nuclear (obtenido de eritroides 2) 3                                       | co-factor de transcripción, altamente expresados en citoblastos placentarios primarios pero no en fibroblastos placentarios               |

| Símbolo    | Gen  | Proceso biológico, descripción, y comentario adicional  |
|------------|--|---|
| NUAK1      | quinasa similar a SNF1, I, familia NUAKE   | fosforilación de aminoácidos proteicos, actividad proteína serina-treonina quinasa  |
| PCDH7      | BH-protocadherina (cerebrocardiaca)  | adhesión y reconocimiento célula-célula, que contiene 7 repeticiones de cadherina   |
| PDLIM3     | Dominio 3 de PDZ y LIM   | proteína LIM asociada a alpha-actinina-2, unión a proteínas del citoesqueleto, expresado en músculo esquelético                         |
| PKP2       | placofilina 2  | adhesión célula-célula, localizada en desmosomas, descubierta en epitelios, se une a cadherinas y filamento intermedio                  |
| RTN1       | reticulón 1  | transducción de señales; diferenciación de neuronas, secreción neuroendocrina, tráfico en la membrana en células neuroendocrinas        |
| SERPINB9   | Inhibidor de serpina peptidasa, ciade B (ovoalbúmina), miembro 9                         | inhibidor de serina proteasa, coagulación, fibrinólisis, fijación del complemento, remodelación de la matriz, expresado en la placenta  |
| ST3GAL6    | sialiltransferasa 10   | metabolismo de aminoazúcares, glucosilación de aminoácidos de proteínas, metabolismo de glucolípidos, lipoilación de proteínas          |
| ST6GALNAC5 | sialiltransferasa 7E   | glucosilación de aminoácidos de proteínas, biosíntesis de gangliósido   |
| SLC12A8    | familia 12 de portadores de soluto (transportadores de sodio/potasio/cloruro), miembro 8 | actividad transportadora de aminoácido-poliamina, cotransportador 9 de catión-cloruro, posible papel en inmunidad epitelial (psoriasis) |
| TCF21      | factor de transcripción 21   | regulación de la transcripción, desarrollo del mesodermo, descubierto en células epiteliales del riñón                                  |
| TGFB2      | factor de crecimiento transformante, beta 2  | regulación del ciclo celular, transducción de señales, señalización célula-célula, proliferación celular, crecimiento celular           |
| VTN        | vitronectina (factor de propagación sérica, somatomedina B, proteína S del complemento)  | respuesta inmunitaria, adhesión de células, proteína secretada, se une a ECM  |
| ZC3H12A    | dedo de zinc de tipo CCCM que contiene 12A   | Proteína inducida por tratamiento con MCP-I, unión a ácidos nucleicos, proteína de dedo de zinc hipotética                              |

5 En primer lugar, se identificaron 58 genes seleccionando aquellos genes sobreexpresados  $\geq$  tres veces en al menos siete de ocho condiciones de células madre AC/UC con respecto a todas las muestras de BM y DF (figura 13). La filtración en ocho de las ocho condiciones de células madre AC/UC producía una lista similar. El segundo método de filtración usaba resultados "ausentes" y "presentes" proporcionadas por el software MAS 5.0 de Affymetrix. Se creó una lista identificando genes ausentes en todas las condiciones de BM y DF y presentes en AC-03, AC-11, UC-03, and UC-11. Los resultados génicos en las condiciones de células madre AC/UC tardías no se estipularon.

10 Las dos listas se solapaban significativamente y se combinaban. La lista combinada se recortó adicionalmente eliminando (1) varios genes expresados a niveles muy bajos en la mayoría o todas las condiciones de células madre AC/UC, y (2) genes portados en el cromosoma Y. se confirmó que las células AC y UC usadas en este estudio son masculinas mediante análisis FISH, y las BM y DF procedían de un donante femenino. La lista resultante de 46 genes específicos de células madre AC/UC se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Genes específicos de AC/UC enumerados por ontología

| Adhesión celular | Citoesquelética       | Desarrollo  | ECM          | Implicados en epitelios |
|------------------|-----------------------|-------------|--------------|-------------------------|
| AMIGO2           | ACTG2                 | ADARB1      | COL4A1       | ACTG2                   |
| B4GALT6          | DMD                   | IER3        | COL4A2       | C11orf9                 |
| DSC3             | KRT18                 | IGFBP7      | MATN2        | COL4A1                  |
| DSG2             | KRT8                  | IL1A        | VTN          | COL4A2                  |
| ICAM1            | PDLIM3                | IL1B        |              | DSC3                    |
| PCDH7            | PDLIM3                | MEST        |              | DSG2                    |
| PKP2             |                       | TGFB2       | F2RL1        | F2RL1                   |
| VTN              |                       |             |              | ICAM1                   |
| Glucosilación    | Respuesta inmunitaria | Proteólisis | Señalización | IGFBP7                  |
| B4GALT6          | ARTS-1                | ARTS-1      | F2RL1        | IL6                     |
| ST3GAL6          | CD200                 | CPA4        | GPR126       | KRT18                   |
| ST6GALNAC5       | IL1A                  | LRAP        | GPRC5B       | KRT8                    |
| Transcripción    | IL1B                  |             | ILIA         | MATN2                   |
| C11orf9?         | IL6                   |             | IL1B         | PKP2                    |
| GATA6            | LRAP                  |             | IL6          | SLC12A8                 |
| NFE2L3           | SLC12A8               |             | RTN1         | TCF21                   |
| TCF21            | VTN                   |             | TGFB2        |                         |

5 Esta lista de 46 genes codifica una colección de proteínas que presentan un número de grupos de ontología. El grupo con mayor representación, adhesión celular, contiene ocho genes. Ninguno de los genes codifica proteínas implicadas en la replicación del ADN o la división celular. Dieciséis genes con referencias específicas para epitelios también se enumeran.

**6.10.3** Discusión

10 Se identificó un patrón de expresión específico de células madre placentarias, y distinguible de células mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea. De forma operativa, este patrón incluye 46 genes que se sobreexpresan en todas las muestras de células madre placentarias con respecto a todas las muestras de BM y DF.

15 El diseño experimental comparaba células cultivadas durante periodos cortos, medios y largos de tiempo en cultivo. Para células AC y UC, cada periodo de cultivo tiene un conjunto característico de genes expresados de forma diferencial. Durante el corto plazo o fase temprana (AC-03 y UC-03) doscientos genes regulados positivamente volvían a la media después de ocho duplicaciones de la población. Sin quedar vinculados por la teoría, es probable que este patrón de expresión génica de fase temprana recuerde al perfil de expresión de AC y UC mientras que en el entorno placentario natural. En la placenta estas células no se están dividiendo activamente, son nutrientes metabolizantes, señalizantes entre ellos, y que fijan su ubicación remodelando los entornos extracelulares.

20 La expresión génica por los cultivos de duración intermedia se define mediante división celular rápida y genes expresados de forma diferencial en este momento son bastante diferentes de aquellos expresados de forma diferencial durante la fase temprana. Muchos de los genes regulados positivamente en AC-11 y UC-11, junto con BM-03 y DF-14, están implicados en la replicación cromosómica y la división celular. En base a la expresión génica, BM-03 parece biológicamente ser un cultivo a medio plazo. En esta fase media, la expresión génica específica del tipo celular está eclipsada por la proliferación celular. Además, casi todos los genes sobreexpresados en los cultivos de AC o UC a corto plazo están regulados negativamente en las condiciones de fase media y tardía. 143 genes estaban regulados positivamente  $\geq$  cinco veces durante esta fase altamente proliferativa, constituyendo aproximadamente 1,7% de los genes expresados.

30 Los cultivos a largo plazo representan la fase final o senescente. En esta fase, las células han agotado su capacidad de dividirse y, especialmente para AC y UC, el número absoluto de genes expresados de forma diferencial se reduce notoriamente. Esto puede ser el resultado de que las células están completamente adaptadas a su entorno de cultivo y un lastre reducido en consecuencia a biosintetizar. Sorprendentemente, cultivos BM y DF tardíos no presentan este mismo comportamiento; un gran número de genes se expresan de forma diferencial en BM-11 y DF-24 con respecto a AC y UC y el valor normalizado de 1. AC y UC son distinguibles de BM y DF de la forma más notable en los cultivos a largo plazo.

5 La lista de genes específicos de células madre placentarias descrita en esta memoria es diversa. COL4A1 y COL4A2 están regulados de forma coordinada, y KRT18 y KRT8 también parecen sobreexpresarse. Ocho de los genes codifican proteínas implicadas en contacto célula a célula, tres de los cuales (DSC3, DSG2, y PKP2) están localizadas en desmosomas, puntos de contacto intercelular anclados a proteínas citoesqueléticas de filamento intermedio tales como queratina 18 y queratina 8. El contacto estrecho célula a célula es característico de células epiteliales y endoteliales y no está típicamente asociado con fibroblastos. La tabla 3 enumera 16 genes, de los 46 en total, característicos de células epiteliales. Las células madre placentarias se describen generalmente como células pequeñas en forma de huso similares a fibroblastos. Esta morfología es típicamente distinta de BM y DF, especialmente a densidades celulares más bajas. Cabe mencionar además el patrón de expresión de CD200, que está presente en células madre AC/UC y ausente en todas las muestras de BM y DF. Además, CD200 ha demostrado estar asociado con tolerancia inmunitaria en la placenta durante el desarrollo fetal (véase, por ejemplo, Clark et al., *Am. J. Reprod Immunol.* 50(3): 187-195 (2003)).

10 Este subconjunto de genes de 46 genes constituye un conjunto de biomarcadores moleculares que distingue células madre AC/UC de células madre mesenquimatosas obtenidas a partir de médula ósea o fibroblastos.

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de producción de una población de células que comprende aislar células madre placentarias de otras células placentarias, en el que las células madre placentarias se adhieren a un sustrato, y determinar que dichas células madre placentarias expresan CD200; en el que dichas células madre placentarias aisladas constituyen dicha población de células.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente determinar que dichas células madre placentarias son CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>.
3. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente determinar que dichas células madre placentarias son CD90<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>.
- 10 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos 70%, al menos 90%, o al menos 99% de las células en dicha población de células son dichas células madre placentarias.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que al menos 90% de dichas células madre placentarias aisladas son de origen no materno.
- 15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha población de células se expande después de dicho aislamiento.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende adicionalmente transformar dichas células madre placentarias en dicha población de células con una secuencia de ADN que codifica una proteína promotora del crecimiento; y exponer a dichas células madre placentarias a condiciones que promueven la producción de dicha proteína promotora del crecimiento.
- 20 8. El método de la reivindicación 1, en el que se determina que dichas células madre placentarias expresan un gen para dicha CD200 a un nivel notoriamente más elevado que una célula madre mesenquimatosa obtenida a partir de médula ósea que se ha sometido al mismo número de pases en cultivo que dichas células madre placentarias.
9. Un método de preparación de un banco de células madre placentarias, que comprende:
  - 25 (a) expandir células madre placentarias de cultivo primario procedentes de una placenta postparto humana que se adhieren a un sustrato para una primera pluralidad de duplicaciones de la población y crioconservar dichas células madre placentarias expandidas para formar un banco de células patrón;
  - (b) expandir una pluralidad de células madre placentarias procedentes del banco de células patrón para una segunda pluralidad de duplicaciones de la población y crioconservar dichas células madre placentarias expandidas para formar un banco de células de trabajo;
  - 30 (c) expandir una pluralidad de células madre placentarias procedentes del banco de células de trabajo para una tercera pluralidad de duplicaciones de la población;
 determinar que dichas células madre placentarias procedentes de la etapa (a), (b) y/o (c) expresan CD200; y crioconservar dichas células madre placentarias expandidas en dosis individuales,
 

en el que dichas dosis individuales componen colectivamente un banco de células madre placentarias.
- 35 10. Una población de células madre placentarias adherentes aisladas, en la que dichas células madre placentarias son CD200<sup>+</sup>.
11. La población de células madre placentarias adherentes aisladas de la reivindicación 10, en la que dichas células madre placentarias son adicionalmente CD10<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> y CD105<sup>+</sup>.
- 40 12. La población de células madre placentarias adherentes aisladas de la reivindicación 11, en la que dichas células madre placentarias son adicionalmente CD90<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>.
13. La población de células madre placentarias adherentes aisladas de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que dichas células madre placentarias se han sometido a un pase al menos 6 veces, al menos de 5 a 10 veces, o no más de 5 a 10 veces.
- 45 14. La población de células madre placentarias adherentes aisladas de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que al menos 90% de las células en dicha población de células son dichas células madre placentarias.
15. La población de células madre placentarias adherentes aisladas de cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en la que al menos 90%; o al menos 99% de dichas células madre placentarias son de origen no materno.
- 50 16. Una composición que comprende la población de células madre placentarias adherentes aisladas de cualquiera de las reivindicaciones 10-15, y un medio condicionado por la población de células madre placentarias adherentes aisladas de cualquiera de las reivindicaciones 10-15 o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. La composición de la reivindicación 16, que está en una forma adecuada para administración intravenosa.

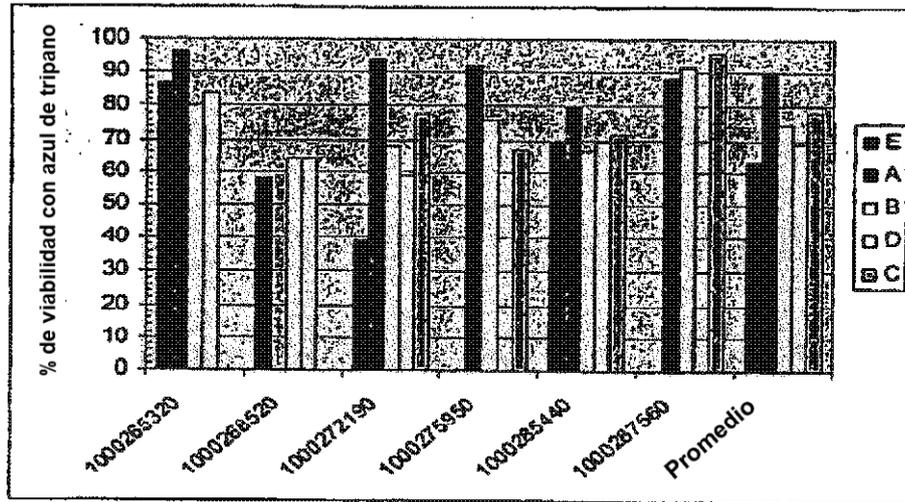


FIG. 1

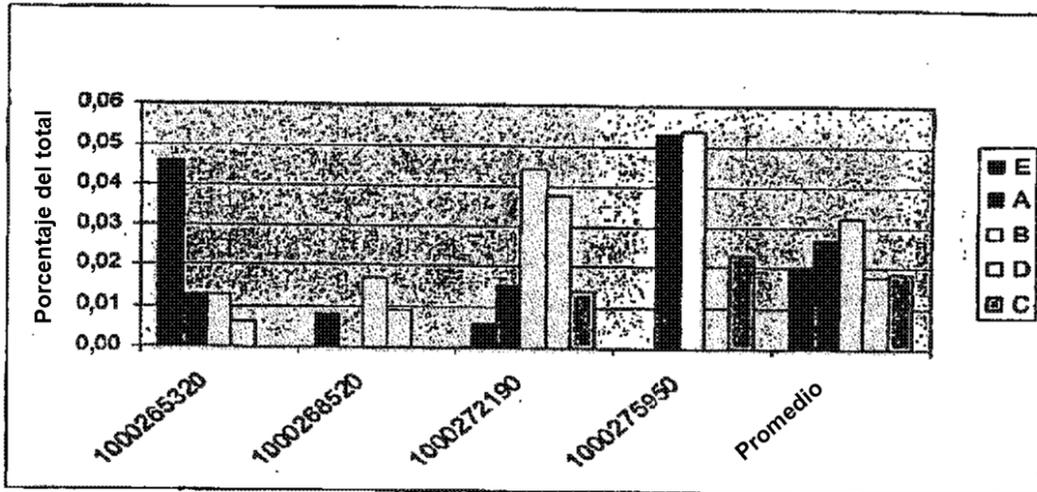


FIG. 2

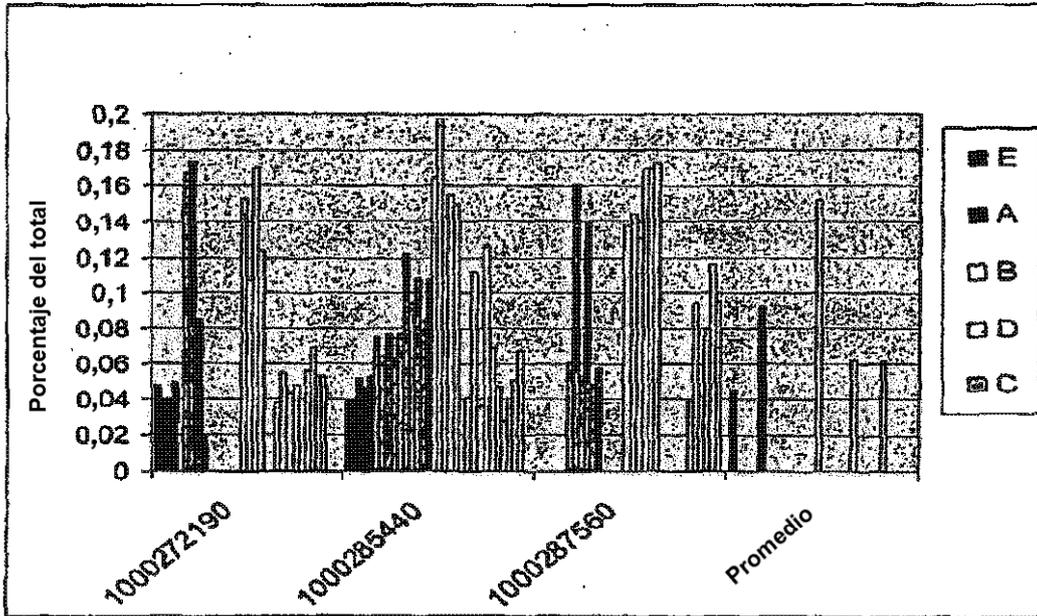


FIG. 3

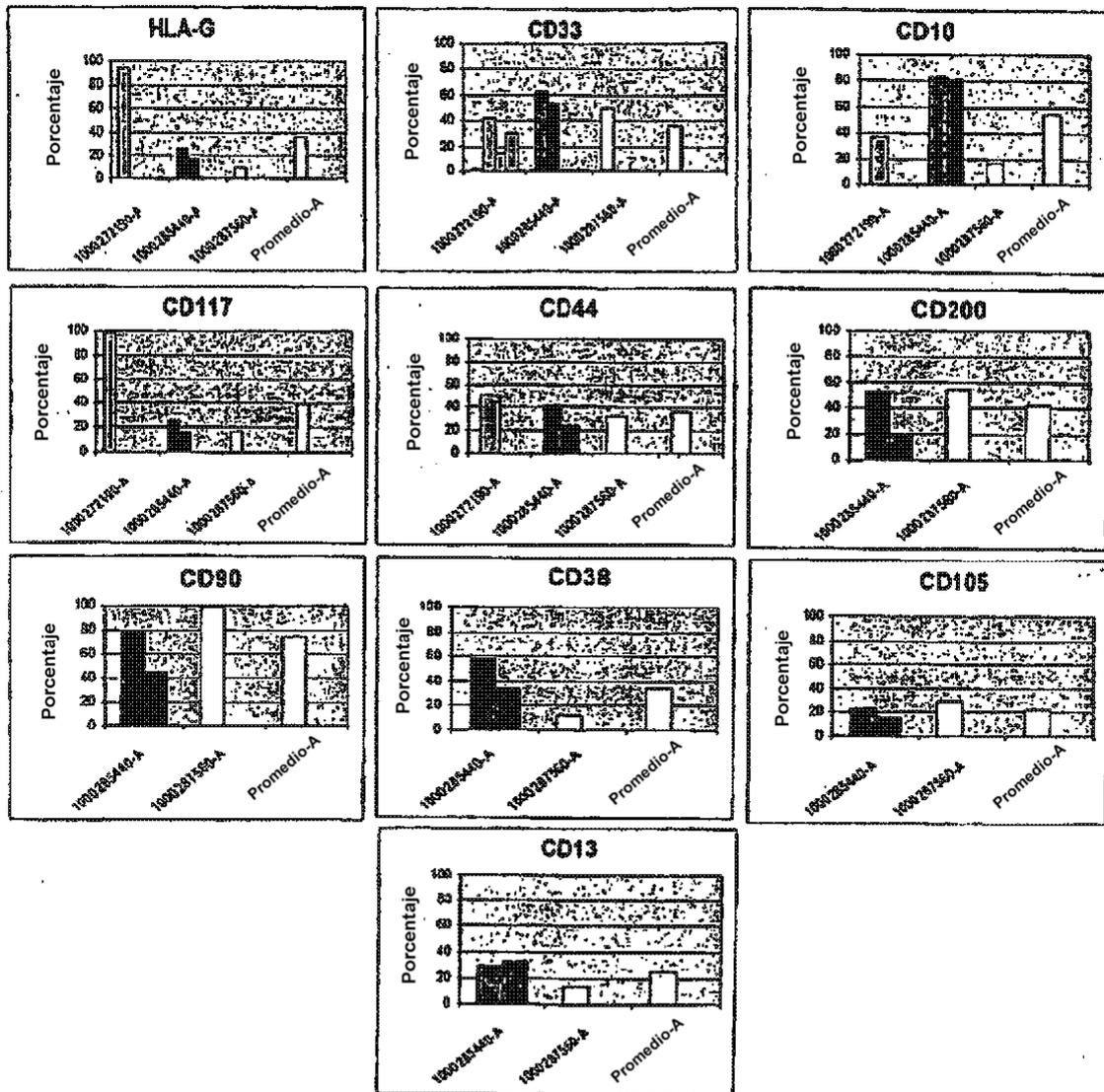


FIG. 4

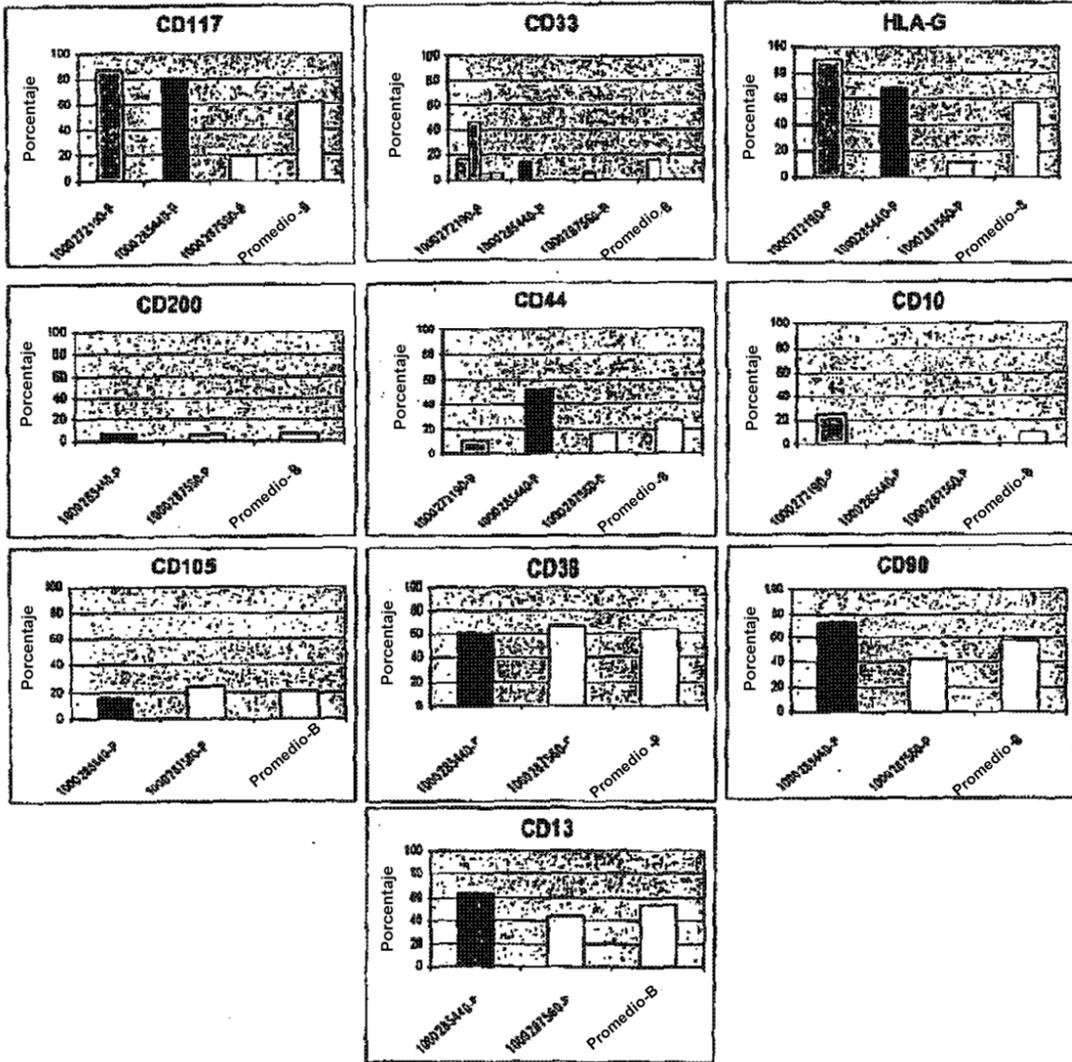


FIG. 5

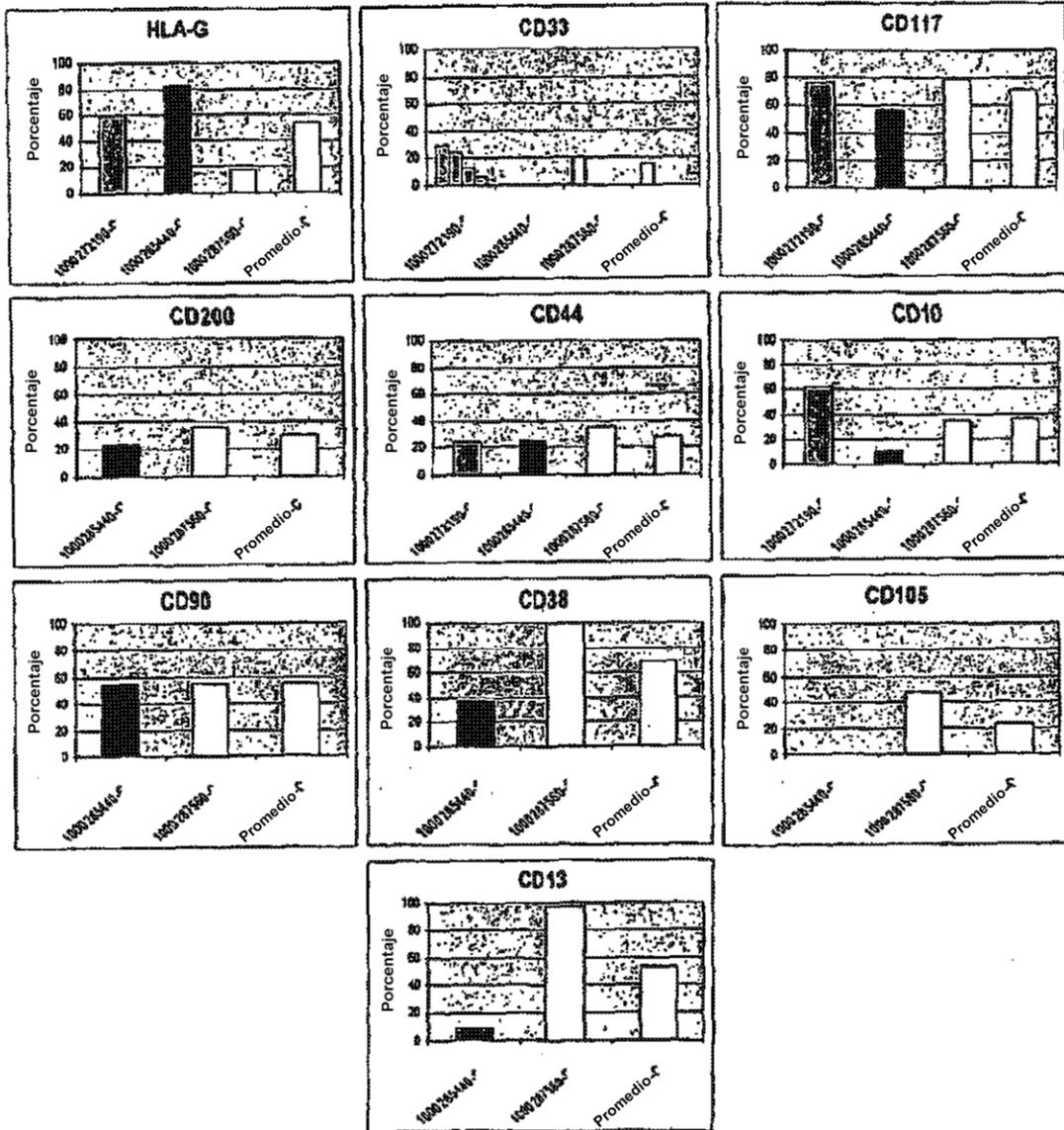


FIG. 6

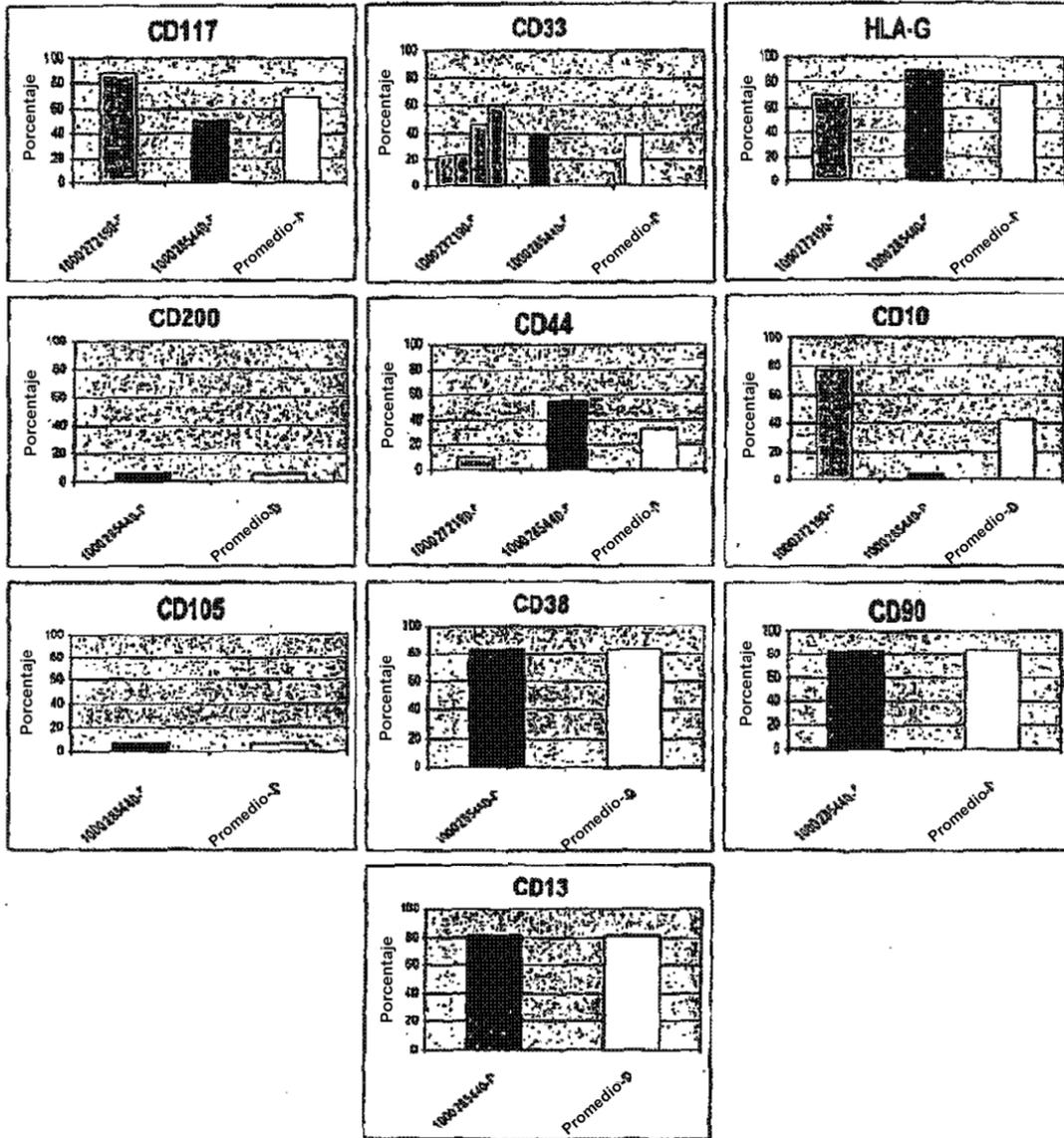


FIG. 7

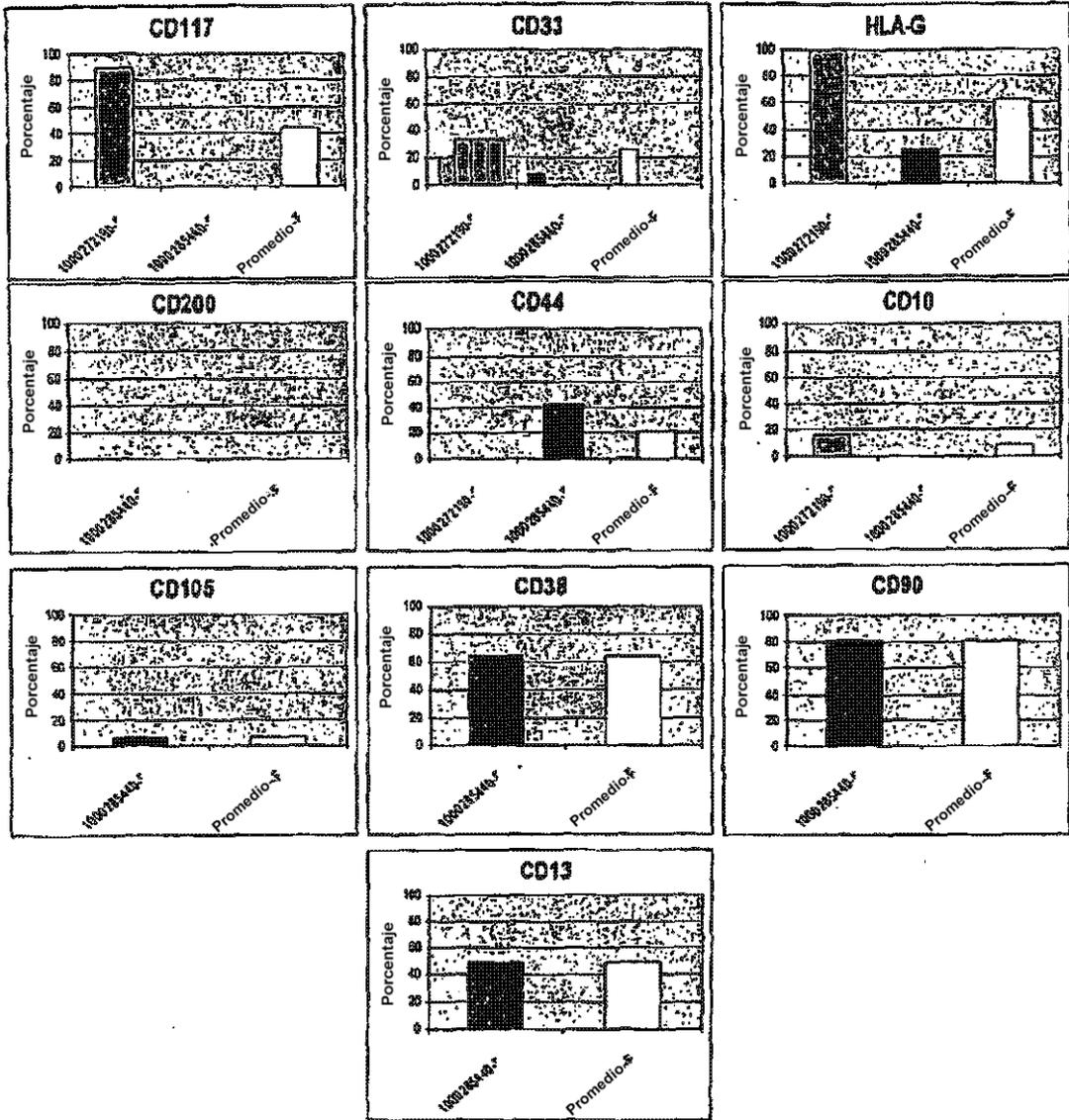
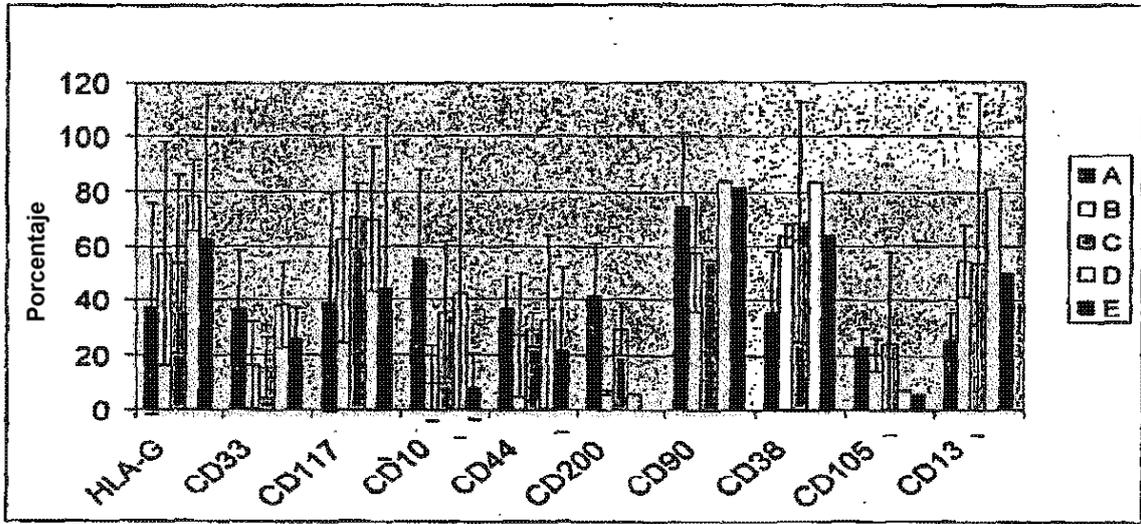
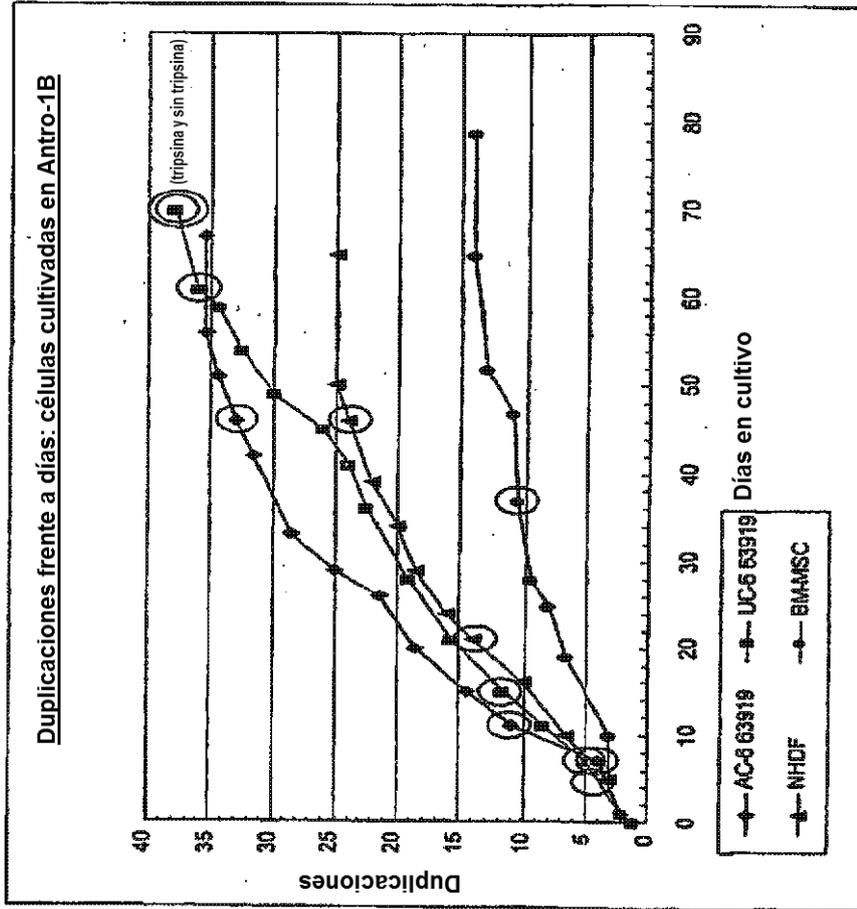


FIG. 8



**FIG. 9**



**FIG. 10**

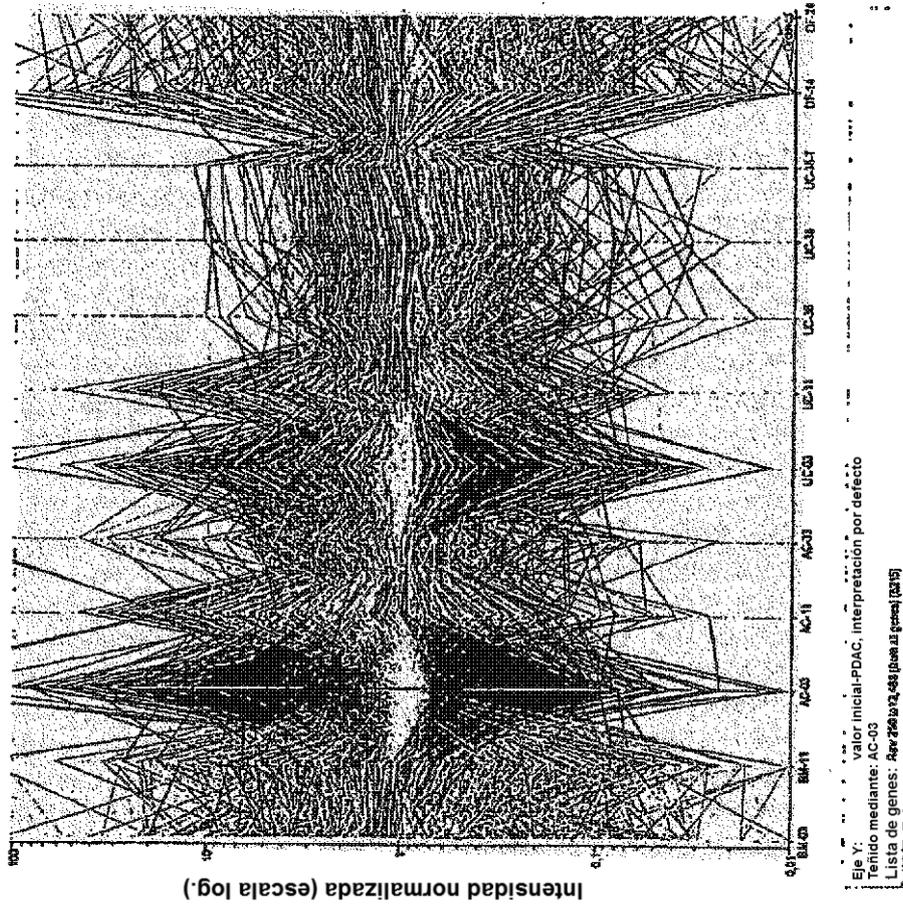
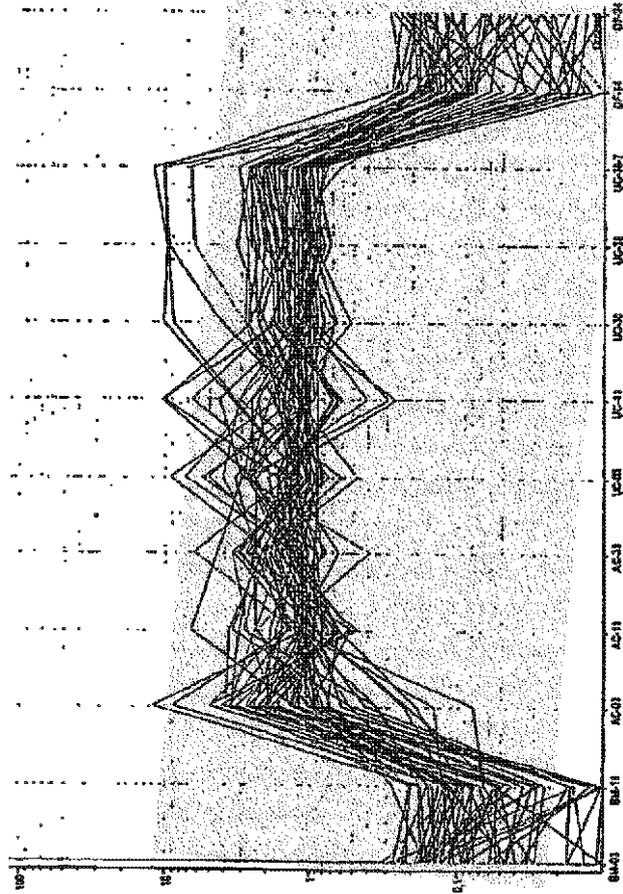


FIG. 11





Eje Y: valor inicial-PDAC, interpretación por defecto  
Teñido mediante: AC-03  
Lista de genes: :X (Bio and DP's top non-PDAC 100)

**FIG.13**